



NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - DOUTORADO
BIOTECNOLOGIA EM AGROPECUÁRIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ UECE
PONTO FOCAL - MARANHÃO

Sofia Sousa Sales

**Modulação da resposta imunológica de cães utilizando BCG em associação
com fração flagelar de *Leishmania amazonensis***

São Luis-MA
2012



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
BIOTECNOLOGIA EM AGROPECUÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - DOUTORADO

**Modulação da resposta imunológica de cães utilizando BCG em associação
com fração flagelar de *Leishmania amazonensis***

Sofia Sousa Sales

Orientadora: Dr^a Ana Lúcia Abreu Silva

Tese apresentada ao programa de pós-graduação
Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO,
ponto focal Maranhão, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

São Luis-MA
2012

SOFIA SOUSA SALLES

**Modulação da resposta imunológica de cães utilizando BCG em associação
com fração flagelar de *Leishmania amazonensis***

Aprovada em / /

Conceito _____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Lúcia Abreu-Silva/ UEMA
(Orientadora)

Dra. Alana Lislea de Sousa/ UEMA
(1° Examinador)

Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta/ UEMA
(2° Examinador)

Dra. Débora Martins Silva Santos/ UEMA
(3° Examinador)

Dra. Anali Linhares Lima/ Faculdade Pitágoras
(4° Examinador)

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre está comigo, guiando os meus passos, orientando-me em todos os instantes da minha vida, refúgio protetor, causa primeira sem a qual todas as outras não teriam razão de ser;

Ao meu amado filho Davi companhia mais recente e feliz que torna os meus dias os mais agradáveis que já vivi;

À minha família pelo apoio constante em todos os momentos de minha vida;

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia Abreu Silva por sua orientação e incentivo na realização deste trabalho;

Às professoras e amigas Lúcia Maria Coelho Alves e Francisca Neide Costa pelo apoio e amizade;

À Médica Veterinária e Amiga Nádia Selene G. Vendrúsculo pela inestimável e valorosa colaboração na execução dos trabalhos de campo;

Aos Médicos Veterinários Zulmira, Fernando, Daniele (Dani), Joyce, Solange, Andréa, Ana Patrícia, Auricélio, David, Daniel, Alessandra, Eduardo (Kadu), Érico e Nancy pelo apoio científico, colaboração técnica na execução dos trabalhos de bancada e coletas de campo;

Ao professor Daniel da UEMA pelo espaço cedido no laboratório CDV para a execução dos ensaios de ELISA;

Aos alunos dos períodos iniciais do curso de Medicina Veterinária e aos orientandos da professora Ana Lúcia pela colaboração nas coletas de campo;

Aos profissionais, alunos e técnicos do Laboratório de Protozoologia da FIOCRUZ/RJ pela colaboração e parceria;

Aos profissionais e alunos do LIF/UFMA pela colaboração e apoio técnico;

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Microbiologia de alimentos da UEMA pela colaboração durante o repique e o cultivo das *Leishmanias*;

Aos meus colegas renorbianos pelos vários momentos felizes que tivemos juntos;

Aos meus professores do RENORBIO que valorosamente contribuíram para a concretização de mais essa etapa acadêmica;

Às minhas amigas Perla Lopes, Waldelice Oliveira, Elizabeth Marinho, Naidles, Amorim e Hélida pela atuante presença amiga nos importantes momentos da minha vida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, FAPEMA, pela bolsa concedida;

A todos as pessoas que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

“Assim diz o Senhor: não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem o forte na sua força, nem o rico nas suas riquezas; mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em Me conhecer e saber que Eu sou o Senhor, e faço misericórdia, juízo e justiça na terra, porque destas coisas me agrado, diz o Senhor”.
(Jeremias 9: 23-24)

RESUMO

SALES, S.S. Rede Nordeste de Biotecnologia / Universidade Estadual do Maranhão, dezembro de 2012. **MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES UTILIZANDO BCG EM ASSOCIAÇÃO COM FRAÇÃO FLAGELAR DE *Leishmania amazonensis*.**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Lucia Abreu Silva.

O propósito do presente estudo foi avaliar a capacidade protetora da fração flagelar de *Leishmania (L) amazonensis* sob imunomodulação do BCG em cães provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) por meio da avaliação sorológica, histológica e imunohistoquímica. A priori foi realizado um estudo do tipo inquérito, sobre a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães macho e fêmea, com idade igual ou superior a seis meses e sua correlação com as variáveis clínicas: hipertrofia de linfonodos poplíteos, alterações cutâneas, onicogribose, caquexia e lesões oculares. Os cães foram analisados sorologicamente, através do teste de ELISA/S7®, utilizando-se amostras de sangue periférico num total de 341 amostras analisadas. Desse total, 173 (50,73%) foram soropositivos e 135 (39,59%) foram soronegativos para anticorpos anti-*Leishmania*. Dos animais com sorologia positiva observou-se 79 (45,66%) com hipertrofia de linfonodos, 25 (14,45%) com alterações cutâneas, 23 (13,29%) com onicogribose, 22 (12,72%) com caquexia e 11 (6,36%) com presença de lesões oculares. Para avaliar a capacidade protetora da fração flagelar imunomodulada pelo BCG, foram avaliados 90 animais com sorologia negativa para LVC, divididos em três grupos de 30 animais: Grupo I – animais imunizados com doses de fração flagelar e BCG; Grupo II – animais imunizados apenas com BCG e o Grupo III – animais controles inoculados com PBS. Após a imunização os animais foram deixados em área endêmica e acompanhados por 14 meses. Na etapa seguinte, 06 cães de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, tiveram sangue e fragmentos de pele da ponta da orelha coletados para posterior realização de sorologia anti-*Leishmania*, imunohistoquímica, *imprinting* e histologia. A avaliação dos resultados mostrou que todas as amostras coletadas foram negativas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Já a análise imunohistoquímica evidenciou formas amastigotas de *Leishmania* sp na pele de 2 animais, um pertencente ao Grupo II (5 parasitos/campo) e outro pertencente ao Grupo III (18 parasitos/campo). Os animais do grupo I (imunizados com fração flagelar e BCG) não apresentaram positividade em nenhuma das análises. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a imunização com fração flagelar de *L. amazonensis* em associação com BCG foi capaz de proteger os cães analisados e que a técnica de imunohistoquímica mostrou-se mais eficiente no diagnóstico da LVC no presente estudo.

Palavras-chave: Imunização. Leishmaniose visceral. Cães.

ABSTRACT

SALES, S.S. Rede Nordeste de Biotecnologia / Universidade Estadual do Maranhão, dezembro de 2012. **MODULATION OF IMMUNE RESPONSE IN DOGS USING BCG IN ASSOCIATION WITH THE FLAGELLAR FRACTION OF *Leishmania amazonensis*.**

Advisor: Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Abreu Silva.

The aim of this study was to evaluate the protective effect of the flagellar fraction of *Leishmania (L) amazonensis* and BCG in dogs from endemic area for canine visceral leishmaniasis (CVL). Initially a study was conducted on an epidemiological survey in order to determine the frequency of antibodies against *Leishmania* in dogs of both sexes, with aged above six months and their correlation with clinical variables such as : hypertrophy of popliteal lymph nodes, skin lesions , onychogryphosis, cachexia and ocular lesions. A total of 341 dogs were used in this study. The serum of these animals was submitted to ELISA/S7 ® test. The serological results showed that 173 (50.73%) were positive and 135 (39.59%) were negative for anti-*Leishmania* antibodies. Among Seropositive animals was observed that 79 (45.66%) presented lymph node hypertrophy, 25 (14.45%) skin lesions, 23 (13.29%) onychogryphosis, 22 (12.72%) cachexia and 11 (6.36%) with the presence of ocular lesions. To evaluate the protective effect of flagellar fraction and BCG were evaluated 90 seronegative animals divided in three groups of 30 animals: Group I - animals immunized with flagellar fraction doses of BCG and Group II - animals immunized with BCG and Group III - control animals inoculated with PBS. After immunization the animals remained in the endemic area and they were followed up during 14 months. For immunohistochemical analysis just 06 dogs of each group were selected randomly. However, all dogs were negative for the presence of anti-*Leishmania*, the immunohistochemical analysis showed amastigotes of *Leishmania* in the skin of 2 animals, one belonging to the Group II (5 parasites / field) and another belonging to the Group III (18 parasites / field). The animals of group I (immunized with BCG and flagellar fraction) did not present parasites in the skin. In conclusion this study reinforce the same results obtained in murine model that immunization with flagellar fraction of *L. amazonensis* in combination with BCG is able to protect dogs analyzed, and the immunohistochemistry was more efficient in the diagnosis of CVL in this study.

Key words: Immunization. Visceral leishmaniasis. Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p
FIGURA 1 – Imunomarcacão de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp na pele de cão assintomático pela técnica de estreptoavidina – peroxidase, 400X.	59
FIGURA 2 – Corte histológico da orelha de cães assintomáticos e soronegativos, não sendo observada presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp pelo teste de imunohistoquímica, 400X.	59
GRÁFICO 1 - Determinação do número de amastigotas de <i>Leishmania</i> sp em tecido auricular de cães pela técnica de imunohistoquímica.	58

LISTA DE TABELAS

	P
TABELA 1 – Resultados sorológicos de cães testados contra anticorpos anti <i>Leishmania chagasi</i> em área endêmica no município de São Luís-MA.	42
TABELA 2 – Variáveis associadas à soropositividade de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral em área endêmica no município de São Luís – MA.	43
TABELA 3 – Frequência de sinais clínicos apresentados por cães soropositivos para leishmaniose visceral em área endêmica no município de São Luís - MA.	44
TABELA 1 – Comparação da intensidade da inflamação (escore inflamatório) em pele de cães provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs – Células apresentadoras de antígenos
BCG – Bacilo Calmette-Guerin
CO₂ – Gás carbônico
DNA – Ácido desoxirribonucleico
D.O – Densidade óptica
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
ELISA – Ensaio Imunoenzimático “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
FML – Fucose manose ligante
HE – Hematoxilina & Eosina
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IgE – Imunoglobulina classe E
IgG – Imunoglobulina classe G
IHQ – Imunohistoquímica
IP – *Imprinting*
IL – Interleucina
INF γ - Interferon gama
iNOS – Oxido nítrico sintetase induzível
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina
LVH – Leishmaniose visceral humana
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS – Ministério da Saúde
NK – Células “*Natural killer*”
NO – Oxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBMC – Células mononucleares de sangue periférico
PBS – Salina tamponada com fosfato
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
ROIs – Intermediários reativos de oxigênio
SFM – Sistema fagocítico mononuclear
Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 2

TNF α – Fator de necrose tumoral

TGF β – Fator β de transformação do crescimento

SUMÁRIO

	P
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL	14
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Distribuição geográfica e epidemiologia.....	15
2.2 Agente etiológico.....	17
2.3 Vetor biológico.....	18
2.4 Hospedeiros	19
2.5 Ciclo biológico.....	20
2.6 Sinais clínicos	20
2.7 Diagnóstico	22
2.8 Resposta imunológica	22
2.9 Imunoprofilaxia	25
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 - FATORES CLÍNICOS E NÃO-CLÍNICOS RELACIONADOS COM A FREQUENCIA DE ANTICORPOS ANTI - <i>Leishmania chagasi</i> EM ÁREA ENDÊMICA NO MUNICÍPIO DE SÃO LUIS/MA/BRASIL.....	38
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Área de estudo	40
2.2 Desenho do estudo.....	40
2.3 Procedimentos	40
2.4 Diagnóstico pelo ELISA/S7®.....	41
2.5 Análise estatística.....	41

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3 – MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES DESAFIADOS COM FRAÇÃO FLAGELAR DE <i>Leishmania (L) Amazonensis</i> ASSOCIADO AO BCG E EXPOSTOS A UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO ATIVA DE <i>Leishmania chagasi/ infantum</i>.....	50
RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1 Área de estudo	52
2.2 Desenho do estudo.....	52
2.3 Análise sorológica.....	53
2.4 Coleta de biópsias de pele.....	53
2.5 Análise histológica.....	53
2.5.1 Hematoxilina-Eosina (HE)	53
2.5.2 <i>Imprinting</i>	54
2.6 Análise imunohistoquímica.....	54
2.7 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	54
2.8 Detecção de citocinas pelo método de ELISA.....	55
2.9 Análise estatística.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4. CONSIDERAÇÕES	60
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 4 – “USO E FORMULAÇÕES DO ANTÍGENO IMUNOPROFILÁTICO DA FRAÇÃO FLAGELAR DE PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania amazonensis</i> IMUNOMODULADA COM BACILO CALMETTE GUERIN (BCG) CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)” (Patente depositada)	63
1. CAMPO DA INVENÇÃO	63
2. REIVINDICAÇÕES	63
APÊNDICES	65
ANEXOS	68

APRESENTAÇÃO

Tendo em vista, a importância epidemiológica do cão como reservatório da leishmaniose visceral e da situação endêmica da doença no Estado do Maranhão, o presente trabalho buscou estudar alternativas concretas e viáveis no campo da imunoprofilaxia da leishmaniose visceral canina (LVC).

O município de São Luís está dividido em sete distritos sanitários, sendo estes: Itaqui-Bacanga, Centro, Tirirical, Vila Esperança, Cohab, Bequimão e Coroadinho. O distrito Tirirical, de acordo com o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), é o distrito que apresenta o maior número de casos de LVC. Deste modo, foi escolhido para a realização desse estudo imunoprolático, sendo necessário a priori um levantamento do perfil epidemiológico local para se proceder todas as etapas do estudo, visando o desenvolvimento de conhecimentos básicos para o controle dessa parasitose.

O estudo realizado resultou na elaboração de uma tese composta por dois artigos científicos e uma patente depositada:

1. “Fatores clínicos e não clínicos relacionados com a frequência de anticorpos anti - *Leishmania chagasi* em área endêmica no município de São Luis/MA/Brasil” (Artigo submetido).
2. “Modulação da resposta imunológica de cães desafiados com associação de fração flagelar de *Leishmania (L) amazonensis* e BCG expostos a uma área de transmissão ativa de *Leishmania chagasi/infantum*”
3. “Uso e formulações do antígeno imunoprolático da fração flagelar de promastigota de *Leishmania amazonensis* imunomodulada com Bacilo Calmette Guerin (BCG) contra leishmaniose visceral canina (LVC)” (patente depositada).

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LEISHMANIOSE VICERAL

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. A doença é endêmica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, sendo relatado também casos de LV canina na região Sul (KRAUSPENHAR et al., 2007; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009).

A LV tem como agente etiológico a espécie *Leishmania chagasi/infantum* que é transmitida ao hospedeiro vertebrado através da picada de um inseto flebotômico hematófago da espécie *Lutzomia longipalpis* (SLAPPENDEL et al., 1998).

O cão doméstico é considerado um reservatório importante do parasito e, aparentemente, é o responsável pela natureza endêmica ou epidêmica da doença (LAINSON & SHAW, 1987; ASHFORD et al., 1998; FUNASA, 2002), particularmente em áreas urbanas, onde há correlação entre a distribuição espacial de cães soropositivos e casos humanos de leishmaniose visceral (OLIVEIRA et al., 2001; CAMARGO-NEVES et al., 2001).

A espécie canina apresenta alta prevalência da infecção, por albergar o parasito na derme, reforçando a importância dessa espécie no ciclo biológico da doença, atuando como fonte de infecção para insetos flebotômicos durante o repasto sanguíneo (MATTOS et al., 2004; LUVIZOTTO et al., 2006).

Visando o controle da LV a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a eutanásia dos cães soropositivos, associada ao tratamento dos casos humanos e combate ao vetor; no entanto, reconhece as limitações do primeiro procedimento. Embora, a eliminação de cães soropositivos seja uma das medidas preconizadas pelos órgãos públicos competentes, tal medida não é suficiente para a erradicação da doença (DIETZE et al., 1997; ASHFORD et al., 1998).

Considerando que as medidas de controle centradas no cão têm se mostrado pouco eficiente, o desenvolvimento de vacinas contra a LV tem sido prioridade e considerada como urgente pela OMS (Da SILVA et al., 2001; BARBIERI, 2006). Esta necessidade fundamenta-se no aspecto de que não basta que a doença clínica seja prevenida, uma vez que, é sabido que animais assintomáticos podem atuar como reservatórios na transmissão do parasito, mas que os cães de modo geral possam apresentar uma reação imunoprotetora permanente que culmine com a quebra do processo infeccioso e o desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distribuição geográfica e epidemiologia

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. O gênero *Leishmania* compreende parasitos heteroxênicos de hospedeiros mamíferos. Os insetos vetores são flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (LAINSON & SHAW, 1987).

As leishmanioses atingem tanto humanos quanto animais, sendo doença de ampla abrangência geográfica, presente em todos os continentes, exceto Antártida e Oceania. Em uma revisão recente Alvar et al. (2012) descrevem ocorrência da doença em 98 países distribuídos nos cinco continentes .

Em todo o mundo, estima-se que a leishmaniose acometa cerca de 12 milhões de indivíduos. Aproximadamente dois milhões de novos indivíduos são infectados anualmente. Atualmente, a leishmaniose se constitui em um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil, onde é considerada uma das endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes Americano, Asiático, Europeu e Africano. Sua importância levou a OMS a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias no seu programa de controle (WHO, 2012).

A leishmaniose é endêmica em 88 países. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em 5 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. A doença atinge principalmente as populações pobres desses países; sendo que, na Índia o caráter é predominantemente urbano (GONTIJO & MELO, 2004; WHO, 2012).

Na América do Sul, principalmente em países como Brasil, Venezuela e Colômbia, o êxodo rural e a urbanização crescente tem grande contribuição para a expansão desta parasitose (PROFETA da LUZ et al., 2001; SILVA et al., 2001).

O Brasil é o principal responsável pela maioria dos casos registrados na América Latina e, segundo o Ministério da Saúde, a LV inicialmente tinha um caráter rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, (BRASIL, 2004a). A LV constitui, na atualidade, um importante problema de saúde pública, sendo observada, uma expansão da área de abrangência da infecção devido, sobretudo, a fatores demográficos e ecológicos (WHO, 2012).

Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o recente aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a reemergência em

várias cidades do mundo representa um problema de saúde pública emergente (ASHFORD, 2000).

A LV no Brasil encontra-se em franca expansão, e desde a década de 90 vem ocorrendo o aumento significativo do número de casos (GONTIJO & MELO, 2004). Com o processo de urbanização, o perfil epidemiológico das leishmanioses passou a ser variável e específico para cada área. A doença deixou de ser primariamente silvestre e passou a se estabelecer em áreas rurais e também em regiões urbanas, desde que haja condições propícias para a sobrevivência dos vetores e a permanência de animais vertebrados que funcionem como reservatórios mantendo o parasito nestes ambientes.

Nas últimas décadas ocorreram profundas mudanças na estrutura agrária do Brasil, que resultaram na migração de grande contingente populacional para centros urbanos, isso trouxe para a periferia das cidades, populações humana e canina de áreas rurais onde a doença era endêmica. Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas), 85% da população do país vive em áreas urbanas, criando condições favoráveis para a emergência e reemergência de doenças, sendo que, a maior incidência encontra-se na região Nordeste (ALEXANDRINO, 2001; BRASIL, 2002; GONTIJO & MELO, 2004).

Vários fatores são atribuídos à expansão da ocorrência da LV no Brasil, entre elas as mudanças ambientais como as alterações climáticas e os desmatamentos que reduziram a disponibilidade de alimento para o mosquito transmissor no ambiente rural, e que como alternativas mais acessíveis encontra o cão e o homem para realizarem o repasto sanguíneo (BRASIL, 2004b; MEDEIROS et al., 2005).

O papel do cão na LV é bem conhecido. Em todos os focos endêmicos da doença humana esses animais apresentam alta prevalência de infecção e riqueza de parasitismo cutâneo, sendo elevada a proporção de infecções inaparentes (FEITOSA et al., 2000).

No Estado do Maranhão a leishmaniose visceral canina (LVC) constitui um grave problema de Saúde Pública, sendo que no município de São Luís constata-se a dispersão da infecção devido à circulação indiscriminada de cães infectados e à manutenção de ambientes peridomiciliares em condições propícias à proliferação do vetor. Inquéritos epidemiológicos tem mostrado que na Ilha de São Luís a soroprevalência da LVC tem percentuais elevados variando entre 51,61% e 67% (GUIMARÃES et al., 2005; ABREU-SILVA et al., 2008; BARBOSA et al., 2010).

2.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* que acometem o homem e diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo. (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

O gênero *Leishmania* apresenta morfologia variável quanto ao hospedeiro em que infecta. Apresenta-se sob duas principais formas: promastigota – forma alongada do protozoário com cinetoplasto anterior ao núcleo, com flagelo livre a partir da porção anterior da célula, que é encontrada no tubo digestório do inseto vetor e a amastigota, a forma arredondada ou oval e com flagelo curto restrito a bolsa flagelar, encontrada principalmente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (LAINSON & SHAW, 1987).

O gênero *Leishmania* inclui aproximadamente 30 espécies diferentes que são classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, possuindo padrões epidemiológicos distintos e algumas espécies com acentuada preferência por reservatórios específicos (MOMEM & CUPOLILLO, 2000).

Os protozoários envolvidos na forma visceral da leishmaniose estão divididos em três espécies pertencentes ao complexo, *Leishmania (Leishmania) donovani*: O agente etiológico *L. donovani* é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia. Nestas regiões, o homem atua como reservatório do parasito e a doença apresenta um perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003). Já a espécie *L. infantum* é o agente etiológico da LV zoonótica presente na região sudoeste e central da Ásia, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea (NICOLLE, 1908). No Novo Mundo, a espécie *L. chagasi* é o agente da LV que também apresenta um caráter zoonótico (CUNHA et al., 1995; TESH, 1995; DESJEUX, 1996; BEVILACQUA et al., 2001).

Em relação à origem da LV no Novo Mundo, há pesquisadores que consideram a hipótese de o agente causador (*L. infantum*) da doença não ser originário das Américas sendo, portanto, introduzido pelos colonizadores europeus e/ou seus cães infectados. Contudo, no Brasil, a grande maioria dos pesquisadores defende que o parasito foi introduzido a milhares de anos juntamente com os primeiros canídeos silvestres que chegaram ao Novo Mundo, os quais consideram a doença como zoonose autóctone das

Américas onde raposas desempenham o papel de reservatórios naturais, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi*. No entanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e *L. infantum* como sendo uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURÍCIO et al., 2000; GONTIJO & MELO, 2004).

2.3 Vetor biológico

O principal vetor da LV no Brasil é *Lutzomyia longipalpis*, pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae; é um inseto flebotomíneo díptero vulgarmente denominado de “asa branca”, “birigui”, “tatuquira”, “mosquito palha”, “cangalhinha”, medindo de 1 a 3 mm apresentando o comportamento de pousar com as asas entreabertas e de voar em pequenos saltos (LAINSON et al. 1985; CARRASCO & MORRISON, 1998).

Estes insetos vetores vivem em ambientes variados, mas suas formas imaturas se desenvolvem em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Possui hábito noturno, período no qual, buscam ativamente os animais vertebrados para realizar o repasto sanguíneo. Os adultos são encontrados durante o dia abrigados em fendas nas pedras, cavernas, galinheiros ou no peridomicílio e intradomicílio. As fêmeas são atraídas pelos feromônios exalados pelos machos e também por odores de outros animais, a exemplo de emanções da pele de seres humanos, bem como pelo CO₂ resultante da respiração de cada indivíduo ou animal (HAMILTON & RAMSOONDAR, 1994; OSHAGHI et al., 1994; URIBE, 1999; PINTO et al., 2001; O`SHEA et al., 2002).

A *L. chagasi* é transmitida pela fêmea, a qual apresenta hábito hematófago, especialmente durante seu período reprodutivo, em virtude da demanda por um suprimento protéico necessário a produção de ovos. Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor se infecta com as formas amastigotas presentes nos macrófagos. Decorridos alguns dias, aproximadamente sete dias, essas formas amastigotas sofrerão alterações bioquímicas e estruturais e convertem-se em formas intermediárias, exclusiva do vetor, denominadas paramastigotas e começam a fixar-se nas paredes do aparelho digestório do inseto até atingir a probóscide, onde se transformam na forma flagelada infectante denominada promastigota metacíclica. Considera-se que o acúmulo destas formas na probóscide do inseto dificulte novos repastos sanguíneos, fazendo com que o vetor aumente a frequência destes repastos, possivelmente ampliando o número de animais

picados. Esta obstrução parcial da probóscide provocaria, também, um movimento de regurgitação do conteúdo, inclusive com formas promastigotas do parasito, para o interior do hospedeiro durante o ato de sugar o sangue o que facilitaria a disseminação da infecção entre um número maior de hospedeiros (DYE, 1996; LAINSON & RANGEL, 2005).

2.4 Hospedeiros

Dentre os hospedeiros tem-se os invertebrados e os vertebrados. Os hospedeiros invertebrados, ou vetores da *Leishmania* são insetos hematófagos conhecidos como os flebotomíneos, dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Enquanto os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, sendo os mais comuns os roedores e os canídeos, mas também podem aparecer os edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, incluindo o homem (LAINSON & SHAW, 1987).

O principal reservatório doméstico de *L. chagasi* é o cão. Já no ambiente silvestre, os principais reservatórios são canídeos, destacando-se as raposas, gambás, e ratos, sendo este último encontrado naturalmente infectado por *L. chagasi*, sendo também considerado como reservatório silvestre da LV no Novo Mundo (CORREDOR et al., 1989; ZULUETA et al., 1999; SHAW, 2003).

O cão apresenta grande importância na manutenção do ciclo do parasito, por representar o principal reservatório doméstico de *L. chagasi*, estando à ocorrência da infecção humana, fortemente associada à LVC. A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos, sendo ainda, mais prevalente que a doença humana. Os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. chagasi*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem (DESJEUX, 2001; CAMPINO, 2003).

Estudos mostram que a maciça migração da população rural para os centros urbanos, leva ao crescimento desordenado destes centros, que é acompanhado por sérios problemas sócio-econômicos. A falta de saneamento básico e as condições de pobreza, verificadas nos subúrbios das cidades, favorecem o estabelecimento do ciclo de transmissão do parasito nestas localidades. Os migrantes normalmente levam consigo cães, porcos e galinhas que são mantidos no peridomicílio, criando nestes ambientes condições propícias para a proliferação do vetor.

2.5 Ciclo biológico

A transmissão da LV entre hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de insetos vetores hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Ao picar um vertebrado infectado o inseto ingere junto com sangue células parasitadas por formas amastigotas. No interior do tubo digestório do inseto vetor, as células infectadas se rompem liberando as formas amastigotas que então se transformam em formas promastigotas que se multiplicam rapidamente no trato digestório médio e anterior do flebotomíneo (ALENCAR et al., 1991; MEHLHORN & PIEKARSKI, 1993; GENARO, 2003).

No interior do flebotomíneo as promastigotas assumem a forma de paramastigotas, aderidas ao epitélio do esôfago e faringe por hemidesmossomas, ao se soltarem do epitélio, são chamadas de promastigotas procíclicas, depois de promastigotas metacíclicas (forma infectante) que são livres e ágeis e que se dirigem para a parte anterior do aparelho bucal. Quando o inseto realiza novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas são inoculadas juntamente com a saliva, no início e durante a hematofagia (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1993; GENARO, 2003).

Uma vez na pele do hospedeiro vertebrado, após a invasão das células do SFM, o parasito perde o flagelo dentro do vacúolo parasitóforo e ocorre multiplicação por divisão binária. As multiplicações sucessivas determinam o rompimento da membrana e consequentemente, a liberação dos parasitos, que são fagocitados por novas células dando sequência ao ciclo (MEDEIROS et al., 2005).

2.6 Sinais clínicos

As manifestações clínicas da doença são semelhantes em cães e humanos. O período de incubação pode variar de meses a anos e, durante este período o parasito se dissemina pelo corpo do hospedeiro. A forma clássica caracteriza-se por sinais e sintomas de doença crônica persistente, incluindo febre ondulante, fadiga e perda de peso; a invasão das células sanguíneas e do sistema reticuloendotelial acarreta hepatoesplenomegalia e linfadenopatia. Porém, o surgimento da doença e sua evolução são consequências de um complexo de interações entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro (MANNA et al., 2006; OLIVA et al., 2006; CHAPPUIS et al., 2007).

No homem as principais formas são a forma assintomática ou inaparente (que pode regredir ou evoluir), a forma oligossintomática ou subclínica e a forma sintomática, que é subdividida em aguda, subaguda e crônica. A forma sintomática

aguda é rara, dura de um a dois meses e pode provocar a morte por anemia. A forma subaguda manifesta-se principalmente em crianças, é grave e quando não tratada pode causar caquexia e levar a óbito num período de cinco meses a um ano. A forma sintomática crônica (calazar clássico ou ainda forma clássica da LV) tem evolução prolongada que pode ser de dois e/ou três anos ou mais (PESSÔA & MARTINS, 1988; MARZOCHI et al., 2001; GENARO, 2003; MEDEIROS et al., 2005).

Os cães são considerados a parte mais vulnerável no ciclo de transmissão de *L. chagasi*. Estes animais, quando infectados, apresentam intenso parasitismo cutâneo, fato que os tornam excelentes fontes de infecção para o vetor (MORENO & ALVAR, 2002).

Os cães infectados podem ser classificados em: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são aparentemente normais, e a infecção pode estar na fase inicial; os oligossintomáticos estão na fase em que se inicia a manifestação da sintomatologia e os sintomáticos manifestam os diversos sintomas da doença (GENARO, 2003; GONTIJO & MELO, 2004; MEDEIROS et al., 2005).

Nos cães que desenvolvem a doença, é observada a ocorrência de manifestações clínicas específicas, como lesões na pele do animal, destacando-se dermatite esfoliativa, alopecia, ulcerações cutâneas, sobretudo nas orelhas, focinho e ponta da cauda, onicogribose e hiperqueratose nasal e digital (CIARAMELLA et al., 1997; ALVAR et al., 2004).

Dessa forma, os primeiros sinais clínicos observados na LVC são a hipertrofia dos linfonodos poplíteos e a ocorrência de uma dermatite descamante periorbital e nasal, que se dissemina. O pelo do animal torna-se opaco e inicia-se a alopecia, sendo acompanhada por onicogribose e edema das patas. Podem ainda ocorrer febre, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal e em casos mais graves, atrofia muscular com paresia das patas posteriores, anorexia, perda de peso e caquexia (REIS et al., 2006).

No entanto, observa-se que um percentual considerado de cães mesmo na presença de infecção, não apresentam sinais clínicos da LV, tornando impossível o diagnóstico apenas clínico (BANETH, 2006). Assim sendo, o diagnóstico da doença é complexo e deve se fundamentar em informações relativas ao estado clínico do animal, epidemiologia da área, achados parasitológicos, sorológicos e moleculares, sendo que todos os dados devem ser considerados em conjunto (ALVAR et al., 2004).

Um fator de particular importância é que parte dos animais infectados, mesmo na ausência de manifestações clínicas da doença, apresenta parasitismo cutâneo, sendo potencialmente infectantes para o vetor. Assim, os cães, como reservatórios domésticos

da *L. chagasi*, apresentam importante participação para o controle da LV (MORENO & ALVAR, 2002).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LV é sempre baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A OMS recomenda que se proceda a investigação de LV em pacientes procedentes ou moradores de áreas endêmicas, que apresentem quadro febril por mais de 15 dias sem motivo aparente, bem como nos casos onde haja hepatoesplenomegalia. A sistematização de critérios epidemiológico, clínico e laboratorial possibilita o diagnóstico precoce, disso resulta importante redução da letalidade. O diagnóstico parasitológico é fundamental e deve ser estabelecido sempre que possível (BRASIL, 2004c; MEDEIROS et al., 2005).

O diagnóstico em cães pode ser feito com base nas características clínicas apresentadas pelos animais, confirmado por métodos laboratoriais diretos e indiretos (BONATES, 2003).

Os métodos de diagnóstico laboratorial para as leishmanioses podem ser agrupados em: histopatológicos, pesquisa direta do parasito, sorológicos e moleculares (ANDRESEN et al., 1996). Existem exames laboratoriais, específicos e inespecíficos para diagnóstico da leishmaniose. Os exames específicos baseiam-se na demonstração do parasito por métodos diretos ou indiretos; já os inespecíficos como exame clínico e hemograma, entre outros, são auxiliares (MEDEIROS et al., 2005). Os métodos diretos compreendem a visualização do agente etiológico, enquanto os indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, por meio de provas sorológicas, além de detecção de DNA (THOMÉ, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de Leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresentam 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO & MELO, 2004).

Atualmente, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a utilização de duas técnicas sorológicas, o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), sendo a RIFI a técnica diagnóstica de rotina (BRASIL, 2004a).

2.8 Resposta imunológica

Após o processo de infecção, as leishmânias são suscetíveis à ação de neutrófilos, mas, a rápida entrada nos macrófagos, permite ao parasito escapar dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos e se multiplicar nas células do SFM (MACHADO et al., 2004).

Após a entrada do parasito nos macrófagos ocorre o processamento de antígeno e apresentação para as células T. A imunidade celular protetora contra a leishmânia é mediada pelos linfócitos T auxiliares (CD4+) que, quando expostos aos antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), liberam produtos solúveis e citocinas, que atraem monócitos e ativam os macrófagos locais, aumentando a habilidade fagocítica destas células (CUNNINGHAM, 2002).

A produção de interleucina 12 (IL-12) pelas células dendríticas e macrófagos permite que os linfócitos T se diferenciem na subpopulação Th1, que produz interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2). Estas citocinas estimulam os macrófagos a produzirem intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e aumentar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de óxido nítrico (NO). Tanto os ROIs quanto o NO são substâncias tóxicas para o parasito. Por outro lado, se houver a produção de interleucina-4 (IL-4) pelos linfócitos T, ocorre o desenvolvimento da subpopulação Th2, que confere susceptibilidade a *Leishmania*, por inibir a produção de IFN- γ e IL-12, diminuir a expressão de receptores para IL-12 nos linfócitos e inibir a produção de NO pelos macrófagos. Já a produção de IL-10 por esta subpopulação estimula os linfócitos B a produzirem anticorpos (ALEXANDER et al., 1999; BROWN & REINER, 1999; KHARAZMI et al., 1999; PINELLI et al., 2000).

A resistência a LV envolve citocinas como: IL-2, IFN- γ e IL-12; e a susceptibilidade está associada com a produção de IL-10, sendo essa citocina considerada supressora da resposta imunológica celular na LV (GOTO & LINDOSO, 2004; BACELAR et al., 2000).

A LV é caracterizada pela incapacidade do macrófago em destruir as formas amastigotas. Tem sido observado que em animais doentes ocorre uma elevação dos níveis de IL-10. O aumento de IL-10 em sinergismo com IL-4 parece ser fundamental na progressão da doença, sendo que ambas são capazes de inibir a ativação de macrófagos pelo TNF- α produzido pelas células TCD4+ (NEVES, 2005).

Cães que desenvolvem a forma crônica da leishmaniose visceral possuem menor número de linfócitos T e estas células apresentam menor capacidade de proliferação, em

resposta ao antígeno de *Leishmania* em análises *in vitro* e *in vivo*, quando comparados aos linfócitos de cães não infectados (PINELLI et al., 1994; DeLUNA et al., 1999).

Análises *in vitro* de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ de cães assintomáticos indicam a possibilidade de participação destas células, na resistência à LV, devido à maior produção de IFN- γ e lise de macrófagos infectados, quando comparado a cães sintomáticos (PINELLI et al., 1995). Em cães susceptíveis, a diminuição de resposta imunológica mediada por células está relacionada à diminuição do número de linfócitos T CD4⁺, quando também se observa uma alta produção de anticorpos (MARTINEZ-MORENO et al., 1995; BORDOISEAU et al., 1997; CABRAL et al., 1998; MORENO et al., 1999, GUARGA et al., 2000; LEANDRO et al., 2001, QUINNELL et al., 2003).

Estudo avaliando a resposta imune humoral, mostrou que a concentração sérica de imunoglobulina G, subclasse 1 (IgG1) foi similar ao do grupo controle não infectado e a de imunoglobulina G, subclasse 2 (IgG2) foi bastante elevada nos cães sintomáticos em relação ao grupo não infectado (LEANDRO et al., 2001).

Segundo Deplazes et al. (1995), as concentrações de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2 podem identificar suscetibilidade à leishmaniose visceral em cães, sendo que os animais suscetíveis apresentam maior concentração de IgG total e IgG2, por mais tempo. Em outros estudos foi observado que cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, apresentavam produção de imunoglobulinas IgE estando esta associada a sintomas mais severos. Assim sendo, a produção de imunoglobulinas na leishmaniose está correlacionada a um padrão de resposta do tipo Th2 (ALMEIDA et al., 2005).

A observação de respostas exclusivamente Th1 ou Th2 é rara na população canina. Porém, foi demonstrada a dicotomia da resposta imune celular ou humoral ao parasito, em cães infectados (MARTINEZ-MORENO et al., 1995; PINELLI et al., 2000).

Portanto, o resultado da infecção é amplamente determinado pelo tipo de resposta dos cães, sendo que os linfócitos T têm papel fundamental na imunidade à leishmaniose, por influenciar a produção de citocinas e interagir com os macrófagos infectados. Assim, a imunidade contra *Leishmania* é mediada por uma complexa interação de citocinas, produzidas principalmente por células Th1, não tendo os anticorpos papel relevante na proteção. (RHALEN et al., 1999; CHAMIZO et al., 2005; FERNANDEZ-BELLON et al., 2005; ROSYPAL et al., 2005).

2.9 Imunoprofilaxia

O controle da LV, recomendado pela OMS desde a década de 70, tem como base três critérios: diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos; eliminação dos cães reservatórios; e controle do vetor com aplicação de inseticidas. Embora a eutanásia de cães soropositivos seja recomendada pela OMS, a própria entidade reconhece que existem cães de grande valor afetivo, econômico e prático, por isso, não podem ser mortos indiscriminadamente (RIBEIRO & MICHALICK, 2001).

Tendo em vista que os métodos até agora utilizados tem sido somente parcialmente efetivos na prevenção e controle da LVC, novas estratégias tem sido desenvolvidas. Assim, a prevenção da doença nos cães através da vacinação surge como uma alternativa para o controle da LV, já que não existe até o momento tratamento eficaz para o cão infectado (DUNAN et al., 1989).

Diante desse fato, esforços vem sendo desenvolvidos na busca de conhecimento dos mecanismos imunológicos da LV e de novos antígenos protetores contra essa parasitose. Assim, o desenvolvimento de vacinas contra a LVC vem sendo estudado como medida alternativa de controle. A eficácia de preparações vacinais em modelos experimentais constitui-se hoje em um dos pilares da aquisição de conhecimento para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose.

Estudos empregando candidatos à vacina para leishmaniose no âmbito de imunobiológicos como extratos brutos de *Leishmania* têm mostrado alguns resultados importantes. O extrato bruto de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* autoclavados foi utilizado para a vacinação de cães e a combinação desse extrato com BCG como adjuvante induziu resposta imune celular e proteção nos animais contra a infecção. A vacinação de cães com o complexo ligante de fucose e manose (FML) de *Leishmania (L.) donovani* em uma área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil (São Gonçalo do Amaranto, RN) conferiu um efeito protetor significativo e durador contra essa parasitose nessa região (SILVA et al., 2001).

Protocolos de imunização com a fração flagelar de *L. (L.) amazonensis* visando à indução de resposta celular na leishmaniose visceral murina, vem sendo utilizados por Do Valle et al. (2007). Os mecanismos de resistência e virulência de diferentes espécies do gênero *Leishmania* têm sido relacionados a dois grupos principais de imunógenos: 1) alguns relacionados a moléculas expressas na superfície do parasito ou constituídos por produtos secretados por eles; 2) um segundo grupo formado por moléculas localizadas no citosol ou em organelas do citoplasma de amastigotas que constituem, em geral,

proteínas altamente conservadas. Alguns desses antígenos são capazes de induzir altos títulos de anticorpos cuja produção tem sido atribuída a estímulos continuados ao longo da infecção pela lise de amastigotas livres no foco inflamatório (REQUENA et al. 2000; KAR et al., 2000; PROBST et al., 2001).

Dentro desse enfoque, tem sido investigada a imunogenicidade de frações subcelulares de tripanosomatídeos e algumas tem apresentado bom potencial como antígenos protetores em modelo murino. Estudos empregando frações flagelares de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* mostraram que elas são capazes de induzir proteção contra a infecção experimental pelo parasito no modelo murino (SEGURA et al., 1977; RUIZ et al., 1986), principalmente quando associadas à ação imunomoduladora do BCG. Estudos empregando detergentes não iônicos como o lubrol, que desintegra a membrana flagelar, mas preserva as estruturas internas do flagelo, mostraram que após esse tratamento a antigenicidade da fração flagelar era mantida quando se utilizava BCG como adjuvante (GONÇALVES da COSTA et al., 1988). Esse fato motivou um grande interesse pelo estudo da estrutura paraxial dos flagelos de tripanosomatídeos (FARINA et al., 1986; CUNHA-e-SILVA et al., 1989; De SOUZA, 2003). Foi demonstrado também que frações subcelulares constituem um componente importante quando utilizadas na avaliação da resposta imunológica do hospedeiro.

Os eventos imunológicos associados à imunoproteção e patologia na LVC mostraram, de acordo com as últimas pesquisas, que os padrões de imunidade protetora para *Leishmania* em cães são semelhantes àqueles observados em modelos de leishmaniose experimental murina e em humanos. O conhecimento destas informações representa uma base importante para a busca de antígenos capazes de intervir no sistema imunológico do cão, favorecendo o desenvolvimento de eventos imunológicos específicos capazes de combater o parasito durante os estágios iniciais da infecção.

Mais especificamente verificou-se que a fração microsomal de formas promastigotas de *L. amazonensis* é capaz de induzir proteção em camundongos albinos quando o BCG é empregado como imunomodulador (GONÇALVES da COSTA et al., 1988). Em camundongos sensibilizados com antígenos de *Leishmania* foi demonstrado também que as frações subcelulares induzem um estado de imunidade celular capaz de ser revelado em testes cutâneos por formas viáveis do parasito, sendo mais significativos quando o desafio se dá com formas amastigotas (ZAMORA MARQUES, 1993).

Em relação aos imunoprofiláticos empregados em intervenções vacinais na LVC pode-se agrupá-los em três classes, que representam diferentes gerações de antígenos vacinais no que se refere ao processo de produção. As vacinas de primeira geração que correspondem às vacinas inativadas, compostas de antígenos mortos ou frações de antígenos; as vacinas de segunda geração que correspondem às vacinas atenuadas ou geneticamente modificadas; e as vacinas de terceira geração que são vacinas originadas a partir de DNA antigênico onde um gene codificante do antígeno é integrado num plasmídeo que depois será inoculado no hospedeiro (FRANÇA, 2003; PALATNICK-de-SOUSA, 2008).

Quanto ao uso de vacinas anti-*Leishmania* utilizadas hoje no Brasil tem-se a vacina desenvolvida na Universidade Federal do Rio de Janeiro, considerada uma vacina de segunda geração, a vacina Fucose Manose Ligante (FML), que com o aval do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), está sendo industrializada e comercializada com o nome de Leishmune, pela Fort Dodge® Saúde Animal desde 2004 (MELO, 2004).

Mais recentemente a Leish-Tec® tem sido utilizada no combate a LVC, licenciada pelo MAPA e comercializada desde 2008. Trata-se de uma vacina composta pelo ativo A2 (proteína recombinante) mais adjuvante, obtida a partir do gene da *Leishmania donovani*. Estudos demonstraram que o antígeno A2, específico do estágio amastigota de *Leishmania*, apresenta grande potencial como antígeno vacinal anti-LV (GHEDIN et al., 1997; CARVALHO et al., 2002).

De acordo com a nota de esclarecimento sobre as vacinas anti-LVC registradas no MAPA e com a nota técnica que diz respeito à contra indicação da vacinação animal, o MAPA possui hoje em registro as vacinas Leishmune® e Leish-Tec®, produzidas pelos laboratórios Fort Dodge Saúde Animal e Hertape Calier Saúde Animal, respectivamente, e esclarece que estas vacinas já tiveram os ensaios em animais de laboratório (testes pré-clínicos) e estudos de Fase I e II completados, estando os estudos de fase III em andamento (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2009).

As vacinas desenvolvidas contra LVC têm demonstrado serem bastante promissoras em modelos murinos, contudo, ao passar para a fase seguinte das provas científicas, que testam as vacinas nos modelos caninos, os resultados tornam-se insatisfatórios (CORRALES & MORENO, 2006). O desenvolvimento de uma vacina para cães representa o método mais eficaz e prático para diminuir a incidência de

leishmaniose visceral humana, e também contribui para o desenvolvimento de uma vacina similar para humanos (GIUNCHETTI et al., 2008).

No entanto, estudos precedentes destacam que o principal requisito para que uma vacina seja eficaz contra a LV é a indução estável e permanente de resposta imune celular do tipo Th1. Sendo assim, a questão crítica para escolha e desenvolvimento de vacinas anti-*Leishmania* em cães é definir antígenos da *Leishmania* e adjuvantes e ou imunomoduladores capazes de fornecer uma favorável e sustentável produção de citocinas *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T.B.; MACEDO, A.M.; GUERRA, R.M.S.N.C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotômíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet. supl.1, 2008.
- ALENCAR, J.E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONEZI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of Intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v.112, p. 2993-3002, 1999.
- ALEXANDRINO, A.C. **Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral: considerações sobre Pernambuco**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2001.
- ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.106, p.151-158, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VE´ LEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. de . Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE** , v.7, P. 356-371, 2012.
- ANDRESEN, K.; GAAFAR, A.; ELHASSAN, A.M.; ISMAIL, A.; DAFALLA, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. **Trasactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.90, p. 133-5, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; SHERLOCK I, EULALIO M.C.; SAMPAIO D.P.; BADARO R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, p.53- 57, 1998.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A.; Jr. JERONIMO, S.; CARVALHO E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.12, p.1228-1231, 2000.

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

BARBIERI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite and Immunology**, v.28, p.329-337, 2006.

BARBOSA, D. S.; ROCHA, A. L.; SANTANA, A. A.; SOUZA, C. DA S. F. DE; DIAS, R. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ABREU-SILVA, A. L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 653-659, 2010.

BEVILACQUA, P.D.; PAIXÃO, H.H.; MODENA, C.M.; CASTRO, M.C.P.S.. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v 53, p. 1-8, 2001.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, v. 61, p.4-5, 2003.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset, levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.59, p.21-30, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde **Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil** Brasília - DF, 2002, p 27-28.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília - DF, 2004a. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Recomendação para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção *Leishmania*/HIV**. Brasília - DF, 2004b. 72p

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmissíveis**. CARMO, E.H. Brasília - DF, 2004c. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Ita.pdf>> Acesso em: 15 jun. de 2005.

BROWN, D.; REINER, S. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. **Infection and Immunity**, v.67, p.266-70, 1999.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUZA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.173-180, 1998.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETO, D.W.; LAGE, L.C.; SPÍNOLA, R.M.F. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p.1263-1267, 2001.

CAMPINO, L.M. In: FARREL J., ed., World Class Parasites: *Leishmania*, v.4, **Kluwer Academic Publishers**. Boston, Dordrecht, London, 2003.

CARRASCO, J.; MORRISON, A. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v.92, p.869-876, 1998.

CARVALHO, F.A.A.; CHAREST, H.; TAVARES, C.A.P.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E.P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.43, p.289-95, 2002.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, p.67-75, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.;BOE LAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; De LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A.A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with *L. infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

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

CORREDOR, A.; GALLEGU, J.F.; TESH, R.B.; MORALES, A.; De CARRASQUILLA, C.F.; YOUNG, D.G.; KREUTZER, R.D.; BOSHELL, J.; PALAU, M.T.; CACERES, E. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, p.480-6, 1989.

CUNHA-e-SILVA, N.L.; HASSÓN-VOLOCH, A.; De SOUZA, W. Isolation and characterization of a highly purified flagellar membrane fraction from trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 37, p.129-36, 1989.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRISTÓVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W.D.; REED, S.G.; BADARO, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 89, p. 155-158, 1995.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, p.132-141, 2002.

Da SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; PONTES, N.N.; CORREIA PONTES, N.N.; PARAGUAI De SOUZA, E.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M ; PALATNIK De SOUSA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v.19, p.1082-1092, 2001.

DeLUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.70, p.95-103, 1999.

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.417-123, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001.

De SOUZA, W.; CUNHA-e-SILVA, N.L. Cell Fractionation of parasitic Protozoa - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v 98, p 151-170, 2003.

DIETZE, R.; BARROS, G.B., TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALKETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v 25, p 1240-1242, 1997.

Do VALLE, T.Z.; GASPAR, E.B.; SOUZA-LEMOES, C.; SOUZA, C.S.; MÁRQUEZ, F.B.; BAETAS-DA-CRUZ, W.; D'ESCOFIER, L.N.; CÔRTE-REAL, S.; CALABRESE, K.S.; Da COSTA, S.C. Experimental *Leishmania (L.) amazonensis* leishmaniasis: characterization and immunogenicity of subcellular fractions. **Immunological Investigations**, v 36, p 473-492, 2007.

DUNAN, S.; FROMMEL, D.; MONJOUR, L. OGUNKOLADE, B.W.; CRUZ, A.; QUILICI, M. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.11, p.397-402, 1989.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v.55, p.125-130, 1996.

FARINA, M.; ATTÍAS, M.; SOUTO-PADRON, T.; De SOUZA, W. Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, v 33, p. 552-557, 1986.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*, v. 15, p. 36 - 44, 2000.

FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALEGO, L.; RODRIGUEZ, A. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Immunol. Immunopathol.*, v.107, p.163- 169, 2005.

FRANÇA, S. Cerco à Leishmaniose. *Revista Manguinhos*, junho de 2003. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/revista/n2_jun03/leishmaniose_ser.htm> Acesso em 11 mar. 2006.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde / MS. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, v.2, p.399, 2002.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu. 2003, p 56-72.

GHEDIN, E.; ZHANG, W.W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R.T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 4,n. 5, p. 530-535, 1997.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 338-349, 2004.

GONÇALVES da COSTA, S.C.; BARBOSA-SANTOS, E.G.; LAGRANGE, P.H. Vaccination Of Mice Against 'Leishmania Mexicana'Amazonoensis'With Polysomal Fraction Associated With BCG. *Annales de l'Institut Pasteur/ Immunologie*, v. 39, p.143-156, 1988.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.615-623, 2004.

GUARGA, J.L.; LUCIENTES, J.; PERIBÁÑEZ, M.A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Tropica*, v.77, p.203-207, 2000.

GUIMARÃES, K.S.; BATISTA, Z.S.; DIAS, E.L.; GUERRA, R.M.N.C.; COSTA, A.D.C.C.; OLIVEIRA, A.S.; CALABRESE, K.S.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; ZAVERUCHA do VALE T.; GONÇALVES da COSTA, S.C.; ABREU-SILVA, A.L.

Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 305-309, 2005.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORREIA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 121, p.23-33. 2008.

HAMILTON, J. G.; RAMSOONDAR, T.M. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, P.375-80, 1994.

KAR, S.; SOONG, L.; COLMENARES, M.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MCMAHON-PRATT D. The immunologically protective P-4 antigen of *Leishmania amastigotes*. A developmentally regulated single strand-specific nuclease associated with the endoplasmic reticulum. **Biological Chemistry**, v 275, p 37789-97, 2000.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHAL, J.A; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.65, p.105-107, 1999.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, p. 907-910, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R.S.M.; SILVEIRA, F.T. Leishmaniasis in Brazil: XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) as the vector. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.223–226, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in biology and medicine. **Academic Press**, v.1, p. 1-120, 1987.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, p.273-284, 2001.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2006. p. 13-21.

MACHADO, P.R.L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, p.647-664, 2004.

MANNA, L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L., CARVALHO, E.M. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271-280, 2006.

MARZOCHI, M.C de A.; MARZOCHI, K.B.F; SCHUBACH, A de O. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: _____. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu. 2001, p. 65-80.

MARZOCHI, M; MARZOCHI, K. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MARTINEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTINEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNANDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p.209–220, 1995.

MATTOS Jr, D.G; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C; COSTA, D.A. Aspectos Clínicos e de Laboratório de Cães Soropositivos para Leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v 56, p. 119-122, 2004.

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 188-189, 2000.

MEDEIROS, I.M.; NASCIMENTO, E.L.T. do; HINRICHSEN, S.L. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In _____. **DIP - Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, p 398-409.

MEHLHON, H.; PIEKARSKI, G. Género *Leishmania*: Leishmaniasis Visceral (Kala Azar, Fiebre Dum Dum). In: _____. **Fundamentos de Parasitologia: Parasitos del Hombre y de los Animales Domésticos**. Zaragoza, España: Acriba, 1993, p. 42-48.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p. 42-45, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). BRASÍLIA/DF. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf> Data de acesso: 5 de novembro de 2009.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.181-195, 1999.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18, p.399-405, 2002.

MOMEM, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.583-588, 2000.

NEVES, D.P. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu. 2005, p. 67-83.

NICOLLE, C. 1908. Isolament et culture des corps de Leishman. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, v.3, 55-56, 1908.

OLIVA, A.; SCALONE, A.; MANZILLO, V.F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA, C.D.L.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p. 1231-1239, 2001.

OSHAGHI, M.A.; McCALL, P.J.; WARD, R.D. Response of adult sandflies, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to sticky traps baited with host odour and tested in the laboratory. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, p.439-444, 1994.

O'SHEA, B.; REBOLLAR-TELLEZ, E.; WARD, R.D.; HAMILTON, J.G.; EL NAIEM, D.; POLWART, A. Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v, 96, p.117-118, 2002.

PALATNICK-de-SOUSA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v.26, p.1709-1724, 2008.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. Leishmaniose Visceral ou Calazar. In: _____. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p.104-124.

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

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

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMA, A.S. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary of Parasitology**, v.92, p.181-89, 2000.

PINTO, M.C.; CAMPBELL-LENDRU, D.H.; , LOZOVEI, A.L.; TEODORO, U.C.; DAVIES, R. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p.132-139, 2001.

PROBST, P; STROMBERG, E; GHALIB, H.W; MOZEL, M; BADARO, R; REED, S.G; WEBB, J.R. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 498-505, 2001.

PROFETA DA LUZ, Z.M.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.; FIUZA, V.O.; RABELLO, A. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p.249-254, 2001.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.91, p.161-8, 2003.

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

REQUENA, J.M; ALONSO, C; SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitology Today**, v.16, p. 246-250, 2000.

RHALLEN, A. et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p.173-184, 1999.

RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Leishmaniose, Estratégia de Controle. **Nosso Clínico**, v.4, p. 10, 2001.

ROSYPAL, A.C.; TROY, G.C.; ZAJAC, A.M.; FRANK, G; LINDSAY, D.S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 970-972, 2005.

RUIZ, A.M.; ESTEVA, M.; RIARTE, A.; SUBÍAS, E.; SEGURA, E.L. Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. **Immunology Letter**, v. 12, p.1-4, 1986.

SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., *World Class Parasites: Leishmania*. **Kluwer Academic Publishers**, v.4, 2003.

SEGURA, E.L.; VAZQUEZ C.; BRONZINA A.; CAMPOS J.M.; CERISOLA J.A; CAPPAS, S.M. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane fraction. **Journal of Protozoology**, v.24, p.540-543, 1977.

SILVA, E.S.; ROSCOE, E.H.; ARRUDA, L.Q.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, p.111-116, 2001.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L.; GREENE, C.E. In: Leishmaniasis - **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2 ed. Philadelphia, 1998, 450-458p.

TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.3, p. 657-667, 2003.

TESH, R.B. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, p.287-292, 1995.

THOMÉ, S.M.G. Cuidado com as leishmanioses. **Cães & Gatos**, v. 14, p. 46-50, 1999.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A.; NAVARRO, I.T.; FARIAS, M.R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N.A.; MIZZONO, J.C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 46-51, 2009.

URIBE, S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for Leishmania transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.6, p.729-734, 1999.

ZAMORA M.F.B. **Efeito modelador da ciclofosfamida na resposta immune induzida pela vacina BCG-RIBOLEISH de Leishmania amazonensis** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 1993.

ZULUETA, A.M.; VILLARROEL, E.; RODRIGUES, N.; FELICIANGELI, M.D.; MAZZARRI, M.; REYES, O.; RODRIGUES, V.; CENTENO, M. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in a endemic focus in Eastern Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.945-950, 1999.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível na Web-site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 25/06/2012.

CAPÍTULO 2 - FATORES CLÍNICOS E NÃO-CLÍNICOS RELACIONADOS COM A FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI *Leishmania chagasi* EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA DO MUNICÍPIO DE SÃO LUÍS/MA/BRASIL.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose de distribuição mundial, que acomete o homem, canídeos e marsupiais. A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e é transmitida pela picada de insetos flebotômicos. O cão vem sendo apontado como principal hospedeiro e reservatório da LV, sendo provavelmente o mais importante reservatório natural relacionado aos casos humanos. Além disso, tem um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas. O presente trabalho teve como objetivo observar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães domiciliados de ambos os sexos, com idade igual ou superior a seis meses, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) e sua correlação com as seguintes variáveis clínicas: hipertrofia de linfonodos poplíteos, alterações cutâneas, onicogribose, caquexia e lesões oculares. Os cães foram analisados sorologicamente, através do teste de ELISA/S7®, utilizando-se amostras de sangue periférico obtidas no período de julho/2008 a janeiro de 2009. Das 341 amostras analisadas, 173 (50,73%) foram soro positivos para anticorpos anti-*Leishmania* 135 (39,59%) foram soro negativos e 33 (9,67%) apresentaram resultado indeterminado. Quanto aos sinais clínicos observou-se que dos animais soropositivos 79 (45,66%) apresentavam hipertrofia de linfonodos poplíteos, 25 (14,45%) apresentavam alterações cutâneas; 23(13,29%) apresentavam onicogribose; 22 (12,72%) apresentavam estado de emagrecimento e 11 (6,36%) presença de lesões oculares. Ao se verificar a associação entre sexo e prevalência da doença, observou-se que dos 173 cães soropositivos, 56,57% eram machos e que 44,58% eram fêmeas. Em relação à idade não foi observado uma associação significativa ($\chi^2 = 4,93$ p = 0,2948) entre a idade do cão e o sorologia para leishmaniose. O elevado número de cães com sorologia positiva para LVC explica, em parte, a alta endemicidade da doença no município de São Luís/MA. Os resultados demonstram que o cão pode ser um importante reservatório doméstico de *Leishmania* sp. à semelhança do que acontece em outras áreas endêmicas do Brasil.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina; Cães domiciliados; Sorologia.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que acometem o homem e diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo (MARZOCHI, 1994). No peridomicílio o parasito circula entre cães, flebótomos e

humanos, enquanto na floresta raposas, flebótomos e marsupiais parecem estabelecer outro ciclo (WHO,1996).

O cão exerce um papel importante na urbanização da leishmaniose visceral, o que pode ser explicado pela estreita convivência com o homem e, principalmente por apresentar alto parasitismo cutâneo mesmo em animais assintomáticos, favorecendo assim a infecção do vetor e, conseqüentemente a transmissão da doença para o homem (DESJEUX , 2001; FRANÇA-SILVA ET AL., 2003).

As características clínicas da LV são semelhantes em cães e humanos. O período de incubação da doença no cão pode variar de meses a anos, durante o qual o parasito se dissemina pelo corpo (OLIVA et al., 2006). De acordo com os sinais clínicos, os cães são classificados: assintomático, quando não apresentam sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomático, quando apresentam poucos sinais tais como linfadenopatia, perda de peso e alterações dermatológicas; e sintomático, quando vários sinais comuns da doença são evidenciados (LIMA et al., 2004).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) pode ser feito com base nas características clínicas apresentadas pelos animais, confirmado por métodos laboratoriais diretos e indiretos (BONATES, 2003). Os métodos diretos compreendem a visualização do agente etiológico, por exemplo, pela demonstração do parasito em punções aspirativas de órgãos linfóides, enquanto os indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, por meio de provas sorológicas, além de detecção de DNA (FEITOSA et al., 2000). Atualmente, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a utilização de duas técnicas sorológicas, o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (BRASIL, 2004).

No Brasil casos de leishmaniose são registrados na periferia de grandes cidades como Belo Horizonte, Teresina, Fortaleza, Rio de Janeiro e São Luís (MARZOCHI, 1994; TESH, 1995), sendo que, no estado do Maranhão a LVC constitui um grave problema de Saúde Pública, uma vez que na Ilha de São Luís há uma grande dispersão da infecção em virtude da circulação indiscriminada de cães infectados e, principalmente devido manutenção de ambientes peridomiciliares em condições propícias à proliferação do vetor. Estudos epidemiológicos mostraram que na Ilha de São Luís a soroprevalência de LVC varia de 25 a 51,61% (GUIMARÃES et al., 2005; ABREU-SILVA et al., 2008).

Neste contexto a compreensão da cadeia epidemiológica das leishmanioses em áreas de ocorrência dessa zoonose é importante para promover medidas de prevenção e

controle. O presente trabalho teve como objetivo observar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) e sua correlação com as seguintes variáveis: idade, sexo e sinais clínicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O bairro Conjunto São Raimundo, pertencente ao distrito sanitário do Tirirical e está localizado ao sudeste do Município de São Luís - Maranhão, nas coordenadas geográficas 2° 35' 57''S e 44° 13' 36'' W. Possui um clima tropical quente e úmido (úmido B2), com temperatura média de 26,1°C, precipitação pluviométrica anual de 2.328 mm, apresentando duas estações bem definidas, uma chuvosa de janeiro a julho, e outra seca de agosto a dezembro (UEMA, 2010). De acordo com o levantamento realizado pela prefeitura municipal, o bairro São Raimundo possui 4.139 residências, com uma população de 11.637 habitantes (MARANHÃO, 2007).

2.2 Desenho do estudo

O estudo foi transversal do tipo inquérito, com cães domiciliados sem raça definida, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a seis meses, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) amostrados por conveniência totalizando 341 cães. Os animais foram submetidos à coleta de sangue periférico e avaliação clínica por técnicas semiológicas de inspeção e palpação. O soro obtido foi submetido ao teste ELISA/S7® (Biogene), seguindo as recomendações do fabricante. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sob número de protocolo 49/2008. Todos os proprietários antes da avaliação clínica dos animais assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.3 Procedimentos

O inquérito canino foi realizado por meio do preenchimento de uma ficha clínica, onde eram anotados os dados referentes a informações sobre idade, sexo, peso estimado e sinais clínicos sugestivos de leishmaniose, tais como: emagrecimento; onicogribose; tipo e localização das lesões cutâneas, presença de lesões oculares (conjuntivite purulenta) e hipertrofia de linfonodos poplíteos.

Posteriormente o animal era imobilizado, realizada assepsia local, coletava-se 5 mL de sangue da veia cefálica, utilizando-se o sistema a vácuo com tubo seco. Após a coleta, os tubos permaneciam a temperatura ambiente até a retração completa do coágulo. Todas as amostras foram centrifugadas e o soro obtido foi armazenado a -20 °C para posterior análise sorológica.

2.4 Diagnóstico pelo ELISA/S7®.

Para o diagnóstico sorológico de LVC foi realizada a reação ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), seguindo a recomendação do fabricante (Biogene).

O cálculo do ponto para análise foi feito a partir da média das Densidades Ópticas (D.O) dos soros não reagentes, somado ao fator $R=0,142$ determinando assim, a amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) e subtraídos do ponto de corte 0,03. As D.Os dos controles não reagentes foram sempre inferiores a 0,100 e as D.Os dos controles reagentes sempre superiores a 0,300. Todos os cálculos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante (Biogene).

2.5 Análise estatística

Utilizando-se o teste do qui-quadrado de aderência verificou-se que as frequências das manifestações clínicas ocorrem na mesma frequência que outras populações, e observou-se que a proporção de cães soropositivos difere das proporções de outras populações. Para verificar a associação das variáveis: sexo, faixa etária e a classificação em sintomáticos e assintomáticos fez-se o teste de qui-quadrado de independência. Em todos os testes o nível de significância (α) aplicado foi de 5%, ou seja, foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 341 cães investigados, 173 (50,73%) apresentaram sorologia positiva para anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, 135 (39,59%) apresentaram-se não reagentes e 33 (9,67%) apresentaram resultado indeterminado (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados sorológicos dos cães testados contra anticorpos anti *Leishmania chagasi* em área endêmica no município de São Luís - MA.

REAÇÃO	Valores		Valor de P
	N	(%)	
Soropositivos	173	50,73	0,0049
Soronegativos	135	39,59	
Indeterminados	33	9,67	
Total	341	100	

$\chi^2 = 7,92$

Estudos de prevalência da doença canina em várias cidades do Brasil têm detectado índices de positividade que variam desde 3,4% em Cuiabá, Mato Grosso (ALMEIDA et al., 2005), 9,7% em Montes Claros, Minas Gerais (FRANÇA-SILVA et al., 2003), 34% Mossoró, Rio Grande do Norte (AMÓRA et al., 2006) até 40,3% em Paulista, Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2006).

O percentual elevado de animais soropositivos encontrados confirma a alta endemicidade da área em estudo. De acordo com Feitosa (2000) e Silva (2001) em áreas endêmicas a prevalência de leishmaniose em cães é alta, acometendo em torno de 20 a 40% da população canina. A prevalência em São Luís (50,7%) é expressivamente alta ($\chi^2=7,92$; P= 0,0049) e corrobora com os resultados observados por Barbosa et al. (2010) e Abreu-Silva et al. (2008) com 67% e 51,61% de positividade, respectivamente, sendo portanto, alarmante a situação em São Luís-MA.

A elevada ocorrência de leishmaniose em cães representa uma fonte de infecção preferencial para o vetor, exercendo assim, papel importante na transmissão da doença para o homem, já que o cão se torna responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, pela alta prevalência da doença nestes animais; além de promover a dispersão da doença para áreas não endêmicas (ARIAS et al.,1996).

Quando se relaciona o número de animais sintomáticos e assintomáticos, observa-se no estudo que dos 173 animais reagentes, 97 (54,19%) apresentaram sinais clínicos sugestivos de LVC e 76 (46,91%) não apresentaram sinais clínicos observáveis (Tabela 2), a presença de animais assintomáticos reagentes podem servir de fonte de infecção para flebotomíneos e disseminação da doença, como já ressaltaram Alvar et al. (2004). Os sinais clínicos, observados no presente estudo, não apresentaram associação estatística significativa ($\chi^2=1.80$; P=0,4059), confirmando que o diagnóstico da leishmaniose visceral canina é complexo e não pode ser determinado somente por este parâmetro.

Tabela 2. Variáveis associadas à soropositividade de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral em área endêmica no município de São Luís – MA.

Variáveis		Soro positivos		Soro Negativos		Indeterminado		Total		Valor de P
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Sinais Clínicos	Sintomático	97	5,19	66	36,87	16	8,93	179	52,50	0,4059
	Assintomático	76	46,91	69	42,59	17	10,49	162	47,50	
Faixa etária	6ms-2anos	89	51,44	76	57,57	23	69,69	188	55,13	0,2948
	3-5anos	46	26,58	37	27,40	05	15,15	88	25,80	
	>5anos	38	21,96	22	16,29	5	15,15	65	19,06	
Sexo	Macho	99	56,57	58	33,14	18	10,28	175	51,31	0,0423
	Fêmea	74	44,58	77	46,38	15	9,04	166	48,68	

$\chi^2 = 1,80$ (sinais clínicos); $\chi^2 = 4,93$ (faixa etária); $\chi^2 = 6,32$ (sexo)

Intervalo de Confiança: 95%

Na associação entre animais assintomáticos soropositivos e soronegativos observou-se que há um percentual elevado de animais infectados sem a presença de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose. Esses dados corroboram com Alvar et al. (2004) e Baneth (2006) ao afirmarem que cerca de 50% a 60% dos cães portadores de formas amastigotas não exibem qualquer sinal clínico da doença.

Vexenat et al. (1994) no Piauí, encontraram mais de 30% dos cães assintomáticos e Marzochi et al. (1985) em áreas endêmicas para leishmaniose visceral no Rio de Janeiro, encontraram uma proporção de cães infectados assintomáticos de 63,2%. De acordo com Moreno e Alvar (2002) e Silva et al. (2005), no âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia reagente não apresenta sinais clínicos apresentando-se como reservatórios importantes na cadeia de transmissão da doença para o homem pelo seu convívio próximo, uma vez que, a doença no cão sempre precede o aparecimento de casos humanos (CAMPINO, 2003).

A análise da associação entre a positividade sorológica e a faixa etária dos cães, mostrou que 51,44% dos animais apresentavam idade entre seis meses a dois anos, 26,58% idades entre 3 a 5 anos e 21,96% encontravam-se acima de 5 anos de idade. Ao se relacionar os cães soronegativos com a idade, o estudo demonstra que 57,57% apresentavam idades entre 6 meses-2 anos; 27,40% com idades entre 3-5 anos; e 16,29% com idades acima de 5 anos (Tabela 2).

Apesar do presente estudo mostrar uma prevalência maior de cães soropositivos com idade entre 6 meses a 2 anos não foi observado associação significativa ($\chi^2=4,93$; $P=0,2948$) entre a idade dos cães e a sorologia para leishmaniose, indicando que a proporção de reagente, não reagente e indeterminado é a mesma nas três faixas etárias.

De acordo com Reichmann (2006), estudos feitos em São Paulo correlacionando faixa etária e infecções por agentes etiológicos, revelaram um maior percentual de casos em animais na faixa de até 2 anos de idade, esse percentual elevado pode estar relacionado à questões imunológicas, já que cães jovens de até 1 ano de idade podem apresentar imunocomprometimento mais acentuado que cães adultos e assim compor um estrato populacional de maior risco quando submetidos a infecções, sendo estes grupos etários os mais envolvidos em casos de prevalência de LVC.

Os dados da sorologia para população de acordo com o sexo estão discriminados na Tabela 2. Dos cães machos testados, 56,57% foram reagentes, 33,14% não reagentes e 10,28% indeterminados. Os resultados obtidos de fêmeas demonstraram que 44,58% dos animais apresentaram sorologia reagente, 46,38% não reagentes e 9,04% apresentaram resultado indeterminado. A análise destes dados demonstra uma maior prevalência da doença em animais do sexo masculino ($\chi^2=6,32$; $P=0,0423$).

Apesar dos machos apresentarem um percentual maior de positividade em relação às fêmeas, estudos no Brasil não evidenciaram predisposição sexual relacionada a infecção (FEITOSA et al., 2000; GONTIJO e MELO, 2004). No entanto, Julião et al. (2007) observaram diferença significativa entre machos e fêmeas para a infecção por *Leishmania* sp, sendo os machos os mais frequentemente parasitados e corroborando assim, com os resultados do presente estudo em que a prevalência nos machos foi maior.

A Tabela 3 mostra que a linfadenopatia e as lesões cutâneas são os sinais clínicos mais frequentes nos cães portadores de leishmaniose visceral.

Tabela 3. Frequência de sinais clínicos apresentados por cães soropositivos para leishmaniose visceral em área endêmica no município de São Luís - MA.

Sinais clínicos	Animais soro positivos [173 (100%)]	Valor de P
Hipertrofia de linfonodos poplíteos	79 (45,66%)	0,0001
Alterações cutâneas	25 (14,45%)	
Onicogribose	23 (13,29%)	
Caquexia	22 (12,72%)	
Lesões oculares	11 (06,36%)	
Total	160 (92,48%)	

$\chi^2 = 90,00$

As manifestações clínicas observadas nos cães soropositivos são similares às observadas por Feitosa et. al. (2000), Silva et al. (2001), Rondon et al. (2008) e Thomaz-Soccol et al. (2009). Entretanto, os sinais clínicos não ocorreram com igual

frequência nos cães soro positivos evidenciando diferença estatística ($\chi^2=90,0$; $P=0,0001$) entre estes sinais.

Alguns autores relatam que a linfadenopatia é um dos sinais clínicos mais frequentes na LVC, variando de 56 a 81% (CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA et al., 2000).

As principais alterações cutâneas observadas no presente estudo foram: dermatites esfoliativas difusa, dermatites ulcerativas nas orelhas e cauda, lesões crostosas de focinho e alopecia localizada ou disseminada. De acordo com Feitosa et al. (2000), as alterações dermatológicas são os sinais clínicos mais comuns na leishmaniose e segundo Cavalcanti et al. (2005), cerca de 68% dos cães acometidos apresentam tais alterações. Para Solano-Gallego (2004), estes sinais podem se iniciar como lesão única, comumente no ponto de inoculação do parasito, ou como lesão múltipla com a disseminação do parasito originando lesões não pruriginosas, descamação epidérmica e alopecia difusa.

Outro sinal clínico sugestivo de LVC é o alongamento das unhas o que pode ser observado neste estudo em 13,29% dos cães. Também Feitosa et al. (2000), observaram que 51% dos animais em estudo apresentavam onicogrifose. O alongamento das unhas costuma ser explicado pelo estímulo do parasito na matriz ungueal, sendo que, o estado de apatia em que o animal permanece durante a doença, também dificulta o desgaste natural das unhas (LETOSQUARD & DONATIEN, 1983; MARZOCHI et al., 1985).

A leishmaniose é uma doença debilitante sendo evidenciado no estudo 12,72% dos animais em estado de caquexia. Almeida et al. (2005), também observaram que os sinais de emagrecimento e ulcerações perfizeram um percentual de 80% dos casos. A perda de peso também foi observada por Martinez-Moreno et al. (1995), em um estudo sobre aspectos clínicos patológicos dos cães com LVC.

Em relação às lesões oculares observou-se que 6,36% dos cães apresentavam conjuntivite purulenta, sinal clínico este, sugestivo de LVC, encontrados em outros estudos, (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo Lima et al. (2004) e MS (2006), as manifestações clínicas apresentadas por cães infectados podem ser evidenciadas com leve perda de peso e alterações dermatológicas até sinais mais severos como, alterações cutâneas incluindo alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, onicogrifose, linfadenopatia, emagrecimento acentuado e ceratoconjuntivite.

O elevado número de cães com sorologia positiva para LVC explica, em parte, a alta endemicidade da doença no município de São Luís/MA. Os resultados demonstram que o cão pode ser um importante reservatório doméstico de *Leishmania* sp. à semelhança do que acontece em outras áreas endêmicas do Brasil. Assim, por ter um importante papel na compreensão da epidemiologia da leishmaniose visceral urbana, os inquéritos caninos são de extrema importância para um bom entendimento da doença, assim como seu controle.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T.B.; MACEDO, A.M.; GUERRA, R.M.S.N.C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotômíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet. supl.1, 2008.
- ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, 227-232, 2005.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, v.57, p.1-87, 2004.
- AMÓRA, S.S.A.; SANTOS, M.J.P.; ALVES, N.D.; COSTA, S.C.G.; CALABRESE, K.S.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p.1854-1859, 2006.
- ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.; ZICKER E. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, p.145-146, 1996.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**, v.73, p.685-698, 2006.
- BARBOSA, D. S.; ROCHA, A. L.; SANTANA, A. A.; SOUZA, C. DA S. F. DE; DIAS, R. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ABREU-SILVA, A. L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 653-659, 2010.
- BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, v. 61, p.4-5, 2003.
- BRASIL**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 120p, 2004.
- CAMPINO, L.M. In: FARREL J. World Class Parasites: *Leishmania*, v.4, **Kluwer Academic Publishers**. Boston, Dordrecht, London, 2003.

CAVALCANTI, M.P.; FAUSTINO, M.A.G.; DA-SILVA, L.B.G.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de Leishmaniose Visceral. **Clinica Veterinária**, v.58, p.36-42, 2005.

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

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

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001.

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

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

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.338-349, 2004.

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

JULIÃO, F.S.; SOUZA, B.M.P.S.; FREITAS, D.S.; OLIVEIRA, L.S.; LARANJEIRA, D.F.; DIAS-LIMA, A.G.; SOUZA, V.M.M.; BARROUIN-MELO, S.M.; MOREIRA JR, E.D.; PAULE, B.J.A.; FRANKE, C.R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.319-324, 2007.

LESTOQUARD, F.; DONATIEN, A. Parasitisme de La matrice ungueale dans La leishmaniose generale du chien. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.31, p.483-487, 1983.

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

MARANHÃO. Secretaria Municipal da Saúde (SEMUS) do Município de São Luís-MA. Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Sanitária. Resumo de Km², localidades, prédios e habitantes do Município de São Luís de zonas rural e urbana por distrito, 2007.

MARTINEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTINEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNANDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p.209–220, 1995.

MARZOCHI, M.C.A. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.23, p.82-84, 1994.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JR., G.; MOMEM, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL JR., F.B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977 -1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, p.349-357, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmanose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 120p. 2006.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18, p.399-405, 2002.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V.F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p.1318-1322, 2006.

REICHMANN, M.L.A.B. Leishmaniose visceral canina como zoonose reemergente. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais ...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 7-8.

RONDON, F.C.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R.; ALCÂNTARA, A.C.; DINIZ, A.T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.24-31, 2008.

SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, p.324-328, 2005.

SILVA, E.S.; ROSCOE, E.H.; ARRUDA, L.Q.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, p.111-116, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of leishmania infantum-infected Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p.7-12, 2004.

TESH, R.B. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, p.287-292, 1995.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A.; NAVARRO, I.T. ; FARIAS, M.R. DE; SOUZA, L. M. DE; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.46-51, 2009.

UEMA. Laboratório de Meteorologia do Núcleo Geoambiental. Centro de Ciências Agrárias. Disponível em <http://www.nemrh.uema.br/>. Acesso em 02.03.2010.

VEXENAT, J.A.; FONSECA DE CASTRO, J.A.; CAVALCANTE, R.; TAVARES, J.P.; SILVA, M.R.E.; BATISTA, W.H.; FURTADO CAMPOS, J.H.; HOWARD, M.K.; FRAM, I.; MCNERNEY, R.; WILSON, S.; MILLES, M.A. Visceral Leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil. Preliminary Observations on the Detection and transmissibility of Canine and Sandflies Infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.131-135, 1994.

WHO. World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis Control. Division of Control of Tropical Diseases, Geneve, 1996.

CAPÍTULO 3 - MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES DESAFIADOS COM FRAÇÃO FLAGELAR DE *Leishmania (L) amazonensis* ASSOCIADO AO BCG E EXPOSTOS A UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO ATIVA DE *Leishmania chagasi/infantum*

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar a capacidade protetora da fração flagelar de *Leishmania (L) amazonensis* sob imunomodulação do BCG em cães provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) por meio da avaliação sorológica, histológica e imunohistoquímica. Para realização do estudo, um total de 90 animais foram divididos em três grupos de 30 animais cada: Grupo I – animais imunizados com doses de fração flagelar e BCG; Grupo II – animais imunizados apenas com BCG e o Grupo III – animais controles inoculados com PBS. Após a imunização os animais foram deixados em área endêmica e acompanhados por 14 meses. Na etapa seguinte, 06 cães de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, tiveram sangue e fragmentos de pele da ponta da orelha coletados para posterior realização de sorologia anti-*Leishmania*, imunohistoquímica, *imprinting* e histologia. O tamanho amostral foi obtido dentro do critério de aceitação do proprietário. A avaliação dos resultados mostrou que todas as amostras coletadas foram negativas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. A análise histopatológica das biópsias mostrou somente infiltrado inflamatório adenexial. Já a análise imunohistoquímica evidenciou formas amastigotas de *Leishmania* sp na pele de 2 animais, um pertencente ao Grupo II (5 parasitos/campo) e outro pertencente ao Grupo III (18 parasitos/campo). Os animais do grupo I (imunizados com fração flagelar e BCG) não apresentaram positividade em nenhuma das análises. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a imunização com fração flagelar de *L. amazonensis* em associação com BCG foi capaz de proteger os cães analisados. Além disso, verificou-se uma maior sensibilidade na detecção da infecção pela técnica de imunohistoquímica.

Palavras-chave: Imunohistoquímica; Fração flagelar de *L.(L) amazonensis*; BCG.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose de distribuição mundial, que acomete o homem, e diversas espécies de mamíferos. A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida aos hospedeiros vertebrados pela picada de insetos flebotômíneos. Desde a sua descoberta no início do século XX, a doença tem sido descrita no novo e velho mundo, atingindo a Ásia, África, Europa e Américas, excluindo-se apenas os locais onde o vetor flebotômíneo não está presente (ASHFORD & BATES, 1998).

A leishmaniose visceral canina (LVC), do ponto de vista epidemiológico, é considerada mais importante que a leishmaniose visceral humana (LVH), pois além de ser mais prevalente, os animais infectados apresentam intenso parasitismo cutâneo servindo como fonte de infecção para os insetos vetores. Estas características tornam o cão doméstico o principal reservatório do parasito (ASHFORD, 1996). A pele dos cães tem esse aspecto importante para a LV por ser a região do corpo que mais manifesta os sinais clínicos, e o local onde acontece a primeira interação entre o parasito e o sistema imunológico do cão, além de ser o local onde se encontra grandes quantidades de formas amastigotas do parasito (CIARAMELLA et al., 1997). No entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico, e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver a presença de parasitos, o que alerta para a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença (CABRAL et al., 1998).

O diagnóstico da LVC pode ser feito com base em características clínicas apresentadas pelos animais, confirmado por métodos laboratoriais diretos e indiretos. Os métodos diretos compreendem a visualização de formas amastigotas do parasito em punções aspirativas de órgãos linfóides, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia esplênica e esfregaço sanguíneo corados com corantes de rotina tais como Giemsa, Wright e panótico; enquanto os indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, por meio de provas sorológicas (FEITOSA et al., 2000; BONATES, 2003). Atualmente as técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino são o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (BRASIL, 2004).

A detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp em biópsias de pele é uma outra alternativa para o diagnóstico de LVC. Existem, atualmente, as técnicas imunohistoquímicas que oferecem a vantagem de aumentar a sensibilidade e a especificidade das técnicas parasitológicas por apresentar alto grau de contraste entre os parasitos e as células hospedeiras (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004).

Além de métodos de diagnósticos, há também, a necessidade de medidas profiláticas voltadas para o controle da LVC. Atualmente a principal medida profilática recomendada pelo Ministério da Saúde no controle da LVC consiste na eutanásia dos cães, porém essa medida, além de criar conflitos entre os proprietários e os agentes de Saúde Pública, representa uma medida de controle ineficaz pela reintrodução de novos animais nas áreas endêmicas (MARZOCHI et al., 1985; DIETZE et al., 1997).

Deste modo, a busca por estratégias de formulações vacinais eficazes contra a LVC que visem à interrupção do ciclo de transmissão da doença vem sendo investigada como medida alternativa de controle. Trabalhando nessa perspectiva, o nosso grupo de pesquisa realizou um ensaio vacinal utilizando a fração flagelar de *Leishmania amazonensis* em associação com BCG em cães provenientes de área endêmica para LV a fim de avaliar seu efeito protetor através da avaliação de diferentes parâmetros, como sorologia, histopatologia, imunohistoquímica e perfil de citocinas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no bairro São Raimundo, pertencente ao distrito do Tirirical, que fica localizado ao sudeste do Município de São Luís - Maranhão, nas coordenadas geográficas 2° 35' 57''S e 44° 13' 36'' W. Segundo levantamento realizado pela prefeitura municipal este bairro possui 4.139 residências, com uma população de 11.637 habitantes (MARANHÃO, 2007). A escolha do local de estudo teve como base a alta soroprevalência de LVC demonstrada em estudos prévios (BARBOSA et al., 2010; SALES, 2012).

2.2 Desenho do estudo

A partir de inquérito sorológico prévio em área endêmica para LVC, foram selecionados 90 cães sorologicamente negativos ao teste ELISA/S7®, sendo estes, divididos em três grupos de 30 animais cada. Grupo I – composto por animais que receberam uma dose subcutânea de BCG e duas doses de fração flagelar de *L. amazonensis* por via intradérmica com intervalos de 21 dias entre doses; Grupo II – composto por animais que receberam três doses subcutâneas de BCG com intervalos de 21 dias entre doses e Grupo III – composto por animais que receberam três doses subcutâneas de PBS com intervalo de 21 dias entre doses.

Após a imunização dos animais, estes foram deixados na área em estudo e acompanhados por 14 meses, quando então 6 animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, tiveram fragmentos de pele da ponta da orelha coletados para os testes imunohistoquímico (IHQ), *imprint* (IP) e histológico (corados por hematoxilina-eosina, HE), para avaliar o grau de proteção oferecido pela fração de *L. amazonensis* através quantificação da carga parasitária, assim como o sangue coletado para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. O tamanho amostral de 18 animais foi obtido dentro do

critério de aceitação do proprietário que, a partir de um termo de consentimento livre e esclarecido, optava pela inclusão dos animais ao processo de avaliação da carga parasitária.

As frações flagelares de *L. (L.) amazonensis* utilizadas nesse estudo foram cepas MHOM/BR/76/Ma-5, provenientes de isolados de caso humano de leishmaniose cutânea difusa, cedidas pelo Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) / Rio de Janeiro – RJ. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA e aprovadosob número de protocolo 49/2008.

2.3 Análise sorológica

Foram coletados 2 mL de sangue periférico através da punção da veia cefálica de cada animal, utilizando-se o sistema *vacuttainer* com tubo seco. Após a coleta, as amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas ao laboratório de anatomopatologia da UEMA. As amostras de sangue foram mantidas a temperatura ambiente até a retração completa do coágulo, quando então foram submetidos a centrifugação para posterior coleta do soro. Os soros obtidos foram aliquotados em tubos tipo *Eppendorf*, identificados e armazenados a -20 °C para posterior análise sorológica através da reação ELISA/S7[®] /Biogene, segundo as recomendações do fabricante .

2.4 Coleta de biópsias de pele

Os animais eram avaliados clinicamente para verificação dos padrões fisiológicos e em seguida sedados usando-se xilazina a 2% na dosagem de 0,2 mg/kg/pv via intramuscular. Para a biópsia foi feita a escolha da pele da ponta da orelha dos cães, onde se procedeu ao processo de infiltração de lidocaína a 2% por via subcutânea e após a sedação e o bloqueio regional da pele, era feita então a retirada de fragmentos e estes secados com papel absorvente e depois fixados em paraformaldeído a 4% e formalina tamponada a 10%, pH 7,4. Posteriormente, no laboratório, os fragmentos de tecido foram incluídos em parafina líquida a 45 °C e cortes de 5 µm de espessura foram obtidos para as análises imunohistoquímica e histopatológica.

2.5 Análise histológica

2.5.1 Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas eram inicialmente desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e a seguir, lavadas em água corrente. Logo após, eram coradas com hematoxilina e, após nova lavagem, coradas em eosina. As lâminas foram, então, imersas em água corrente, desidratadas em soluções de álcool crescente e posteriormente diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo sintético.

Para a avaliação da reação inflamatória foi feita a análise semi-quantitativa, na qual a intensidade inflamatória era interpretada em escores de 1 a 4, onde: 1- ausência de inflamação; 2- inflamação discreta; 3- inflamação moderada e 4- inflamação intensa.

2.5.2 *Imprinting*

Após a biópsia foi feita a oposição do fragmento de pele sobre lâmina de vidro de borda fosca, que após secagem era fixada em metanol e corada pelo Giemsa. A análise feita foi qualitativa observando-se a presença ou ausência de formas amastigotas.

2.6 Análise imunohistoquímica

A técnica de Imunohistoquímica para marcação de formas amastigotas de *Leishmania* sp em material embebido em parafina seguiu o protocolo de Tafuri et al. (2004). A presença de parasitos na pele foi avaliada utilizando-se a técnica da estreptoavidina-peroxidase. A análise foi quantitativa levando-se em conta o número de amastigotas encontradas em até 20 campos microscópicos na objetiva de 40X.

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se PBS, em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo foi utilizado uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado com *Leishmania (L) chagasi*.

2.7 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

A técnica de PBMC foi realizada em dois períodos: com seis meses e quatorze meses após a última imunização. Nesses períodos procederam-se as coletas de sangue periférico, onde eram coletados 8 mL de sangue por venopunção na veia cefálica, em um sistema *vacuttainer* com tubos contendo heparina. As amostras eram transportadas ao laboratório para os procedimentos de obtenção de células mononucleares. No

laboratório, as amostras de sangue eram transferidas para tubos Falcon de 50 mL, e uma quantidade proporcional de soro fisiológico era acrescentada, sendo a mistura levemente homogeneizada. Em seguida essa mistura era transferida para outro tubo Falcon contendo Ficoll-Paque e levados pra centrifugação por 40 minutos a 15000 rpm a 10 °C. Após a centrifugação era retirada a camada de plasma e o anel leucocitário (anel de PBMC) era então coletado e transferido para um novo tubo Falcon acrescido de soro fisiológico 3X o volume de células obtido. Procedia-se uma segunda centrifugação por 10 minutos a 14 °C em 1000 rpm, onde era desprezado o sobrenadante e o pellet (sedimento) era ressuspensão com 15 mL de soro fisiológico e centrifugado por 10 minutos a 800 rpm a 10 °C. Após a última centrifugação o sobrenadante era desprezado e o pellet final de células ressuspensão em meio RPMI 1640 completo em um volume de 1 mL. 10 µL de células ressuspensa em meio RPMI completo era misturado a 10 µL de corante azul de Tripan e colocados em câmara de Neubauer para contagem e ajuste de células. A contagem era ajustada para 2×10^6 células /mL. Após o ajuste as amostras eram plaqueadas em placas de 48 poços com e sem estímulos de *L. amazonensis* e incubadas em estufa de CO₂ a 5% por 48 horas. Após essa etapa procedia-se então, o teste de ELISA de citocina. O mesmo procedimento do ELISA de citocinas foi utilizado para avaliar a linfoproliferação no soro sanguíneo.

2.8 Detecção de citocinas pelo método de ELISA

A concentração das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foi determinada pelo método imunoenzimático (DuoSet[®] - ELISA Development System) de acordo com as recomendações do fabricante, para o IFN- γ , IL-12 e IL-10. Placas de 96 poços foram preparadas, adicionando-se 100µL de anticorpo de captura diluído em PBS conforme a citocina estudada. As placas eram incubadas por 12 horas em temperatura ambiente e depois lavadas com tampão de lavagem, PBS, e bloqueadas com 300 µL de solução de bloqueio em cada poço. As placas eram vedadas e incubadas a temperatura ambiente por no mínimo 1 hora, e novamente lavadas em solução tampão e secadas. Em seguida eram acrescentados 100 µL das amostras de sobrenadante de cultura de PBMC e/ou soro sanguíneo e dos padrões seriadamente diluídos com ponto inicial de curva em 1000 pg/mL. As placas eram então vedadas e agitadas levemente por 1 minuto e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Depois desse tempo, eram lavadas e secadas, e 100 µL de anticorpo de detecção conforme a citocina

estudada era colocado em cada poço, as placas novamente eram vedadas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas eram novamente lavadas e secadas, e em seguida eram acrescentados 100 µL de Streptavidin-HRP em cada poço e uma nova incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. Repetida a lavagem e secagem das placas, eram acrescentados 100 µL de solução substrato em cada poço e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo da luz. Finalmente era acrescentado 50 µL de solução de parada em cada poço com uma leve agitação. A leitura das placas era realizada em um aparelho espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Todos os passos descritos para a realização dessa etapa estavam descritos no “Kit DuoSet® - ELISA Development System” para cada citocina estudada. Os reagentes utilizados nesse experimento pertence ao Kit DuoSet da R&D Systems.

2.9 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. A flutuação das citocinas, foi analisada como medidas repetidas no tempo. O modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento, período e a interação tratamento e período. O modelo utilizado para a análise foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + T_i P_j + e_{ij}$$

Sendo: Y_{ij} as medidas observadas nas unidades experimentais; μ a média geral; T_i o efeito de tratamento; P_j o efeito das datas experimentais; $T_i P_j$ a interação entre tratamento e datas experimentais e e_{ij} o erro experimental.

Para execução das análises estatísticas foi utilizado o procedimento PROC MIXED do programa estatístico SAS®, versão 9. Para todas as análises considerou-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Os escores do tipo celular verificados no infiltrado inflamatório da pele foram avaliados por regressão logística, considerando os efeitos de grupo. A comparação entre grupos foi feita pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni ($p < 0,05$). Em todos os testes o nível de significância (α) aplicado foi de 5%, ou seja, foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais em estudo submetidos ao ensaio sorológico apresentaram-se negativos. Nas técnicas histológicas de *imprint* e HE não se observou a presença de parasito, mas ao exame microscópico, os fragmentos de pele corados por HE de todos os animais, independente do grupo estudado, apresentaram-se com lesões qualitativas muito semelhantes, variando apenas na intensidade (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação da intensidade da inflamação (escore inflamatório) em pele de cães provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.

Grupo	Média		DP
I	0,1297 ^a	±	0,2085
II	0,3891 ^b	±	0,0965
III	0,3806 ^b	±	0,1294

F= 5,623; p= 0,015

ANOVA com comparação das médias (Log) pelo teste de comparação de Boferoni, a, b, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre as médias do grupo (p < 0,05).

Os resultados demonstraram que os animais do grupo I apresentaram reação inflamatória considerada discreta, no grupo II foi visualizado uma reação inflamatória variando de discreta a intensa e o grupo III apresentou uma reação inflamatória de discreta a moderada, sendo o exsudado celular misto, constituído principalmente de células mononucleares como linfócitos, plasmócitos e em menor quantidade observou-se polimorfonucleares distribuídos difusamente.

De acordo com Xavier et al. (2006), em animais oligossintomáticos e sintomáticos observa-se um processo inflamatório crônico, principalmente na pele da orelha. Esse processo inflamatório crônico se caracteriza por infiltrado inflamatório mononuclear, difuso nas camadas superficiais da derme e focal em torno dos vasos, folículos pilosos e glândulas submucosas.

A presença de reação inflamatória pode ocorrer principalmente por ser a região auricular área-alvo de injúrias, levando ao prurido regional e a auto-traumatismos e como consequência uma maior migração de células inflamatórias (monócitos/macrófagos) para a região como relatado por Tafuri et al. (2000) e Moura et al. (2008).

A técnica utilizando a IHQ revelou que os animais pertencentes ao grupo II e III apresentavam marcações positivas para a forma amastigota da *Leishmania* sp, sendo um animal do grupo II (5 parasitos por campo) e outro animal do grupo III (18 parasito por

campo) (Gráfico 1). A carga parasitária da pele foi quantificada contando-se o número de amastigotas marcadas. Observou-se que na pele dos cães do grupo III houve maior quantidade de formas amastigotas de *Leishmania* sp por campo analisado em relação aos animais do grupo II não havendo diferença estatística entre os dois grupos. Quanto aos animais do grupo I todos foram negativos em relação a presença de formas amastigotas (Figura 2).

Portanto, a técnica de IHQ ao detectar a presença de formas amastigotas na pele dos cães (Figura 1), permitiu avaliar a proteção conferida aos animais imunizados com fração flagelar de *L. amazonensis* e os grupos controles, o que não foi possível pelos testes do IP e HE. De acordo com Bourdoiseau et al. (1997), embora o HE seja específico e usado como avaliação de rotina para Leishmânias, há certa dificuldade para visualização das amastigotas e, algumas vezes, os exames podem ser inconclusivos, uma vez que, a positividade pela HE é sempre menor quando comparado à análise feita pela técnica de IHQ.

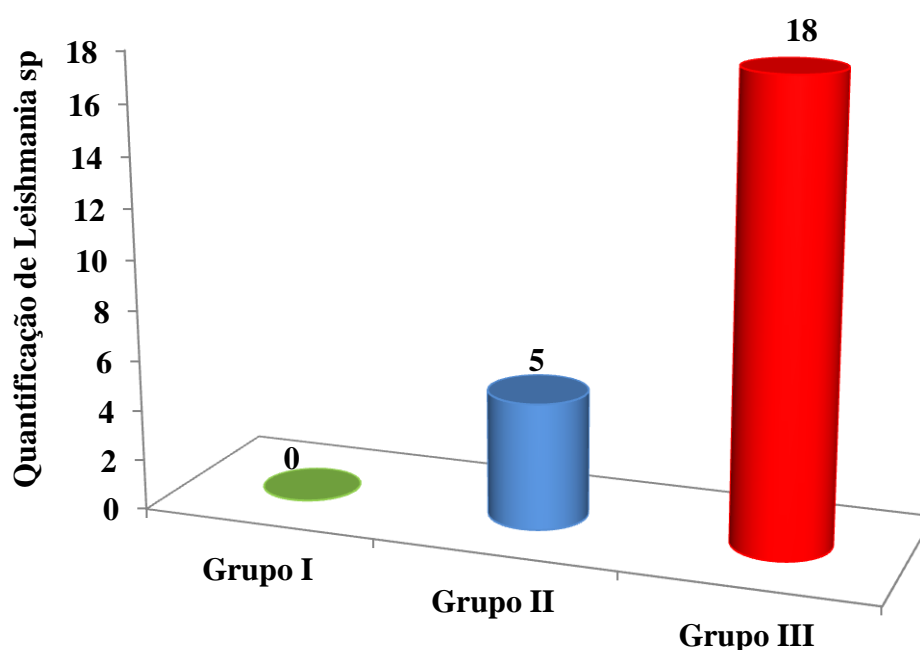


Gráfico 1 – Determinação do número de amastigotas de *Leishmania* sp em tecido auricular de cães pela técnica de imunohistoquímica.

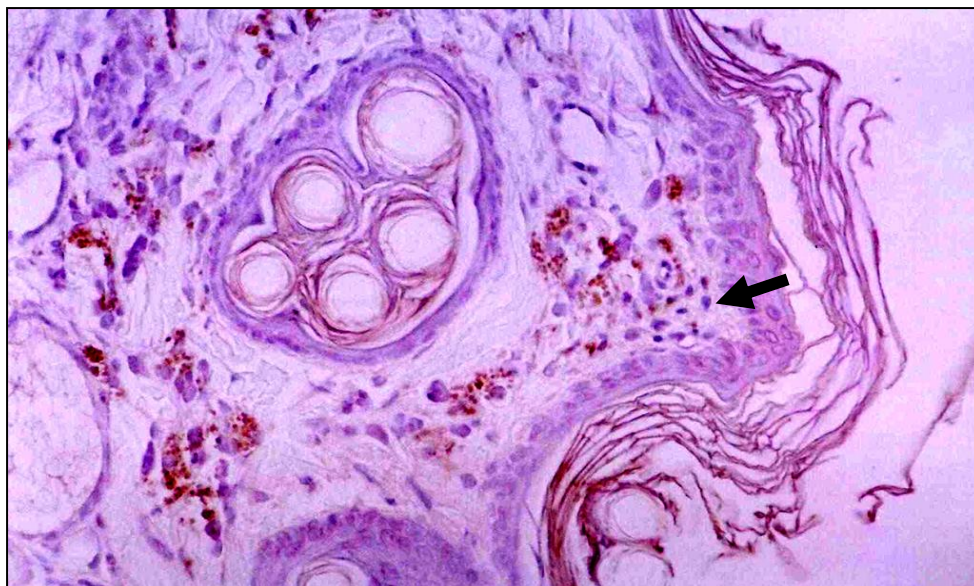


Figura 1 - Imunomarcacão de formas amastigotas de *Leishmania* sp na pele de cão assintomático pela técnica de estreptoavidina – peroxidase, 400X (seta).

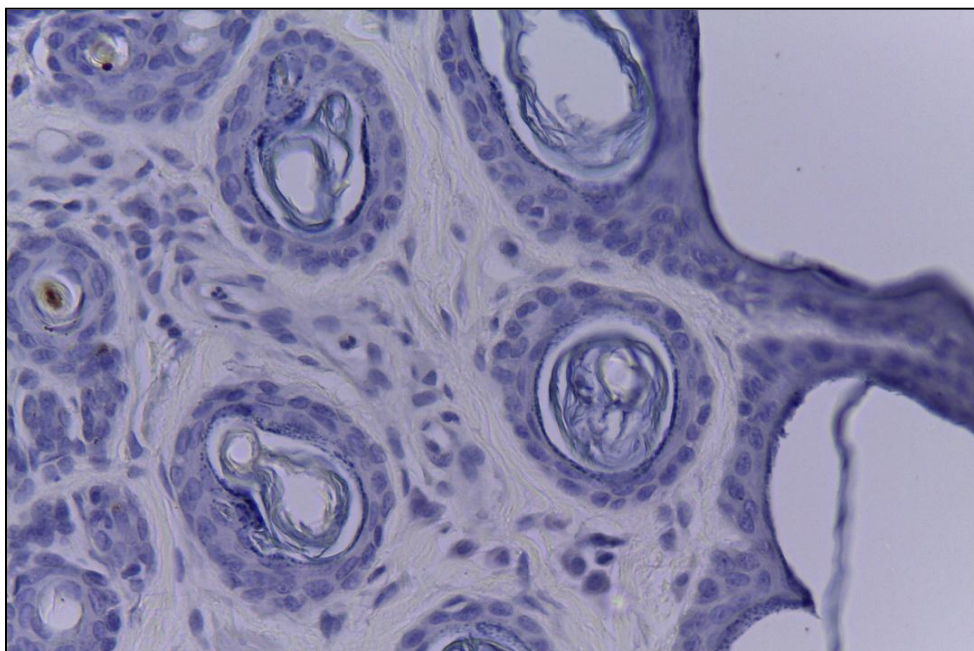


Figura 2 – Corte histológico da orelha de cães assintomáticos e soronegativos, não sendo observado presença formas amastigotas de *Leishmania* sp pelo teste de imunohistoquímica, 400X.

De acordo com Maia e Campino (2008), a IHQ é empregada como ferramenta diagnóstica importante para a confirmação da LVC, principalmente quando a carga parasitária é baixa ou quando as alterações histológicas, apesar de sugerirem a doença não evidenciam o parasito.

Segundo Tafuri et al. (2004), a IHQ apresenta desempenho diagnóstico superior, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados permitindo uma melhor visualização do parasito, por possibilitar um alto grau de contraste entre os parasitos e o tecido do hospedeiro, sendo possível o diagnóstico mais preciso da LVC (ORDEIX et al., 2005).

A análise feita pela IHQ permite a identificação de leishmânias na pele dos cães, independentemente da sua condição clínica, permitindo avaliar seu potencial como reservatório, sendo assim, essa técnica mostra-se como uma ferramenta importante pela sua maior sensibilidade frente às outras técnicas histopatológicas.

4. CONSIDERAÇÕES

No presente estudo sobre a avaliação da resposta celular em cães imunizados com a formulação vacinal composta por proteína flagelar de *L. amazonensis* associada ao BCG, não foi possível a observação do perfil de citocinas relacionadas à resistência e/ou susceptibilidade de forma conclusiva, uma vez que, não houve diferenças entre os grupos estudados. Ao longo do experimento foi observada apenas uma flutuação nas três citocinas estudadas.

No entanto, observou-se que durante um período de quatorze meses, os cães imunizados com a fração antigênica de *L. amazonensis*, não apresentaram sorologia positiva para LVC e ao teste de IHQ não apresentaram formas amastigostas de leishmânias, mostrando que essa formulação vacinal foi imunogênicas e ofertou proteção nesse período. Porém, a realização de estudos complementares são ainda necessários para se conhecer melhor a resposta imune oferecida por essa formulação vacinal e a manutenção dessa proteção observada durante o período do experimento.

REFERÊNCIAS

- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinical Dermatology**, v. 14, p.523-532, 1996.
- ASHFORD, R.W.; BATES, P.A. Leishmaniasis on the old World. **Microbiol and Microbial infection**, v.5, p.215-240, 1998.

BARBOSA, D. S.; ROCHA, A. L.; SANTANA, A. A.; SOUZA, C. DA S. F. DE; DIAS, R. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ABREU-SILVA, A. L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 653-659, 2010.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, v. 61, p.4-5, 2003.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 439-440, 1997.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2004. 120p.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.173-180, 1998.

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

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALKETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v 25, p 1240-1242, 1997.

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

FERRER, L.M.; RABANAL, R.M.; DOMINGO, M. Identifications of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidases staining. **Review Veterinary Science**, v. 44, p. 2194, 1988.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, p. 274-87, 2008.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL JR, F.B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, p.349-357, 1985.

MARANHÃO.Secretaria Municipal da Saúde (SEMUS) do Município de São Luís-MA. Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Sanitária. Resumo de Km2,

localidades, prédios e habitantes do Município de São Luís de zonas rural e urbana por distrito. Ano 2007.

MOURA, E.P.R.; SAMPAIO, R.R.; LIMA, W.M.; ALVES, W.G.; MELO, C.F.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.M. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.1, p.10-15, 2008.

ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDEVILA, D.; FERRER, L.; FONDATI, A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. Infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p.187-191, 2005.

SALES, S.S. **Modulação da resposta imunológica de cães utilizando BCG em associação com fração flagelar de *Leishmania amazonensis***. 2012. 70f. [Tese de Doutorado]. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; PAIVA, M.C.; MOSSER, D.M. Kinetics of an experimental inflammatory reaction induced by *Leishmania major* during the implantation of paraffin tablets in mice. **Virchows Archives**, v.437, p.429-35, 2000.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal Immunological Methods**, v. 292, p.17-23, 2004.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; HADADE MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v.2, p.1-7, 2006.

CAPÍTULO 4 - USO E FORMULAÇÕES DO ANTÍGENO IMUNOPROFILÁTICO DA FRAÇÃO FLAGELAR DE PROMASTIGOTA DE *Leishmania amazonensis* IMUNOMODULADA COM BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).

1. CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao uso e formulações do antígeno imunoprolifático de fração flagelar de promastigota de *Leishmania amazonensis* imunomodulada com bacilo Calmette Guerin (BCG) contra leishmaniose visceral canina (LVC) atuando assim, como um bloqueador na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (LV).

Mas especificamente a invenção refere-se ao uso do antígeno de fração flagelar de promastigota de *L. amazonensis* no estímulo de respostas celulares linfoproliferativas capazes de gerar uma reação imunoprotetora, tornando-se assim, um potencial candidato à vacina.

2. REIVINDICAÇÕES

1. Uso do antígeno da fração flagelar de promastigota de *Leishmania amazonensis* associado ao imunomodulador BCG, caracterizado por estimular respostas celulares linfoproliferativas capazes de gerar uma reação imunoprotetora em cães na prevenção de leishmaniose visceral (LV).

2. Uso do antígeno imunoprolifático de fração flagelar de promastigota de *L. amazonensis* imunomodulada com bacilo Calmette Guerin (BCG) caracterizado por apresentar uma ação imunógena contra a leishmaniose visceral canina (LVC) atuando assim, como um bloqueador na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (LV).

3. Uso do antígeno flagelar de promastigota de *L. amazonensis* de acordo com a reivindicações 1, caracterizado por ser administrado em três doses com intervalos de 21 dias entre dose, sendo a primeira dose de BCG por via subcutânea e as duas de fração flagelar por via intradérmica.

4. Uso de antígeno da fração flagelar de promastigota de *L. amazonensis* de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser na preparação de vacina adicionado ou não de veículos farmacológicos adequados para bloquear a leishmaniose visceral canina (LVC).

5. Formulações imunoprotetoras de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por apresentar uma ação imunogênica e protetora contra leishmaniose visceral.

6. Formulações imunoprotetoras de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de gerar pelo menos uma resposta imune celular.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento livre e esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, **Sofia Sousa Sales**, Médica Veterinária sob CRMV nº 0781, doutoranda da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, sob a orientação da Dra. Ana Lucia Abreu Silva sob CRMV nº 0375 estabelecidas no Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Anatomopatologia, da Universidade Estadual do Maranhão, localizada na Cidade Universitária Paulo VI, nesta cidade, cujo telefones de contato são 32573676/99649404/81120884, estamos desenvolvendo uma pesquisa cujo título é: “**Avaliação da resposta imunológica a partir da aplicação de proteínas imunizantes de *leishmania (l) amazonensis* sob modulação de *mycobacterium bovis* em cães de área endêmica para calazar no município de São Luís - MA.**” O objetivo deste estudo é de **Imunizar cães não infectados domiciliados e avaliar as respostas linfoproliferativas dos animais imunizados com a fração flagelar e imunomodulados pelo *Mycobacterium bovis*, BCG.** O estudo visa uma maior eficácia nas medidas de controle da leishmaniose canina através da imunoprofilaxia como alternativa capaz de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias, implementando o desenvolvimento de novas tecnologias imunoterapêuticas que previna não só a doença, mas também a possibilidade da transmissão do agente em animais imunizados. Sendo assim, é necessário que o Sr.(a). permita a execução do procedimento de imunização do seu cão em que realizaremos os seguintes procedimentos: o cão receberá durante a pesquisa a aplicação de três doses do imunógeno aqui proposto a intervalos de 21 dias e por ocasião da aplicação, será realizada a coleta de sangue e todo o processo de avaliação clínica do animal. Sua participação é voluntária e importante para o aumento do conhecimento a respeito do processo da resposta imunoprofilática do animal frente à aplicação de antígenos flagelares, o que pode colaborar para que os cães de modo geral possam apresentar uma permanente reação imunoprotetora que culmine com a quebra do processo infeccioso e o desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva. Informo que o Sr.(a). tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Você poderá, caso sinta necessidade, entrar em contato com o Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA), da Universidade Estadual do Maranhão, no campus universitário no Curso de Medicina Veterinária, localizado na Cidade Universitária Paulo VI – Bairro Tirirical pelo telefone 3257 3676 e comunique-se com a Profa Dra Ana Lucia Abreu Silva e a Profa Dra Alana Lisléia de Sousa. Também é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo. O Sr.(a). tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar. Não existirão despesas ou compensações pessoais para a sua participação em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Nós nos comprometemos a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos. Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com o Sr.(a) e outra arquivada com os pesquisadores responsáveis.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficiente informado à respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, em relação ao estudo “**Avaliação da resposta imunológica a partir da aplicação de proteínas imunizantes de *leishmania (l) amazonensis* sob modulação de *mycobacterium bovis* em cães de área endêmica para calazar no município de São Luís - MA.**”. Eu discuti com a Médica Veterinária, Sofia Sousa Sales, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no atendimento neste serviço.

Data ____/____/____

Assinatura do Participante

Nome:

Endereço:

Fone:

Data ____/____/____

Assinatura do Pesquisador

Data ____/____/____

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA DE COLETA DE DADOS

RENORBIO – UEMA / COLETA ELISA

FRASCO Nº _____ Data da coleta _____ Investigadores _____

Nome do animal _____ Idade _____ Sexo _____ Peso estimado _____

Estado Geral : () Ativo / () Apático Ectoparasitas: () Pulgas / () carrapatos

Proprietário: _____ Endereço/Fone _____

Parâmetros Clínicos	Pontuação	Classificação			Observações
Estado nutricional		Normal – obeso(0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Pelagem		Bom-ótimo(0)	Regular(1)	Ruim(2)	
Unhas		Normais(0)	Aumentados(1)	Grandes(2)	
Coloração das mucosas		Róseas(0)	Rósea clara(1)	Pálidas(2)	
Lesão em mucosas		Ausentes(0)	Apenas 1 lesão(1)	2 ou + lesões (2)	
Linfonodos poplíteo		Normais (0)	Aumentados apenas um par (1)	Aumentados 2 pares (2)	
Secreção ocular		Ausente (0)	Serosa, mucosa (1)	Mucopurulenta (2)	
Total de pontos					

ANEXOS

ANEXO C - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado “**Avaliação da resposta imunológica em cães imunizados com proteína flagelar de promastigotas de *Leishmania (leishmania) amazonensis* sob modulação de *Mycobacterium bovis*, BCG, em áreas endêmicas para leishmaniose visceral no Município de São Luís – MA**” em execução pela doutoranda do Programa de Pós-Graduação do RENORBIO – Medicina Veterinária da UEMA, **Sofia Sousa Sales**, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva do Departamento de Patologia da UEMA, foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal -CEEa do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 049/2008, por atender as Normas de Bem Estar na Experimentação Animal.

São Luís, 01 de novembro de 2012

Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA
(Docente UEMA - Matrícula 9357)

ANEXO D – INFORMATIVO DE TRAMITAÇÃO DE PATENTE





UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PPG
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – NIT

PI 1003830-2

INFORMATIVO DE TRAMITAÇÃO DE PATENTE

DADOS DO DEPÓSITO DE PATENTE	
(21) Número do Processo:	PI 1003830-2
(54) Título:	"USO E FORMULAÇÕES DO ANTÍGENO IMUNOPROFILÁTICO DA FRAÇÃO FLAGELAR DE PROMASTIGOTA DE LEISHMANIA AMAZONENSIS IMUNOMODULADA COM BACILO COLMETT GUERIN (BCG) CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)"
(72) Inventores:	Sofia Sousa Sales, Ana Lúcia Abreu Silva, Kátia da Silva Calabrese, Celeste da Silva Freitas de Souza.
(71) Nome do Depositante:	Universidade Estadual do Maranhão (BR/MA)
Revista RPI nº	RPI 2111 (Por meio da Revista de Propriedade Industrial (RPI), o INPI efetua a publicidade dos atos, despachos e decisões sobre o depósito). (link para download: http://revista.inpi.gov.br/ConsultaINPI.asp).
Situação atual do pedido:	Pedido admitido, numerado, publicado na RPI 2111 e em sigilo até 21/04/2012.

PRAZOS E DATAS				
(22) Data do Depósito	(43) Data da Publicação (RPI)	Prazo de Sigilo	Vencimento da 1ª Anuidade	Requerimento de Exame
21/10/2010	21/06/2011	21/04/2012 (18 meses)	21/10/2012 (24 meses)	21/10/2013 (até 36 meses)
GRU Valor: R\$ 80,00			Valor: R\$ 100,00	Valor: 200,00

CALENDÁRIO DE ACOMPANHAMENTO DE PRAZOS																																					
Aniversários	1º											2º											3º														
Ano	2010			2011											2012											2013											
Mês nº	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Mês	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	set
Prazos*	Prazo de Sigilo																		Pag. Anuidade						Requerimento de Exame												

São Luís - MA, 25 de julho de 2011.

E – DEPÓSITO DE PEDIDO NACIONAL DE PATENTE JUNTO AO INPI



Consulta à Base de Dados do INPI

[[Pesquisa Base Marcas](#) | [Pesquisa Base Desenhos](#) | [Ajuda?](#)]

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: **PI1003830-2 A2**

(22) Data do Depósito: 21/10/2010

(57) Resumo:

(71) Nome do Depositante: Universidade Estadual do Maranhão (BR/MA)



[Leia-me antes](#)

PUBLICAÇÕES

Nº RPI	Data RPI	Despacho	Complemento do Despacho
2111	21/06/2011	2.1	

Dados atualizados até **30/10/2012** - Nº da Revista: **2182**

