

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três
espécies de *Leishmania***

Miguel Monteiro Tannus

**Uberlândia – MG
Abril – 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três
espécies de *Leishmania***

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Miguel Monteiro Tannus

Orientadora: Dra. Maria Aparecida de Souza

**Uberlândia – MG
Abril – 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três
espécies de *Leishmania***

Miguel Monteiro Tannus

Orientadora: Dra. Maria Aparecida de Souza

Homologado pela coordenação
do Curso de Ciências Biológicas
em / /2006.

Dra. Cecília Lomônaco de Paula
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Uberlândia – MG
Abril – 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três
espécies de *Leishmania***

Miguel Monteiro Tannus

Aprovado pela Banca Examinadora em: 12/04/2006

Nota: 100,0

Dra. Maria Aparecida de Souza - UFU

Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva - UFU

Msc. Flávio Hercos Rodrigues - UFU

Uberlândia, 12 de abril de 2006.

“Aos meus pais, que são a base de todas as minhas realizações.”

Agradecimentos

Agradeço à professora Dra. Maria Aparecida de Souza pela simplicidade, paciência, dedicação e amizade, sendo muito mais que uma orientadora comum e um exemplo a ser seguido em minha vida.

À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pelo auxílio em várias etapas deste trabalho, pela simpatia e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Flávio Hercos, pelas inúmeras sugestões e auxílio neste trabalho.

À Eneida César Mastrantonio, pelo auxílio, carinho e apoio dentro e fora do laboratório, nos momentos engraçados e tristes, os quais foram bem mais fáceis de superar com seus conselhos.

Ao meu pai e minha mãe, por sempre me apoiarem em minhas escolhas, e brigarem comigo nas horas certas.

Aos meus irmãos, Gabriela e Rafael, pelas gritarias e palhaçadas diárias que tornam a vida muito mais divertida.

À Dra. Janethe D. Oliveira Pena, pelas aulas durante a graduação que despertaram meu interesse pela imunologia, e por ter sido minha primeira orientadora.

À Martha R. Bonilha, pelas primeiras lições laboratoriais e por várias horas de trabalho na cultura.

Aos meus amigos do laboratório, que tornaram mais agradáveis estes dois anos de trabalho, Carla, Sandra, Fernanda, Renata, Cristiano, Alexandre, Eduardo, Camila, Ronaldo, Gabriele, Melina, Mônica e Jorge.

Aos meus amigos da Biologia, pela convivência durante estes quatro anos de curso, amizade, e sem os quais provavelmente eu não estaria me formando hoje. Principalmente às meninas do 104, Luíza, Marcela e Leticia; e aos fracassados honorários, Leozera, Dieguito, BamBam, Hugo, BlauBlau, Patureba, Neydson, Paulinha, Silvia, Dani e Rachel.

À minha família escolhida durante a vida, Anderson, Dudu, Fabiane, Silvinha e Maria, pela amizade incondicional, por agüentarem minhas chatices, e por tornarem a vida mais significativa simplesmente por participarem dela.

Aos meu cães Giba e Toffy pelo companheirismo a qualquer hora.

A todos sou eternamente grato!

Resumo

As leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, usualmente transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos. Várias espécies animais servem como reservatório deste parasito, sendo o cão (*Canis familiaris*) de grande importância na cadeia epidemiológica, devido à sua proximidade com o homem. O diagnóstico geralmente é estabelecido com base na associação entre os achados clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais, tais como: histopatológicos, pesquisa direta do parasito, sorológicos e moleculares. O objetivo do presente estudo foi verificar a reatividade sorológica de cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando o teste ELISA frente aos antígenos de três espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*). Além disto, o perfil antigênico reconhecido por soros positivos foi identificado por Immunoblotting e a associação com os sinais clínicos apresentados pelo animal foi investigada. Dos 502 soros analisados 13,15% apresentaram reatividade para o antígeno de *L. a.*, 7,60% para *L. b.* e 14,75% para *L. c.*, havendo concordância de 1,60% na reatividade com os antígenos das três espécies. As diferentes preparações antigênicas apresentaram diferenças estatisticamente significantes quanto à reatividade sorológica dos cães ($P=0,0001$). O antígeno obtido a partir de *L. braziliensis* apresentou reatividade sorológica significativamente menor quando comparado a *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente $P=0,0048$ e $P=0,0367$. O reconhecimento sorológico por immunoblotting se deu principalmente contra componente de 67kDa, provavelmente correspondente à glicoproteína Gp63. Quanto aos achados clínicos e epidemiológicos, verificou-se um aumento discreto na reatividade sorológica à *Leishmania* no grupo de cães que apresentavam hepatopatias, lesões renais ou de pele, e baixa reatividade nos soros de

animais com idade inferior a dois anos ou que eram suspeitos de Erliquiose. Houve diferenças no perfil antigênico entre as espécies de *Leishmania* analisadas, o que pode levar a diferenças na reatividade sorológica frente a estes antígenos, sendo que grande parte dos cães sorologicamente reativos provavelmente se enquadrariam no quadro de portadores assintomáticos deste parasito.

Palavras-chave: *Leishmania*, cães, reatividade sorológica, immunoblotting, sinais clínicos.

Sumario

1- Introdução	10
2- Objetivos	19
3- Materiais e Métodos	20
4- Resultados	25
5- Discussão	32
6- Conclusões	35
Referências bibliográficas	36

1 - INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), são transmitidas por picadas de fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e se manifestam de diversas formas no Velho e Novo Mundo (COX, 2002). Possuem distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, afetando 88 países, com estimativa de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas onde existe risco de infecção, e prevalência total de 12 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2004).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo silvestre no qual o homem é apenas um hospedeiro acidental das várias espécies potencialmente patogênicas (GRIMALDI; TESH, 1993). Durante seu ciclo, estes protozoários parasitas podem se apresentar de duas formas: uma presente no intestino médio de hospedeiros invertebrados, dípteros da sub-família *Phlebotominae* (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo mundo) (ROSS, 1903), que possui flagelo único, núcleo no terço médio da célula e cinetoplasto em posição mais anterior, denominada promastigota; ou outra, presente nos vacúolos parasitóforos no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado (HERWALDT, 1999), denominada amastigota, não apresenta flagelo livre, possui forma esférica, núcleo na posição central e cinetoplasto adjacente ao mesmo (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

A transmissão das leishmanioses em seu ciclo natural, ocorre por meio de vetor, no caso do Novo Mundo, dípteros fêmeas do gênero *Lutzomyia*. Esses insetos, ao se alimentarem do sangue de um hospedeiro infectado, têm seu trato digestivo colonizado por formas promastigotas, podendo ser eliminadas durante o repasto sanguíneo ao se alimentar

de outro vertebrado. Uma vez em seu novo hospedeiro, essas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos no interior dos quais se diferenciam em amastigotas, e se multiplicam reiniciando o ciclo. Segundo LEMOS et al (2001) em levantamento da fauna flebotomínea realizado no município de Uberlândia, MG, foram capturados e identificados 8657 exemplares de flebotomíneos. Foram encontrados exemplares de *Lu. intermedia* (8602), *Lu. lutziana* (10), *Lu. sallesi* (8), *Lu. whitmani* (06), *Lu. shannoni*, *Lu. termitophila*, *Lu. lenti* (03 cada), *Lu. sp* (espécie não identificada), *Lu. sordellii*, *Lu. cortelezzii* (2 cada), *Lu. renei* e *Lu. longipennis* (01 cada), *Brumptomyia sp* (14).

As leishmanioses podem manifestar-se clinicamente de várias formas dependendo da espécie do parasito envolvida, da resposta imune do hospedeiro e do flebotomíneo vetor, cuja saliva contém componentes como o maxadilán, que promovem vasodilatação local, evitam a coagulação do sangue, e induzem um perfil de resposta Th2 no local da lesão, contribuindo assim com a evolução da infecção (SACKS; KAMHAWI, 2001).

O grau de patogenicidade, tradicionalmente definido como “virulência”, é demonstrado pelo espectro clínico de sintomas causados por estes parasitos, sendo que as espécies causadoras das formas cutâneas com resolução espontânea são consideradas menos virulentas que aquelas causadoras de manifestações viscerais potencialmente fatais (CHANG; McGWIRE, 2002). É difícil porém, correlacionar as diferentes manifestações clínicas das leishmanioses com determinadas espécies do parasito, devido à complexidade taxonômica das mesmas. A tabela 1 resume as associações espécie específicas com as respectivas formas clínicas.

Tabela 1. Associação entre espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas.

Espécie	Manifestação Clínica
Subgênero <i>Leishmania</i>	
Complexo <i>L. donovani</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	Visceral
<i>Leishmania (L.) infantum</i>	Visceral
<i>Leishmania (L.) chagasi</i>	Visceral
Complexo <i>L. aethiopica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) aethiopica</i>	Cutânea difusa
<i>Leishmania (L.) garnhami</i>	Cutânea
Complexo <i>L. major</i>	
<i>Leishmania (L.) major</i>	Cutânea
Complexo <i>L. tropica</i>	
<i>Leishmania (L.) tropica</i>	Cutânea/Visceral
Complexo <i>L. mexicana</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	Cutânea
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Cutânea/Mucosa/Visceral
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i>	Cutânea
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i>	Cutânea
Subgênero <i>Viannia</i>	
Complexo <i>L. braziliensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Cutânea/Mucosa
<i>Leishmania (V.) peruviana</i>	Cutânea
<i>Leishmania (V.) colombiense</i>	Cutânea/Visceral
Complexo <i>L. guyanensis</i>	
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	Cutânea
<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	Cutânea
Não especificados	
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	Cutânea
<i>Leishmania (V.) shawi</i>	Cutânea
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	Cutânea

Adaptado de Lainson; Shaw, 1987; Brasil, 2000; Gontijo et al, 2002

A leishmaniose **cutânea**, pode apresentar-se nas formas localizada, disseminada (numerosas lesões em várias áreas do corpo) ou difusa, e caracteriza-se pela presença de úlcera com bordas elevadas, em moldura com fundo granuloso, com ou sem exsudação sanguinolenta, sendo em geral, indolores. A forma **mucosa**, é na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas primárias, surgindo geralmente meses ou anos após a

resolução destas. Com freqüência não se identifica a porta de entrada supondo-se que tais infecções sejam provenientes de infecção sub-clínica. São freqüentemente acometidas as cavidades nasais, seguida da cavidade oral, faringe e laringe. Na forma **mucocutânea** verifica-se a presença de lesões na pele e mucosas, podendo ser concomitantes, com acometimento mucoso à distancia da lesão ativa em pele, ou contíguas, com comprometimento mucoso que ocorre por extensão da lesão ativa na pele situada próxima de mucosas (WALTON, 1987). A leishmaniose **visceral** ou calazar, caracteriza-se por lesões em órgãos internos, cujos sinais clínicos e laboratoriais são: febre, perda de peso, letargia, tosse, diarréia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia periférica (REES; KAGER, 1987).

A resposta imune do hospedeiro vertebrado é determinante na evolução da infecção por *Leishmania*, que apesar de ser um parasito intracelular, tem seus antígenos apresentados preferencialmente através de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, contrastando com a utilização do MHC de classe I pela maior parte dos organismos intracelulares, como os vírus e o *Trypanosoma cruzi* (LOCKSLEY; REINER, 1995). Este fato ressalta a importância de células T CD4+ na resposta imune contra este parasito, sendo comprovado por Locksley et al (1993), os quais demonstraram que camundongos deficientes em MHC de classe II eram incapazes de resistir à infecção por *L. major*, apesar da presença de células T CD8+ normais. Em contrapartida, Wang et al (1993), demonstraram que camundongos depletados para o gene da β_2 -microglobulina que possuem células CD4+ normais, mas sem células CD8+, são capazes de curar-se do desafio com *L. major*.

As células T CD4+, ou linfócitos T “helper”, possuem um papel determinante na resposta imune, uma vez que são capazes de polarizar esta resposta para imunidade celular

(resposta Th1) ou humoral (resposta Th2) pela liberação de diferente perfil de citocinas. A ativação dos macrófagos pelas citocinas derivadas de células T é muito importante no controle da infecção e progressão da doença, uma vez que nestas células a inibição do crescimento ou destruição do parasito é mediada pela produção de óxido nítrico, a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é ativada principalmente pelo IFN- γ (GRADONI, 2001).

Em modelos experimentais murinos bem caracterizados, como o da infecção por *L. major*, foi demonstrado que linhagens resistentes, como os camundongos C57BL/6, infectados sub-cutaneamente, desenvolvem uma pequena lesão no local, que desaparece em três ou quatro semanas, coincidindo com o aparecimento de células Th1, que liberam IFN- γ , linfotóxina e IL-2 (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Em contraste, linhagens susceptíveis, como camundongos BALB/c, desenvolvem lesões de aumento progressivo no sítio de inoculação, disseminação de parasitos para o baço e morrem entre 12 e 16 semanas. A resposta imune nestes animais é caracterizada pelo aparecimento de células Th2, que liberam citocinas como IL-4 e IL-10 (HEINZEL et al., 1991). Em humanos (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998) e cães (PINELLI et al., 1994) estes parasitos podem causar infecções assintomáticas ou sintomáticas, sendo que a resposta imune protetora é também do perfil Th1.

Os métodos de diagnóstico laboratorial para as leishmanioses podem ser agrupados em: histopatológicos, pesquisa direta do parasito, sorológicos e moleculares. A análise histopatológica consiste no exame microscópico direto, sendo a forma mais simples e rápida de se fazer o diagnóstico, embora não detecte o parasito em todos os casos. O material utilizado pode ser proveniente de punção dos linfonodos que drenam a área afetada, ou da lesão, escarificação das bordas da lesão ou impressão por aposição

(“imprints” cutâneos). As lâminas devem ser então submetidas à fixação com metanol e coloração pelo Giemsa, que cora o cinetoplasto em vermelho. Os esfregaços nem sempre são satisfatórios pois, em geral, além da infecção secundária sobre as lesões, o que atrapalha a visualização, o parasito localiza-se de forma profunda no tecido. O isolamento *in vivo* e *in vitro* também pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico utilizando biópsias como material, que deve ser macerado e inoculado em animais de laboratório, preferencialmente em hamster (*Mesocricetus auratus*), ou colocado em cultura em meio líquido, preferencialmente o meio *Drosophila* de Schneider suplementado com soro fetal bovino. Para um diagnóstico positivo, observa-se, no primeiro caso, se há desenvolvimento de lesão no animal e, no segundo, se ocorre o crescimento de formas promastigotas no meio.

Entre os testes sorológicos, o teste intradérmico ou teste de Montenegro traduz a resposta de hipersensibilidade celular tardia, sendo eficaz para detecção das formas cutânea e mucosa da doença, enquanto que na forma visceral aguda, o teste é sempre negativo. Os métodos para a detecção de anticorpos circulantes mais utilizados são a imunofluorescência indireta (IFI), os imunoenzimáticos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e immunoblotting, testes rápidos de aglutinação, de fixação do complemento e aglutinação direta. Estas técnicas apresentam boa sensibilidade e especificidade, dependendo do protocolo utilizado, porém, um resultado positivo nem sempre é conclusivo de uma doença ativa, da mesma forma que cães infectados podem ser soronegativos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de diagnóstico molecular, que detecta o parasito através da amplificação de um segmento do seu DNA. Consiste na extração do DNA contido na amostra, na maioria das vezes em biópsias, e a amplificação específica de segmentos gênicos do parasito direcionada por pares de “primers”

complementares ao DNA do mesmo. Este método pode ser utilizado também na determinação da espécie envolvida, dependendo dos “primers” utilizados, como no caso do multiplex PCR, que é um método de ensaio que pode identificar três complexos de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*), tendo como alvo uma seqüência de subunidades do gene do rRNA, o qual se repete no genoma destes organismos e gera, como resultado, fragmentos diferentes para cada um dos complexos (MARFURT et al., 2003). Apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, ao redor de 100%, não é um método indicado para inquéritos epidemiológicos devido ao seu alto custo, sendo bastante utilizado como ferramenta de controle no pós-tratamento, já que a sorologia positiva pode permanecer durante vários anos após a resolução da doença. A PCR também tem se mostrado eficiente quando se deseja distinguir portadores assintomáticos dos não-infectados (INIESTA et al., 2002).

Várias espécies de animais servem como reservatórios desses protozoários, entre elas estão roedores e canídeos, e algumas espécies de marsupiais e primatas (GRIMALDI; TESH, 1993). Entre os canídeos, que atuam como reservatório de maior importância no Brasil, destacam-se as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) no ciclo silvestre e rural e o cão doméstico (*Canis familiaris*) no ciclo urbano e rural (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROF. ALEXANDRE VRANJAC, 2003). Desde 1908, quando foi relatada, pela primeira vez na Tunísia, a presença de formas promastigotas em canídeos domésticos (NICOLLE; COMTE, 1908), e no Brasil (DEANE; DEANE, 1955) quando observou-se intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará, o cão tem sido considerado como reservatório de grande importância na cadeia epidemiológica desta zoonose, devido à sua proximidade com o homem. Em estudos recentes, tem sido proposto, que os felídeos possam ser potenciais reservatórios das

leishmanioses no Brasil, devido não só ao aumento do número de casos da doença, como também à alta prevalência da infecção por *Leishmania* em gatos (*Felis catus*) de áreas endêmicas da doença (PENNISI, 2002). Em outro estudo, comprovou-se a susceptibilidade destes animais à infecção experimental por *L. (Viannia) braziliensis* (SIMÕES-MATTOS et al., 2005).

Em estudos epidemiológicos anteriores, para a leishmaniose tegumentar, na região do município de Uberlândia e Indianópolis, Afonso-Cardoso *et al* (1989) encontraram soropositividade para *L. braziliensis* em 22,52% dos cães. Anos mais tarde, Maywald (1993) obteve 8,4% de soro-reagentes para os cães do município de Uberlândia através do método de IFI. As leishmanioses caninas são patologias graves, caracterizadas pela evolução de sinais cutâneo-viscerais, que ocorrem em menos de 50% dos cães infectados (BARRAHAL et al., 1996), porém, tanto os animais sintomáticos quanto assintomáticos são infectivos para o vetor (MOLINA et al., 1994).

Há muitas discussões quanto à utilização de técnicas sorológicas como forma de diagnóstico das leishmanioses, principalmente no que se refere às medidas de controle da leishmaniose visceral baseadas na eliminação de cães soropositivos da população. Segundo alguns autores, os testes de IFI e o ELISA apresentam baixas sensibilidade e especificidade, acarretando taxas de infecções subestimadas e, conseqüentemente, permitindo a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas (DE PAULA et al., 2003, SILVA et al., 2005). Também foi demonstrado que a sensibilidade dos testes sorológicos pode se modificar de acordo com o curso da infecção (QUINNELL et al., 2001). Em contrapartida, vários trabalhos relatam sensibilidades satisfatórias quando se utiliza ELISA como teste de diagnóstico. Mettler et al. (2005), estudando cães naturalmente infetados com *Leishmania infantum*, mostrou que a utilização do antígeno total de formas promastigotas deste parasito

foi capaz de detectar 100% dos animais infectados, tanto sintomáticos quanto assintomáticos, com especificidade de 96% quando se utilizou o anticorpo secundário anti-IgG total de cão. Já o teste de imunofluorescência apresentou baixa sensibilidade em cães assintomáticos, 29,4%, mas alta em cães sintomáticos 90%, porém com 100% de especificidade.

Rosário et al. (2005), utilizando o teste ELISA para comparar antígenos totais de *L. amazonensis* e *L. chagasis*, obteve 100% e 98% de sensibilidade respectivamente e 100% de especificidade para ambos antígenos, não havendo diferença significativa nos resultados quanto à sintomatologia apresentada pelo animal.

2 – OBJETIVOS

- Padronizar o teste ELISA utilizando preparações antigênicas de diferentes espécies de *Leishmania*, para detecção de anti-corpos IgG anti-*Leishmania* em amostras de soros de cães.
- Realizar avaliação soroepidemiológica das leishmanioses, no município de Uberlândia, em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.
- Identificar o perfil de reconhecimento antigênico de diferentes espécies de *Leishmania* por amostras de soro reativas por meio de Immunoblotting.
- Verificar a associação entre a sintomatologia clínica apresentada pelo animal e a reatividade sorológica frente a antígenos de *Leishmania*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Obtenção dos parasitos

Os parasitos foram obtidos por meio de cultivo axênico de promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (isolado da região) e *L. chagasi* (UB104) em meio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, BR), 1% de antibiótico e 1% de L-glutamina (Gibco BRL-Life Technologies, New York, USA) a 25°C até atingirem a fase estacionária.

3.2 - Preparação dos antígenos

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (*L.a.*), *L. braziliensis* (*L.b.*) e *L. chagasi* (*L.c.*) foram colhidas, lavadas por centrifugação em salina balanceada de Hanks (HBSS), ressuspensos em 1ml de salina tamponada com Tris (TBS a 0,02M, pH 7,2) contendo 1,6mM de fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF) e mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram submetidos a 3 ciclos de congelamento (N₂ líquido)/descongelamento (banho-maria, 37°C) e rompidos por 3 ciclos de sonicação a 80 hertz. O lisado foi centrifugado a 20.000 x g por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi colhido, filtrado em membrana de 0,22µm e, a concentração protéica determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), e armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.3 – Amostras de soros

Amostras de soros (n = 502) foram obtidas de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU), no período de julho de 2003 a agosto de 2004. O sangue dos animais foi coletado, centrifugado por 10 min a 1000 x g, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Das 502 amostras de soros coletadas, 183 foram escolhidas aleatoriamente e suas fichas clínicas analisadas quanto à sintomatologia e alterações nos exames laboratoriais apresentadas durante a consulta. Esses animais foram agrupados de acordo com a presença de: hepatopatia (n = 81), lesões renais (n = 70), lesões de pele (n = 37), anemia (n = 69), presença de ectoparasitas (n = 30), erliquiose negativa, suspeita e confirmada (n = 105, n = 48 e n = 16 respectivamente), e idade menores de 2 anos (n = 51), entre 2 e 10 anos (n = 81) e mais de 10 anos (n = 26).

3.4 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Placas de poliestireno (Montegrotto Terme, Padova, Italy), com 96 poços foram sensibilizadas separadamente com 50µl/poço de antígeno de *Leishmania* (L.a., L.b. e L.c.) em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida e, em seguida, lavadas com salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). As amostras de soro foram adicionadas (50µl/poço, em duplicata), Após incubação por 45 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas, e o conjugado imunoenzimático (anticorpo policlonal de coelho anti-IgG de cão ligado à peroxidase) diluído em PBS-T foi adicionado (50µl/poço) e

posteriormente incubados por 45 minutos a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, sendo adicionado o substrato enzimático (peridrol em tampão citrato de sódio/acido cítrico, pH 5,0 contendo orto-fenilenodiamina (OPD), 50µl/poço). Após o desenvolvimento da reação cromógena por 15 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura em densidade óptica efetuada em leitor de microplacas a 492nm.

3.4.1 – Padronização

Para a padronização da reação de ELISA, as placas de ELISA foram sensibilizadas com os antígenos produzidos em diferentes diluições, 1:500 e 1:1000, e, em seguida, utilizadas amostras de soro de cães controle positivos e negativos. Essas amostras foram utilizadas nas seguintes diluições: 1:100, 1:200 e 1:500. E o conjugado imunoenzimático, foi avaliado nas diluições 1:2000 e 1:3000. Os reagentes foram diluídos em PBS-T ou PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) (PBS-TM), com função bloqueadora. As diluições ótimas foram estabelecidas, quando houve melhor discriminação, ou seja, quando a diferença entre a média dos padrões reagentes e não-reagentes foi maior, com ou sem a utilização da solução bloqueadora.

3.4.2 - Aplicação do teste ELISA

Foram avaliadas 502 amostras de soro de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, por teste ELISA. A reação foi conduzida como descrito acima e os antígenos de L.a., L.b. e L.c, utilizados para sensibilizar as placas nas seguintes diluições 1:1000, 1:500 e 1:1000, respectivamente, em tampão carbonato. As amostras de soros e o conjugado imunoenzimático, foram diluídos a

1:200 e 1:3000, respectivamente, em PBS-T. Os resultados foram expressos por índice ELISA (IE), calculado pela fórmula $IE = (S - B)/(Cut\ off)$, onde S é a média dos valores da densidade óptica em cada amostra, B corresponde à média dos valores da densidade óptica do controle sem a adição do anticorpo primário e o “cut off” foi calculado como a média dos valores de densidade óptica dos controles negativos acrescida de cinco desvios padrões, que consistem na raiz quadrada da variância desta mesma amostra. Amostras com $IE \geq 1,000$ foram consideradas reativas.

3.5 - Análise eletroforética

Os antígenos foram analisados quanto ao perfil protéico por eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida a 5-20%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1%, conforme descrito por Laemmli (1970). O peso molecular aparente foi determinado utilizando como parâmetros proteínas de peso molecular conhecido (IgG de coelho, 150 kDa; albumina, 67 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; e inibidor da tripsina, 20 kDa).

3.6 - Immunoblotting

Após a separação eletroforética, os componentes protéicos de *L. amazonensis* foram transferidos para membrana de nitrocelulose, utilizando sistema de transferência úmido (Bio-Rad, EUA), de acordo com Towbin et al. (1979). As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras longitudinais com 3 a 4mm, e colocadas em placas de immunoblotting contendo solução bloqueadora (PBS-Tween a 0,005% contendo leite em pó desnatado [PBS-TM] a 5%) por duas horas a temperatura ambiente, e então lavadas com PBS-TM a 1%. Os soros reativos no teste ELISA, com antígeno de L.a., foram então

diluídos a 1:200 em PBS-TM a 1%, adicionados às placas, e incubados por 18h a 4°C. Após 6 ciclos de lavagem com PBS-T por 5 min cada, as tiras foram incubadas com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cão, marcado com peroxidase) na diluição de 1:2000, em PBS-TM, por 2h a temperatura ambiente. Seguiu-se nova lavagem com PBS-TM a 1% e revelação com solução cromógena/substrato, contendo 2.5mg de DAB (diaminobenzidina) em 15ml de PBS e 225µl de peridrol a 30%. A reação foi interrompida após 5min, por sucessivas lavagens com água destilada.

3.7 – Análise Estatística

Para a análise estatística utilizou-se o programa GraphPad (Versão 3.0, San Diego, California, USA, Foi utilizado o teste ANOVA, não paramétrico, para verificar a diferença estatística nos resultados obtidos com a utilização das diferentes preparações antigênicas. E o teste *t* de Student para comparar a reatividade das preparações antigênicas duas a duas. Em todos os testes, foi estabelecido $p < 0,05$ como nível para a rejeição da hipótese de nulidade.

4 – RESULTADOS

4.1 – Análise eletroforética

Foram observadas diferenças no perfil eletroforético dos antígenos preparados a partir das três espécies de *Leishmania* utilizadas (Figura 1). Em *Leishmania amazonensis* (L.a.) ficou evidente a presença de componentes de peso molecular aparente de 67 kDa e peptídeos na faixa de 25 a 38 kDa (Figura 1, pista 1). Para *Leishmania braziliensis* (L.b.) foram mais evidentes peptídeos de 25, 42, 49, 57 e 67 kDa (figura 1, pista 2). Já *Leishmania chagasi* (L.c.) apresentou componentes de alto peso molecular aparente, variando de 98 a 250 kDa, e proteínas de 39 a 60 kDa. Além dessas foi evidente a presença de uma proteína de baixo peso (8 kDa) (figura 1, pista 3).

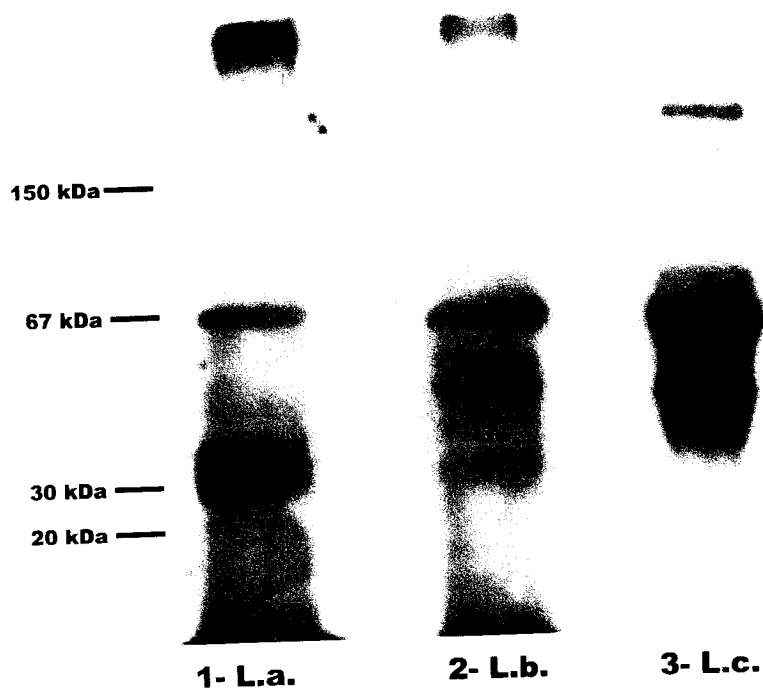


Figura 1 – Análise do perfil eletroforético dos antígenos obtidos a partir de diferentes espécies de *Leishmania*. Pista 1 antígeno de *L. amazonensis* (L.a.), pista 2 antígeno de *L. braziliensis* (L.b.) e pista 3 antígeno de *L. chagasi* (L.c.).

4.2 – Padronização do teste ELISA

Para a padronização do ELISA, diluições diferentes dos antígenos, soros e do conjugado anti-IgG de cão foram testadas com soros controles positivos e negativos. Considerou-se diluição ótima, aquela que melhor diferenciou os soros reagentes dos não reagentes. Sendo que para os antígenos de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, a diluição ótima foi de 1:1000, e para *L. braziliensis*, 1:500. A diluição ótima do soro e do conjugado foram 1:200 e 1:3000, respectivamente (Dados não mostrados).

4.3 – Resultado do teste ELISA

Das 502 amostras analisadas 13,15% apresentaram reatividade com antígeno de *L. amazonensis* (L.a.), 7,60% para *L. braziliensis* (L.b.) e 14,75% para *L. chagasi* (L.c.). Houve concordância de 1,60% na reatividade com os antígenos das três espécies de *Leishmania* (L.a., L.b. e L.c.). A distribuição das amostras está apresentado na Figura 2A. Os valores mínimos, máximos, a mediana e a média obtidos com a utilização de cada preparação antigênica estão apresentados na Tabela 2. No entanto, a maioria das amostras se concentraram entre 0 e 1, como demonstrado na Figura 2 B.

Tabela 2. Valores de índice ELISA (IE) mínimos, máximos, média e mediana, obtidos com a utilização de cada antígeno de *Leishmania*, frente aos soros de cães.

	Mínimo	Mediana	Máximo	Média
<i>L. amazonensis</i>	0.000	0.2285	6.653	0.4822
<i>L. braziliensis</i>	0.000	0.1990	3.079	0.3126
<i>L. chagasi</i>	0.000	0.2070	11.180	0.5847

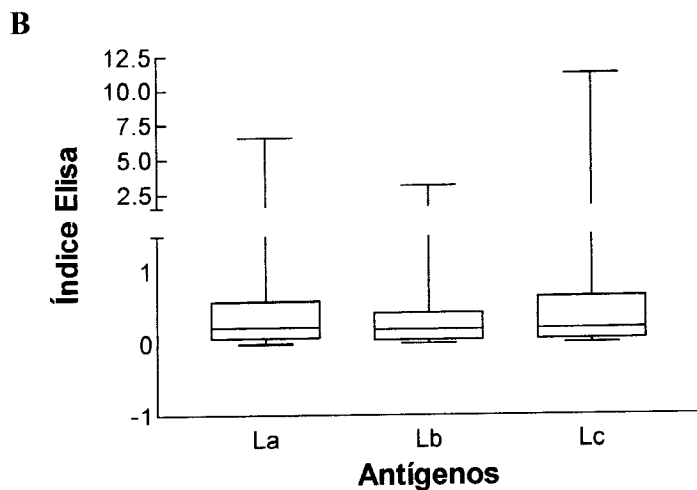
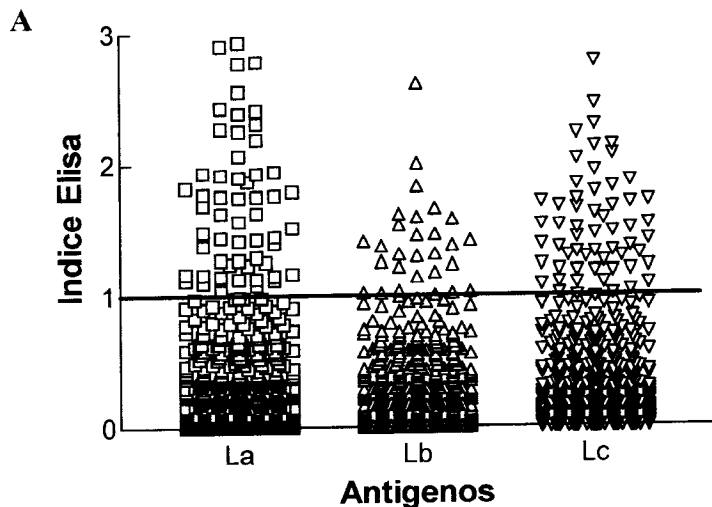


Figura 2 – (A) Valores de índice ELISA (IE) das amostras de soro de cães testados frente a diferentes preparações antigênicas obtidas a partir de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) e *L. chagasi* (Lc). São consideradas positivas as amostras com IE maior ou igual a 1. **(B)** Valores de IE das amostras de soros de cães, mostrando a áreas de concentração de 50% dos dados plotados, mínimos e máximos frente a cada preparação antigênica. O traço médio representa a mediana.

As diferentes preparações antigênicas foram avaliadas estatisticamente conforme sua reatividade frente às amostras de soros, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, sendo que houve diferença significativa entre elas ($P=0,0001$). Também foram avaliadas aos pares, pelo teste de Mann-Whitney, de modo que o antígeno obtido a partir de *L. braziliensis* apresentou reatividade significativamente menor quando comparado a *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente $p=0,0048$ e $p=0,0367$. Quando comparados, os antígenos de *L.a.* e *L.c.*, não apresentaram diferença significativa ($p=0,5229$) na reatividade sorológica de cães.

4.4 – Associação entre os sinais clínicos e a reatividade sorológica

Pela análise da reatividade sorológica, agrupada segundo os sinais clínicos e a idade, observou-se uma reatividade aumentada em cães que apresentavam lesões renais e hepatopatia para os três antígenos. Com a utilização do antígeno de *L. chagasi*, observou-se uma maior reatividade em cães que apresentavam lesões de pele. Quando agrupados de acordo com diagnóstico positivo para erliquiose, confirmada pela visualização do parasito no esfregaço sanguíneo, houve menor reatividade em relação ao valor total, o que foi observado também para o grupo que apresentava sinal de anemia (Figura 3A).

Cães com idade inferior a dois anos apresentaram baixa reatividade sorológica, e quando se observou a curva de reatividade relacionada à idade dos animais, o antígeno de *L. braziliensis* apresentou curva crescente de reatividade, diretamente proporcional à idade dos animais (Figura 3B).

A

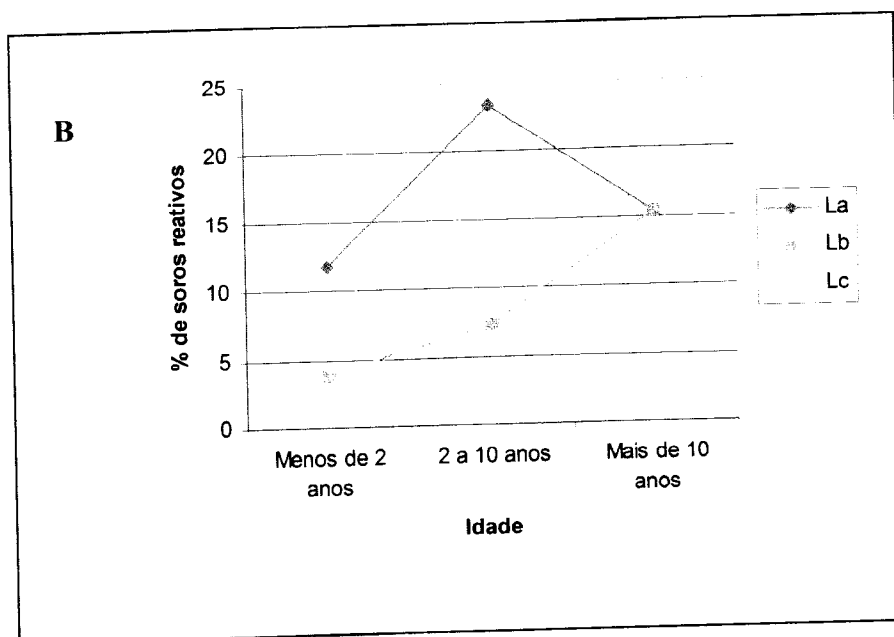
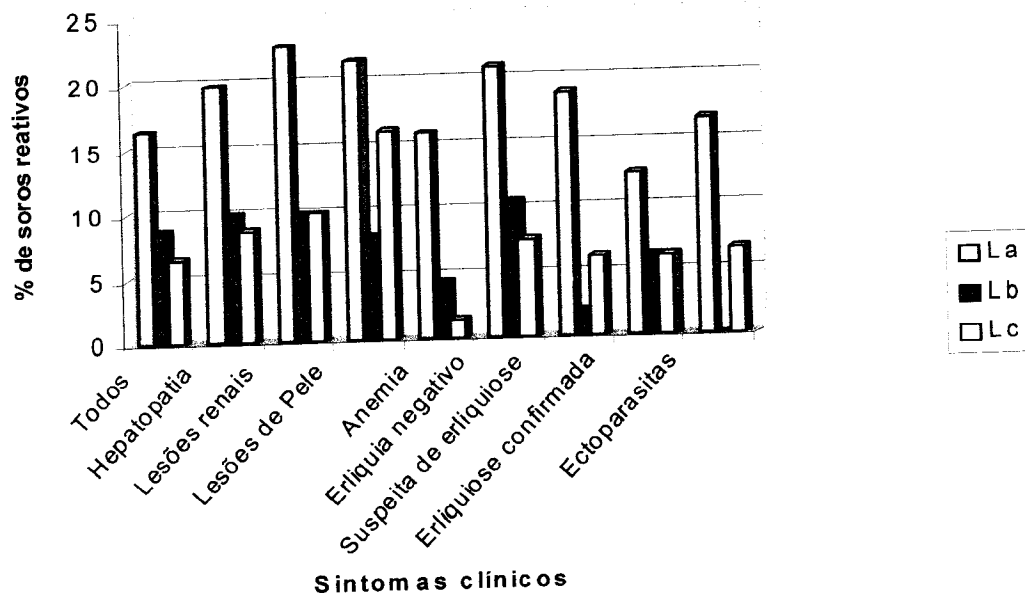


Figura 3 – Associação entre os sinais clínicos (A) ou a idade (B) apresentada pelo animal e a porcentagem de soros reativos frente a antígenos de *L. amazonensis* (L.a.), *L. braziliensis* (L.b.) e *L. chagasi* (L.c.).

4.5 – Immunoblotting

O soro controle positivo mostrou amplo padrão de reconhecimento de antígenos de *L. amazonensis*, principalmente com o peptídeo de 67 kDa, e com peptídeos acima e abaixo de 67 kDa (Figura 4A, pista 10 e Figura 4B, pista 1). O soro controle negativo, com índice Elisa menor que 1, não mostrando qualquer reatividade sorológica (Figura 4A, pista 3 e Figura 4B, pista 2).

Todas as amostras reativas com L.a. no ELISA foram testadas por immunoblotting e reconheceram predominantemente o peptídeo imunodominante (67 kDa) desta espécie de *Leishmania* (Figura 4). No entanto, cinco amostras reativas no ELISA não apresentaram reatividade no immunoblotting (Figura 4B, pistas 3 e 5-8). Além da fração de 67 kDa, o soro de número 394 mostrou um perfil de reconhecimento semelhante ao padrão positivo (Figura 4, pista 02).

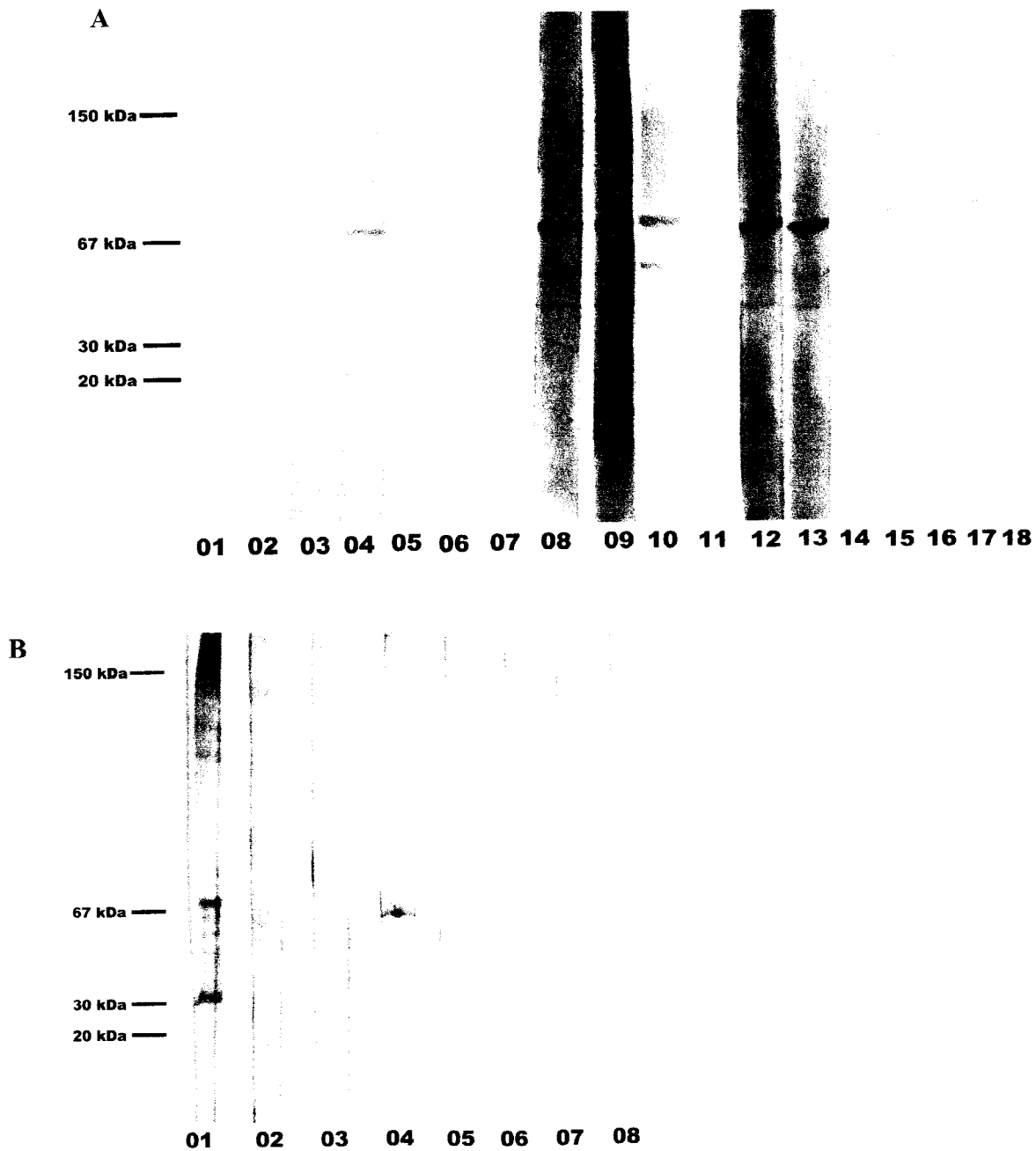


Figura 4 – Análise do perfil de reconhecimento antigênico por amostras representativas de soros de cães com índice Elisa maior que 1, frente ao antígeno de *L. amazonensis*. **(A)** Na pista 10 o controle positivo, soro de um cão com leishmaniose ativa, e na pista 3, o controle negativo, amostra de soro de cão com índice Elisa menor que 1. **(B)** Pista 1 controle positivo, pista 2 controle negativo.

5 – DISCUSSÃO

Neste estudo, foi observado por eletroforese um perfil proteico único para cada antígeno obtidos a partir de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, concordando com os resultados obtidos para *L. a.* e *L. c.* por Kutner et al. (1991).

A maior reatividade sorológica observada frente a antígenos de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em relação a *L. braziliensis*, pode ser devido a uma maior expressão de moléculas imunogênicas pelas mesmas. Segundo um modelo hipotético de virulência para as várias espécies de *Leishmania*, proposto por Chang e McGwire (2002), a maior patogenicidade de espécies mais virulentas estaria associada a uma maior expressão quantitativa e/ou qualitativa de moléculas envolvidas nos processos de invasão celular e evasão do sistema imune, e de determinantes patoantigênicos capazes de provocar uma forte imunidade humoral no hospedeiro vertebrado.

A menor reatividade dos soros de cães com idade inferior a dois anos sugere que o menor tempo de vida possa refletir em uma menor exposição aos parasitos do gênero *Leishmania*, assim como a outros que poderiam apresentar reatividade cruzada com frações dos antígenos utilizados. Para o antígeno preparado a partir de *L. braziliensis*, proveniente de um isolado humano da região, uma curva crescente de reatividade em função da idade foi observada, possivelmente pelo maior risco de exposição em função do tempo. Já para os antígenos de *L. chagasi* e *L. amazonensis*, observou-se maior reatividade em cães com idades entre 2 e 10 anos, e uma queda da mesma em animais com mais de 10 anos. Supõe-se que isso se deva à presença de reatividade cruzada entre estes antígenos e outros parasitas desta sub-população.

A suspeita inicial da existência de reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* sp. e *Ehrlichia canis*, que tem alta prevalência na região, não foi sustentada, devido à baixa reatividade sorológica ante-*Leishmania* nos animais clinicamente suspeitos de erliquiose e diminuição acentuada no grupo de cães com doença confirmada. Vários autores, pesquisando reatividade cruzada entre estes dois patógenos, mostraram que há reatividade cruzada entre as diferentes espécies de *Ehrlichia*, porém não entre *Ehrlichia* sp. e *Leishmania* sp. (BANETH et al., 1998; MANCIANTI et al., 1996; LLERA et al., 2002). Este fato, possivelmente, também explica a baixa reatividade em animais que apresentavam sinal de anemia, comumente observada nos cães positivos para erliquiose. No entanto, anticorpos contra *E. canis* podem coexistir com anticorpos contra *L. infantum*, como mostrado por Llera et al., (2002), em 4% dos cães analisados.

Nesse trabalho, a observação de aumento discreto na reatividade em soros de animais que apresentavam hepatopatia e lesões renais, sugere a presença de infecções subclínicas por protozoários do gênero *Leishmania* ou, então, reatividade cruzada com outros parasitos. Supostamente, esta reatividade cruzada, pode ser atribuída à *Babesia canis*, que além de provocar lesões hepáticas e renais, tem sido descrita como possível fonte de reatividade cruzada com *Leishmania* sp. (MANCIANTI et al., 1996; ROSARIO et al., 2005).

No presente trabalho, o immunoblotting utilizando o antígeno de *L. amazonensis* demonstrou o reconhecimento de vários polipeptídeos pelo soro controle positivo e pelo soro 394, sendo que padrão semelhante foi exibido por soros de cães sintomáticos, com altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (CARRERA et al., 1996; RIERA et al., 1999). McGwire et al., (2002) demonstraram que os soros de animais assintomáticos reconheceram preferencialmente uma fração de aproximadamente 67kDa, provavelmente

correspondente à gp63, uma proteína imunodominante especialmente abundante na superfície de formas promastigotas (McGWIRE et al., 2002).

Em um estudo envolvendo cães sintomáticos, assintomáticos e tratados, Fernández-Pérez et al., (2003), demonstraram por immunoblotting, diferenças no padrão de reconhecimento de antígenos de *L. infantum* por estes grupos de cães. Porém, os cães sintomáticos mostraram um perfil de reconhecimento bastante amplo, ao contrário dos cães assintomáticos que não reconheceram nenhum polipeptídeo ou apenas algumas frações, sendo que o mais comum foi o reconhecimento de uma proteína de peso molecular aparente de 67kDa, semelhante ao que foi encontrado neste estudo utilizando antígeno de *L. amazonensis*. Esta proteína é expressa por várias espécies de *Leishmania* (BOUVIER et al., 1987), o que sugere que a maioria dos cães, no presente estudo, que apresentaram reatividade frente aos antígenos deste parasito, poderiam ser enquadrados no quadro de portadores assintomáticos, por exibirem reatividade sorológica anti-*Leishmania*, um padrão de reconhecimento antigênico semelhante, e ausência de sinais clínicos associados às leishmanioses.

6 – CONCLUSÕES

- Houve diferenças no perfil antigênico entre as espécies de *Leishmania* analisadas, o que pode levar a diferenças na reatividade sorológica frente a estes antígenos.
- Sinais clínico-patológicos como hepatopatia, lesões renais e de pele parecem estar associadas à reatividade sorológica frente a antígenos de *Leishmania*.
- Grande parte dos cães sorologicamente reativos poderiam ser classificados como portadores assintomáticos, por apresentarem perfil de reconhecimento antigênico semelhante a outros trabalhos e ausência de sintomas característicos das leishmanioses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO-CARDOSO, S. R.; MACHADO, M. I.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M. R. F.; STUTZ, W. H.; Leishmaniose Tegumentar Canina no município de Uberlândia, Minas Gerais – Diagnóstico clínico e sorológico de cães naturalmente infectados. **Rev. Centro Ci. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia**, v.5, n.1, p14-21, 1989.
- BANETH, G.; SHKAP, V.; SAMISH, M.; PIPANO, E.; SAVITSKY, I.; Antibody response to *Hepatosoon canis* in experimentally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 299-305, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, 2000, 62p.
- BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 273-277, 1996.
- BOUVIER, J.; ETGES, R.; BORDIER, C.; Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 24, n. 1, p. 73-77, 1987.
- CARRERA, L.; FERMIN, M.L.; TESOIRO, M.; GARCÍA, P.; ROLLÁN, E.; GONZÁLEZ, J.L.; MÉNDEZ, S.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J.M.; Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. **Exp. Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 139-146, 1996.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROF. ALEXANDRE VRANJAC, SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, COORDENAÇÃO DO PROGRAMA ESTADUAL DST/AIDS, INSTITUTO PASTEUR. **II Informe técnico: Leishmaniose Visceral Americana**, 48p, 2003.
- CHANG, K.P.; MCGWIRE, B.S.; Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2002. Disponível em: <<http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/1>>. Acessado em: 20 mar. 2005.
- COX, F. E. G.; History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-612, 2002.

DE PAULA, A.A.; DA SILVA, A.V.M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M.; The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 832-836, 2003.

DEANE, C.; DEANE, M.P.; Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, v. 48, p. 61-70, 1955.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.J.; GÓMES-MUÑOZ, M.T., MÉNDEZ, S., ALUNDA, J.M.; *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. **Acta Tropica**, v. 86, n. 1, p. 83-91, 2003.

GONTIJO, C.M.; DA SILVA, E.S.; DE FUCCIO, M.B.; DE SOUSA, M.C.; PACHECO, R.S.; DIAS, E.S.; ANDRATE FILHO, J.D.; BRAZIL, R.P.; MELO, M.N.; Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhona Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 143-150, 2002.

GRADONI, L.; An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1-2, p. 87-103, 2001.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B.; Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; MUTHA, S.S.; LOCKSLEY, R.M.; Production of interferon- α , IL-2, IL-4 and IL-10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 16, p. 7011-7015, 1991.

HERWALDT, B. L.; Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191, 1999.

KUTNER, K.; PELLERIN, P.; BRENIERE, S.F.; DESJEUX, P.; DEDET, J.P.; Antigenic Specificity of the 72-Kilodalton Major Surface Glycoprotein of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 595-599, 1991.

INIESTA, L.; FERNÁNDES-BARREDO, S.; BULLE, B.; GÓMEZ, M.T.; PIARRROUX, R.; GÁLLECO, M.; ALUNDA, J.; PORTÚS, M.; Diagnostic Techniques to Detect Cryptic Leishmaniasis in Dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1137-1141, 2002.

LAEMMLI, U.K.; **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- LAISON, R.; SHAW, J.J.; Leishmaniasis in the New World: Taxonomic Problems. **Br. Med. Bull.**, v. 28, p. 44-88, 1972.
- LEMOS, J.; C.; LIMA, S.; C.; COSTA, M.; B.; MAGALHÃES, M.; J. Leishmaniose Tegumentar Americana: Fauna Flebotomínica em Áreas de Transmissão no Município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 2, n. 3, p. 57-73, 2001.
- LLERA, J.L.G.; GARCIA, M.L.L.; REINOSO, E.M., GONZÁLEZ, R.V.; Diferencial serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 185-190, 2002.
- LOCKSLEY, R.M.; REINER, S.L.; Murine Leishmaniasis and the regulation of CD4+ Cell Development. In: BOOTHROYD, J.C., KOMUNIECKI, R., **Molecular approaches to Parasitology**. New York: Wiley-Liss, p. 455-466, 1995.
- LOCKSLEY, R.M.; REINER, S.L.; HATAM, F.; LITTMAN, D.R.; KILLEN, N.; Helper T cells without CD4: Control of Leishmaniasis in CD4-deficient mice. **Science**, v. 261, p. 1448-1451, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A.; Evaluation of dog enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with the indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.
- MARFURT, J.; NERDERWIESER, I.; MAKIA, N.D.; BECK, H.; FELGER, I.; Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 115-124, 2003.
- MAYWALD, P. G. **Aspectos bioecológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba: o surto do Rio Araguari-1987**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 66p, 1993.
- McGWIRE, B.S.; O'CONNELL, W.A.; CHANG, K.P.; ENGMAN, D.M.; Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of (GPI) phospholipolysis. **Journal of Biol. Chem.**, v. 277, n. 11, p. 8802-8809, 2002.

- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P.; Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.
- MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLES, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J.; Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.
- MOLYNEUX, D.; KILLICK-KENDRICK, R.; Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Florida: Academic, v. 1, p. 121-168, 1987.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.M.L.; Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- NICOLLE, C.; COMTE, C.; Origine du Kala-Azar. **CRL' Academy Sciences**, p. 146-789, 1908.
- PENNISI, M.G.; A high prevalence of feline leishmanioses in southern Italy. In: International Canine Leishmaniasis Forum, 2., 2002, Sevilla. Proceedings.. **Sevilla: Intervet**, p. 39-48, 2002.
- 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, n. 1, p. 229-235, 1994.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C.; Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 253-261, 2001.
- REES, P.H.; KAGER, P.A.; Visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Florida: Academic, v. 2, p. 637-661, 1987.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA., H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M.; Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143-148, 1998.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E.; GÁLLEGO, M.; AÍSA, M.J.; CASTILLEJO, S.; FISA, R.; RIBAS, N., CARRIÓ, J.; ALBEROLA, J.; ARBOIX, M.; Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 1-2, p. 33-47, 1999.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M.; Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSS, R.; Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on *Leishmania*'s bodies. **BMJ**, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SACKS, D., KAMHAWI, S. Molecular aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; BEVILAQUA, C.M.L.; PRATA-JÚNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, Z.C.B.; COELHO, I.C.B.; BARRAL, A.; POMPEU, M.M.L.; The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 199-208, 2005.

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**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J.; Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

WALTON, B.C.; American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Florida: Academic, v. 2, p. 637-661, 1987.

WANG, Z.E.; REINER, S.L.; HATAM, F.; HEINZEL, F.P.; BOUVIER, J.; TURK, C.W.; LOCKSLEY, R.M.; Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-

microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 4, p. 2077-2086, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Report of the scientific working group meeting on Leishmaniasis**, Geneva: World Health Organization: 2004 (TDR/SWG/04)