

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

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA-P E DA MRP1 EM
TECIDOS DE CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Andréa Maria Campos Calado

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2010

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

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA-P E DA MRP1 EM
TECIDOS DE CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Andréa Maria Campos Calado

Orientador: Prof^ª. Dra. Mirela Tinucci Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2010

C141e Calado, Andréa Maria Campos
Expressão da glicoproteína-p e da mrp1 em tecidos de cães
portadores de leishmaniose visceral / Andréa Maria Campos Calado. -
- Jaboticabal, 2010
vi, 42 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Mirela Tinucci Costa
Banca examinadora: Julieta Rodini Engracia de Moraes, Maria
Cecilia Rui Luvizotto
Bibliografia

1. Glicoproteína-P. 2. MRP. 3. *Leishmania (L.) chagasi*. 4. dog. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉA MARIA CAMPOS CALADO – Natural de Recife, Pernambuco, nascida em 25 de agosto de 1982. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE em 2001 e graduou-se no ano de 2006, após estágio curricular na Clínica Santo Agostinho em Belo Horizonte, Minas Gerais, onde desenvolveu sua monografia sobre o tratamento de cães com leishmaniose visceral. Durante o ano de 2007, atuou em projetos desenvolvidos na UFRPE e trabalhou como veterinária autônoma em clínica veterinária. Em 2008, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, sob orientação da Profa Dra Mirela Tinucci Costa,

*“Os animais de estimação são o cinto de segurança
que temos na montanha-russa emocional que é a
vida; são confiáveis, nos mantêm seguros
e tornam a viagem menos atribulada.”*

Dr. Nick Trout

Dedico este trabalho inteiramente aos meus pais, Marcos e Maria José, exemplos de vida, fé, perseverança e humildade. Pelo amor incondicional as filhas. Realmente, eles foram essências nessa minha jornada. E a minha irmã Luciana, por ser, minha verdadeira amiga.

AGRADECIMENTOS

Deus e a Mãe Rainha Três Vezes Admirável de Schoenstatt, por proteger e iluminar meus passos; E por me dar tranquilidade nos momentos em que a saudade apertava o coração. E ao meu anjo da guarda por sempre me guiar nessa caminhada.

A professora Mirela Tinucci Costa, pela dedicação, paciência e a oportunidade de fazer o mestrado nesta universidade. Por ser um exemplo que competência e simplicidade podem andar juntos.

Ao professor Leucio, a quem sempre vou me referir como um grande mestre e segundo pai. Nas horas de medo e dúvidas, foram nas suas palavras de apoio e total confiança que eu me apeguei e a oportunidade de um dia ter me aceitado como monitora de sua disciplina, pois foi o pontapé inicial para toda essa vontade de seguir na área acadêmica.

Aos Centros de Zoonoses de Caruaru e Petrolina, por apoiar essa pesquisa, ajudando na apreensão dos animais, assim como hospedagem a todos os alunos e pesquisadores envolvidos nesse experimento.

Ao Departamento de Patologia da UNESP, pela ajuda no processamento das minhas amostras, em especial a técnica Francisca de Assis Ardisson (Chica).

A todos os meus familiares, em especial a tia Ana e tia Neta, exemplos de bondade, serenidade e generosidade. Obrigada por todo apoio.

A todos os meus amigos do Departamento de Parasitologia Veterinária da UFRPE, que me ensinaram a importância de se trabalhar em equipe: Rafa, Danilo, Marília, Mariana Galindo, Mariana França, Renan, George, Dennys e Carina. Obrigada pela amizade e ajuda durante as coletas das minhas amostras em Pernambuco, tornando esses momentos mais agradáveis.

E a todos os amigos do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, em especial Giovanni, Thiago “quaiada”, Carol e Mariana. A amizade, a troca de experiências e auxílio foram de grande importância durante todo o meu experimento.

A Fabiana pela paciência em oferecer toda a sua experiência em imunohistoquímica e ao Alexandre “Dedo” pela ajuda na realização da estatística desse trabalho.

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde o início dessa jornada: Daniel Beretta, Renata “bozena”, Vânia, Kelly, Manu “bunita, Lili, Cris, mylife, Juliana, Déa e Carol. E a todos que tornaram essa minha caminhada muita mais divertida, assim como o carinho que recebi de todos que foram entrando na minha vida ao longo dessa caminhada: Nara, Tati, Dan, Max, Gui, Mirna, Tiago, Jorginho e Du. Todos vocês formaram minha grande família de Jaboticabal.

Aos meus amigos de Recife, que mesmo longe, enviavam vibrações positivas e torciam pela minha vitória: Aninha, Cau, Lu, Thiago, Mayara, Airton, Dinho e Eddie.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pagina
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Leishmaniose Visceral Canina.....	3
2.2 Mecanismos de resistência a múltiplas drogas (RMD).....	5
2.2.1 Glicoproteína-P.....	6
2.2.2 Proteína de resistência a múltiplas drogas (MRP).....	9
III. OBJETIVOS.....	12
3.1 Geral.....	12
3.2 Específicos.....	12
IV. METODOLOGIA.....	13
4.1 Local e Cães.....	13
4.2 Processamento das amostras.....	14
4.3 Análise Imuno-histoquímica da Leishmania sp.....	14
4.4 Análise Imuno-histoquímica da MRP e gp-P.....	16
4.5 Análise estatística.....	17
V. RESULTADOS.....	18
5.1 Exame físico.....	18
5.2 Imuno-histoquímica de Leishmania sp.....	18
5.3 Imuno-histoquímica da pg-P e MRP.....	19
5.3.1 Imunomarcção da Glicoproteína-P.....	19
5.3.2 Imunomarcção da Proteína de resistência a múltiplas drogas.....	21
5.2.3 Avaliação comparativa das imunomarcações da Glicoproteína P e MRP.....	23
VI. DISCUSSÃO.....	25

VII. CONCLUSÕES.....	30
VIII. REFERÊNCIAS.....	31

EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA-P E DA MRP1 EM TECIDOS DE CÃES PORTADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica e imunomediada. É provocada pelo protozoário da espécie *Leishmania (L.) chagasi*, que é transmitido ao homem e aos animais através da picada do vetor infectado, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Até o momento não há tratamento que leve a cura parasitológica dos cães e o arsenal de fármacos leishmanicidas é limitado. A resistência aos medicamentos constitui um impedimento importante para o controle de enfermidades e a manifestação de resistência a vários medicamentos é conhecida como MDR (“multidrug resistance”). Um desses mecanismos de resistência a múltiplas drogas é o aumento da expressão da glicoproteína-P (gp-P), um sistema de efluxo de xenobióticos codificadas pelo gene MDR1. Na presente pesquisa, buscou-se avaliar a possibilidade do fenômeno de resistência a múltiplas drogas em cães naturalmente parasitados por *Leishmania (L.) chagasi*. Foram objetivos do estudo avaliar a expressão da glicoproteína-P (gp-P) e da proteína de resistência a múltiplas drogas (MRP) por meio da imuno-histoquímica, em amostras fígado, adrenais, rins, baço e pele de cães portadores da LV. Os resultados mostraram que o fígado, rins e adrenais expressam significativamente ($p < 0,001$) mais gp-P do que a pele e o baço; também que as adrenais expressam significativamente ($p < 0,001$) mais MRP do que a pele e o baço e que este último expressa significativamente ($p < 0,001$) mais MRP do que a pele. Quando se comparou os dois anticorpos verificou-se que o fígado, rins e adrenais expressam porcentagens semelhantes de células imunomarcadas e que o MRP é significativamente ($p < 0,01$) mais reativo na pele que a gp-P. Esses resultados poderiam justificar a redução da carga parasitária na pele que se acompanha durante o tratamento. Todavia, a não obtenção da cura parasitológica poderia ser devido a alta expressão da gp-P e MRP1 no fígado, adrenal e rins, o que aumentaria o efluxo dos fármacos nesses órgãos.

Palavras – chave: cão, glicoproteína-P, *Leishmania (L.) chagasi*, MRP

EXPRESSION OF GLYCOPROTEIN-P AND MRP1 IN TISSUES OF DOGS CARRYING VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – Canine visceral leishmaniasis (LVC) is a systemic immunomediated disease. It is caused by the protozoary from the *Leishmania (L.) chagasi* species, wich is transmitted to man and animals through the infected vector bite, the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Until present, there is no treatment leading to a parasitologic cure for dogs and the leishmanicide medicine arsenal is limited. Drug resistance is one of the important impediments for infirmity control and the resistance manifestation to multiple drugs is known as MDR. One of those multiple drugs resistance mechanisms is the increase of the glycoprotein-P (gp-P) expression, a xenobiotic efflux system encoded by the MDR1 gene. At the present research, it aimed to evaluate the possibility of resistance phenomenon the multiple drugs in dogs naturally parasited by *Leishmania (L.) chagasi*. The objectives of this study was to evaluate glycoprotein-P (gp-P) and multiple drugs resistance protein (MRP) immunohistochemical expressions in LVC infected dogs' liver, adrenals, kidneys, spleen and skin samples. Results showed that liver, kidneys and adrenals express significantly ($p < 0,001$) more gp-P than skin and spleen; also, adrenals express significantly ($p < 0,001$) more MRP than skin and spleen and that spleen express significantly ($p < 0,001$) more MRP than skin. When the two antibodies were compared, it was verified that liver, kidneys and adrenals express similar percentages of immunomarked cells and that MRP is significantly more reactive in skin than gp-P. These results could justify the parasitary load reduction in skin during treatment. Nevertheless, the lack of parasitologic cure could be due to the high pg-P and MRP1 expressions in liver, adrenals and kidneys, which could increase the pharmac efflux at these organs.

Keywords: dog, glycoprotein-P, *Leishmania (L.) chagasi*, MRP

I. INTRODUÇÃO

Com ampla distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida por calazar é considerada uma das seis endemias prioritárias no mundo (BRASIL, 2006; SILVA et al., 2005). A maioria dos casos humanos ocorre principalmente em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (BRANT, 2007).

O cão doméstico tem grande importância no ciclo da LV por ser considerado o principal reservatório urbano, tendo em vista que a epidemia canina normalmente precede o aparecimento dos casos humanos (BEVILACQUA et al., 2001). Em geral, os cães com LV submetidos ao tratamento não obtêm a cura parasitológica, mas a conduta terapêutica pode oferecer boa qualidade de vida e maior longevidade aos animais infectados (SOUZA, 2005). A resistência aos medicamentos constitui um impedimento importante para o controle da enfermidade considerada como um problema de saúde pública no mundo (OSORIO et al., 2005). Um desses mecanismos de resistência é o aumento da expressão da glicoproteína-P (gp-P), um sistema de efluxo de xenobióticos codificadas pelo gene MDR1 (ROULET et al., 2003). A presença desta proteína está relacionada com a suscetibilidade aumentada para doenças, além de alterações na farmacocinética de drogas, em seres humanos e cães, (LINARDI & NATALINI, 2006).

Células selecionadas para resistência a um único agente quimioterápico podem apresentar resistência cruzada a vários compostos não relacionados estrutural e funcionalmente. Este fenômeno é conhecido como resistência às múltiplas drogas (RMD). A RMD é considerada o maior obstáculo ao sucesso da quimioterapia no tratamento das neoplasias e de outras enfermidades (LINARDI & NATALINI, 2006).

Estudos sobre a resistência a drogas podem contribuir para se encontrar estratégias afim de aumentar a eficácia ou a vida útil das poucas drogas disponíveis. Este estudo pretende avaliar se a LVC induz a resistência à múltiplas drogas em cães com infecção naturalmente adquirida, com a expectativa de que os resultados obtidos

possam oferecer perspectivas de uma abordagem terapêutica mais segura e eficaz nesta doença.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral Canina

A LV ou calazar é uma doença crônica com distribuição mundial, causada por distintas espécies de protozoário do gênero *Leishmania*, conhecidas no Velho Mundo por *L.donovani* e *L.infantum* e no Novo Mundo *L. chagasi* (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; BRASIL, 2006; SILVA, 2007).

Atualmente, o calazar é endêmico em 62 países, com aproximadamente 90% dos casos na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (GONTIJO & MELO, 2004). No Brasil, a LV já foi registrada em 19 estados (SOUZA, 2005) e apesar de ser uma doença predominantemente rural, encontra ambiente favorável no espaço urbano para se estabelecer e desenvolver (BEVILACQUA et al., 2001).

Por ser uma zoonose primariamente de canídeos silvestres (SILVA, 2007), o cão doméstico é considerado o principal reservatório em áreas urbanas (SAKAMOTO et al., 2007; SILVA et al., 2005), uma vez que mesmo assintomáticos, são fontes de infecção para os flebotomíneos e consequentemente têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (TASCA et al., 2009).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica e grave, transmitida para o homem e animais por meio da picada do vetor infectado *Lutzomyia longipalpis* (PERU, 2000; BRASIL, 2006). O parasito infecta células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro, com reflexos na pele, fígado, baço, linfonodos e rins (SILVA et al., 2009).

Devido às características intrínsecas do parasita e respostas variáveis dos cães infectados (SANTOS et al., 2006), diversas manifestações clínicas estão associadas à LVC, desde estados subclínicos (DINIZ et al., 2005), até a doença sistêmica crônica, caracterizada por caquexia (SOUZA et al., 2005), perda de peso progressiva, anemia generalizada, onicogribose, lesões cutâneas (SILVA et al., 2009), hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia (DINIZ et al., 2005; SOUZA et al., 2005), pirexia

intermitente, lesões oculares, nefropatia, assim como problemas de locomoção (SANTOS et al., 2006), osteomielite (SOUZA et al., 2005) e lesões cardíacas (SILVA et al., 2009; LÓPEZ-PEÑA et al., 2009).

O diagnóstico precoce da infecção canina, particularmente antes dos sinais clínicos e, em alguns casos, antes mesmo da soroconversão, é almejado por se tratar de uma doença com potencial zoonótico e para a adoção de medidas de controle específicas sobre o reservatório doméstico da doença (ALVES & BEVILACQUA, 2004; MAIA & CAMPINO, 2008). Apesar do progresso feito no desenvolvimento de diversos métodos diretos e indiretos utilizados na detecção da infecção, o diagnóstico da LVC continua sendo um desafio (MAIA & CAMPINO, 2008).

O diagnóstico clínico é precário e complexo, pois os sinais clínicos são variáveis e inespecíficos (TASCA et al., 2009). Deste modo, as novas ferramentas de diagnóstico laboratorial para LVC se baseiam em métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (GOMES et al., 2008).

O exame parasitológico direto é o método mais simples e mais comumente utilizado (SOUZA, 2005), obtido pelo encontro do parasita em punções aspirativas de medula óssea, de linfonodos, baço, fígado, além de raspados de pele íntegra e/ou lesionada (GOMIDE, 2005). Diferentes meios de cultura podem ainda ser utilizados para isolamento do agente (MADEIRA et al., 2009).

A detecção de amastigotas por imuno-histoquímica em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina é utilizada rotineiramente em vários laboratórios, demonstrando ser uma alternativa eficiente, particularmente em tecidos com baixa carga parasitária (TAFURI et al., 2004).

Os testes laboratoriais imunológicos, por meio da detecção de anticorpos contra o parasita, ou respostas celulares específicas são úteis em inquéritos epidemiológicos e quando for difícil demonstrar a presença de *Leishmania sp.* (LIRA, 2005). Os quatro principais testes sorológicos, com diferentes especificidades e sensibilidades, aplicados no diagnóstico da LVC incluem o teste de imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento e a aglutinação direta (DAT) (MOREIRA et al., 2002; SOUZA, 2005). Apesar do seu alto custo, disponibilidade de

reagente, equipamentos e pouca adaptabilidade ao campo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALVES & BEVILACQUA, 2004) está sendo utilizada como uma técnica de alta especificidade e sensibilidade na identificação do DNA parasitário (MOREIRA et al., 2002; ALVES & BEVILACQUA, 2004).

As opções existentes de tratamento para LVC não são satisfatoriamente efetivas e seguros, pois não previnem a ocorrência de recidivas e não eliminam completamente o parasita, tornando o cão uma fonte de infecção para o homem e outros animais (RIBEIRO & MICHALICK, 2001; IKEDA, 2004). Devido a isso, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) recomenda como uma das medidas de controle, em áreas endêmicas no Brasil, a eutanásia de cães sorologicamente positivos para *Leishmania (L.) Chagasi* (SILVA, et al., 2005).

Embora a terapia da LVC seja considerada ineficaz, alguns pesquisadores a indicam para cães de áreas não endêmicas, com poucos sinais clínicos, pois induz a melhora clínica e pode atrasar a progressão da doença (BANETH & SHAW, 2002). No entanto, o arsenal de drogas antiprotozoário é limitado, fato que constitui um impedimento importante para o controle da enfermidade, considerado como problema de saúde pública no mundo (OSORIO et al., 2005).

2.2 Mecanismos de resistência a múltiplas drogas (MDR)

Na última década, muitos mecanismos celulares que explicam a resistência a drogas foram caracterizados. Tais mecanismos incluem a ativação de proteínas transmembranas que promovem o efluxo de diferentes substâncias químicas do interior da célula; ativação de enzimas do sistema glutatona; alterações de genes e proteínas envolvidas no controle da apoptose; alterações nos mecanismos de reparação celular e alterações no alvo da droga (HARRISON, 1995; ÁGUILA et al., 1998; STAVROVSKAYA, 2000; BERGMAN, 2003).

A manifestação de resistência aos vários medicamentos é conhecida como fenótipo MDR ("multidrug resistance"), descrito inicialmente em células tumorais de mamíferos e posteriormente em bactérias, protozoários e fungos (OSORIO et al., 2005).

O gene “multidrug resistance” (MDR1), também conhecido como gene ABCB1, relaciona-se a resistência cruzada das células contra uma gama de medicamentos com diferentes estruturas e objetivos (LINARDI & NATALINI, 2006). Um dos mecanismos celulares que leva a MDR é o aumento substancial na atividade de um sistema de efluxo de xenobióticos, resultante da superexpressão da proteína de membrana glicoproteína-P (gp-P) (ROULET et al., 2003).

2.2.1 Glicoproteína-P

A gp-P atua como uma bomba capaz de expulsar drogas em diferentes tipos celulares (OSORIO et al., 2005), limitando o efeito citotóxico das mesmas no seu local de ação (STAVROVSKAYA, 2000). A gp-P foi descrita em 1976 por JULIANO & LING em células de ovário de hamster e teve na sua denominação o “P” atribuído a sua função de modular a permeabilidade da membrana a vários medicamentos. É uma proteína com 1280 aminoácidos, constituída por 12 segmentos transmembrana, que é característico desta família de transportadores de efluxo (AZEREDO et al., 2009). Esta proteína forma seis asas com estruturas de alfa hélice na membrana plasmática, nas quais constituem os sítios de interação com o substrato (Figura 1). A hidrólise de ATP fornece a energia necessária para expulsão das drogas (OSORIO et al., 2005).

A gp-P está ligada ao gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1), expresso em células tumorais e em muitos tecidos normais de cães e felinos como o fígado, o epitélio tubular renal, o córtex da adrenal, o epitélio do cólon, e na barreira hematoencefálica (GIN, 1996; HEYDEN et al., 2009; PEKCEC et al., 2009). Foi também identificada em camundongos, bovinos, macacos, roedores e humanos (LINARDI & NATALINI, 2006).

Esta proteína interfere na absorção, distribuição, metabolização e excreção de fármacos, influenciando na farmacocinética dos mesmos, podendo influenciar na redução da biodisponibilidade da droga, conduzindo a resistência a medicamentos (ROULET et al., 2003).

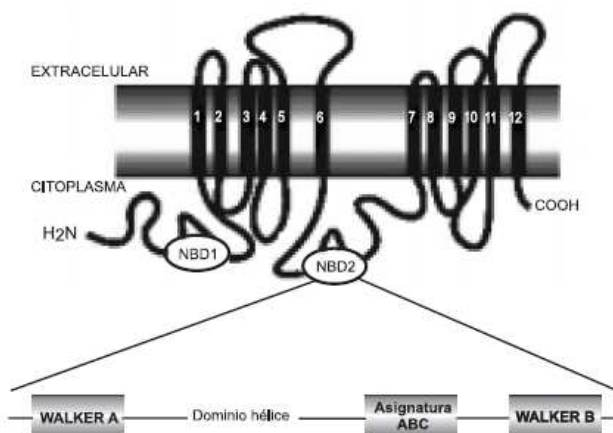


Figura 1. Estrutura do transportador ABC (gp-P). Um polipeptídeo (140-190 kd) com duas metades homólogas, cada uma com 6 segmentos transmembrana e um sítio de fixação a nucleotídeos (NBD) responsáveis pela hidrólise de ATP. Os domínios NBD contêm os motivos Walker A e B e uma sequência curta denominada ABC (OSÓRIO et al., 2005).

Porém, ela tem importante papel na proteção contra os efeitos adversos dos xenobióticos em vários órgãos, como o sistema nervoso central e testículo (ROULET et al., 2003).

Cães da raça Collie são mais sensíveis aos efeitos adversos do fármaco Ivermectina. Estes animais exibem sinais neurotóxicos a doses bem baixas e estudos indicam que isto ocorre devido à gp-P não funcionar adequadamente nestes animais. Em Collies sensíveis, a concentração de ivermectina no cérebro pode exceder a do plasma e fígado (ROULET et al., 2003).

A função fisiológica da gp-P, na ausência de agentes terapêuticos ou toxinas, não está clara. Estudos em camundongos sem a expressão do gene MDR1 mostraram que estes mantiveram vitalidade e fertilidade inalteradas e uma variedade de parâmetros bioquímicos e imunológicos normais (SCHINKEL et al., 1996).

Randolph & Beaulieu (1998) demonstraram *in vitro* que a gp-P estimula a migração das células dendríticas humanas (células apresentadoras de antígenos) para os linfonodos periféricos, iniciando a resposta imune mediada por linfócitos T.

Os substratos transportados pela gp-P são vários e não possuem relação estrutural e farmacológica entre eles, incluindo agentes antineoplásicos, imunossupressores, hormônios esteroidais, bloqueadores do canal de cálcio, β -bloqueadores e glicosídeos cardíacos (AZEREDO et al., 2009).

Muitos destes agentes podem induzir ao fenótipo de resistência às múltiplas drogas, pois além de substratos, podem também aumentar a expressão da gp-P, tais como, a dexametasona, a rifampina e a morfina (BERGAN, 2003) (Quadro 1).

Interação com substâncias inibidoras da gp-P são de grande interesse, pois podem aumentar a absorção de medicamentos importantes que são geralmente pouco absorvidos, como os quimioterápicos (EL-NAHAS & EL-ASHMAWY, 2008). Um exemplo desses inibidores é o verapamil, que se liga à gp-P e de forma competitiva inibe a ligação ou transporte de fármacos que são substratos da gp-P (LEONARD et al., 2003).

A alteração na expressão, função e inibição da gp-P está relacionada ao aumento da susceptibilidade a diversas doenças em humanos e animais. Um exemplo ocorre na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), onde a super expressão da gp-P parece limitar a absorção intestinal de inibidores de proteases do HIV e seu acesso ao cérebro, contribuindo, portanto, para a persistência do vírus (CHOO et al., 2000).

A gp-P pode ser detectada em tecidos humanos pelas técnicas de hibridização, imunoblotting, imuno-histoquímica (GIN, 1996) e PCR (BERGMAN & OGILVIE, 1995). Dentre estes, a imuno-histoquímica apresenta-se como uma técnica de fácil realização e pode ser utilizada em tecidos parafinados, congelados (BERGMAN & OGILVIE, 1995).

Quadro 1. Agentes terapêuticos que são substratos ou inibidores para glicoproteína-P (LINARDI & NATALINI, 2006).

SUBSTRATOS			INIBIDORES
Antiácidos Cimetidina Ranitidina Antibióticos Eritromicina Tetraciclina Rifampina Levofloxacina Antiemético Ondansetrona Antineoplásico Paclitaxel Doxorubicina Daunorubicina Vinblastina Vincristina Actinomicina D Docetaxel Etoposide Imatinib Teniposide	Antagonista β-adrenoceptor Bunitrolol Carvedilol Celiprolol Talinolol Reserpine Bloqueadores dos canais de Ca^{++} Diltiazem Mibefradil Drogas cardíacas /antiarrítmicos Digoxina Digotoxina Histamina H1, receptores antagonistas Fexofenadine Terfenadine Inibidores da Protease HIV Amprenavir Indinavir Nelfinavir Saquinavir Ritonavir	Imunossupressores Ciclosporina A Sirolimus Tacrolimus Opióides Loperamide Domperidone Morfina Pentazocina Metadona Asimadolina Fentanil Esteróides Dexametasona Metilprednisolona Aldosterona Progesterona Hidrocortisona Cortisol Corticosterone Outros Colchicina Itraconazol Fenotiazinas Ivermectina	Inibidores Diversos Agentes Verapamil Quinidina Valspodar (PSC) Ciclosporina Cetoconazol

2.2.2 Proteína de resistência às múltiplas drogas (MRP)

O segundo mecanismo mais freqüente de MDR é da proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP) (BERGMAN, 2003), apresentada pela primeira vez em 1992, quando Susan Cole e Roger Deeley clonaram o gene associado à MRP, agora conhecida como MRP1 (COLE et al., 1992). A MRP foi caracterizada inicialmente como um transportador de conjugados aniônicos, preferencialmente a glutatona conjugada (MÜLLER et al., 1994) (Figura 2).

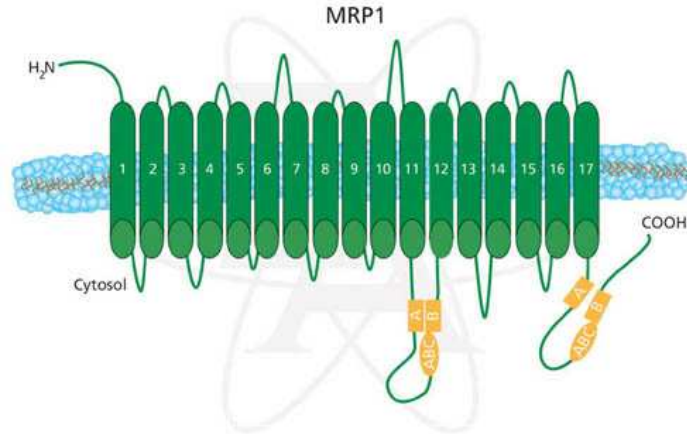


Figura 2. Modelo topográfico da MRP1 (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Pesquisas sobre outros membros desta família, resultaram na descoberta de um total de 9 genes MRP e pelo menos 6 deles foram suficientemente caracterizados para indicar o transporte de compostos antineoplásicos e antivirais (GOTTESMAN et al., 2002). Eles agem aumentando o efluxo das drogas de forma dependente de energia, resultando na redução do acúmulo intracelular das mesmas (LOE et al., 1996).

O papel fisiológico da MRP pode variar de transporte de compostos excretórios e eliminação de xenobióticos, para a mediação da resposta inflamatória. O MRP1 é amplamente expresso e tem uma função fundamental dentro, por exemplo, das reações de tecido leucotrieno dependentes - C4 (LTC₄), como também no transporte pela barreira hemato-cefálica (WIJNHOLDS et al., 1997).

As MRPs são expressas em tecidos importantes para absorção (por exemplo, pulmão e intestino), metabolismo e eliminação (fígado e rim) e devido a isso, acredita-se que esta proteína transportadora exerça um papel importante na proteção das células contra os danos causados pelos xenobióticos (LESLIE et al., 2005).

A MRP1 se localiza predominantemente na membrana plasmática basolateral das células (EVERS et al., 1996; WRIGHT et al., 1998). Isto pode ser um fator de proteção importante, por exemplo, para as células germinativas nos túbulos testiculares, ou para prevenir a entrada de tóxicos no líquido cefalorraquidiano, por meio do plexo coróide (BORST et al., 2000).

Os substratos transportados pela MRP1 compreendem uma grande variedade de compostos, que incluem agentes quimioterápicos, tais como, vincristina, doxorubicina, entre outros (HAIMEUR et al., 2002) (Quadro 2).

Quadro 2. Substratos transportados pela MRP1 (adaptado de DEELEY & COLE, 2006).

Classe/Substratos	Exemplos
<i>Drogas/Xenobióticos</i>	
Antineoplásicos	Metotrexato, edatrexato, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, etoposídeo, vincristina, vimblastina, paclitaxel, irinotecan, flutamida, hidroxiflutamida
Antivirais	Saquinavir, ritonavir
Antibióticos	Difloxacina, grepafloxacina
Metalóides	Arsenito de sódio, arsenato de sódio, antiamoniato de potássio, tartarato antimônio de potássio
Sondas fluorescentes	Caliceína, Fluo-3,
Tóxicos	Aflatoxina B ₁ , metoxiclor, fenitroton, clorprofam
<i>Drogas/ xenobióticos conjugados</i>	
Conjugado glutatiônicos	2,4-Dinitrofenil-GSH, bimeane-GSH, N-etilmaleimida-GSH, doxorubicina-GSH, tiotepa-GSH, ciclofosfamida-GSH, melfalan-GSH, clorambucil-GSH, vincristina-GSH, ácido etacrínico-GSH
Conjugados glucuronídeos	Etoposídeo-Gluc, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL)-3 β -O-Gluc, 4-metilumbeliferil- β -D-Gluc, SN
<i>Metabólitos de ocorrência natural</i>	
Conjugados glutatiônicos	Leucotrieno C ₄ , prostagladina A ₂ -GSH, 15-deoxi- Δ ^{12,14} prostaglandina J ₂ -GSH, hidroxinonenal-GSH
Conjugados glucuronídeos	17 β -Estradiol-17- β -D-Gluc, glucuronosil bilirrubina, bisglucuronosil bilirrubina
Sulfatos conjugados	Estrona 3-sulfato, sulfato dihidroepiandrosterona
Folatos	Ácido fólico, L-leucovorin
Peptídeos	Glutathiona, glutathiona oxidada
Outros	Bilirrubina

A resistência a fármacos está associada a mecanismos celulares e a fatores que afetam a biodisponibilidade e a eficácia de um fármaco e constitui um impedimento importante para o controle de muitas enfermidades.

III. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se a LV desencadeia em cães o fenômeno de resistência à múltiplas drogas.

3.2 Específicos

- Confirmar por meio da imuno-histoquímica a presença do parasita em cães sorologicamente positivos para LVC;
- Avaliar a expressão da glicoproteína-P e da MRP (proteína de resistência a múltiplas drogas) na pele, rins, glândula adrenal, fígado e baço de cães com LVC, por meio da técnica de imuno-histoquímica

IV. METODOLOGIA

4.1 Local e Cães

Amostras de pele, rins, glândulas adrenais, fígado e baço foram obtidas de 24 cães positivos para LVC (Imunofluorescência indireta e ELISA) oriundos do Centro de Controle de Zoonoses – CCZ das cidades de Caruaru ($08^{\circ}16'58''$ S e $35^{\circ}58'33''$ O) e Petrolina ($09^{\circ}23'55''$ S e $40^{\circ}30'03''$ O), localizados, respectivamente, no Agreste e Sertão do Estado de PE (Figura 3).



Figura 3. Mapa do Estado de Pernambuco, Brasil, ressaltando as cidades de Caruaru e Petrolina (círculos vermelhos); locais onde foram coletadas amostras biológicas de 24 cães com leishmaniose visceral canina, (Fonte: <http://www.technet1.org/>).

Os cães, de um ou outro sexo, passaram por exame físico e foram classificados quanto aos sinais clínicos, em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, seguindo critérios descritos por Assis et al. (2010). Os critérios clínicos considerados são: alterações cutâneas, como pelame seco, prurido, alopecia, áreas de hiperqueratose e nódulos intradérmicos; apatia; linfadenomegalia;

hepatoesplenomegalia; onicogrifose; emaciação; anemia; oftalmopatias e emagrecimento.

4.2 Processamento das amostras

Após o exame físico, os cães foram sedados com 0,05mg/kg de acepromazina (Acepran® 1% - Univet) por via intramuscular, para coleta das espécimes de pele na face interna da orelha, com auxílio de “punch” com diâmetro de 4mm. Em seguida receberam a aplicação intravenosa rápida de Thionembutal a 30% (Tiopental sódico – Abbot Laboratórios do Brasil) na dose de 100mg/kg, para produzir parada cardíaca, seguindo o protocolo de rotina estabelecido pelos CCZs de Caruaru e Petrolina. Após a confirmação do óbito, os animais foram então necropsiados e os materiais coletados. As amostras de pele, rins, glândulas adrenais, fígado e baço foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos e processadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária e no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Campus de Jaboticabal).

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número 007763/10.

4.3 Análise Imuno-histoquímica da *Leishmania sp.*

Existindo a possibilidade de resultados falsos positivos nos testes sorológicos dos cães deste experimento, optou-se pela confirmação da LVC por meio da imuno-histoquímica.

A imunomarcagem das formas amastigotas de *Leishmania sp.* foi realizada seguindo metodologia padronizada por Tafuri et al. (2004), com poucas modificações, descritas a seguir: Amostras de pele, fígado e baço incluídas em parafina foram cortadas (3 µm de espessura) e montadas em lâminas pré-tratadas com Poly-L-lisina

(Cód. P4832 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO EUA). Antes das reações, as lâminas contendo os cortes foram colocadas em estufa a 60°C por 30 minutos, seguindo-se os processos de desparafinização em xilol e hidratação em graduações decrescentes de etanol. Após lavagem em água destilada foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio de imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 8% em metanol, por 30 minutos. Na recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato (pH 6,0), em banho-maria a 92°C, por 30 minutos. Após o resfriamento das lâminas por 30 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se o bloqueio das reações inespecíficas (Background Sniper – Biocare Medical, Concord), por 30 minutos. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário durante 18 horas, à 4°C, em câmara úmida. Como anticorpo primário foi utilizado o soro hiperimune de cão naturalmente infectado para *Leishmania chagasi*, com confirmação testes sorológicos e por PCR.

Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas com sistema de detecção de polímeros (MACH 4 – Biocare Medical, Concord), durante 35 minutos. As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzendina (Cód. SK4100 – DAB – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto.

Entre as etapas foram realizadas três lavagens das lâminas em solução tampão salina com fosfato (PBS) pH 7,2, com duração de cinco minutos cada, com exceção da etapa entre o bloqueio das ligações inespecíficas e o anticorpo primário.

A desidratação dos cortes foi feita pela imersão das lâminas em gradiente crescente de álcoois e xilóis, seguidas pela montagem com lamínula em meio permanente entellan (Merck, Alemanha).

Como controle positivo utilizou-se amostras de baço de cão PCR positivo para *Leishmania chagasi*. O controle negativo foi conseguido pela substituição do anticorpo primário por imunoglobulina G de camundongo. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram as amastigotas imunomarcadas pelo cromógeno DAB.

4.4 Análise Imuno-histoquímica da MRP e gp-P

Dois anticorpos primários produzidos em camundongos contra antígenos humanos das proteínas MRP1 e gp-P foram utilizados para se avaliar a expressão dessas proteínas em amostras de pele, baço, fígado, adrenais e rins (Quadro 3).

Quadro 3. Especificações dos anticorpos monoclonais empregados nas reações de imuno-histoquímica desse estudo.

Anticorpos	Imunoglobulina	Diluição	Fonte
MRP1	IgG2a	1:25	Labvision (NCL-MRP1)
gp-P (C494)	IgG _{2a}	1:200	Signet (Cód. 8720-01)

O processamento das lâminas, a desparafinização e o bloqueio da atividade endógena da peroxidase seguiram o mesmo procedimento descrito no item 4.2. A recuperação antigênica foi realizada pelo calor e a técnica utilizada variou de acordo com o anticorpo primário empregado (Quadro 4). Após o resfriamento das lâminas por 30 minutos a temperatura ambiente, procedeu-se o bloqueio das reações inespecíficas (Quadro 4). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário durante 18 horas, a 4°C.

Quadro 4. Métodos e tampões de recuperação antigênica, bloqueio das ligações não imunes empregados nas reações de imuno-histoquímica dos tecidos de cães com LVC, pelo método de polímeros.

Anticorpos primários	Tampões de Recuperação	Método	Bloq. das ligações não imunes
MRP1	Tris-EDTA pH=9,0	Panela de pressão (5 minutos)	Sol. leite** em pó a 3% (30 minutos)
gp-P (C494)	Retrieval*	Banho-Maria (30 minutos)	Sol. leite** em pó a 3% (30 minutos)

*Retrieval – Dako North America, Carpinteria; **Leite em pó Molico^R (Nestlé Brasil LTDA)

Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (Envision® - DAKO North América, Carpinteria) durante 60 minutos para a gp-P e sistema de detecção de polímeros (MACH 4 – Biocare Medical, Concord) para a MRP1 durante 30 minutos. As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico, 3,3 diaminobenzendina (Cód. SK4100 – DAB – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto.

Entre as etapas foram realizadas três lavagens das lâminas em solução tampão salina com fosfato (PBS), pH 7,2, com duração de cinco minutos cada, com exceção da etapa entre o bloqueio das ligações não imunes e o anticorpo primário.

A desidratação dos cortes foi feita pela imersão das lâminas em gradiente crescente de álcoois e xilóis, seguidas pela montagem em lamínula em meio permanente entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

As reações tiveram como controle positivo o cólon canino e humano. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por imunoglobulina G de camundongo (Dako North America, Carpinteria).

A frequência da imunomarcagem foi obtida selecionando-se cinco campos por corte. Em cada campo foram contadas 100 células do tecido, entre marcadas e não marcadas, com auxílio de um retículo micrométrico (Nikon, Inc. – Japan) em aumento de x400. Destes foram extraídas porcentagens de células marcadas em relação ao total.

4.5 Análise estatística

Empregou-se um teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para comparar a frequência da expressão da glicoproteína-P e da MRP, e entre os dois, através da análise de variância de via única. Em seguida, foi realizado o teste de Tukey para comparar as médias entre os anticorpos (SSPS-SigmaStat 3.0®, Systat Software inc, San Jose, USA), considerando-se o nível mínimo de significância $p \leq 0,05$

V. RESULTADOS

5.1. Exame físico

Dos 24 cães empregados neste estudo dois eram assintomáticos, 12 oligossintomáticos, ou seja, possuíam até três sinais de LVC e 10 eram polissintomáticos, com mais de três sinais para LVC. Não houve predileção por raça, sexo ou idade.

5.2 Imuno-histoquímica de *Leishmania sp.*

Todos os animais apresentaram imunomarcção para *Leishmania sp.*, variando de intensa a moderada, de acordo com sua carga parasitária infectante (Figura 4).

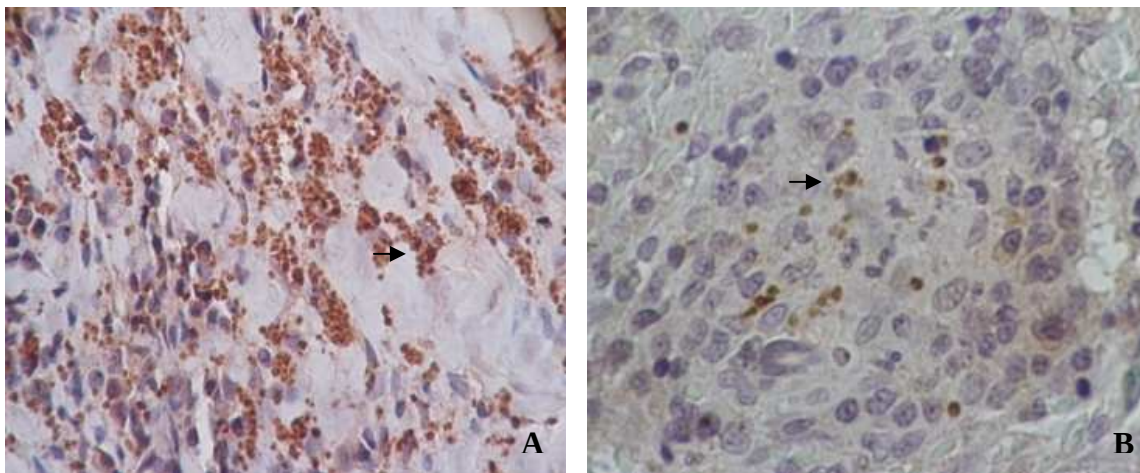


Figura 4. Fotomicrografias de pele (A) e baço (B) de cães naturalmente infectados por *L.chagasi* exibindo alta densidade de antígenos do parasita (coloração castanha) em A e baixa densidade em B. Método ABC, contracoloração Hematoxilina de Harris. Obj 40X. Jaboticabal, SP, 2010.

5.3. Imuno-histoquímica da gp-P e MRP

Todas as amostras de fígado, baço, rim e adrenal dos 24 cães positivos para LVC, submetidos às reações imuno-histoquímicas, mostraram imunorreatividade aos anticorpos monoclonais anti-glicoproteína-P, clone C494, e anti-MRP, clone MRP1. Todas as amostras de pele foram também reativas ao clone MRP1, porém apenas 21 apresentaram marcação para C494. Também exibiram reatividade as amostras de cólon canino, sem alterações patológicas, que foram utilizados como controle positivo das reações.

5.3.1 Imunomarcção da Glicoproteína-P

A localização da imunomarcção da gp-P foi em membrana plasmática nas amostras de fígado, com total delineamento do hepatócito, e no córtex das adrenais; citoplasmática e granular na polpa branca e vermelha do baço, na epiderme e glândulas sudoríparas e sebáceas e no epitélio tubular renal. A intensidade de coloração variou de moderada a forte (Figura 5).

A porcentagem de células marcadas no fígado em relação ao total variou de 58% a 86,39%, com média de 75,94%. Para o baço a variação foi de 13,90% a 63,86%, com média de 35,03%. Nas adrenais de 55,62% a 97,72%, com media de 79,23%; nos rins de 18% a 96%, com média de 72,08%. Na pele, a média foi de 12,14%, variando de tecidos sem marcação até marcações em 35,87% das células.

Quando se compararam as porcentagens de células com imunomarcacões pela gp-P entre as amostras observou-se que as adrenais, fígado e rins apresentaram maiores marcações ($p < 0,001$) se comparadas com as de baço e pele. O mesmo ocorreu no baço em relação a pele ($p < 0,001$). Não houve diferença entre as marcações de fígado, adrenais e rins (Figura 6).

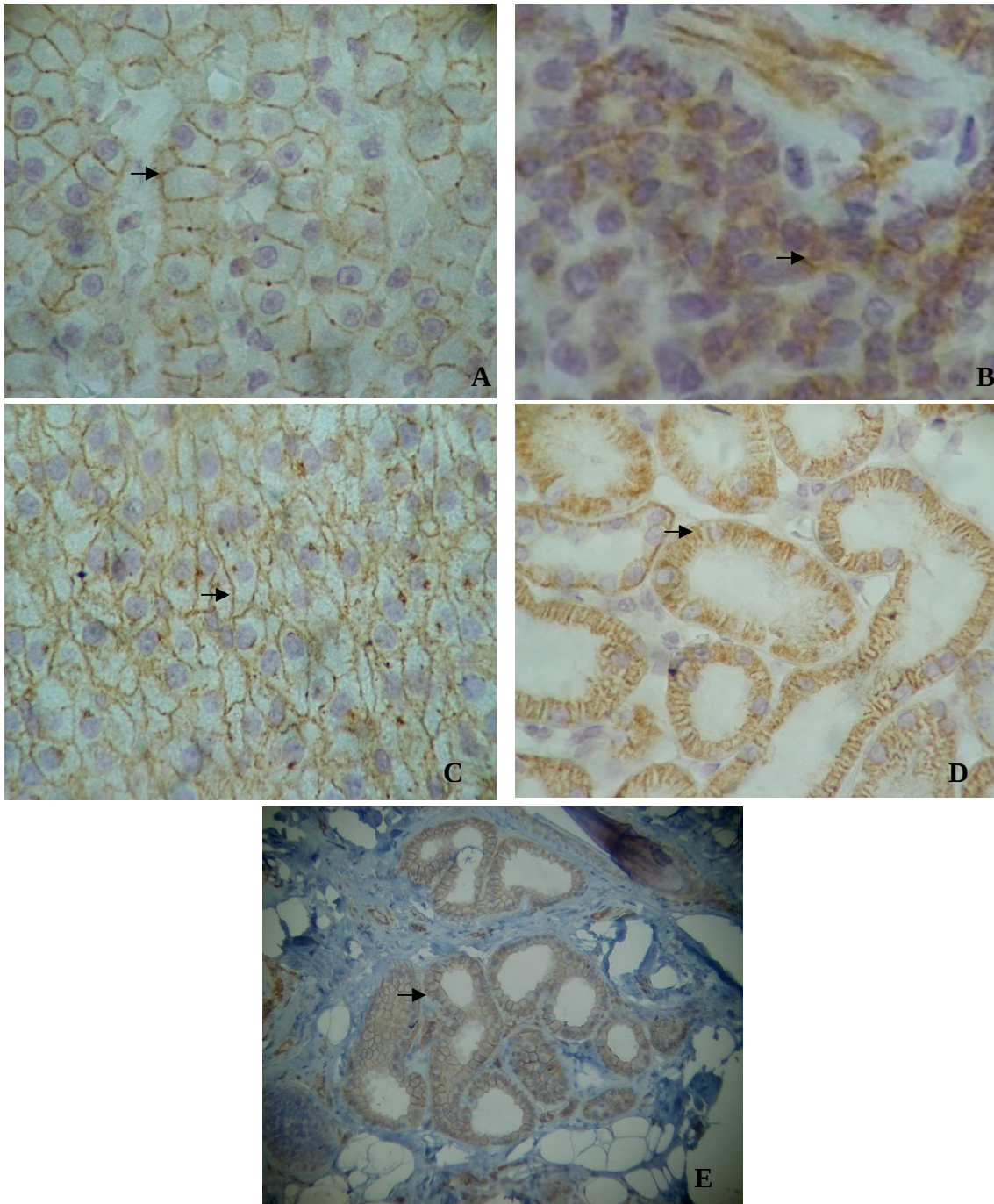


Figura 5. Fotomicrografias de fígado (A), baço (B), adrenal (C), rins (D) e pele (E) de cães com leishmaniose visceral imunomarcadas pelo anticorpo primário Glicoproteína P. Reação imuno-histoquímica, método ABC. Contracoloração Hematoxilina de Harris. Obj. 40x. Jaboticabal, SP, 2010.

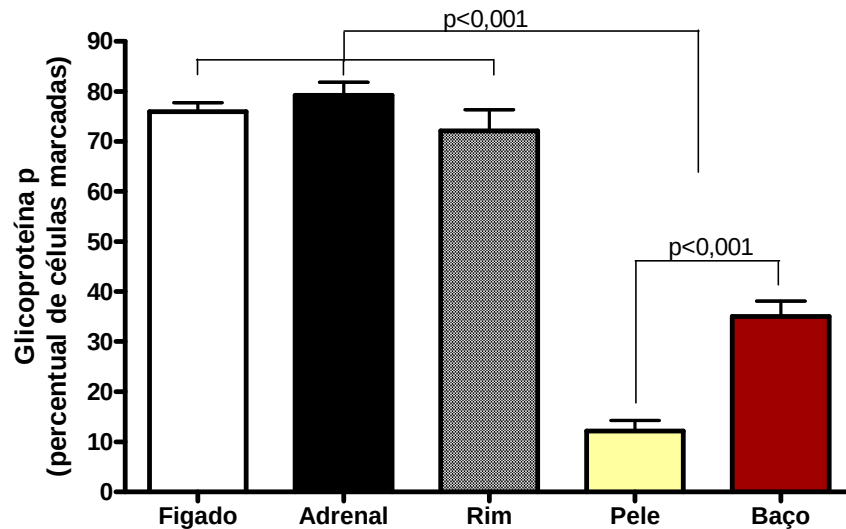


Figura 6. Ilustração representativa das percentagens médias de células imunomarcadas pelo anticorpo primário anti-glicoproteína-P (gp-P) em amostras de fígado, adrenais, rins, pele e baço de cães positivos para leishmaniose visceral canina, mostrando a significância entre elas. ($p < 0,001$ - Teste Tukey). Jaboticabal, SP, 2010.

5.3.2 Imunomarcção da Proteína de resistência a múltiplas drogas

Todos os tecidos apresentaram marcação citoplasmática, de aspecto granular, com intensidade de coloração variando de intensa a moderada. (Figura 7).

A porcentagem média de células imunomarcadas no fígado foi de 74,56% variando de 60,32% a 100%; no baço a média foi de 37,43% (20,44% a 56,61%); de 79,21% (58,10% - 94,74%) nas adrenais; nos rins essa média foi de 70,09% (18% - 98%) e, na pele, a variação foi de 2,25% a 54,25%, com média de 28,67%.

A comparação entre a expressão das imunomarcações da MRP nas adrenais, fígado e rins não diferiram entre si, porém houve diferença ($p < 0,001$) entre baço e pele, que por sua vez não diferiram entre si (Figura 8).

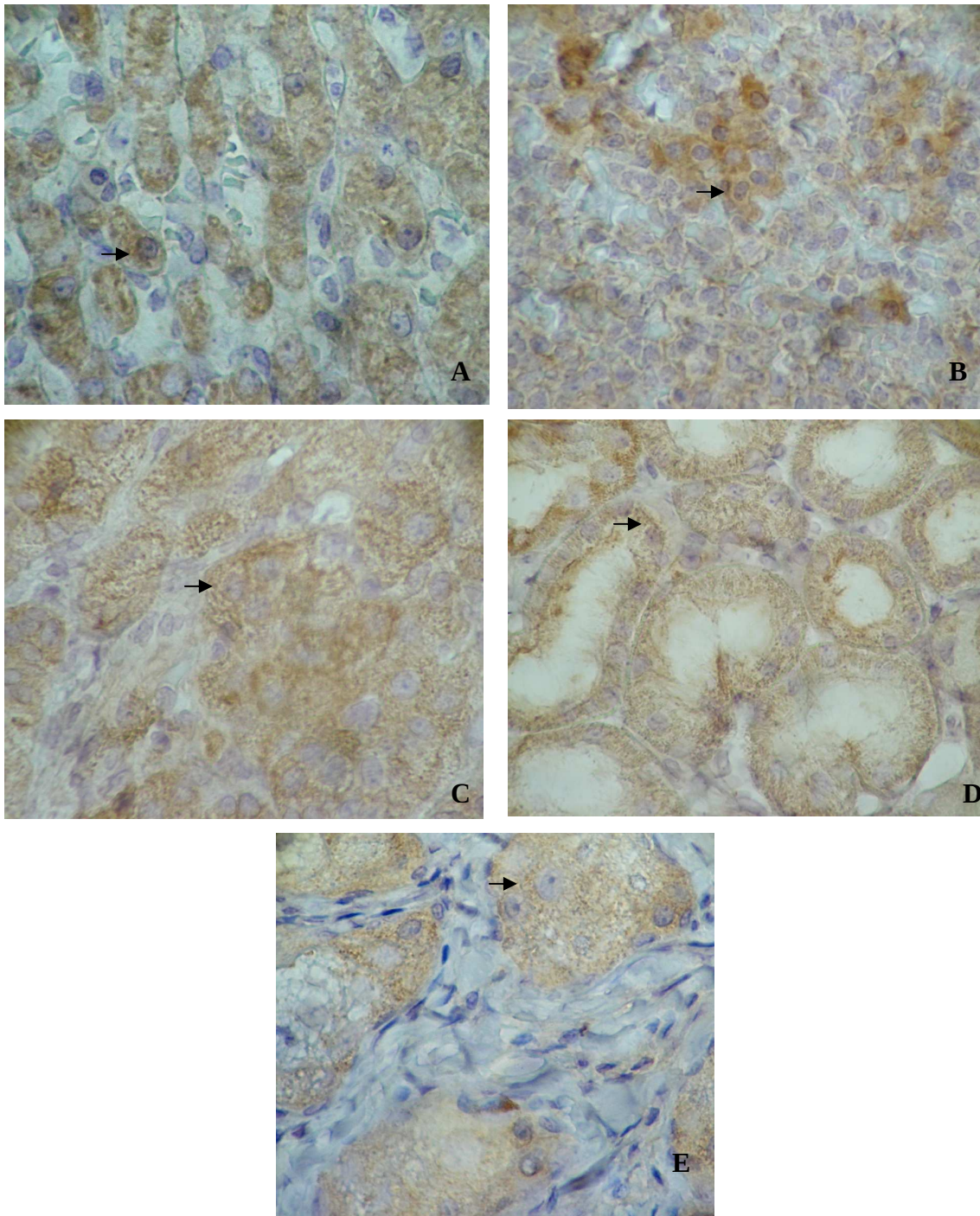


Figura 7. Fotomicrografias de fígado (A), baço (B), adrenal (C), rins (D) e pele (E) de cães com Leishmaniose visceral imunomarcadas citoplasmática de coloração castanha (seta) pelo anticorpo primário MRP. Reação imuno-histoquímica, método ABC. Contracoloração Hematoxilina de Harris. Obj. 40x. Jaboticabal, SP, 2010.

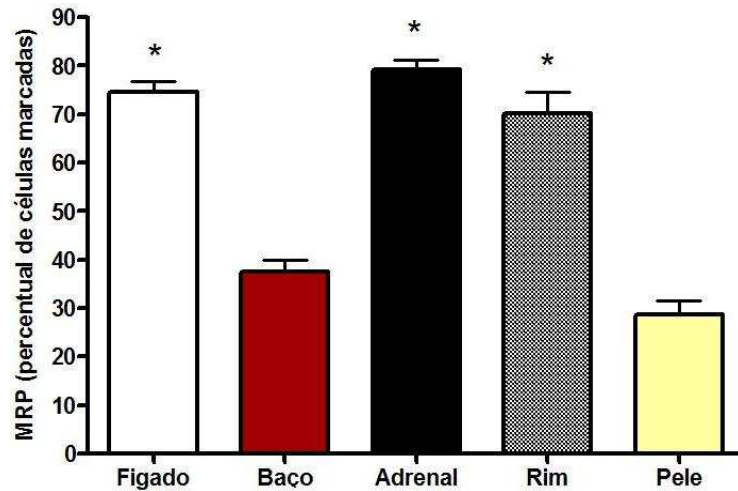


Figura 8. Ilustração representativa das percentagens médias de células imunomarcadas pelo anticorpo primário de Resistência a Multiplas Drogas (MRP) em amostras de fígado, adrenais, rins, pele e baço de cães positivos para leishmaniose visceral canina, mostrando as significâncias entre elas. (* $p < 0,001$ - Teste Tukey). Jaboticabal, SP, 2010.

5.2.3 Avaliação comparativa das imunomarcações da Glicoproteína P e MRP

Analisando em conjunto os resultados das imunomarcações pode-se observar que a gp-P e a MRP apresentaram expressões significativamente menores ($p < 0,001$) no baço e pele, em comparação com os outros tecidos, os quais não diferiram entre si. O que também foi verificado com as imunomarcações encontradas nos baços com os dois anticorpos. Significativas ($p < 0,01$) também foram as expressões da pele entre os anticorpos (Figura 09).

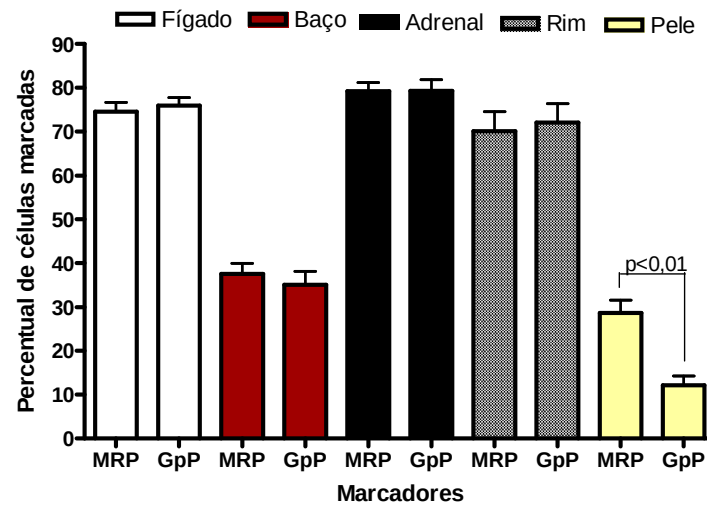


Figura 09. Ilustração representativa das percentagens médias de células imunomarcadas pelos anticorpos primários de Resistência a Múltiplas Drogas (MRP1) e glicoproteína-P em amostras de fígado, adrenais, rins, pele e baço de cães positivos para leishmaniose visceral canina, mostrando as significâncias entre elas. ($p < 0,01$ - Teste Tukey). Jaboticabal, SP, 2010.

VI. DISCUSSÃO

O Ministério da Saúde recomenda para inquérito epidemiológico canino o teste sorológico imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (BRASIL, 2006). Contudo, cães saudáveis que tiveram contato prévio com a *Leishmania chagasi* também podem ter sorologia positiva, sem, contudo apresentarem a doença (NOLI, 1999).

Por existir a possibilidade de resultados falsos positivos nos testes sorológicos de cães, neste experimento optou-se pela confirmação da LVC por meio da imuno-histoquímica, utilizando como anticorpo primário soro hiperimune de cão positivo para *L. chagasi*, como sugerido por Tafuri e colaboradores (2004). Os resultados das reações de imuno-histoquímica comprovaram tratar-se de 24 cães positivos para LVC, que exibiram formas amastigotas nos três órgãos analisados (fígado, baço e pele).

Resultados semelhantes foram descritos por Alves (2008), que também encontrou positividade em fígado, baço e pele de orelha de cães assintomáticos e com sintomatologia clínica de LVC. A presença de amastigotas nas amostras dos cães assintomáticos, principalmente nos fragmentos de pele de orelha é um achado importante devido à participação do cão na epidemiologia da doença, sendo fonte de infecção para o vetor (ABRANCHES et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LIMA et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Os tecidos submetidos a imuno-histoquímica foram propositalmente selecionados devido às suas diferentes origens embrionárias. A pele e a adrenal se originaram de dois folhetos, ectoderme e mesoderme; o rim e o baço, a partir da mesoderme, enquanto que o fígado surgiu a partir da endoderme (MCGEADY et al., 2006).

Os anticorpos anti-gp-P, clone C494 e anti-MRP1, apesar de não serem espécie-específicos, neste experimento demonstrou-se que podem ser utilizados, com sucesso em tecidos caninos, corroborando com os dados de Ginn (1996) e Gerardi (2005), que também obtiveram reatividade cruzada da gp-P com tecidos caninos e de Gerardi (2008) com a MRP-1.

O padrão de marcação exibido pela gp-P nos espécimes de pele, rins, fígado, adrenais e baço foi parcialmente congruente ao descrito por Ginn (1996). Este autor encontrou padrão de marcação semelhante ao descrito em espécimes humanos de fígado, glândula adrenal, cólon, rim, estômago, pâncreas e ductos das glândulas salivares e marcação não uniforme na epiderme, porém o autor não obteve marcação em baço, discordando dos nossos resultados.

No fígado, com a gp-P, Ginn (1996) obteve marcação de membrana exibindo total delineamento do hepatócito; No córtex da adrenal a marcação também foi de membrana plasmática. Houve marcação citoplasmática no epitélio tubular renal e marcação do citoplasma do epitélio, assim como de algumas glândulas sebáceas. Estes resultados se assemelham aos encontrados em nosso experimento, exceto os do baço, que o autor não obteve imunomarcação. Diferenças de procedimentos laboratoriais podem justificar essa ausência de marcação. Uma possibilidade poderia recair no tipo e tempo de fixação e armazenamento das amostras, já que esses dados não foram detalhados no artigo. A recuperação antigênica também é um fator importante. Enquanto Ginn (1996) utilizou sistema de recuperação enzimática, em nossa pesquisa utilizamos o calor como forma de recuperação antigênica. Estas pequenas diferenças parecem que foram cruciais em se conseguir as imunomarcações nas amostras de baço deste estudo em comparação aos resultados descritos por Ginn (1996).

Em tecidos humanos o nível de expressão da gp-P pode variar de muito baixo a indetectável nas células epidérmicas, a níveis altos no córtex da adrenal e epitélio tubular renal (GOTTESMAN & PASTAN, 1993). Essa variação de marcação entre os tecidos condizem com os resultados obtidos em nosso experimento, no qual a pele apresentou um menor número de células imunomarcadas e a adrenal, rim e fígado maior numero.

A MRP1 foi encontrada em todos os órgãos testados, semelhante ao que ocorre em tecidos humanos onde é onipresente (BORST et al., 1999). Nos caninos sua expressão já foi assinalada em fígado, rim, intestino, pulmão, cérebro e testículo (CONRAD et al., 2001).

O fígado, adrenal e rim apresentaram marcações citoplasmáticas e foram os tecidos com maiores imunomarcações com a MRP1, seguidos da pele e baço, os quais apresentaram menores imunomarcações. Esses resultados discordam parcialmente dos achados de Borst e colaboradores (1999) e de Deeley e colaboradores (2006). Nos trabalhos desses pesquisadores a MRP1 foi pobremente detectada no fígado humano sem alterações, todavia nos hepatócitos em proliferação e nas linhagens celulares neoplásicas hepáticas, a expressão foi consideravelmente alta. No entanto, em outra pesquisa com tecidos caninos, o fígado apresentou resultados semelhantes aos nossos, embora tanto o fígado humano como o canino tenham sido imunomarcados pela MRP1, sua função neste órgão ainda não foi totalmente elucidada (CONRAD et al., 2001).

Existem diferenças de expressão da MRP canina e humana, embora a MRP1 canina apresente 92% de similaridade com a MRP1 humana (MA et al., 2002). Possivelmente, o anticorpo utilizado para detectar MRP1 por não ser específico para tecidos caninos pode detectar outros membros da família MRP, como por exemplo, MRP3, que é encontrada em altos níveis no fígado canino. No entanto, o nível de expressão do RNAm para MRP1 canina hepática é bastante alto, o que pode justificar a expressão relativamente alta da MRP1 (CONRAD et al., 2001).

Um resultado inédito na literatura e observado neste trabalho mostra que o baço e a pele apresentaram menor imunomarcção da gp-P e da MRP1 em comparação aos outros tecidos. Mesmo a MRP1 sendo mais expressa do que a gp-P na pele, quando se comparam às marcações nos rins, adrenais e fígado com ambos, a pele e o baço foram os tecidos que menos expressam os dois anticorpos. Embora até o momento não existam trabalhos que correlacionem a expressão dessas proteínas em tecidos caninos, muito menos em cães com LV, esses resultados podem explicar, ao menos em parte, a redução da parasitemia cutânea de cães durante o tratamento. Como a pele apresenta baixa expressão desses marcadores de resistência a múltiplas drogas, é possível que os fármacos administrados corretamente exerçam atividade parasiticida eficiente na pele e com isso o cão, durante o tratamento, apresente-se negativo aos testes de parasitemia cutânea, já que alguns fármacos podem proporcionar até 93% de cura

clínica, como no caso da anfotericina B (RIBEIRO & MICHALICK, 2001). Todavia, a interrupção ou falha na administração do fármaco proporciona a reincidência da parasitemia cutânea. Isto sugere que o parasita fique albergado em outros órgãos, possivelmente nos que expressem elevados níveis desses marcadores de resistência a múltiplas drogas, nos quais os fármacos não consigam exercer sua atividade.

Na LVC, as formas amastigotas podem ser encontradas no fígado, baço, medula óssea, linfonodos, rins, supra-renais, intestinos, pulmões e na pele. Ocasionalmente são vistos em células do sangue, no interior de leucócitos, sobretudo de monócitos (REY, 2002). Segundo Ferrer (1988) e Reis (2006) existe uma correlação positiva entre a carga parasitária do baço e pele com o estado clínico da doença, sugerindo que estes parâmetros possam ser importantes no acompanhamento da terapia.

Alguns autores avaliaram a densidade parasitária em diferentes tecidos de cães com LVC, visando identificar os principais sítios de localização e proliferação do parasita. Alves (2008) por meio da imuno-histoquímica, observou que os órgãos mais intensamente parasitados foram o baço e a pele. Neste mesmo trabalho, o fígado foi o órgão que apresentou menor parasitismo. Nos rins e glândulas adrenais, o parasita também não foi facilmente encontrado (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2001; TAFURI et al., 2004). Por sua vez Reis et al. (2006) também verificaram que o baço e a pele de orelha são mais intensamente parasitados do que os demais órgãos avaliados, independente da sintomatologia clínica.

Analisando esses dados em conjunto pode-se observar que existe uma relação inversa entre a expressão da MRP e gp-P e a carga parasitária nos tecidos caninos.

Mesmo com a cura clínica, até o momento não existe a cura parasitológica no cão (SOUZA, 2005; RIBEIRO & MICHALICK, 2001; IKEDA, 2004) e apesar da baixa densidade parasitária no fígado, adrenal e rim, foi verificado neste trabalho que estes são os órgãos que mais expressam a gp-P e MRP, duas proteínas que causam resistência a múltiplas drogas, por meio do efluxo de fármacos em diferentes tipos celulares (LESLIE et al., 2005). Podemos sugerir que nestes órgãos, os fármacos leishmanicidas não consigam desempenhar seu papel, favorecendo a permanência do parasita no interior da célula, e conseqüentemente não erradicação da doença no cão.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo, nas condições em que foi desenvolvido permitiram concluir que:

Fígado, baço, glândulas adrenais, rim e pele de cães com LVC expressam os marcadores de resistência a múltiplas drogas, glicoproteína-P e MRP1.

Pele de orelha e baço de cães com LV apresentaram menor número de células imunomarcadas pela glicoproteína-P e MRP1 em comparação ao fígado, rim e glândula adrenal.

Aparentemente existe uma relação inversa entre a expressão da MRP e pg-P e a carga parasitária nos tecidos caninos.

VIII. REFERÊNCIAS¹

ABRANCHES, P.; SILVA, M.C.P.; CONCEICAO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.77, n.4 p.557-561, 1991.

ÁGUILA, J. F.; RAMOS, O.C.; ÁLVAREZ, I.V.; VÁZQUEZ, R.P. Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. **Revista Cubana de Oncologia**, Habana, v.14, n.2, p.111-120, 1998.

ALVES, C.F. **Determinação do perfil de citocinas e quantificação da carga parasitária em cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi (Cunha & Chagas, 1937) com e sem expressão clinica da leishmaniose visceral**. 2008, 200f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.1, p.259-265, 2004.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; JUNIOR, A.C.F.N.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.1, p.17-25, 2010.

¹ ABNT.NBR6023-AGO2002

AZEREDO, F.J.; UCHÔA, F.T.; COSTA, T.D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.90, n.4, p.321-326, 2009.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.106, p.315-324, 2002.

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

BERGMAN, P.J.; OGILVIE, G.K. Drug resistance and cancer therapy. **The Compendium**, New York, v.17, n.4, p.549-558, 1995.

BERGMAN, P.J. Mechanisms of anticancer drug resistance. In: KITCHELL, B.E. **The Veterinary Clinics of the North America - Small Animal Practice**, Maryland Heights, v.33, n.3, p.651-667, 2003.

BORST, P.; EVERS, R. KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. The multidrug resistance protein family. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v.1461, n.2, p.347-357, 1999.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJINHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v.92, p.1295-1302, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2006, 120p.

BRANT, J.L. **Leishmaniose visceral canina: busca ativa de casos e estudo sobre o conhecimento da doença em proprietários de cães na área urbana de Botucatu**.

2007, 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

CHOO, E.F.; LEAKE, B.; WANDEL, C.; IMAMURA, H.; WOOD, A.J.J.; WILKINSON, G.R.; KIM, R.B. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v.28, n.6, p.655-660, 2000.

COLE, S.P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUCAN, A.M.; DEELEY, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, Washington, v.258, n.5088, p.1650-1654, 1992.

CONRAD, S.; VIERTELHAUS, A.; ORZECOWSKI, A.; HOOGSTRAATE, J.; GJELLAN, K.; SCRENK, D.; KAUFFMANN, H.M. Sequencing and tissue distribution of canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1. **Toxicology**, Amsterdam, v.156, n.2-3, p.81-91, 2001.

DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v.580, p. 1103-1111, 2006.

DEELEY, R.G.; WESTLAKE, C.; COLE, S.P.C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 86, p.849-899, 2006

DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M.; BUENO, R.; REIS, B.P.; TAFURI, W.L.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the sêmen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 42, p.650-658, 2005.

EL-NAHAS, A.F.; EL-ASHMAWY, I.M. Effect of ivermectin on male fertility and its interaction with P-glycoprotein inhibitor (verapamil) in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.26, p.206-211, 2008.

EVERS, R.; ZAMAN, G.J.; VAN DEEMTER, L.; JANSEN, H.; CALAFAT, J.; OOMEN, L.C.; OUDE ELFERINK, R.P.; BORST, P.; SCHINKEL, A.H. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.97, p.1211–1218, 1996.

FERRER, L.; RABANAL, R.M.; DOMINGO, M.; Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research Veterinary Science**, Barcelona, v.44, n.2, p.194-196, 1988.

GERARDI, D.G. **Reatividade à glicoproteína-P pelos anticorpos C219 e C494 em tecidos neoplásicos de cães**. 2005, 56 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005

GERARDI, D.G. **Reatividade de tecidos neoplásicos caninos à proteína associada à resistência múltiplas drogas-1 (MRP1), à glutathiona-s-transferase pi (GST-pi) e à proteína p53**. 2008, 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GINN, P.E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Veterinary Pathology**, Basel, v.33, p.533-543, 1996.

GOMES, Y.M.; PAIVA, C.M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, London, v.175, p.45-52, 2008.

GOMIDE, A. P. **Leishmaniose visceral canina: Reflexões sobre a opção do tratamento**. 2005, 60f. Monografia (Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, 2005.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.; BATES, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, London, v.2, n.1, p.48-58, 2002.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.62, p.385-427, 1993.

HAIMEUR, A.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Charged amino acids in the sixth transmembrane helix of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) are critical determinants of transport activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, n.44, p.41326-41333, 2002.

HARRISON, D.J. Molecular mechanisms of drug resistance in tumours. **Journal of Pathology**, Edinburgh, v.175, p. 7-12, 1995.

HEYDEN, S.V.D.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R. Tissue distribution of P-glycoprotein in cats. **Anatomia, histologia, embryologia**, Berlin, v.38, n.455-460, 2009.

IKEDA, F.A. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento.** 2004, 184f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

JULIANO, R.L.; LING, V.A. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.455, p. 152-162, 1976.

LEONARD, G.D.; TOJO, T.; BATES, S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. **The Oncologist**, North Carolina, v.8, p.411-424, 2003.

LESLIE, E.M.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 an BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.204, p.216-237, 2005.

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

LINARDI, R.L.; NATALINI, C.C. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.336-341, 2006.

LIRA, R.A. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos.** 2005, 70f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

LOE, D.W.; ALMQUIST, K.C.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, n.16, p.9675-9682, 1996.

LÓPEZ-PEÑA, M.; ALEMAÑ, N.; MUÑOZ, F.; FONDEVILA, D.; SUÁREZ, M.L.; GOICOA, A.; NIETO, J.M. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinária Scandinavica**, Copenhagen, v.52, n.20, p.1-3, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.158, n.4, p.274-287, 2008.

MA, L.; PRATT, S.E.; CAO, J.; DANTZIG, A.; MOORE, R.E.; SLAPAK, C.A. Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v.1, p.1335-1342, 2002.

MCGEADY, T.A.; QUINN, P.J.; FITZPATRICK, E.S.; RYAN, M.T. **Veterinary Embriology**. 390p, 2006.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, n.2, p. 103-106, 2002.

MÜLLER, M.; MEIJER, C.; ZAMAN, G.J.R.; BORST, P.; SCHEPER, R.J.; MULDER, N.H.; VRIES, E.G.E.; JANSEN, P.L.M. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.91, p.13033-13037, 1994.

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

OSORIO, W.J.; ROBLEDO, S.M.; ARANGO, G.J.; MUSKUS, C. *Leishmania*: papel de la glicoproteína P en la mediación de resistência a medicamentos y estrategias de reversión. **Biomédica**, Bogotá, v.25, p.242-260, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK M. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, n.5, p.510-516, 2001.

PEKCEC, A.; SCHNEIDER, E.L.; BAUMGÄRTNER, W.; STEIN, V.M.; TIPOLD, A.; POTSCHKA, H. Age-dependent decline of blood-brain barrier P-glycoprotein expression in the canine brain. **Neurobiology of aging**, New York, p.1-9, 2009.

PERU. **Ministerio De Salud**. Leishmaniasis: Serie de documentos monográficos. Lima, 2000. (Módulo Técnico, 8).

RANDOLPH, G.; BEAULIEU, E. A physiologic function for P-glycoprotein (MDR1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vassels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95 p.6924-6929, 1998.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, London, v.81, n.1, p.68-75, 2006.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, AM.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam v.3, n.112, p.102-16, 2006b.

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

RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Revista Nosso Clínico**, São Paulo, v.4, p.10-20, 2001

ROULET, A.; PUEL, O.; GESTA, S.; LEPAGE, J.F.; DRAG, M.; SOLL, M.; AVINERIE, M.; PINEAU, T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam Cedex, v.460, p.85-91, 2003.

SAKAMOTO, C.A.M.; BRESCIANI, K.D.S.; SERRANO, A.C.M.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F.; KANAMURA, C.T.; COSTA, A.J. Leishmaniose visceral canina em Jaboticabal – SP – primeiro caso. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.125-128, 2007.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; ASSUNÇÃO, M.; MATOS, A.J.F. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.141, n.3-4, p.340-344, 2006.

SCHINKEL, A.; WAGENAAR, E.; MOL, C.A.A.M.; van DEEMTER, L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological

activity of many drugs. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.97, n.11, p.2517-2524, 1996.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.324-328, 2005

SILVA, B.C.; RACHID, M.A.; VIEIRA, F.G.; FIGUEIREDO, M.M.; VALLE, G.R.; TAFURI, W.L.; JÚNIOR, J.C.T.; RIBEIRO, V.M. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infected dog. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Belo Horizonte, v.2, n.2, p.107-109, 2009.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.1, n.1, p.20-31, 2007.

SOLANO-GALLEG0, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.39, p.560-3, 2001..

SOLANO-GALLEG0, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of comparative pathology**, Liverpool, v.130, p.7-12, 2004.

SOUZA A.I.; JULIANO, R.S.; GOMES, T.S.; DINIZ, S.A.; BORGES, A.M.; TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in dog. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.129, p.51-54, 2005.

SOUZA, F. R. **Leishmaniose visceral canina**. 2005. Monografia (Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, 2005.

STAVROVSKAYA, A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry**, Washington, v.65, n.1, p.95-106, 2000.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathologic picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 96, 203, 2001

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

TASCA, K.I.; BUZETTI, W.A.S.; TENORIO, M.S.; PAULAN, S.C.; LIMA, F.L.; QUEIROZ, N.M.G.P.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NEVES, M.F.; NORONHA JR, A.C.F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.1, p.28-33, 2009.

WRIGHT, S.R.; BOAG, A.H.; VALDIMARSSON, G.; HIPFNER, D.R.; CAMPLING, B.G.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.G. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.4, p.2279–2289, 1998.

WIJNHOLDS, J.; EVERS R.; LEUSDEN, M. R. V.; MOL, C. A.A.M.; ZAMAN, G. J.R.; MAYER, U.; BEIJNEN, J.H.; VALK, M.V.D.; KRIMPENFORT, P.; BORST, P. Increased sensitivity to anticancer

drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. **Nature Medicine**, New York, v.3, p.1275,1279, 1997.