

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SEQÜENCIAMENTO DE DNA E IMUNOISTOQUÍMICA  
RENAL PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* sp EM CÃES**

**Maria de Jesus Veloso Soares**

Médica Veterinária

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SEQÜENCIAMENTO DE DNA E IMUNOISTOQUÍMICA  
RENAL PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* sp EM CÃES**

**Maria de Jesus Veloso Soares**

**Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária).

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2007

S676s Soares, Maria de Jesus Veloso  
Seqüenciamento de DNA e imunoistoquímica renal para a  
detecção de *Leishmania* sp em cães / Maria de Jesus Veloso Soares.  
-- Jaboticabal, 2007  
xix, 67 f.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Banca examinadora: Ana Maria Ferreira Roselino, Angela Cleusa  
de Fátima Banzatto de Carvalho, Carlos Noriyuki Kaneto, Gilson  
Pereira de Oliveira

Bibliografia

1. Imunoistoquímica. 2. *Leishmania*. 3. PCR-RFLP.

I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:616.993.161: 636.7

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** SEQÜENCIAMENTO DE DNA E IMUNOISTOQUÍMICA RENAL PARA  
DETECÇÃO DE *Leishmania sp* EM CÃES

**AUTORA:** MARIA DE JESUS VELOSO SOARES

**ORIENTADORA:** Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA  
VETERINÁRIA área de PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

*Julieta Rodini de Moraes*

Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

*Ana Maria Ferreira Roselino*

Dra. ANA MARIA FERREIRA ROSELINO

*Carvalho*

Dra. ANGELA CLEUSA DE FÁTIMA BANZATTO DE CARVALHO

*Carlos Noriyuki Kaneto*

Dr. CARLOS NORIYUKI KANETO

*Gilson Pereira de Oliveira*

Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

Data da realização: 24 de maio de 2007.

*Julieta Rodini de Moraes*

Presidente da Comissão Examinadora

Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARIA DE JESUS VELOSO SOARES** – natural de Teresina-PI, nascida em 27 de outubro de 1970, cursou graduação em Medicina Veterinária entre 1991 e 1996, na Universidade Federal do Piauí. Em seguida, trabalhou em clínica veterinária. Em 1999, foi selecionada em concurso público na Escola Superior de Agricultura de Mossoró-RN como professora substituta e lecionou as disciplinas Clínica Médica Veterinária I e Prática Hospitalar durante dois anos consecutivos. Realizou, entre 2001 e 2003, o curso de mestrado em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Campus de Jaboticabal. Deu continuidade ao estudo, cursando o doutorado em Medicina Veterinária – área de concentração em Patologia Veterinária, nesta mesma instituição de ensino, concluindo-o em maio de 2007.

Não fostes vós que me escolhestes,  
Fui eu que vos escolhi  
Para irdes e produzirdes fruto  
E para que o vosso fruto permaneça,  
A fim de que tudo o que pedirdes  
Ao PAI em meu nome, ele vos dê.  
Isto vos mando: Amai-vos uns aos outros.

(Jesus Cristo)

João 15,16-17

*Dedico à minha família grande, unida e sempre presente na minha vida. Agradeço a meus pais Jurandy e Emília, a meus irmãos Maria Veloso (Maninha), José Veloso (Dedé), Kátia, Júnior, Layna e Emílinha e aos meus sobrinhos Denise, Guilherme, Jéssica e Jésley pelo amor, pelo apoio, pela força e pela torcida nessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes (FCAV-Unesp) por ter aceitado orientar-me e permitido a realização deste sonho.

À professora Dra. Ana Maria Ferreira Roselino (FMRP-USP) por colaborar imensamente nesta pesquisa, pelas sugestões, pelas “portas abertas” do seu laboratório permitindo o meu desenvolvimento na área de biologia molecular.

À Sandra Rodrigues (FMRP-USP) por ter colaborado muito nesta pesquisa e por ensinar pacientemente diversos conhecimentos na área de biologia molecular.

À professora Dra. Ivete Mendonça e ao biólogo Jadson (UFPI) por terem doado cultura de *Leishmania*.

Ao professor Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior (IMT-FM-USP) por gentilmente ter doado o anticorpo primário anti-*Leishmania*.

À Dra. Carla Pagliari e equipe do laboratório (IMT-FM-USP) pela colaboração e gentileza na realização das reações imunoistoquímicas.

À professora Dra. Mirela Tinucci Costa (FCAV-Unesp) e à colega de pós-graduação Ana Carolina por terem ensinado-me os primeiros passos em imunoistoquímica.

Ao professor Dr. Gener Tadeu (FCAV-Unesp) pela paciência e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao médico veterinário Fernando Luiz Lima de Oliveira, do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina-PI, pela colaboração neste estudo.

À companhia agradável dos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (FMRP-USP) Maria José, Stella, Andrezza, Olívia, Renata Simões, Maria Fernanda, Isabela, Janaína, Erick, Daniel, Gustavo e Luís Otávio.

À amiga Angela Akamatsu, quem me deu muito apoio numa fase difícil. Agradeço a companhia saudável.



Aos amigos Luís Guilherme, Rute Chamié, Ricardo, Gaby, Adriana, Gisela e Mauro pela amizade, pelo apoio, pela simpatia, pela companhia.

Ao meu amigo Júlio, por ser uma pessoa agradabilíssima, pela simpatia, pela alegria.

À Moema, secretária da Patologia Veterinária (FCAV-Unesp), pela simpatia, pela colaboração, pelas conversas agradáveis.

À colega de pós-graduação Ana Sílvia, sempre muito prestativa.

À Fabiana Rizzi Bozzo, pela amizade, pelo apoio num momento importante.

Aos colegas da Patologia Veterinária (FCAV-Unesp), Lígia, Daniel, Patrícia, Trícia, Cristiane, Geórgia, Gisele e Marina.

À equipe de apoio do Departamento de Patologia Veterinária, Tel, Edgar, João e dona Isaura.

Às técnicas Lia e Chica, pela confecção das lâminas de imunoistoquímica.

À equipe da biblioteca (FCAV-Unesp) Tieko, Cristiane, Ana Sílvia, Mabel e aos demais.

Aos professores doutores Kaneto, Gilson, Rosemeri, Ângela, Marileda e Isaura, pelas correções e sugestões.

À Dra. Karina Cestari e ao Dr. Wolme, pela ajuda em momentos importantes.

A todos vocês o reconhecimento da importância nesta jornada e o agradecimento sincero.

## **AGRADECIMENTOS ÀS ENTIDADES**

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e reserva técnica, permitindo assim o desenvolvimento deste projeto.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp-Jaboticabal, pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Teresina-PI, por ter doado os animais para este estudo.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, pela parceria no desenvolvimento deste projeto.

Ao Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina-USP-São Paulo, pela oportunidade de acréscimo ao meu aprendizado técnico-científico na área de imunistoquímica.

Ao Laboratório de Sanidade Animal (UFPI), por ter contribuído neste estudo.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xvi
RESUMO .....	xvii
SUMMARY .....	xix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
- Considerações gerais .....	5
- Características do protozoário .....	7
- Situação epidemiológica da leishmaniose visceral .....	7
- Ciclo biológico da <i>Leishmania chagasi</i> .....	10
- Técnicas diagnósticas .....	11
- Patologia da leishmaniose visceral .....	12
- Envolvimento renal na leishmaniose visceral .....	14
- Imunoistoquímica na detecção de <i>Leishmania</i> .....	17
- Biologia Molecular e Leishmaniose .....	17
3 OBJETIVOS .....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 Animais .....	24
4.2 Coleta de amostras .....	24
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	24
- Extração de DNA de tecidos .....	24
- Extração de DNA de cultura de <i>Leishmania</i> .....	25
- Concentração de DNA .....	25

- Amplificação do DNA .....	26
- Eletroforese em gel de agarose .....	26
4.4 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) .....	27
- Concentração de DNA da PCR .....	27
- Incubação com Hae III .....	27
- Incubação com Rsa I .....	27
- Incubação com Bsr I .....	27
- Eletroforese em gel de acrilamida .....	28
4.5 Seqüenciamento de DNA .....	28
- Amplificação do produto da PCR .....	28
- Precipitação da reação de seqüenciamento .....	29
- Seqüenciamento .....	29
- Edição e alinhamento das seqüências .....	29
4.6 Imunoistoquímica .....	30
- Bloqueio de peroxidase endógena .....	30
- Recuperação antigênica .....	30
- Bloqueio de biotina endógena e reações inespecíficas .....	30
- Adição de anticorpos .....	30
- Revelação, contracoloração e montagem das lâminas .....	31
4.7 Estatística .....	31
5 RESULTADOS .....	32
5.1 Exames subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina .....	33
5.2 PCR-RFLP .....	37
5.3 Seqüenciamento de DNA .....	41
5.4 Imunoistoquímica .....	43
6 DISCUSSÃO .....	45
7 CONCLUSÕES .....	50
8 REFERÊNCIAS .....	52
APÊNDICE .....	65

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, com produtos amplificados (120 bp) a partir de <i>primers</i> específicos para o gênero <i>Leishmania</i>. A. controle negativo; B. amostra de linfonodo do animal 3; C. amostra de linfonodo do animal 7; D. amostra de baço do animal 17; E. amostra de rim do animal 17; F. amostra de cultura de <i>Leishmania chagasi</i>; G amostra de cultura de <i>Leishmania amazonensis</i>; H. amostra de cultura de <i>Leishmania braziliensis</i>; I. marcador de peso molecular de 100bp .....</p>	36
<p>Figura 2. Gel de acrilamida 10% após digestão enzimática com Hae III. 1. amostra de linfonodo de cão, positivo para <i>Leishmania chagasi</i>; 2. amostra de cultura de <i>L. chagasi</i>. 3. marcador de peso molecular 10 bp; 4. amostra de cultura de <i>L. amazonensis</i>; 5. amostra de cultura de <i>L. braziliensis</i> .....</p>	38
<p>Figura 3. Gel de acrilamida 10% após digestão enzimática com Hae III, de PCRs de amostras de DNA de diferentes animais (3, 7, 8, 9, 12 e 17) e tecidos: linfonodo (l) baço (b) e rim (r). 10bp. Marcador de peso molecular .....</p>	39
<p>Figura 4. Gel de acrilamida 10% após digestão enzimática com Rsa I, Bsr I e Hae III. 44. Amostra de DNA de linfonodo do animal 44; 45. Amostra DNA de linfonodo do animal 45; C+. Controle positivo com DNA de cultura de <i>L. chagasi</i>. 50bp e 10bp. Marcador de peso molecular .....</p>	40
<p>Figura 5. Alinhamento das seqüências obtidas da região conservada do minicírculo kDNA a partir do seqüenciamento de 27 amostras de linfonodos de cães com leishmaniose .....</p>	42
<p>Figura 6. Corte histológico submetido a reação imunoistoquímica anti-<i>Leishmania</i> pelo método LSAB. Fígado: presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> (controle positivo). Barra: 0,7µm .....</p>	44
<p>Figura 7. Corte histológico submetido a reação imunoistoquímica anti-<i>Leishmania</i> pelo método LSAB. Rim de cão com leishmaniose visceral: presença de formas amastigotas, no interstício. Barra: 0,7µm .....</p>	44

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Comparação das técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico de leishmaniose em cães do município de Teresina-PI, 2007 .....	35
Tabela 2. Comparação da técnica PCR aplicada ao diagnóstico de leishmaniose em cães do município de Teresina-PI, 2007 .....	35
Tabela 3. Comparação das técnicas sorológicas e PCR aplicadas ao diagnóstico de leishmaniose em cães do município de Teresina-PI, 2007 .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome  
BioEdit - biological sequence alignment editor  
bp - base pairs  
BSA - Bovine Serum Albumin  
CCZ - Centro de Controle de Zoonoses  
DAB - diaminobenzidina  
DNA - deoxyribonucleic acid  
dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate  
EDTA - Ethylene DiamineTetracetic Acid  
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
FM - Faculdade de Medicina  
FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
HE - hematoxilina-eosina  
IFI - Imunofluorescência Indireta  
IHQ - imunoistoquímica  
kD - quilodaltons  
kDNA - Kinetoplast DNA  
LASAN - Laboratório de Sanidade Animal  
MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
NJ - Neighbor-Joining  
NNN - Novy-McNeal-Nicolle  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PBS - Phosphate-Buffered Saline  
PCR - Polymerase Chain Reaction

PK - proteinase K  
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism  
RNA - ribonucleic acid  
rpm - rotações por minuto  
TA - temperatura ambiente  
TBE - Trisbase, Boric acid, EDTA  
Th 1 - T helper 1  
Th 2 - T helper 2  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
UFPI - Universidade Federal do Piauí  
UNESP - Universidade Estadual Paulista  
USP - Universidade de São Paulo  
VPN - Valor Preditivo Negativo  
VPP - Valor Preditivo Positivo  
WHO - World Health Organization



**LISTA DE SÍMBOLOS**

°C - grau Celsius  
μg - micrograma  
μL - microlitro  
μm - micromolar  
10x - dez vezes  
1x - uma vez  
Å - ångström  
g - grama  
h - hora  
Kg - quilograma  
M - molar  
mA - miliamperes  
Mb - mega bases  
mg - miligrama  
MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio  
min - minutos  
mL - mililitro  
mm - milímetros  
mM - milimolar  
ng - nanograma  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - sulfato de amônia  
nm - nanomolar  
pmoles - picomoles  
s - segundo  
U - unidades  
v - volts

## SEQÜENCIAMENTO DE DNA E IMUNOISTOQUÍMICA RENAL PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* sp EM CÃES

**RESUMO** - A leishmaniose é uma enfermidade provocada por protozoários do gênero *Leishmania*, que pode produzir manifestações cutâneas, mucocutâneas ou viscerais. Os objetivos deste ensaio foram os de identificar a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando o método PCR-RFLP em amostras de tecido de cães com leishmaniose visceral; seqüenciar o fragmento amplificado de DNA das amostras de linfonodos de diferentes animais, em busca de homologia e polimorfismos; comparar os métodos de imunistoquímica e de PCR dos rins, na identificação da *Leishmania* e comparar as técnicas sorológicas em relação à PCR como auxílio diagnóstico da leishmaniose. Para tanto, foram utilizadas amostras de 48 cães com leishmaniose, diagnosticados por meio de testes IFI, ELISA e por PCR. Realizou-se PCR com amostras de linfonodo poplíteo, baço e rins, utilizando 'primers' específicos para o gênero *Leishmania*. A partir de amostras amplificadas, o DNA foi submetido à digestão enzimática (técnica PCR-RFLP) com as enzimas Hae III, Bsr I e Rsa I. Para o seqüenciamento de DNA, produtos de PCR foram amplificados com 'primer sense', precipitados e submetidos ao seqüenciamento automático. Com fragmentos histológicos renais, realizou-se a técnica imunistoquímica utilizando anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em coelho. O método PCR-RFLP permitiu identificar a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* em todas as amostras de DNA dos diferentes tecidos. No seqüenciamento de DNA, os fragmentos amplificados mostraram-se pertencentes às espécies causadoras de leishmaniose visceral, porém não foi possível diferenciá-las. A técnica de imunistoquímica mostrou presença de formas amastigotas íntegras em meio ao infiltrado inflamatório intersticial em dois (4%) dos 48 animais avaliados, enquanto a PCR confirmou *Leishmania* sp em 77% dos cães. Conclui-se que a técnica PCR-RFLP caracterizou como sendo a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, o agente etiológico da leishmaniose visceral canina, neste grupo de animais; o fragmento de DNA seqüenciado apresentou homologia de 55bp entre as amostras de *Leishmania* estudadas; a PCR realizada nas amostras renais foi mais

sensível e precisa na detecção de *Leishmania sp* quando comparada à imunistoquímica.

**Palavras-chave:** DNA, imunistoquímica, *Leishmania*, PCR-RFLP, rns, seqüenciamento

## SEQUENCING OF DNA AND RENAL IMMUNOHISTOCHEMISTRY TO IDENTIFICATION OF *Leishmania sp* IN DOGS

**SUMMARY** - Leishmaniasis is a disease caused by organisms belonging to the genus *Leishmania*. Clinical forms of leishmaniasis are found as being cutaneous, mucocutaneous or visceral. The objectives of the present study were to identify the *Leishmania (Leishmania) chagasi* species in tissue specimen from dogs presenting visceral disease diagnosed by PCR-RFLP assay; to determine the fragment sequence (120bp) from lymph node samples from different animals searching for homologies and polymorphism; and to compare immunohistochemistry method to PCR assay with renal tissue and *Leishmania* local identification. Forty eight samples from dogs clinically diagnosed positive to leishmaniasis by IFAT, ELISA and PCR assays were used in this study. The PCR were performed with samples of popliteo lymph node, spleen and kidneys, and specific oligonucleotides to genus *Leishmania*. PCR products were digested with enzymes Hae III, Bsr I and Rsa I. The nucleotide sequences were determined automatically. For immunohistochemical purposes the sections of kidneys and anti-*Leishmania* polyclonal antibody were used. PCR-RFLP assay allowed us to identify the *Leishmania (Leishmania) chagasi* specie in all DNA samples from different tissues samples. DNA sequencing revealed products amplified belonging to specie responsible to cause visceral leishmaniasis, but it was not possible to distinguish the species. The immunohistochemical study revealed the presence of amastigotes organisms on interstitial inflammatory infiltrate from two dogs (4%), while the PCR assay detected the *Leishmania sp* in 37 dogs (77%). Based on the PCR-RFLP results, we concluded that it characterized as being *Leishmania (Leishmania) chagasi* species, etiologic agents of visceral leishmaniasis, in this group of animals; DNA sequence presented homology of 55 bp among all *Leishmania spp* studied. Additionally, the PCR performed with samples kidneys was more sensible and precise to detect *Leishmania sp* in comparison to the immunohistochemistry study.

**Key words:** DNA, immunohistochemistry, *Leishmania*, PCR-RFLP, kidneys, sequencing.

# 1 INTRODUÇÃO

---

As espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos são muito similares morfológicamente entre si, mas induzem diferentes formas da doença. A característica comum a todas é a cronicidade nas manifestações clínicas. A infecção pode ser predominantemente visceral, denominada leishmaniose visceral ou calazar; restrita à pele, com úlceras crônicas, ou expandir-se nas membranas mucosas produzindo lesões mutilantes (HANDMAN, 2001).

A leishmaniose é uma zoonose e humanos são geralmente hospedeiros acidentais (HANDMAN, 2001). Os reservatórios vertebrados mais importantes são os cães, especialmente em áreas onde *L. chagasi* ou *L. infantum* são os agentes causais da doença (SILVA et al., 2001).

Os protozoários parasitas do gênero *Leishmania* têm larga distribuição mundial e a leishmaniose representa um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (VOLPINI et al., 2004). No Brasil, focos de leishmaniose visceral são registrados em áreas rurais, suburbanas e urbanas, ocorrendo simultaneamente em humanos e em cães. Nas zonas endêmicas a prevalência de leishmaniose visceral em cães é alta e precede a doença humana (SILVA et al., 2001).

Várias espécies relatadas de *Leishmania*, como *L. donovani* (Índia e África), *L. infantum* (região Mediterrânea e Ásia) e *L. chagasi* (América do Sul) comprometem órgãos viscerais e levam a alterações marcantes na função do baço, fígado e medula óssea. O sítio inicial da infecção, no local presumível da picada do inseto vetor, raramente é observado, no entanto os parasitas são encontrados na pele (HANDMAN, 2001).

No hospedeiro vertebrado, a forma amastigota da *Leishmania* sobrevive e multiplica-se intracelularmente em fagócitos mononucleares (SOLBACH e LASKAY, 2000). A transmissão para o hospedeiro vertebrado é realizada por meio de um inseto

vetor (flebótomo), no qual o parasita desenvolve-se e multiplica-se na forma promastigota (HANDMAN, 2001).

O resultado da infecção é determinado por interações entre o hospedeiro e o parasita, e conseqüentemente o estudo do genoma de ambos tem sido alvo de análise das seqüências (ROBERTS et al., 2000).

Os parasitas, agentes etiológicos da leishmaniose visceral, determinam diversos sinais clínicos nos cães como anemia, linfadenopatia, esplenomegalia, perda severa de peso (caquexia), nódulos cutâneos ou úlceras, alopecias, lesões oculares e envolvimento renal (CIARAMELLA et al., 1997). Os rins, com sofisticado sistema de filtração glomerular, são os principais alvos de injúrias imunológicas (OLIVEIRA et al., 1985).

Os objetivos deste ensaio foram os de identificar a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando o método PCR-RFLP em amostras de tecido de cães com leishmaniose visceral; seqüenciar o fragmento amplificado de DNA das amostras de linfonodos de diferentes animais, em busca de homologia e polimorfismos e comparar os métodos de imunoistoquímica e de PCR dos rins, na identificação da *Leishmania*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---



## Considerações gerais

Os parasitas do gênero *Leishmania* determinam infecções denominadas leishmaníases ou leishmanioses, que afetam particularmente o sistema fagocítico mononuclear. Entretanto, por apresentarem características clínicas e epidemiológicas diferentes em cada região geográfica, foram consideradas doenças distintas (REY, 2002).

De acordo com a 'World Health Organization - WHO' (2007), as leishmanioses podem ser classificadas em quatro formas principais: **leishmaniose visceral**, freqüentemente fatal quando não tratada; **leishmaniose cutânea**, que resulta em múltiplas lesões dilacerantes e podem cicatrizar espontaneamente; **leishmaniose mucocutânea**, que começa com úlceras da pele que se disseminam, causando destruição mutilante e maciça do tecido, especialmente do nariz e da boca e **leishmaniose difusa**, que produz lesões disseminadas e crônicas, assemelham-se a hanseníase e são difíceis de tratar.

As leishmanioses são protozooses causadas por 20 espécies patogênicas em humanos. O protozoário é transmitido pela picada de um inseto vetor de 2-3mm de comprimento, denominado flebótomo. Das 500 espécies de flebótomos conhecidos, apenas 30 foram identificadas como vetores da doença. Somente as fêmeas infectadas com os parasitas *Leishmania*, contidos no sangue sugado de humanos ou outro hospedeiro mamífero, transmitem o protozoário. Do sangue dos hospedeiros, as proteínas são utilizadas como substrato para o desenvolvimento dos ovos dos insetos (WHO, 2005).

Na leishmaniose visceral, as formas amastigotas que vivem no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, são encontradas nas células de Kupffer do fígado, nas células reticulares e macrófagos do baço, na medula óssea e nos

linfonodos. Nos rins, nas supra-renais, nos intestinos, nos pulmões e na pele podem também ser encontradas. Ocasionalmente os parasitas são vistos no sangue no interior de leucócitos, sobretudo de monócitos (REY, 2002).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), a posição taxonômica do agente etiológico da leishmaniose visceral *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a seguinte:

Reino: **Protista** Haeckel, 1866

Sub-reino: **Protozoa** Goldfuss, 1817

Filo: **Sarcomastigophora** Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: **Mastigophora** Deising, 1866

Classe: **Zoomastigophorea** Calkins, 1909

Ordem: **Kinetoplastida** Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976

Sub-ordem: **Trypanosomatina** Kent, 1880

Família: **Trypanosomatidae** Dofein, 1901, *emend.* Grobden 1905

Gênero: **Leishmania** Ross, 1903

Sub-gênero: **Leishmania** Saf 'yanova, 1982

Espécie: **Leishmania chagasi** Cunha & Chagas, 1937

Existem divergências sobre o uso do nome específico *chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral. Com base nos perfis isoenzimáticos, alguns autores consideram que *Leishmania (Leishmania) chagasi* é igual a *Leishmania (Leishmania) infantum* e, por isso, o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum*. Porém, outros autores chamam atenção para suas diferenças bioquímicas e usam preferencialmente o nome *chagasi*. O uso do nome *Leishmania donovani chagasi* é incorreto, pois a *L. donovani* pertence a um grupo geneticamente diferente, que causa leishmaniose visceral no subcontinente indiano (BRASIL, 2006).

## **Características do protozoário**

O gênero *Leishmania* apresenta-se sob as formas amastigota e promastigota, com reprodução por divisão binária. A forma amastigota encontra-se no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, tem forma ovóide e mede 2-6 $\mu$ m de diâmetro, com núcleo excêntrico e citoplasma claro, onde se observa estrutura mitocondrial especializada, o cinetoplasto, que possui forma alongada, apresentando na proximidade do flagelo, que é rudimentar, filamentos entrelaçados e compactos, que correspondem ao ácido desoxirribonucléico (MOLYNEUX e KILLICK-KENDRICK, 1987; DEDET et al., 1999).

A forma promastigota encontra-se no inseto vetor e em cultura. É extracelular, alongada, medindo 15-30 $\mu$ m de comprimento e 2-3 $\mu$ m de largura, possui núcleo central, cinetoplasto e flagelo anterior, longo e livre (MOLYNEUX e KILLICK-KENDRICK, 1987; PEARSON e SOUSA, 1996; DEDET et al., 1999). Este flagelo proporciona mobilidade ao parasita, além de contribuir para a fixação ao epitélio digestivo do hospedeiro invertebrado (PESSOA e MARTINS, 1982).

## **Situação epidemiológica da leishmaniose visceral**

A leishmaniose é endêmica em 88 países dos quatro continentes. Aproximadamente 90% de casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru. Esta mesma percentagem é observada para leishmaniose visceral em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (WHO, 2007).

No Brasil, a leishmaniose visceral apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2006).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais

recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2006).

Em 1998, no município de Araçatuba (SP), foi detectada a presença de leishmaniose visceral em cães e, em 1999, casos humanos. A enzootia canina foi registrada em 12 municípios da região, onde também foi identificada a presença do vetor desde 1997 (SUCEN, 2007).

A doença é mais freqüente em crianças menores de dez anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de cinco anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de maior exposição ao vetor nas áreas próximas ao domicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da leishmaniose visceral, pelas formas oligossintomáticas ou assintomáticas, além das formas com expressão clínica (BRASIL, 2006).

Os fatores que determinam a susceptibilidade ou resistência à leishmaniose visceral são ainda pouco definidos, mas a genética do hospedeiro pode ter um fator importante (PEARSON e SOUSA, 1996).

Nos últimos anos, vários são os relatos de leishmaniose cutânea e visceral em associação com 'Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS', enfatizando as formas generalizada e recidivada (HERNÁNDEZ et al., 1993; ALVAR et al., 1997; MORIMOTO et al., 1998; ROSATELLI et al., 1998).

O período de incubação da leishmaniose visceral é tipicamente de três a oito meses, mas foi encontrado período curto (10 dias) ou longo (34 meses). A doença é diagnosticada em pessoas que se tornaram imunocomprometidas, anos após elas terem saído da área endêmica (PEARSON e SOUSA, 1996).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção. A enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães é mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil

foram encontradas raposas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais didelfídeos infectados foram encontrados no Brasil e na Colômbia (BRASIL, 2006).

Estudos atuais indicam que gatos também são reservatórios, uma vez que foram descritos alguns casos em diversas partes do mundo (SAVANI et al., 2004; MANCIANTI, 2004, RÜFENACHT et al., 2005).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos por meio do inseto vetor pertencente ao gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África e pelo gênero *Lutzomyia*, nas Américas (PEARSON e SOUSA, 1996).

O poder infectante dos insetos varia em função da espécie de flebotomíneo presente, da abundância de reservatórios da infecção na área, da cepa do parasita, bem como de outras circunstâncias, inclusive a susceptibilidade de novos hospedeiros, que é geneticamente determinada (REY, 2002).

A distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* é ampla e está em expansão. Esta espécie foi encontrada em quatro das cinco regiões geográficas do Brasil: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste, a *Lutzomyia longipalpis* foi identificada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação do inseto para o ambiente rural e esta foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos (BRASIL, 2006).

A infecção experimental de *Lutzomyia longipalpis* foi conseguida com frequência três vezes maior e mais intensamente quando os insetos picavam cães do que quando sugavam homens doentes. A *Leishmania* é encontrada em 16% das biopsias de pele humanas e em 77% das caninas. Individualmente o cão é, portanto, o reservatório mais importante que o homem, já que na natureza ambos são avidamente sugados pelos flebotomíneos (REY, 2002).

Recentemente *Leishmania* foi diagnosticada em *Rhipicephalus sanguineus*. Nestes carrapatos, coletados de cães com leishmaniose visceral, foram detectados infecções naturais por *L. chagasi*. No mesmo estudo avaliou-se também a infectividade de *Leishmania* nestes carrapatos, por meio da administração oral em hamsters, de uma

solução de macerado de carrapatos infectados. Após seis meses de observação, os hamsters foram sacrificados e avaliados por várias técnicas. Diversos animais estavam infectados. Desta forma, os carrapatos podem ser um vetor alternativo para a transmissão de *L. chagasi* entre cães, abrindo novas perspectivas na epidemiologia da leishmaniose visceral (COUTINHO et al., 2005).

### **Ciclo biológico da *Leishmania chagasi***

No Brasil, a forma de transmissão da leishmaniose visceral é através da picada dos vetores, *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi*, infectados pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2006).

As fêmeas dos insetos ingerem macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania*, durante a sucção sangüínea. Em seguida, transformam-se em promastigotas, multiplicam-se, e diferenciam-se no intestino do inseto. O ciclo de vida é completado, aproximadamente uma semana após, quando a forma infectante, promastigota metacíclico, migra para a probóscida e são inoculados na pele do hospedeiro, no próximo repasto sangüíneo (PEARSON e SOUSA, 1996).

A saliva do inseto *Lutzomyia longipalpis* possui um potente peptídeo vasodilatador, denominado maxadilan, que é liberado na pele do hospedeiro, quando o inseto realiza o repasto sangüíneo (LERNER et al., 1991, LERNER e SHOEMAKER, 1992).

Na epiderme do hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos. Com a liberação destas formas, são fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

## Técnicas Diagnósticas

O diagnóstico da leishmaniose visceral pode ser realizado de várias formas, dentre as quais destacam-se: características clínicas (FEITOSA et al. 2000); exames parasitológicos com pesquisa do protozoário em esfregaço de material aspirado do baço, medula óssea, linfonodos e de biópsia hepática; com o isolamento em meio de cultura Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; AGGARWAL et al., 1999); mediante inoculação intraperitoneal de material aspirado e diluído em animais susceptíveis, como o hamster; exames imunológicos como fixação de complemento (FC), 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay' (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997) e métodos moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) (NOLI, 1999).

As técnicas parasitológicas têm alta especificidade, porém baixa sensibilidade. As preparações citológicas dos aspirados de gânglios linfáticos e medula óssea são rápidas e fáceis. Os cultivos parasitários não são usados rotineiramente em medicina veterinária por serem complexos e pouco específicos (NOLI, 1999).

A inoculação experimental em hamsters (*Mesocricetus spp*), de amostras de tecidos de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral, não tem valor prático no diagnóstico da doença devido ao seu longo tempo de positividade, um a três meses (BRASIL, 2006).

Os testes imunológicos são métodos indiretos para evidenciação do parasita (BRASIL, 1994). Estas provas têm usualmente especificidade e sensibilidade alta (80 a 100 %), porém não são exclusivas, já que podem dar resultados falsos positivos em cães sadios resistentes que tiveram contato prévio com o parasita. Também são observados falsos negativos em cães afetados que não produziram anticorpos (NOLI, 1999). O uso deste exame é limitado nas áreas onde a leishmaniose visceral, a leishmaniose tegumentar e a doença de Chagas coexistem como endemias (FURTADO apud MARTINS, 1999).

A PCR facilita o diagnóstico nas pesquisas científicas. Ela reproduz *in vitro* o fenômeno da duplicação *in vivo* da molécula de DNA. Nesta reação é possível

determinar qual seqüência ou fragmento de DNA será copiado e amplificado e o número de cópias geradas cresce em proporção geométrica a cada ciclo da reação (RODRIGUES, 2000).

O método da PCR, amplificação do DNA do parasita, constitui-se em nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral, pois apresenta 94% de sensibilidade. Entretanto, os seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, entre elas temos: área endêmica, o tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado para amplificação, o método de extração do DNA, entre outros (BRASIL, 2006).

### **Patologia da leishmaniose visceral**

Na leishmaniose visceral os parasitas invadem os macrófagos de todo o sistema fagocitário mononuclear, e causam doença sistêmica grave marcada por hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, febre e perda de peso. As células fagocíticas ficam aumentadas e preenchidas com formas amastigotas de *Leishmania* sp, muitas células plasmáticas estão presentes e a arquitetura do baço se altera. Nos estágios finais o fígado torna-se cada vez mais fibrótico. As células fagocitárias enchem a medula óssea e também podem ser encontradas nos pulmões, no trato gastrointestinal, nos rins, no pâncreas e nos testículos. Nos rins, pode haver glomerulonefrite mesangioproliferativa, mediada pelo complexo imune e, em casos avançados, pode haver deposição amilóide. A sobrecarga de células fagocitárias com parasitas predispõe os pacientes às infecções bacterianas, causa comum de óbito. As hemorragias relacionadas à trombocitopenia também podem ser fatais (McADAM e SHARPE, 2005).

O hamster é empregado como modelo experimental no estudo das lesões da leishmaniose visceral. Este animal é susceptível à infecção pela *L. (L.) chagasi*, e dependendo da forma parasitária, do inóculo, da via de inoculação e do tempo de infecção, a doença se desenvolve semelhante à doença humana, do ponto de vista anatomopatológico. A inoculação intraperitoneal de formas amastigotas provenientes de



homogenato de baço infectado determina alterações anatomopatológicas evolutivas nos diferentes órgãos envolvidos nesta protozoose (LAURENTI, 1993).

No fígado, observou-se hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, com parasitismo que aumentava com o tempo de infecção, além de infiltrado inflamatório mononuclear portal e intraparenquimatoso caracterizado por linfócitos, plasmócitos e macrófagos parasitados (DUARTE e CORBETT, 1987). No baço, a hiperplasia e hipertrofia do sistema fagocítico mononuclear com parasitas, é acompanhada de depleção específica de linfócitos T na polpa branca, com substituição dessas células por plasmócitos e macrófagos parasitados (CORBETT et al., 1992).

Formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* foram inoculadas no tecido subcutâneo do coxim plantar de hamster. Inicialmente, no ponto de inoculação, observou-se resposta inflamatória mononuclear com parasitas, que evoluía com a formação de granulomas com células gigantes e corpúsculos de Schauman no centro e a presença de material antigênico no citoplasma de macrófagos. A visceralização da infecção ocorreu entre 45 e 60 dias após a infecção (LAURENTI et al., 1990).

Laurenti (1993) avaliou parâmetros da resposta inflamatória aguda desencadeada pela inoculação de formas amastigotas. Inicialmente, das duas às 12 horas, observou-se afluxo crescente de leucócitos, predominantemente neutrófilos polimorfonucleares. Com a evolução do processo, este exsudato neutrofílico diminuiu e número crescente de células mononucleares migrou para o local a partir de 24 horas. A gradativa substituição dos neutrófilos pelos mononucleares resultou em infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear as 48 e 72 horas de infecção. Em relação à fagocitose, aproximadamente 10% de neutrófilos e monócitos foram observados fagocitando leishmanias às duas horas. Como nesta fase há predomínio de neutrófilos, viu-se maior fagocitose por estas células. Das seis às 12 horas de infecção, a fagocitose de parasitas pelos dois tipos celulares diminuiu para aproximadamente 20%, com recuperação posterior no grau de fagocitose, às 24 horas, quando o infiltrado inflamatório era misto. A partir de 48 horas, com a regressão do exsudato neutrofílico, notou-se somente o envolvimento de células mononucleares na fagocitose.

## Envolvimento renal na leishmaniose visceral

O glomérulo, como um componente altamente especializado do sistema circulatório sangüíneo, responsável pela ultrafiltração, possui quatro componentes significantes, as **células endoteliais**, que revestem o capilar, a **membrana basal do glomérulo**, o **mesângio**, que constitui o tecido de sustentação dos capilares, compreende as células mesangiais, com propriedade fagocítica e o material extracelular e, as **células epiteliais** ou **podócitos**, que formam o revestimento externo ao capilar (STEVENS e LOWE, 1998).

A maioria das doenças glomerulares compromete diferentes glomérulos em graus variáveis, com apenas um pequeno número de doenças comprometendo todos os glomérulos de maneira uniforme. Os padrões de doença glomerular são **global**, afeta uniformemente o glomérulo como um todo, **segmentar**, afeta um segmento glomerular, deixando outros segmentos inalterados, **difuso**, afeta todos os glomérulos em ambos os rins e **focal**, afeta uma proporção dos glomérulos enquanto outros permanecem inalterados (STEVENS e LOWE, 1998).

No padrão mais comum de doença imunológica, os complexos imunes circulantes no sangue são capturados ou depositados na membrana basal ou no mesângio, ou em ambos. O padrão da doença glomerular depende da natureza, quantidade, distribuição dos complexos imunes e do padrão de reação à sua presença, como proliferação celular, necrose e espessamento da membrana (STEVENS e LOWE, 1998).

O envolvimento intersticial e/ou glomerular dos rins, são bem conhecidos nas infecções produzidas pela *L. donovani* em animais experimentais (CARAVACA et al., 1991), mais raramente em humanos. Glomerulonefrites e lesões tubulointersticiais são descritas como expressão de doença por imunocomplexos. Na maioria dos casos apresenta-se como glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial e, em decorrência das lesões renais ocorrem distúrbios funcionais, podendo ser observadas albuminúria e hematúria (DUARTE et al., 1983; PRASAD et al., 1992).

O mecanismo da nefrite intersticial na leishmaniose visceral é ainda desconhecido, todavia as alterações na membrana basal tubular e no interstício, com depósitos de imunoglobulinas e complementos, suportam a hipótese que mecanismos imunológicos podem estar relacionados (POLI et al., 1991).

A interação antígeno-anticorpo induz processos imunopatológicos que causam doença renal, particularmente glomerulonefrites. O glomérulo, com sofisticado sistema de filtração é o principal alvo das injúrias imunológicas, entretanto seu mecanismo é pouco esclarecido. Os imunocomplexos são demonstrados nas alças dos capilares glomerulares, predominantemente subepitelial. Há excesso de antígenos, e é possível que outros complexos imunes estejam solúveis no sangue ou no glomérulo. De grande importância é a observação de que complexos imunes são formados por anticorpos e antígenos do parasita (OLIVEIRA et al., 1985).

A infecção por *L. donovani* em hamster é uma doença crônica e progressiva. O aumento do número de amastigotas e a elevação de gamaglobulinas, especialmente IgG, são bem documentados. É possível que a liberação do antígeno pela destruição de macrófagos e de parasitas dentro deste, bem como produtos de excreção dos parasitas, induz a formação de complexos imunes solúveis de tamanhos intermediários depositados em vários órgãos, particularmente nos rins. Os tufo de capilares glomerulares são submetidos a maior pressão sangüínea que outros leitos capilares e, portanto, tornam-se susceptíveis à deposição de macromoléculas circulantes. Os complexos, uma vez depositados, podem levar à injúria do tecido ou por ativação dos mecanismos dependentes de complemento, ou pelo acúmulo dos complexos, causando substituição do tecido e estímulo à proliferação da matriz intercelular. Ambos os mecanismos são capazes de produzir lesões características. O envolvimento renal na leishmaniose visceral experimental em hamster é mais comum que na infecção em humanos. A razão disso não é precisamente conhecida, mas quando é injetado número elevado de formas amastigotas por via intracardíaca em hamster, verifica-se elevada freqüência de doença renal nos animais infectados. Este número elevado de amastigotas pode suprir o excesso de antígeno necessário para a formação de complexos imunes circulantes (AGU et al., 1981).

Os imunocomplexos são identificados nas infecções natural e experimental de *Leishmania donovani* formado por vários antígenos do parasita, e de IgG, IgM, IgA e frações do complemento C3 (NIETO et al., 1992). Em estudo com imunofluorescência para IgG e complemento C3 em Golden hamsters infectados experimentalmente, exame do rim demonstrou depósitos de imunocomplexos. A deposição de IgG e complemento C3 foram detectados no glomérulo. A fluorescência corou de forma difusa envolvendo o glomérulo, vasos sangüíneos e alguns túbulos. No glomérulo, a fluorescência envolveu a lâmina basal glomerular dos capilares e o mesângio. Em alguns casos foram identificadas granulações de fluorescência (AGU et al., 1981).

O uso da técnica imunoistoquímica em rins de cães com leishmaniose visceral possibilitou a identificação do antígeno de *Leishmania* em células fagocíticas no glomérulo em 50 (90,9%) dos 55 animais avaliados. Trinta e quatro destes animais (61,8%) apresentavam também antígeno de *Leishmania* em fagócitos do infiltrado inflamatório intersticial. Imunoglobulinas G, M e A foram pesquisadas em 21 animais infectados e cinco controles e não houve diferença significativa na intensidade dos depósitos de imunoglobulinas entre estes dois grupos. As imunoglobulinas localizavam-se na parede dos capilares glomerulares, não correspondendo à localização do antígeno (COSTA et al., 2003).

Em outro estudo com cães com leishmaniose visceral sintomáticos e assintomáticos, foram identificados vários padrões de distribuição dos grânulos sub-endoteliais nos glomérulos, para IgG e IgM: global, segmentar, difusa ou focal. O estudo concluiu que na leishmaniose visceral canina as reações imunoistoquímicas com IgM apresentam intensidade mais forte que na IgG e caracterizam-se pela distribuição de grânulos sub-endoteliais nos capilares glomerulares (SOARES e MORAES, 2005).

Em estudo feito com hamsters infetados experimentalmente com *L. donovani*, os autores identificaram grandes quantidades de imunoglobulinas na urina, em conseqüência de glomerulonefrite por imunocomplexos detectada sete dias após o início da infecção. Depósitos de antígenos de *L. donovani* e imunoglobulinas foram encontrados em depósitos granulares na área mesangial e alças capilares dos glomérulos (SARTORI et al., 1987).

### **Imunoistoquímica na detecção de *Leishmania***

O diagnóstico histológico de *Leishmania* tem pouco sucesso devido à baixa sensibilidade dos métodos histológicos tradicionais para detecção do parasita (BOURDOISEAU et al., 1997; FERRER et al., 1988; LIVNI et al., 1983).

A detecção imunoistoquímica de formas amastigotas de *Leishmania* em tecidos fixados e parafinados de cães (BOURDOISEAU et al., 1997) e tecidos humanos (LIVNI et al., 1983) é descrita e usada rotineiramente em muitos laboratórios.

Métodos imunoistoquímicos para identificação de *Leishmania* em tecidos são simples, não precisam de equipamentos especiais, e são muito sensíveis e específicos (BOURDOISEAU et al., 1997; FERRER et al., 1988; LIVNI et al., 1983).

Em estudo com cães, a reação imunoistoquímica em fígado, baço e medula óssea foi capaz de identificar parasitas nos tecidos e mostrou-se mais sensível para a detecção de *Leishmania* quando comparado aos fragmentos corados com hematoxilina-eosina (TAFURI et al. 2004).

### **Biologia Molecular e Leishmaniose**

O DNA é uma macromolécula filamentosa composta por unidades denominadas nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto por um açúcar de cinco carbonos (desoxirribose), um grupamento fosfato e uma base nitrogenada. Essa base pode ser um derivado de purina (adenina e guanina) ou pirimidina (citosina e timina) (RODRIGUES, 2000).

Sendo a *Leishmania* membro da ordem Kinetoplastida, possui uma estrutura especial na mitocôndria, contendo DNA extranuclear, denominada cinetoplasto. O gênero deste parasita possui uma região de aproximadamente 200 pares de base conservada entre as diferentes espécies, sendo que a seqüência restante é variável entre as espécies e as subespécies (ASHFORD et al., 1995).

Com o avanço tecnológico na área da biologia molecular é possível a identificação de *Leishmania* em casos de doenças subclínicas e em casos com poucos

parasitas. Esse fato favorece o acompanhamento do tratamento e a avaliação mais precisa da prevalência em áreas endêmicas (RODRIGUES, 2000).

O uso da sorologia para o diagnóstico das infecções por *Leishmania* em cães é questionado, e sugere a PCR como o diagnóstico mais preciso para definir a infecção por esse parasita, quando comparado a cultura ou a inoculação em hamster (ASHFORD et al., 1995).

Novos métodos mais simples e com alta sensibilidade e especificidade foram desenvolvidos com a finalidade prática do diagnóstico e da terapia, podendo ser aplicados no diagnóstico taxonômico. A PCR apresenta-se como nova opção que permite a identificação do protozoário em poucas horas a partir de quantidade mínima de DNA (MARTINS, 1999).

Para a detecção de *Leishmania*, a PCR mostrou ser mais sensível que qualquer método parasitológico convencional de diagnóstico de leishmaniose (MARQUES et al., 2001). Uma vez que a diferenciação morfológica das espécies de *Leishmania* não é possível, vários critérios bioquímicos, imunológicos ou moleculares foram introduzidos para a classificação das espécies patogênicas, como a caracterização por eletroforese de isoenzimas, ou por hibridização com sondas espécies-específicas, com probes de DNA do minicírculo (WIRTH et al., 1989).

A PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro*, de uma seqüência de bases de DNA, milhões de vezes e em poucas horas. Assim, caracteriza-se como extremamente útil na amplificação e detecção de moléculas de DNA presentes em baixo número de cópias em amostras biológicas. É utilizada em várias áreas da Biologia Molecular. Basicamente, a PCR realiza *in vitro* um processo que as células fazem *in vivo*, ou seja, duplicação do DNA (ANDRADE, 1993).

As endonucleases de restrição caracterizam-se por ampla variedade de aplicações práticas. São enzimas bacterianas com a propriedade de clivar moléculas de DNA estranho, que porventura penetrem a célula. A clivagem ocorre em determinados pontos da dupla hélice de DNA, conhecidos como sítios de restrição. Estes são seqüências de quatro a oito nucleotídeos, específicos para cada enzima. Há grande variedade de enzimas de restrição que reconhecem ampla gama de seqüências de

nucleotídeos. Portanto, para cada segmento de DNA, é possível eleger enzimas de restrição que fornecerão fragmentos em número e tamanhos desejados. A distribuição dos sítios de restrição de uma enzima num determinado gene é específica, bem como para a função da seqüência de nucleotídeos do gene. Este é o princípio em que se baseia a técnica de RFLP (ANDRADE, 1993).

O gênero *Leishmania* está dividido dentro de dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* de acordo com o desenvolvimento no inseto vetor. A especificação dentro do gênero depende de vários fatores como a distribuição geográfica do parasita isolado, da apresentação clínica da doença, e a epidemiologia do vetor e do animal reservatório (LAISON e SHAW, 1978). Na leishmaniose cutânea, as úlceras causadas por *Leishmania* do subgênero *Viannia* são geralmente mais agressivas e podem recorrer após tratamento (PASSOS et al., 2000). Ao contrário, as úlceras causadas pelo subgênero *Leishmania* tendem a ser menos severas, e com possibilidade de cura após o tratamento ou espontaneamente. Portanto, a identificação das espécies é crucial para o diagnóstico, para clarear a epidemiologia da doença, para o correto prognóstico, para conduta do regime terapêutico e para as medidas de controle (VOLPINI et al., 2004).

O método de PCR-RFLP foi desenvolvido para diagnosticar e identificar as espécies de *Leishmania* que causam a leishmaniose cutânea obtidas de amostras clínicas. O método foi seguro, rápido e fácil para conduzir em biópsias e apresenta extrema importância para o diagnóstico e identificação de *Leishmania* em amostras clínicas, reservatórios e vetores. Utilizando a enzima de restrição Hae III, o método foi hábil para diferenciar *L. (V.) braziliensis* de *L. (L.) amazonensis*. A enzima digeriu os 120 bp produtos da PCR de *L. (V.) braziliensis* produzindo dois fragmentos, um de 40 bp e outro de 80 bp, enquanto que a enzima não digeriu *L. (L.) amazonensis* (VOLPINI et al. (2004). Outros autores obtiveram resultados semelhantes utilizando-se esta enzima (GARCIA, 2005).

Em estudo utilizando-se a mesma técnica e enzima, em amostras extraídas de cães com leishmaniose, naturalmente infectados, a enzima Hae III clivou o DNA da *Leishmania* em 120, 80, 60 e 40 bp. A *Leishmania* foi identificada como pertencente à espécie *L. (L.) chagasi* (ANDRADE et al., 2006).

O DNA de *Leishmania* foi encontrado em diferentes amostras clínicas de doentes com leishmaniose visceral e cutânea em humanos e caninos (MATHIS e DEPLAZES, 1995; MEDEIROS, 1999; REITHINGER et al., 2000; HU et al., 2000; SUFFIA et al., 2000; LACHAUD et al., 2002; MARFURT et al., 2003).

Várias pesquisas utilizam seqüenciamento de DNA ou RNA, para identificação e caracterização genômica das espécies de *Leishmania* (BLACKWELL, 1992). O seqüenciamento do DNA do cinetoplasto, utilizando produtos de extensão de *primers* por PCR, é realizado para caracterização da espécie da *Leishmania* (MINODIER et al., 1997; MEDEIROS et al., 2002).



## 3 OBJETIVOS

---

- Identificar a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando o método PCR-RFLP em amostras de tecido de cães com leishmaniose visceral;
- Seqüenciar o fragmento amplificado de DNA das amostras de linfonodos de diferentes animais em busca de homologia e polimorfismos;
- Comparar os métodos de imunistoquímica e de PCR dos rins, na identificação da *Leishmania*;
- Comparar as técnicas sorológicas em relação à PCR como auxílio diagnóstico da leishmaniose.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

#### **4.1 Animais**

Foram utilizadas amostras de tecidos de 48 cães com leishmaniose, naturalmente infectados, em estágios variados de evolução da doença, de ambos os sexos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Teresina-PI, no período de janeiro a março de 2002.

O diagnóstico foi realizado por meio dos testes IFI, ELISA e PCR. Os exames IFI e ELISA foram realizados no Laboratório de Sorologia para Leishmaniose da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG e as PCRs foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

#### **4.2 Coleta de amostras**

Os animais foram submetidos à eutanásia e, em seguida, foi realizada coleta de fragmentos de linfonodo poplíteo, baço e rins. Fragmentos destes órgãos foram congelados a 70°C negativos para posterior extração de DNA. Amostras de rins foram imersas em solução de formol a 10% tamponada durante oito horas, em seguida colocadas em solução de álcool a 70% para preservação dos epítomos e incluídos em parafina, para avaliação imunoistoquímica.

#### **4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

- **Extração de DNA de tecidos**

A extração do DNA das amostras de baço, linfonodo poplíteo e rins (região cortical e medular) foi realizada com aproximadamente 25mg de tecido. Utilizou-se o protocolo do 'QIAamp DNA Mini Kit'.

- **Extração de DNA de cultura de *Leishmania***

Amostras de culturas de *Leishmania (L.) chagasi* obtidas de medula óssea de cães infectados foram adquiridas no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN-UFPI), em Teresina-PI, e serviram como controle positivo. Amostras de DNA de culturas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

A partir de 500µL de cultura de *Leishmania*, em um microtubo, adicionou-se 500µL de fenol/clorofórmio na proporção de 1:1, em seguida passou-se no 'vortex'. Centrifugou-se essa mistura, a 14.000rpm, por dois minutos em temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Adicionou-se novamente 500µL de clorofórmio. Inverteu-se o microtubo. Novamente centrifugou-se a amostra a 14.000rpm, por dois minutos à temperatura ambiente. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, adicionou-se 1mL de etanol absoluto (4º C), inverteu-se e colocou em freezer a 20°C negativos por uma hora. Em seguida, repetiu-se a centrifugação na mesma rotação, por 30 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500µL de etanol 75% refrigerado. Centrifugou-se 14.000rpm, por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e após evaporação completa do álcool, o 'pellet' foi hidratado com 50µL de água bidestilada estéril.

- **Concentração de DNA**

Amostras de 2µL de DNA, extraídas dos tecidos ou cultura foram diluídas em 1.500µL de água bidestilada estéril e submetidas à leitura em espectrofotômetro de absorção (Beckman Coulter™, DU® 640 Spectrophotometer). A concentração foi calculada seguindo o programa já estabelecido em 260nm.

- **Amplificação do DNA**

Para amplificar a região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto da *Leishmania* (DNA mitocondrial ou kDNA), foram utilizados a seqüência de oligonucleotídeos ('primers'), segundo (SCHUBACH et al, 1998):

A: 5'- (G/C) (G/C) (C/G) CC (A/C) CTAT (A/T) TTA CAC CAA CCC C - 3'

B: 5' - GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA - 3'

As reações foram feitas em volume final de 30µL, contendo 19,05µL de água bidestilada estéril, 25pmoles de cada 'primer', 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5µL de buffer 10x, 0,2µL (1U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 1µg de cada DNA extraído.

O controle positivo foi realizado com amostras de DNA extraídas de cultura de *Leishmania chagasi* e o controle negativo, com água bidestilada estéril.

A amplificação foi realizada em termociclador automático (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400). As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por três minutos e 30 segundos e em seguida foram submetidas a 35 ciclos que incluíram desnaturação a 93°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. A extensão final foi 72°C por 10 minutos e em seguida 4°C (modificado de MEDEIROS, 2002).

- **Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos obtidos das PCRs foram analisados por meio de eletroforese em cuba horizontal (80v por 60 min) em gel de agarose a 1,5%, diluído em tampão TBE, corado com brometo de etídeo e utilizando-se marcador de peso molecular de 100bp. As bandas de DNA separadas por meio de eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas.

Para os 'primers' utilizados, esperam-se visualizar bandas em aproximadamente 120bp.

#### 4.4 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Os produtos das PCRs foram submetidos à digestão com enzimas de restrição Hae III (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a seqüência 5'....GG<sup>▼</sup>CC....3' ou 3'....CC<sup>▲</sup>GG....5'; Rsa I (isolada *Rhodopseudomonas sphaeroides*), que cliva fragmentos em 5'....GT<sup>▼</sup>AC....3' ou 3'....CA<sup>▲</sup>TG....5'; e Bsr I (isolada de *Bacillus stearothermophilus*), que cliva em 5'....ACTGGN<sup>▼</sup>....3' ou 3'....TGAC<sup>▲</sup>CN....5'.

- **Concentração de DNA da PCR**

Inicialmente os produtos amplificados foram quantificados no espectrofotômetro de absorção (Beckman Coulter<sup>TM</sup>, DU<sup>®</sup> 640 Spectrophotometer). Adicionou-se 2µL do produto da PCR em 1.500µL de água bidestilada estéril e fez-se a leitura.

- **Incubação com Hae III**

Adicionou-se 1µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima Hae III, 1µg de DNA da PCR, que foi completado com água em volume final de 10µL. Em seguida, incubou-se em banho-maria a 37°C 'overnight'.

- **Incubação com Rsa I**

Em volume final de 10µL, adicionou-se 5U da enzima Rsa I, 1µg de DNA da PCR e 0,75 µL de buffer 10x. O mix foi incubado em banho-maria a 37°C 'overnight'.

- **Incubação com Bsr I**

Adicionou-se 1µL de buffer 10x, 5U da enzima Bsr I, 1µg de DNA da PCR, que foi completado com água em volume final de 10µL. Incubou-se a 65°C 'overnight'.

- **Eletroforese em gel de acrilamida**

Para a identificação das bandas, foram utilizados 4 $\mu$ L do DNA digeridos com as enzimas Hae III, Rsa I e Bsr I, acrescidos de 5 $\mu$ L de corante. Utilizaram-se marcadores de peso molecular de 10 e 50bp.

O DNA foi submetido à eletroforese vertical em gel de acrilamida a 10% não desnaturante, com tampão TBE (190v, 400mA, 2 h). Em seguida, os géis foram fixados, revelados pela prata e montados em papel celofane e placa de vidro até a completa secagem após 12h, em temperatura ambiente. Posteriormente os resultados dos géis foram avaliados.

#### **4.5 Seqüenciamento de DNA**

Foram seqüenciadas fragmentos de DNA, provenientes de produtos amplificados a partir das amostras de linfonodos dos cães infectados, positivos nas PCRs, para o gênero *Leishmania*.

- **Amplificação do produto da PCR**

Para a PCR do seqüenciamento utilizaram-se os seguintes reagentes: 2 $\mu$ L de ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> terminator, 2 $\mu$ L de solução tampão 5x, 1-3ng de DNA (produto amplificado), 3,2pmol do 'primer' A: 5'- (G/C) (G/C) (C/G) CC (A/C) CTAT (A/T) TTA CAC CAA CCC C - 3' e água bidestilada estéril em volume final de 10 $\mu$ L.

As amostras foram amplificadas em termociclador automático (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400) seguindo-se o protocolo: inicialmente foram desnaturadas a 96°C por 1min e em seguida, foram submetidas a 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 10s, anelamento a 50°C por 5s, e extensão a 60°C por 4 min e, a seguir 8°C.



- **Precipitação da reação de seqüenciamento**

Após a amplificação do DNA, utilizando fluorocromos específicos para oligonucleotídeos, realizou-se a precipitação da reação de seqüenciamento, utilizando isopropanol.

Foram adicionados 40µL de isopropanol a 75% (concentração final de 60%), homogeneizou-se no vortex, fez-se 'spin down' e incubou-se por 20min em temperatura ambiente (TA). Em seguida, foi centrifugado por 25min a 14.000rpm (Centrifuge 5417C, Eppendorf).

Os tubos foram invertidos para remoção do isopropanol e, em seguida, adicionou 200µL de etanol a 70%, fez-se 'spin down' e centrifugou-se por 5min a 14.000rpm. Após remover esta solução, a lavagem foi repetida com etanol 70% e centrifugou-se. Em seguida descartou o sobrenadante e removeu o álcool residual com bomba a vácuo (Concentrator 5301, Eppendorf) por aproximadamente 15 min.

- **Seqüenciamento**

O 'pellet' foi ressuspenso em 20µL de formamida Hi-Di e, no termociclador automático desnaturou-se a 95 °C por 2min, colocou-se os tubos imediatamente no gelo que foram colocados no seqüenciador.

O seqüenciamento foi realizado no ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. Após a corrida das amostras, as seqüências obtidas de DNA foram coletadas e armazenadas para análise em computador.

- **Edição e alinhamento das seqüências**

As relações de similaridade entre os fragmentos de DNA de *Leishmania*, das amostras seqüenciadas, foram alinhadas no programa BioEdit v 7.0.0. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e avaliadas no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

#### 4.6 Imunoistoquímica

Foram utilizadas amostras de fragmentos renais de cães, com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral. O material foi previamente fixado em formol a 10% durante oito horas, imerso em álcool 70% para preservação dos epítomos e parafinado. As reações foram realizadas no Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo.

Os cortes histológicos renais de 3µm foram desparafinizados em xilol e reidratados em álcoois com concentrações decrescentes.

- **Bloqueio de peroxidase endógena**

As lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 0,3%, por 10min, três vezes e, em seguida, lavadas em água destilada.

- **Recuperação antigênica**

Realizou-se em 'Steamer' por 20 minutos em solução Dako® target retrieval. A seguir, após estabilizar a temperatura, as lâminas foram lavadas com solução PBS.

- **Bloqueio de biotina endógena e reações inespecíficas**

As lâminas foram incubadas por 15 minutos com solução de avidina (DAKO®), lavadas e reincubadas com solução de biotina (DAKO®) por mais 15 minutos, para o bloqueio de biotina endógena. Em seguida, lavadas novamente com PBS. Para o bloqueio das reações inespecíficas, utilizou-se leite desnatado a 10% e incubou-se por 30min.

- **Adição de anticorpos**

O anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania* produzido em coelho foi diluído 1:1000 em solução PBS/BSA e adicionado ao corte de cada lâmina. Incubou-se a 4°C 'overnight'. No dia seguinte, deixou-se a câmara úmida estabilizando a temperatura por 30min. Após lavagem com PBS, foi adicionado o anticorpo de ligação

(kit LSAB-DAKO<sup>®</sup>) por 30min. Após lavagem em PBS, foram incubados com estreptavidina peroxidase (kit LSAB-DAKO<sup>®</sup>) por 30min.

- **Revelação, contracoloração e montagem das lâminas**

Após enxágüe em PBS, adicionou-se o substrato cromógeno DAB-3,3'diaminobenzidina (DAKO<sup>®</sup>), até revelação da cor. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Em seguida, os cortes foram desidratados em álcool em concentrações crescentes, e transferidos para solução de xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck<sup>®</sup>). O controle positivo foi feito com corte histológico de fígado com parasitas e para o controle negativo, adicionou-se solução de BSA 1% em substituição ao anticorpo primário.

#### **4.7 Estatística**

Para cada teste diagnóstico foram calculados a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo (VIEIRA, 2004).

A comparação das técnicas sorológicas com PCR foi estabelecida pelo teste estatístico de McNemar (ZAR, 1999; PAGANO e GAUVREAU, 2004), para populações relacionadas, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade, por meio do programa 'SAS System for Elementary Statistical Analysis' (SCHLOTZHAUER e LITTELL, 1997). Para a comparação entre as concordâncias observadas e esperadas, empregou-se o indicador 'Kappa', com o auxílio do mesmo programa.

Os resultados dos achados das lâminas por imunoistoquímica foram comparados aos achados da PCR em fragmentos renais e avaliados pelo teste exato de Fisher. As análises foram realizadas utilizando-se o programa 'SAS System for Elementary Statistical Analysis'.

## 5 RESULTADOS

---

## 5.1 Exames subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina

Os resultados dos exames subsidiários IFI, ELISA e PCR, realizado com amostras de 48 cães com leishmaniose visceral infectados naturalmente e com estágios variados de evolução da doença, estão apresentados no Apêndice A. O 'cutt-off' da IFI foi de 1:40 e do ELISA foi de 0,100Å. As PCRs foram consideradas positivas quando identificadas bandas de aproximadamente 120bp no gel de agarose.

Nos exames sorológicos (IFI/ELISA), 26 do total de 31 cães sintomáticos, tiveram sorologia positiva, enquanto 15 de 17 dos assintomáticos, apresentaram positividade (Tabela 1).

Todos os animais sintomáticos (31/31-100%) apresentaram resultados positivos nas PCRs, enquanto os assintomáticos, 15 do total de 17 (88%) cães apresentaram resultados positivos neste teste e apenas dois negativos (12%) (Tabela 2).

Pelo teste de McNemar, a comparação entre os resultados dos exames sorológicos IFI/ELISA com a PCR, demonstrou que não houve diferença significativa ( $p=0,0956$ ) entre eles. O indicador Kappa também foi calculado (0,069) e resultou em concordância pobre entre os dois exames (Tabela 3).

Por meio das PCRs dos linfonodos e baço, com os 'primers' A e B, definiu-se positividade para o gênero *Leishmania*. Na Figura 1 estão ilustradas algumas amostras de DNA amplificadas de linfonodos, baço e rins, pertencentes a diferentes animais, e de culturas de *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Estas bandas apresentaram aproximadamente 120bp.

As PCRs de rins foram realizadas com a intenção de comparar os resultados encontrados aos achados imunistoquímicos, estando estes, expostos no Apêndice A.

Detectou-se DNA de *Leishmania* em tecidos renais de 37 dos 48 (77%) cães avaliados, sendo 25 (80%) animais sintomáticos e 12 (70%) assintomáticos.

Os testes sorológicos IFI e ELISA, em relação aos sintomas dos animais, apresentaram sensibilidade de 63,4%, especificidade de 28,6%, valor preditivo positivo de 83,9% e valor preditivo negativo de 11,8%. A acurácia do teste foi de 58,3%.

A PCR apresentou sensibilidade de 67,4%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 11,8%, e acurácia de 68,8%.

**Tabela 1.** Comparação das técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico de leishmaniose em cães do município de Teresina-PI, 2007.

	<b>Sorologia (IFI/ELISA)</b>					
	Positivo		Negativo		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sintomático	26	84	5	16	31	100
Assintomático	15	88	2	12	17	100
<b>Total</b>	<b>41</b>		<b>7</b>		<b>48</b>	

sensibilidade=63,4%, especificidade=28,6%, VPP=83,9%, VPN=11,8%,  
 acurácia=58,3%

**Tabela 2.** Comparação da técnica PCR aplicada ao diagnóstico de leishmaniose em cães do município de Teresina-PI, 2007.

	<b>PCR</b>					
	Positivo		Negativo		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sintomático	31	100	0	0	31	100
Assintomático	15	88	2	12	17	100
<b>Total</b>	<b>46</b>		<b>2</b>		<b>48</b>	

sensibilidade=67,4%, especificidade=100%, VPP=100%, VPN=11,8%,  
 acurácia=68,8%

**Tabela 3.** Comparação das técnicas sorológicas e PCR aplicadas ao diagnóstico de leishmaniose em cães do município de Teresina-PI, 2007.

<b>PCR</b>	<b>Sorologia (IFI/ELISA)</b>					
	Positivo		Negativo		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo	39	81	7	15	46	96
Negativo	2	4	0	0	2	4
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>85</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>48</b>	<b>100</b>

p = 0,0956 (teste de McNemar), indicador Kappa=0,069 (pobre)

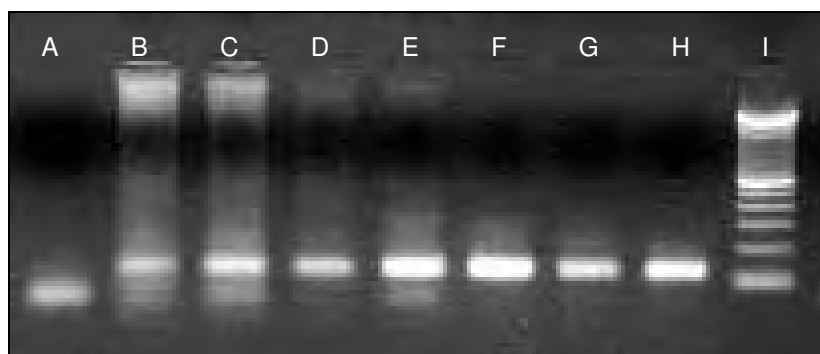


Figura 1. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, com produtos amplificados (120 bp) a partir de *primers* específicos para o gênero *Leishmania*. A. controle negativo; B. amostra de linfonodo do animal 3; C. amostra de linfonodo do animal 7; D. amostra de baço do animal 17; E. amostra de rim do animal 17; F. amostra de cultura de *Leishmania chagasi*; G amostra de cultura de *Leishmania amazonensis*; H. amostra de cultura de *Leishmania braziliensis*; I. marcador de peso molecular de 100bp.



## 5.2 PCR-RFLP

Amostras de DNA amplificadas dos 46 cães positivos nas PCRs foram submetidas à digestão com Hae III, utilizando-se a técnica PCR-RFLP. Deste modo demonstrou-se que as espécies de *Leishmania* das amostras de DNA extraídas dos linfonodos dos cães parasitados diferenciaram-se de amostras padronizadas em que os agentes causadores são *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Para *L. (L.) amazonensis*, a enzima Hae III não digeriu o fragmento amplificado, formando apenas uma banda em 120bp. Por outro lado, para a espécie *L. (V.) braziliensis* a enzima Hae III digeriu o fragmento resultando duas bandas de aproximadamente 40bp e 80bp (Figura 2).

Na PCR-RFLP, com a digestão com a enzima Hae III, todas as amostras de DNA dos diferentes tecidos foram identificadas como pertencentes à espécie *L. (L.) chagasi* e mostraram bandas de 120, 80, 60 e 40bp (Figuras 2 e 3), dos quais se diferenciaram do padrão das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Portanto, de acordo com estas reações, as amostras de todos os animais estudados, positivos nas PCRs, são pertencentes à espécie *L. (L.) chagasi*.

Com a utilização das enzimas de restrição Hae III, Rsa I e Bsr I, verificou-se padrão de restrição distintos entre elas.

As amostras de DNA de *L. (L.) chagasi*, extraídas de linfonodos de cães com leishmaniose e DNA de cultura da mesma espécie, submetidas à digestão com Rsa I não foram clivadas permanecendo bandas em 120pb (Figura 4).

Com a enzima Bsr I, as amostras de DNA de *L. (L.) chagasi* dos mesmos animais e da cultura apresentaram-se clivadas em aproximadamente 110bp (Figura 4). Esta enzima clivou *L. (L.) amazonensis* em 80 e 40bp e não clivou *L. (V.) braziliensis*, permanecendo banda em 120bp (dados não mostrados).

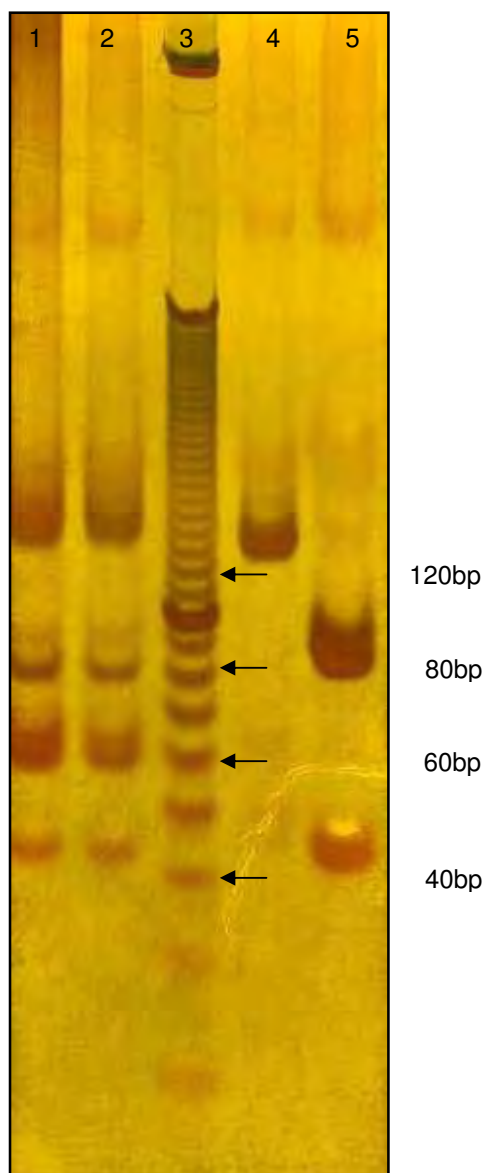


Figura 2. Gel de acrilamida 10% após digestão enzimática com Hae III. 1. amostra de linfonodo de cão, positivo para *Leishmania chagasi*; 2. amostra de cultura de *L. chagasi*. 3. marcador de peso molecular 10 bp; 4. amostra de cultura de *L. amazonensis*; 5. amostra de cultura de *L. braziliensis*.

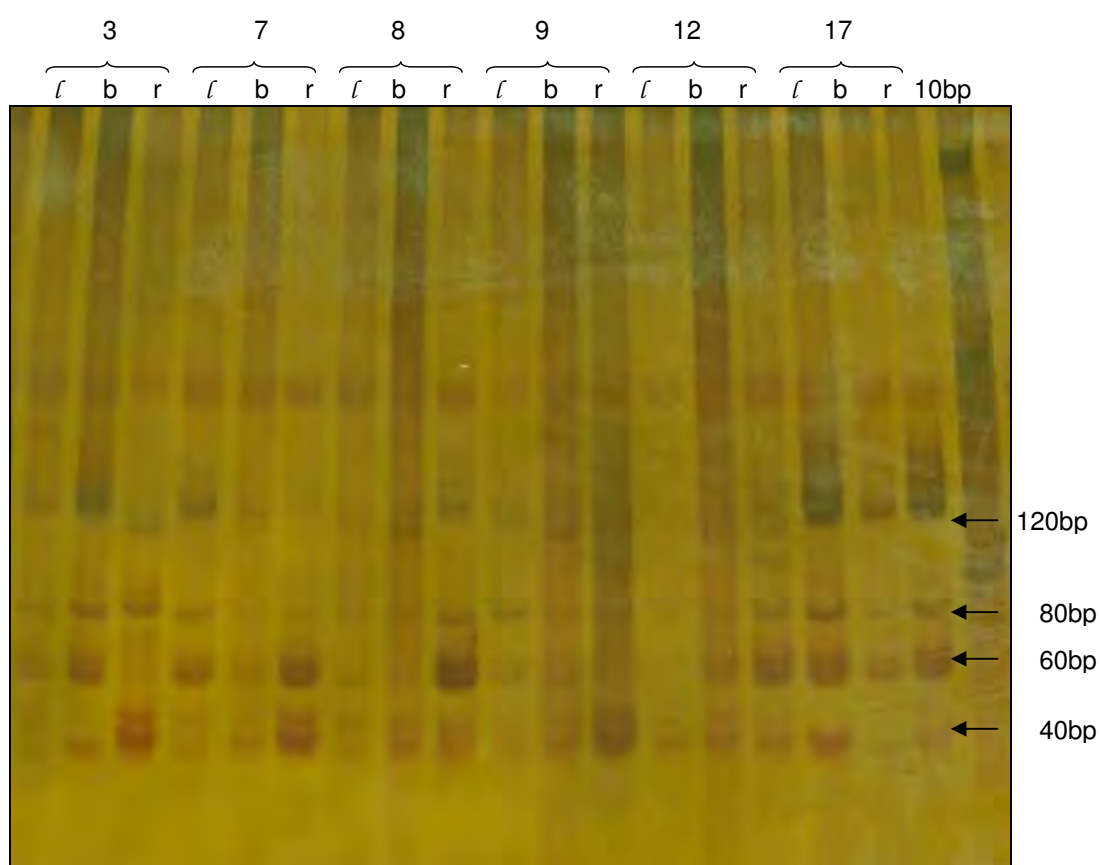


Figura 3. Gel de acrilamida 10% após digestão enzimática com Hae III, de PCRs de amostras de DNA de diferentes animais (3, 7, 8, 9, 12 e 17) e tecidos: linfonodo (l) baço (b) e rim (r). 10bp. Marcador de peso molecular.

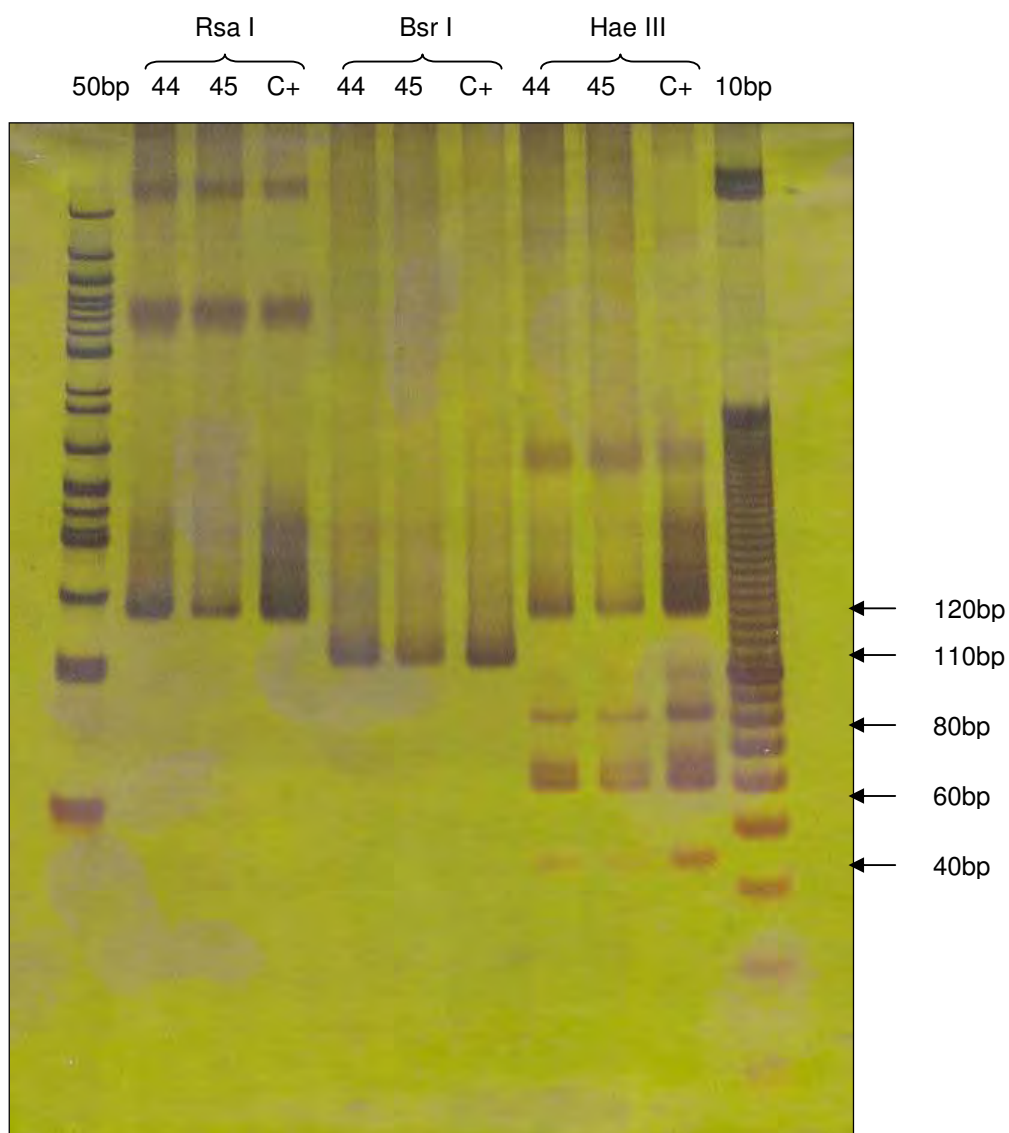


Figura 4. Gel de acrilamida 10% após digestão enzimática com Rsa I, Bsr I e Hae III. **44**. Amostra de DNA de linfonodo do animal 44; **45**. Amostra DNA de linfonodo do animal 45; **C+**. Controle positivo com DNA de cultura de *L. chagasi*. **50bp** e **10bp**. Marcador de peso molecular.

### 5.3 Seqüenciamento de DNA

Os produtos obtidos de PCR de linfonodos dos 46 cães positivos foram seqüenciados. De acordo com a avaliação no site NCBI (National Center for Biotechnology Information), dos fragmentos de DNA seqüenciados, cada uma das seqüências obtidas eram características das espécies causadoras da leishmaniose visceral (*L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*), porém não foi possível diferenciá-las por meio desta técnica.

No programa BioEdit foram alinhados os fragmentos amplificados de apenas 27 animais, dos quais obteve-se seqüência de DNA de *Leishmania* (Figura 5). Um fragmento de aproximadamente 55pb apresentou homologia entre as amostras seqüenciadas.

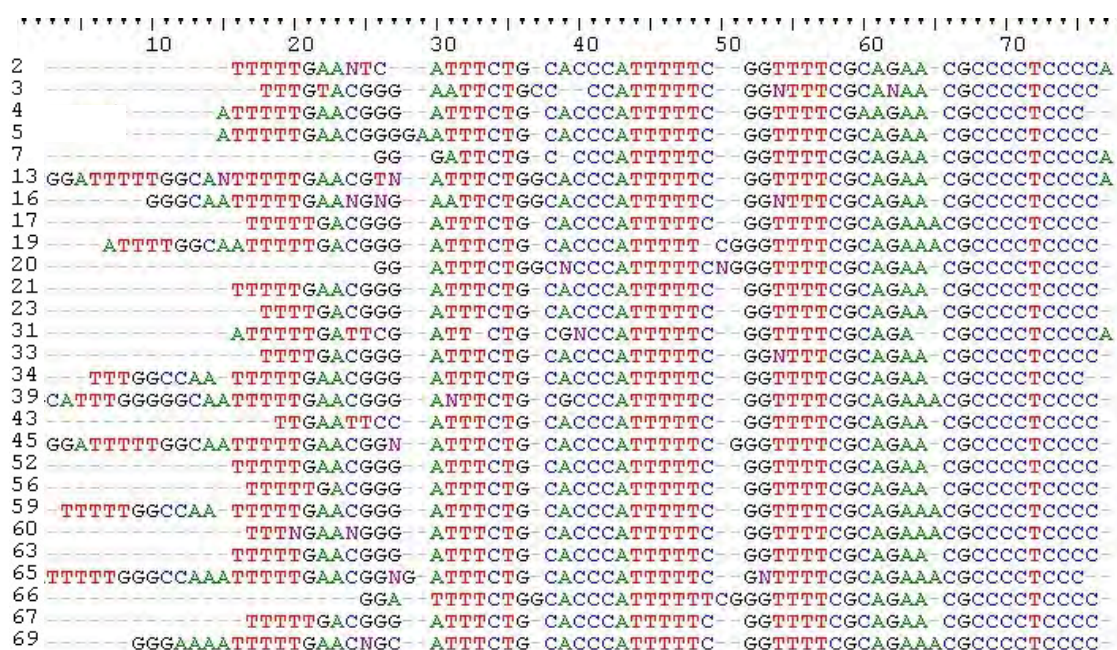


Figura 5. Alinhamento das seqüências obtidas da região conservada do minicírculo kDNA a partir do seqüenciamento de 27 amostras de linfonodos de cães com leishmaniose.

#### 5.4 Imunoistoquímica

Por meio das reações imunoistoquímicas foram identificadas formas amastigotas íntegras de *Leishmania* em meio ao infiltrado intersticial em cortes histológicos renais de dois (4%), dos 48 cães avaliados. Estas se mostraram ausentes em outras localizações como nos túbulos renais ou nos glomérulos, mesângio e sub-endotélio dos capilares dos tufo glomerulares (Figura 6 e 7).

A análise imunoistoquímica quando comparada aos resultados das PCRs dos rins, mostrou diferença significativa pelo teste exato de Fisher a 1% de probabilidade, indicando que a PCR é um teste mais preciso para detectar a presença do parasita neste órgão, quando comparada à imunoistoquímica. Os resultados dos animais positivos nas PCRs e nas reações imunoistoquímicas estão demonstrados no Apêndice A.



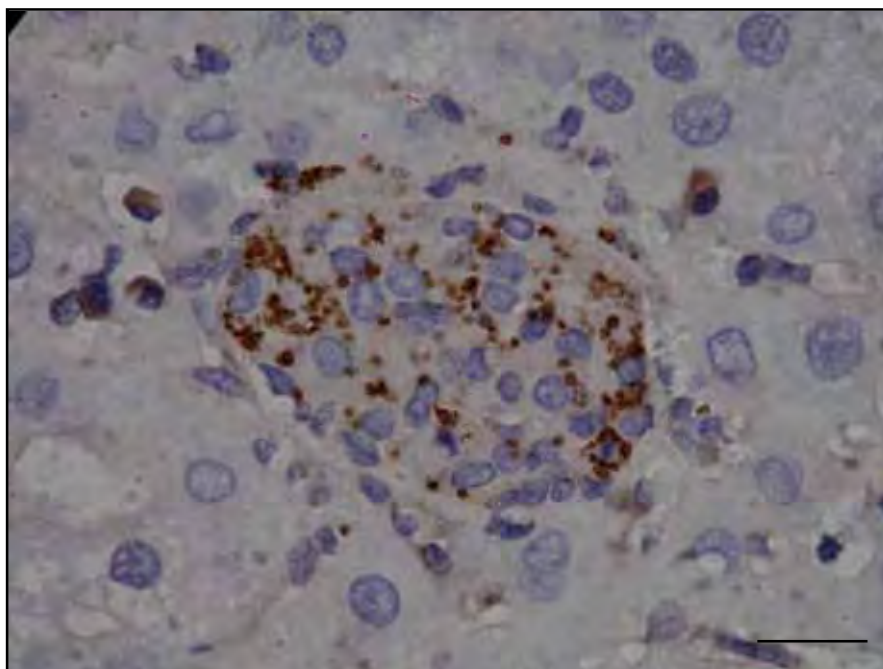


Figura 6. Corte histológico submetido a reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* pelo método LSAB. Fígado: presença de formas amastigotas de *Leishmania* (controle positivo). Barra: 0,7 $\mu$ m.

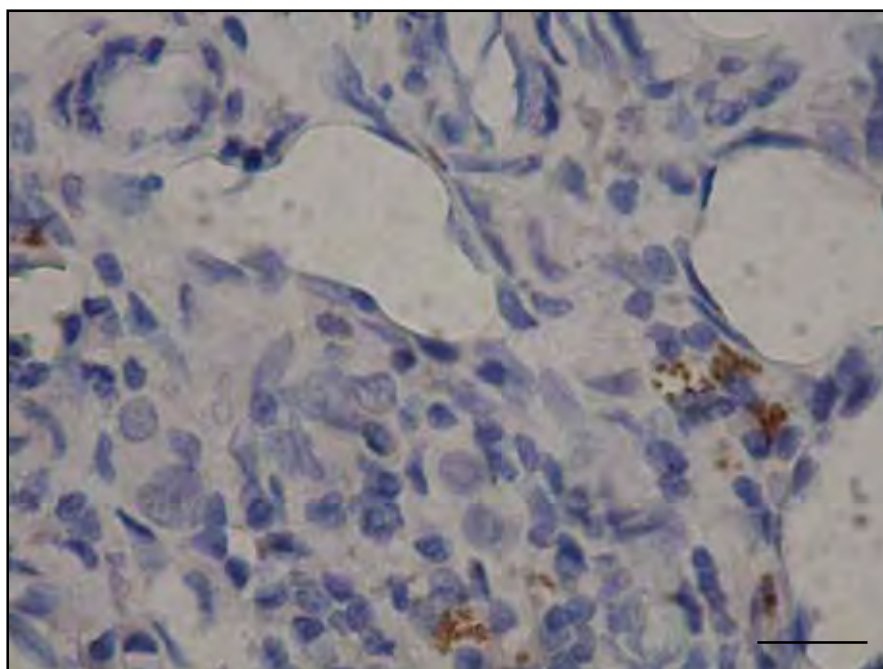


Figura 7. Corte histológico submetido a reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* pelo método LSAB. Rim de cão com leishmaniose visceral: presença de formas amastigotas, no interstício. Barra: 0,7 $\mu$ m.



## 6 DISCUSSÃO

---

A leishmaniose visceral é endêmica em algumas regiões do Brasil e encontra-se difundida na maioria dos estados brasileiros incluindo o de São Paulo, onde foram identificados casos humanos, caninos e a presença do inseto vetor infectado.

O prognóstico e o tratamento de pacientes humanos com leishmaniose dependem do agente etiológico envolvido. Devido à existência de espécies simpátricas no estado do Piauí, causadoras de leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, a identificação e a distinção dos parasitas morfologicamente similares é imprescindível. Assim, a identificação da espécie de *Leishmania*, por meio de seqüenciamento e PCR-RFLP, em diferentes tecidos de animais infectados, provenientes de Teresina-PI-Brasil, foi objetivo desta pesquisa. Por meio de técnicas de imunistoquímica e PCR, foram analisadas amostras de tecido renal dos mesmos animais, com o propósito de identificar qual o método mais efetivo e seguro na identificação do agente.

Todos os animais deste ensaio sofreram infecção natural e estavam em estágios variados de evolução da doença. Em 31/31 (100%) dos cães sintomáticos e em 15/17 (88%) dos assintomáticos para leishmaniose visceral, foram detectados *Leishmania* sp nos tecidos (linfonodos e baços) por meio da PCR.

O diagnóstico por meio de sorologia, utilizada rotineiramente em estudos epidemiológicos e por órgãos governamentais, freqüentemente apresenta resultados falso-positivos devido a reações cruzadas pela infecção por *Babesia canis* sp, *Trypanosoma* sp e *Ehrlichia canis*. Nos exames sorológicos (IFI/ELISA), 84% dos cães sintomáticos e 88% dos assintomáticos apresentaram sorologia positiva. Entretanto, na comparação dos resultados dos exames sorológicos IFI/ELISA com a PCR, verificou-se que não houve diferença significativa no diagnóstico da infecção.

Neste estudo, os testes sorológicos IFI e ELISA, apresentaram sensibilidade de 63,4%, especificidade de 28,6%, valor preditivo positivo de 83,9% e valor preditivo negativo de 11,8%. A acurácia do teste foi de 58,3%. A PCR apresentou sensibilidade

de 67,4%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 11,8%, e acurácia de 68,8%. Resultados semelhantes foram descritos por Ashford e colaboradores (1995), que observaram sensibilidade de 63%, especificidade de 68% na sorologia e sensibilidade de 100% na PCR no diagnóstico de Leishmaniose visceral em 25 cães.

As enzimas de restrição digerem produtos do minicírculo do DNA em fragmentos de diferentes tamanhos e números que podem ser separados por eletroforese em gel, formando padrões de bandas específicas (JACKSON et al., 1984).

Por meio da técnica PCR-RFLP, utilizando-se amostras de linfonodos, baço e rins dos cães e amostras de cultura de *L. chagasi*, a enzima Hae III clivou o DNA da *Leishmania* em 120, 80, 60 e 40 bp. A *Leishmania* foi identificada como pertencente à espécie *L. (L.) chagasi*. Amostras de DNA de culturas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* também foram digeridas por esta enzima. A enzima digeriu os 120 bp, produtos da PCR de *L. (V.) braziliensis* produzindo dois fragmentos, um de 40 bp e outro de 80 bp, entretanto, não digeriu *L. (L.) amazonensis*. Todas as amostras de DNA de *Leishmania* obtidas dos animais deste experimento mostraram padrão semelhante. Portanto, de acordo com a técnica PCR-RFLP, as amostras dos animais estudados, positivos nas PCRs, são pertencentes à espécie *L. (L.) chagasi*. Utilizando a mesma técnica e enzima, em amostras extraídas de cães com leishmaniose, naturalmente infectados, foram descritos resultados semelhantes aos deste estudo para a espécie *L. (L.) chagasi* (ANDRADE et al., 2006).

Em biopsias de pele ou mucosa de pacientes com leishmaniose cutânea, utilizando-se a enzima Hae III, outros autores também identificaram os agentes etiológicos como pertencentes às espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, apresentando o mesmo padrão de restrição (VOLPINI et al., 2004; GARCIA, 2005).

Em nossos ensaios, o DNA extraído das amostras de culturas de *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, e dos linfonodos de cães com leishmaniose, não foram clivadas quando submetidas à digestão com Rsa I, sugerindo que essa enzima não foi apropriada na diferenciação destas espécies nas condições experimentais utilizadas. Por outro lado, a utilização de outra enzima: a Bsr I clivou *L.*

(*L.*) *amazonensis* em 80 e 40bp, *L. (L.) chagasi* em 110bp e não digeriu *L. (V.) braziliensis*, permanecendo a banda em 120bp, caracterizando-a como efetiva para diferenciar as espécies *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

A diferenciação das espécies *L. chagasi* (Novo Mundo) e *L. donovani* e *L. infantum* (Velho Mundo), causadoras de leishmaniose visceral é controversa. Alguns autores defendem a teoria de que existem três espécies causadoras da enfermidade, diferenciadas pelo uso da RFLP com a enzima Hpa II (JACKSON et al., 1984), dados corroborados por Pearson e Sousa (1996). Contrariamente, outros autores afirmam que *L. chagasi* e *L. infantum* são as mesmas espécies, uma vez que as bandas formadas após eletroforese em gel com o uso da RFLP com diferentes enzimas produziram padrões idênticos na digestão do DNA (MARFURT et al., 2003). Destes dados concluiu-se que a taxonomia da *Leishmania* é complexa e inconclusiva.

Da avaliação das seqüências obtidas com o programa de edição e alinhamento, apenas 27 amostras foram adequadas ao estudo. Verificou-se que aproximadamente 55bp do fragmento seqüenciado eram homólogos nestas amostras estudadas.

Do seqüenciamento das amostras de DNA com o 'primer' A, concluiu-se que a seqüência de oligonucleotídeos foi compatível com as dos agentes etiológicos da leishmaniose visceral. Entretanto, o seqüenciamento não possibilitou a diferenciação entre as espécies *L. chagasi*, *L. infantum* e *L. donovani*. O fragmento amplificado foi muito curto, não sendo possível diferenciá-las. Concluiu-se ainda, que a utilização de outro 'primer' que produzisse fragmento mais longo, ou a clonagem do DNA, seria recomendada para melhor performance no seqüenciamento.

A técnica imunoistoquímica é um procedimento importante no diagnóstico da *Leishmania* em fragmentos de diferentes órgãos, propiciando a identificação precisa do agente etiológico, além de auxiliar na avaliação da resposta tecidual desenvolvida pelo hospedeiro (GARCIA, 2005).

Nas reações imunoistoquímicas renais foram identificados apenas dois (4%) animais sintomáticos com formas amastigotas de *Leishmania* íntegras no infiltrado inflamatório do interstício renal, excluindo os túbulos, glomérulos, mesângio e sub-

endotélio dos tufos capilares. Contrariamente, nas mesmas condições experimentais, antígeno de *Leishmania* foi identificado no infiltrado inflamatório intersticial e nas células fagocíticas glomerulares em 61,8% e 90,9%, respectivamente, dos 55 animais avaliados (COSTA et al., 2003).

As técnicas usuais de coloração histológica são inapropriadas para a identificação do parasita em rins (NICODEMO et al., 1984; CARAVACA et al., 1991; MARTINELLI et al., 1999; COSTA et al., 2003). Não há relato na literatura consultada de estudo sistemático na identificação do protozoário em tecido renal, utilizando a PCR.

A PCR realizada em amostras renais identificou a presença de DNA de *Leishmania* sp em 37 (77%) dos 48 cães avaliados, demonstrando ser a PCR, quando comparada à imunistoquímica, um teste mais preciso para detectar a presença do parasita neste órgão.

## 7 CONCLUSÕES

---

Com base nos resultados apresentados, nas condições experimentais utilizadas e na literatura consultada, conclui-se que:

- A técnica PCR-RFLP caracterizou como sendo *Leishmania (Leishmania) chagasi* o agente etiológico da leishmaniose visceral canina.
- O fragmento de DNA seqüenciado apresentou homologia de 55bp entre as amostras de *Leishmania* estudadas.
- A PCR realizada nas amostras renais foi mais sensível e precisa na detecção de *Leishmania sp* quando comparada à imunistoquímica.
- A PCR foi mais sensível e específica que a sorologia na detecção da infecção por *Leishmania sp*.

## 8 REFERÊNCIAS

---



AGGARWAL, P.; HANDA, R.; SINGH, S.; WALI, J. P. Kala-azar: new developments in diagnosis and treatment. **Indian J. Pediatr.**, New Delhi, v. 66, n. 1, p. 63-71, 1999.

AGU, W. E.; FARRELL, J. P.; SOULSBY, E. J. L. Proliferative glomerulonephritis in experimental *Leishmania donovani* infection of the golden hamster. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, Oxford, v. 4, n. 3/4, p. 353-368, 1981.

ALVAR, J.; CANÁVETE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, G.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, n. 2, p. 298-319, 1997.

ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet. Parasit.**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 231-238, 2006.

ANDRADE, L. E. C. Theoretical and basic principles in molecular biology. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 31-41, 1993.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR., R. H.; BADARO, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

BLACKWELL, J. M. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. **Parasitology**, Cambridge, v. 104, s19-s34, 1992.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **J. Vet. Diag. Invest.**, Columbia, v. 9, n. 4, p. 439-440, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar)**: normas técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1994. 103 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília-DF: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

CARAVACA, F.; MUNÓZ, A.; PIZARRO, J. L.; SANTAMARIA, J. S.; FERNANDEZ-ALONSO, J. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. **Am. J. Nephrol.**, Basel, v. 11, n. 4, p. 350-352, 1991.

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*. **Vet. Rec.**, London, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CORBETT, C. E. P.; PAES, R. A. P.; LAURENTI, M. D.; ANDRADE JR, H. F.; DUARTE, M. I. S. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **Intern. J. Experim. Pathol.**, Oxford, v. 73, n. 4, p. 417-433, 1992.

COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally

acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 40, n. 6, p. 677-684, 2003.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 128, n.1-2, p. 149-155, 2005.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F.; LANOTTE, G.; RAVEL, C. The parasite. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 17, n. 3, p. 261-268, 1999.

DUARTE, M. I.; CORBETT, C. E. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 131-136, 1987.

DUARTE, M. I. S.; SILVA, M. R. R.; GOTO, H.; NICODEMO, E. L.; AMATO NETO, V. Interstitial nephritis in human kala-azar. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 77, n. 4, p. 531-537, 1983.

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). **Clin. Vet.**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A., FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Res. Vet. Sci.**, London, n. 44, n. 2, p. 194-196, 1988.

GARCIA, F. C. B. **Métodos subsidiários para o diagnóstico da LTA:** comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR-RFLP para a determinação da espécie de *Leishmania* em amostras cutâneo-mucosas (janeiro de 1993 a junho de

2004). 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microb. Rev.**, Washington, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, N.; MARTÍNEZ, C.; GARCIA, L.; CONVIT, J. *Leishmania braziliensis* causing visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus infection, identified with the aid of the polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 87, n. 6, p. 627-628, 1993.

HU, X.; YANG, W.; LU, H.; YAN, H.; CHENG, J.; MA, Y.; JIN, B.; ZHANG, T. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of Leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 86, n. 4, p. 822-826, 2000.

JACKSON, P. R.; WOHLHIETER, J. A.; JACKSON, J. E. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 33, n. 5, p. 808-819, 1984.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, Cambridge, v. 125, n. 3, p. 197-207, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, London, v. 273, n. 5664, p. 595-600, 1978.

LAURENTI, M. D. **Aspectos patogénicos da resposta inflamatória aguda induzida experimentalmente em *Mesocricetus auratus* pela inoculação subcutânea de *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 1993. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LAURENTI, M. D.; SOTTO, M. N.; CORBETT, C. E. P.; MATTA, V. L. R.; DUARTE, M. I. S. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. **Int. J. Exp. Pathol.**, Reino Unido, v. 71, n. 6, p. 791-797, 1990.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M. C.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, n. 17, p. 11234-11236, 1991.

LERNER, E. A.; SHOEMAKER, C. B. Maxadilan: cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, n. 2, p. 1062-1066, 1992.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.**, Berlin, v. 401, n. 2, p. 147-151, 1983.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N. D.; BECK, H.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diag. Microb. Infect. Dis.**, New York, v. 46, n. 2, p. 115-124, 2003.

MARQUES, M. J.; VOLPINI, A. C.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; ROMANHA, A. J. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 65, n. 6, p. 902-906, 2001.

MARTINELLI, R.; SILVEIRA, M. A.; ROCHA, H. Glomerulonefrites associada a infestações parasitárias. In: SOARES, V.; ALVES, M. A. R.; BARROS, R. T. **Glomerulopatias**: patogenia, clínica e tratamento. São Paulo: Sarvier, 1999. p. 206-213.

MARTINS, J. J. N. (Coord.). **Zoonoses emergentes nas regiões sul e sudeste**: vigilância e controle da leishmaniose americana de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: SUCEN, 1999. 46 p.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1145-1149, 1995.

McADAM, A. J.; SHARPE, A. H. Doenças infecciosas. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia**: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 8, p. 357-432.

MEDEIROS, A. C. R. **Análise filogenética das espécies *Leishmania* implicadas na leishmaniose tegumentar americana em pacientes atendidos no hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (janeiro de 1993 a junho de 2002)**. 2002. 116f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

MEDEIROS, A. C. R. **Leishmaniose tegumentar americana**: casuística e implantação de PCR para diagnóstico, HC-FMRP-USP, 1978-1998. 1999. 174 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

MEDEIROS, A. C. R.; RODRIGUES, S. S.; ROSELINO, A. M. F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 4, p. 421-424, 2002.

MINODIER, P.; PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F.; JOBLET, C.; DUMON, H. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 10, p. 2551-2555, 1997.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, cap. 2, p. 121-176.

MORIMOTO, A. A.; PONTELLO, R.; EISELI, R. L.; MORIMOTO, H. K.; BORTOLIERO, A. L. American cutaneous leishmaniasis (LTA) in an HIV-positive patient: a case report. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 219-222, 1998.

NICODEMO, E. L.; DUARTE, M. I. S.; NICODEMO, A. C.; AMATO NETO, V. Aspectos clínicos-laboratoriais da nefrite intersticial da leishmaniose visceral. **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v. 102, n. 1, p. 19-22, 1984.

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; SERRANO, F.; RENDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, London, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SARTORI, A.; CAMPOS-NETO, A.; ROSSI, M. A. Mesangial proliferative glomerulonephritis associated with progressive amyloid deposition in hamsters experimentally infected with leishmania donovani. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 120, n. 2, p. 256-262, 1985.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Tabelas de contingência. In: \_\_\_\_\_. **Princípios de bioestatística**. São Paulo: Thompson Learning, 2004. cap. 15, p. 304-331.

PASSOS, V. M.; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J.; KRETTLI, A. U.; VOLPINI, A. C.; LIMA E COSTA, M. F. F. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bull. World Health Org.**, New York, v. 78, n. 8, p. 968-974, 2000.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PESSOA, S. P.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap. 7, p. 77-118.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nefron**, Basel, v. 57, n. 4, p. 444-452, 1991.

PRASAD, L. S. N.; SEN, S.; GANGULY, S. K. Renal involvement in Kala-azar. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 95, n. 1, p. 43-46, 1992.



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

REY, L. Leishmaníase visceral. In: \_\_\_\_\_. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 6, p. 63-70.

ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future: leishmaniasis. **British Medical Journal**, London, v. 321, n. 7264, p. 801-804, 2000.

RODRIGUES, E. H. G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco**. 2000. 70 f. Dissertação (Mestrado) - NESC do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.

ROSATELLI, J. B.; SOUZA, C. S.; SOARES, F. A.; FOSS, N. T.; ROSELINO, A. M. F. Generalized cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 229-232, 1998.

RÜFENACHT, S.; SAGER, H.; MÜLLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M. M.; ROOSJE, P. J. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **Vet. Rec.**, London, v. 156, n. 17, p. 542-545, 2005.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clín. Vet.**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SARTORI, A.; OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C., ROSSI, M. A.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 93-103, 1987.

SAVANI, E. S. M. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'ÁURIA, S. R. N.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasit.**, Amsterdam, n. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SCHLOTZHAUER, S. D.; LITTELL, R. C. **SAS System for Elementary Statistical Analysis**. 2 ed. Cary: SAS, 1997. 440p.

SCHUBACH, A., HADDAD, F., NETO, M.P.-O., DEGRAVE, W., PIRMEZ, C., GRIMALDI JR., G., FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 178, n. 3, p. 911-914, 1998.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 65, n. 6, p. 896-898, 2001.

SOARES, M. J. V.; MORAES, J. R. E. Padrão de distribuição de imunoglobulinas IgG E IgM em rins de cães naturalmente infectados com leishmaniose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 57, n. 7, supl. 1, p. 105, 2005.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Adv. Immunol.**, San Diego, v. 74, n.1 , p. 275–317, 2000.

STEVENS, A.; LOWE, J. Doenças do sistema urinário. In: \_\_\_\_\_. **Patologia**. 2. ed., São Paulo: Manole, 1998. cap.15, p. 317-349.

SUCEN. **Leishmaniose visceral americana**: situação epidemiológica. 2007. Disponível em <<http://www.sucen.sp.gov.br>>. Acesso em: 31 jan. 2007.

SUFFIA, I.; FERRUA, B.; STIEN, X.; MOGRABI, B.; MARTY, P.; ROUSSEAU, D.; FRAGAKI, K.; KUBAR, J. A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 68, n. 2, p. 630-636, 2000.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. F. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

VIEIRA, S. As tabelas 2 x 2. In: \_\_\_\_\_. **Bioestatística**: tópicos avançados. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 3, p. 51-86.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis, **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

WIRTH, D. F.; ROGERS, W. O.; BARKER, R.; DOURADO, H.; SUESEBANG, L.; ALBUQUERQUE, B. Leishmaniasis and malaria: DNA probes for diagnosis and epidemiologic analysis. **Ann. New York Acad. Sci.**, New York, v. 569, p. 183-192, 1989.

WHO. **Focus**: leishmaniasis. 2005. Disponível em <<http://www.who.int/tdr/dw/leish2004.htm>>. Acesso em: 12 març. 2005.

WHO. **Leishmaniasis**. 2007. Disponível em <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/>> Acesso em: 22 jan. 2007.

ZAR, J. H. Paired-sample hypotheses. In: \_\_\_\_\_. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. cap. 9, p. 161-176.

## APÊNDICE

---

APÊNDICE A - Resultados de PCR, IHQ, IFI e ELISA de 48 cães com leishmaniose visceral, do município de Teresina-PI, 2007.

Nº Animal	Sintomas	PCR rim	PCR linfon	PCR baço	IHQ	IFI*	ELISA**
2	S	-	+		-	5120	1,242
3	A	+	+	+	-	NR	0,079
4	S	+	+		-	1280	0,546
5	S	-	+		-	1280	0,714
6	S	+	+		-	5120	1,348
7	S	+	+	+	-	160	0,951
8	S	+	+	+	-	160	0,620
9	A	+	+	+	-	40	0,225
12	A	+	+	+	-	160	0,476
13	S	+	+		-	1280	0,897
14	A	+	+		-	640	0,599
15	S	+	+		-	640	0,799
16	A	+	+		-	160	0,753
17	S	+	+	+	-	160	1,192
18	S	+	+		+	5120	1,205
19	S	+	+		-	160	0,571
20	S	+	+		-	640	0,496
21	S	+	+	-	-	NR	0,016
22	S	+	+		-	5120	1,293
23	S	+	+		+	640	0,780
31	S	+	+		-	320	1,063
33	S	+	+		-	5120	0,992
34	S	+	+		-	5120	0,877
35	S	+	+		-	5120	1,173
38	S	+	+	+	-	80	0,688
39	A	+	+		-	320	0,448
41	A	-	+		-	320	0,658
42	S	-	+		-	NR	0,072
43	A	-	+		-	80	0,131
44	S	-	+		-	NR	0,080
45	S	-	+		-	2560	1,417
50	A	+	+		-	40	0,224
52	S	+	+		-	80	0,137
54	S	-	+		-	NR	0,022
56	S	+	+		-	2560	1,097
57	A	-	-	+	-	320	1,088
58	A	-	-	-	-	640	0,388
59	A	-	+	+	-	160	0,591
60	A	+	+	-	-	640	0,431
61	S	+	+		-	160	0,218
62	A	+	+		-	2560	0,983
63	S	+	+		-	5120	1,151
64	S	+	+	+	-	NR	0,018

65	A	+	+	-	-	160	0,112
66	A	+	+	+	-	NR	0,004
67	S	+	+		-	1280	0,807
68	S	+	+		-	160	0,417
69	A	+	+	-	-	40	0,158

\*Cutt-off 1:40, \*\*Cutt-off 0,100Å; S: sintomático; A: assintomático; IHQ: imunoistoquímica; +: positivo; -: negativo; NR: não reagente