

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

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E
LABORATORIAIS DE CÃES SORORREAGENTES PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL, EM FOCO DE TRANSMISSÃO NO
DISTRITO FEDERAL – DF – BRASIL.**

Cássio Ricardo Ribeiro

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio - 2007

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

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E
LABORATORIAIS DE CÃES SORORREAGENTES PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL, EM FOCO DE TRANSMISSÃO NO
DISTRITO FEDERAL – DF – BRASIL.**

Cássio Ricardo Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Maio – 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CÁSSIO RICARDO RIBEIRO - nascido em 07 de janeiro de 1968, em Jaú, SP, é Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual Paulista – UNESP – Jaboticabal, em fevereiro de 1994. Trabalhou como médico veterinário autônomo na área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais e Laboratório de Patologia Clínica, no período de março de 1994 a janeiro de 2000. Realizou curso de aperfeiçoamento em Clínica Médica, Cirurgia e Reprodução de Pequenos Animais (480h) na UNESP-Botucatu em 1996. Docente da disciplina de Microbiologia Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá – UNIC – MT, no período de fevereiro de 2000 a julho de 2001. Docente da disciplina de Clínica Médica de Pequenos Animais, na Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT – MT, como professor substituto concursado, no período de novembro de 2000 a junho de 2002. Concluiu Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, em maio de 2003. Ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, em nível de Doutorado, na mesma instituição, em agosto de 2003. Docente das disciplinas de Clínica Médica de Pequenos Animais, Semiologia Veterinária e Patologia Clínica na Faculdade de Medicina Veterinária da União Pioneira de Integração Social – UPIS – Brasília – DF, no período de julho de 2002 a agosto de 2004. Publicou sete artigos em periódicos especializados e 26 trabalhos em anais de eventos. Orientou três trabalhos de conclusão de curso na área de Medicina Veterinária. Atua na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Clínica Médica e Patologia Clínica Animal.

Àquelas que sempre estão presentes nos momentos importantes de minha caminhada.

Àquelas que sempre foram compreensivas com minha ausência

Àquelas que sempre me norteiam e incentivam:

à minha amada esposa, Paula,

e à minha princesa, Izadora.

Dedico.

.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela confiança e orientação e principalmente pelo exemplo de humildade, determinação e respeito que sempre me nortearam.

Ao Médico Veterinário Péricles Norimitsu Teixeira Massunaga, da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde do Distrito Federal – DF e demais funcionários que, direta ou indiretamente viabilizaram a realização deste estudo.

À Médica Veterinária Denise Salgado, proprietária e exímia patologista clínica, do Centro Integrado de Diagnósticos Veterinários – CID-Vet – Brasília - DF, pelo incentivo e viabilização das análises bioquímicas.

Aos funcionários Paulo César Silva e Renata Lemos Nagib Jorge do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ UNESP/ Câmpus de Jaboticabal, por viabilizarem a realização das análises protéicas e bioquímicas séricas.

Ao Dr. Carlos Bloch Jr. do Laboratório de Biologia Molecular/ Espectrometria de Massa - CENARGEN – EMBRAPA – Brasília – DF e ao Dr. Thales Lima Rocha do Laboratório de Integração Planta-Praga - CENARGEN – EMBRAPA – Brasília – DF por viabilizarem a realização e utilização do MALDI-TOF.

À Dr^a Denise de Aragão Costa Martins do Instituto de Letras da Universidade de Brasília – UnB, doutora em lingüística, pela revisão da língua portuguesa deste estudo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO.....	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral	3
2.1.1. Agente Etiológico	3
2.1.2. Agente Transmissor	4
2.1.3. Reservatórios	6
2.1.4. Ciclo Evolutivo	7
2.1.5. Aspectos Ambientais.....	8
2.1.6. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	9
2.1.7. Diagnóstico.....	10
2.1.8. Vigilância Epidemiológica na Leishmaniose Visceral	12
2.2. Achados Clinicopatológicos.....	18
2.2.1. Bioquímica Sérica.....	18
2.2.2. Proteinograma.....	21
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Área do Estudo.....	26
4.2. Inquérito Sorológico Censitário Canino e Inquérito Epidemiológico.....	26
4.3. Inquérito Entomológico.....	30
4.4. Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	30

4.5. Amostragem.....	30
4.5.1. Tamanho da Amostra e Formação dos Grupos Experimentais.....	30
4.6. Análises Laboratoriais.....	31
4.6.1. Análise de Constituintes Bioquímicos Séricos.....	31
4.6.2. Proteinograma Sérico.....	32
4.7. Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Inquérito Sorológico Censitário e Aspectos Clínicos e Epidemiológicos.....	34
5.2. Inquérito Entomológico.....	41
5.3. Bioquímica Sérica.....	43
5.4. Proteinograma Sérico Obtido em Gel de Poliacrilamida Contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) e Espectrometria de Massa (MALDI-TOF).....	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. COLABORADORES.....	51
8. REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Número de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para <i>Leishmania</i> sp., em foco de transmissão no Distrito Federal (Condomínio Serra Azul – fev./mar.2006).....	35
Tabela 2 - Aspectos clínicos e epidemiológicos de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para <i>Leishmania</i> sp., em foco de transmissão no Distrito Federal (Condomínio Serra Azul – fev./mar.2006).....	37
Tabela 3 - Aspectos clínicos de cães oligossintomáticos e sintomáticos, reagentes e não-reagentes à RIFI para <i>Leishmania</i> sp., em foco de transmissão no Distrito Federal (Condomínio Serra Azul – fev./mar.2006).....	39
Tabela 4 – Dados de coleta de flebotomíneos em foco de transmissão para LVA no Distrito Federal – DF (Condomínio Serra Azul – 07 a 09 fev. 2006).....	41
Tabela 5 - Valores normais, médias e desvios-padrão de constituintes do soro sangüíneo de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para <i>Leishmania</i> sp., em foco de transmissão no Distrito Federal (Condomínio Serra Azul – fev./mar.2006).....	43
Tabela 6: Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) constatadas no proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cães sororreagentes em comparação aos cães não-reagentes à RIFI para LVC, em foco de transmissão no Distrito Federal - DF (Condomínio Serra Azul – fev./mar.2006) - Brasil.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Foto aérea obtida por satélite mostrando as regiões do Distrito Federal: Condomínio Serra Azul (seta amarela), Sobradinho (seta azul), Fercal (seta verde) e Lago Norte (seta vermelha).....	27
Figura 2 - Foto aérea obtida por satélite ampliada, mostrando em detalhes o Condomínio Serra Azul – Sobradinho II – Distrito Federal.....	28
Figura 3 - Ficha da Secretaria de Estado de Saúde para obtenção de dados de identificação, epidemiológicos e quadro clínico de animais suspeitos de leishmaniose visceral canina, no Distrito Federal – DF.....	29
Figura 4 - Fotomicrografia de <i>Leishmania</i> sp. evidenciada pela técnica da reação de imunofluorescência indireta (400X).....	34
Figura 5 - Representação gráfica da quantidade de cães soropositivos à RIFI para LVC em relação à idade.....	35
Figura 6 - Foto de cadela, sem raça definida, com três anos de idade, sintomática, criada no Condomínio Rural Serra Azul, Sobradinho II, Distrito Federal, reagente à RIFI para LVC. Nota-se grau de caquexia acentuado, lesões de pele (alopecia peri-ocular e nos membros, descamação e paquidermização) e onicogribose.....	40
Figura 7: Mapa mostrando pontos de instalação de armadilhas e coletas para flebotomíneos (armadilhas positivas: pontos vermelhos; armadilhas negativas: pontos amarelos), distribuição de cães sororreagentes à RIFI para LVC (pontos verde-claro) e distribuição de casos de LVA em humanos (pontos verde-escuro), no Condomínio Serra Azul – DF.....	42

Figura 8: Traçados densitométricos em SDS-PAGE de amostras de cães não-reagentes e de cães reagentes à RIFI para LVC, bem como traçado padrão com os respectivos pesos moleculares (PM; kDa). Notar presença de proteína com 33 kDa (seta) presente somente nas amostras de soro de cães reagentes para LVC..... 45

Figura 9: Exemplo de traçado densitométrico (em SDS-PAGE) de amostra de soro sangüíneo de cão reagente à RIFI para leishmaniose visceral canina com 31 proteínas, com destaque para albumina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina e IgG de cadeia leve..... 46

Figura 10: Exemplo de traçado densitométrico (em SDS-PAGE) de amostra de soro sangüíneo de cão não-reagente à RIFI para leishmaniose visceral canina com 29 proteínas, com destaque para albumina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina e IgG de cadeia leve..... 46

Figura 11: Segmento de traçado eletroforético obtido em SDS-PAGE de amostra de soro sangüíneo de cão reagente à RIFI para leishmaniose visceral canina, evidenciando banda 29 (33 kDa) de imunoglobulina..... 49

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CÃES SORORREAGENTES PARA LEISHMANIOSE VISCERAL, EM FOCO DE TRANSMISSÃO NO DISTRITO FEDERAL – DF – BRASIL

RESUMO – A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma antroponose de distribuição cosmopolita. No Brasil, é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, que tem flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* como vetores e grande variedade de mamíferos, inclusive pessoas, como hospedeiros. As infecções mais comuns ocorrem em mamíferos silvestres; em áreas urbanas e periurbanas, o cão é o hospedeiro de maior importância epidemiológica. Assim, o objetivo do estudo foi verificar aspectos clínicos e epidemiológicos, e avaliar a bioquímica sérica, inclusive proteínas de fase aguda, em proteinograma em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de 120 cães de região periurbana com foco de transmissão no Distrito Federal. Sessenta cães eram sororreagentes e sessenta animais não eram reagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para LVC. A soroprevalência observada foi de 24,5%, sendo animais assintomáticos a maioria entre os cães sororreagentes ou não-reagentes à RIFI para LVC. Nos animais sororreagentes oligossintomáticos, os sinais clínicos mais evidentes foram lesões cutâneas (primárias e secundárias), inclusive alopecia de nariz e/ou orelhas. As médias das concentrações séricas de uréia, creatinina, colesterol, cálcio, fósforo, magnésio e das atividades de AST, ALT, ALP e GGT situaram-se na faixa de normalidade para a espécie canina. Os teores séricos de colesterol e de HDL foram inferiores e as concentrações séricas de proteínas totais e imunoglobulinas foram mais elevadas em cães sororreagentes à RIFI. Notou-se uma proteína de peso molecular 33 kDa em cães sororreagentes à RIFI, não constatada em cães soronegativos. Ainda, em animais sororreagentes, evidenciaram-se teores séricos superiores – embora não significativos, mas com provável importância biológica – das proteínas de fase aguda ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina e glicoproteína ácida.

Palavras-chave: Aspectos clínicos, bioquímica sérica, cão, epidemiologia, *Leishmania* sp., proteinograma.

**CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND LABORATORIAL ASPECTS OF
SEROREAGENTS DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS AT DISTRITO
FEDERAL – DF – BRASIL.**

SUMMARY – Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an anthroponotic infection of cosmopolitan distribution. In Brazil, it is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and transmitted by vector *Lutzomyia longipalpis* (sandfly), having a great variety of hosts (including humans). The most common infections take place in wild mammals; in urban and periurban areas, dogs are the most important epidemiological host. The aim of this study was to verify clinical and epidemiological aspects of 120 dogs from the periurban area of transmission at Distrito Federal. Serum biochemical evaluation (including acute phase proteins) was performed using SDS-PAGE method. Sixty dogs were seroreagents and sixty were not reactive to the indirect immunofluorescence assay (IFA) for CLV. Seroprevalence rate was of 24.5%; asymptomatic dogs were the majority of seroreagent or non-reagent to IFA for CLV. In the seroreagent oligosymptomatic animals the most evident clinical signs were skin lesions (primary and secondary) including alopecia of nose and/or ears. Mean concentration of urea, creatinine, cholesterol, calcium, phosphorus, magnesium and the activities of AST, ALT, ALP and GGT were within normal limits for canine species. Serum cholesterol and HDL were inferior and total serum protein concentration and immunoglobulins were more elevated in dogs seroreagent to IFA. In the dogs seroreagent to IFA, it was noticed a protein with molecular weight of 33 kDa, not noticed in seronegative animals. In the seroreagent animals, it was noticed increased serum levels of acute phase proteins (ceruloplasmin, transferrin, haptoglobin and acid glycoprotein), although not significant but with a probable biological importance.

Keywords – dogs, clinical aspects, epidemiology, *Leishmania* sp., proteinogram, serological aspects.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose de distribuição cosmopolita causada por protozoários pleomórficos intracelulares com formas promastigotas e amastigotas, pertencentes à família *Trypanosomidae*, gênero *Leishmania spp.* (RIBEIRO, 1997; FEITOSA et al., 2000; GREENE et al., 2006). No Brasil, a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) (LAINSON & SHAW, 1987; LAINSON & SHAW, 1992; WHO, 1998), sendo vetores os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (PEARSON & QUEIROZ-SOUSA, 1996; ALVAR et al., 2004; MATHIAS, 2004). Os hospedeiros incluem grande variedade de mamíferos, inclusive o homem, sendo infecções mais comuns as que ocorrem nos mamíferos silvestres; em áreas urbanas e periurbanas, o cão é o hospedeiro de maior importância epidemiológica, pois, quando infectado, constitui o principal reservatório doméstico do parasita e tem papel fundamental na transmissão para humanos (RIBEIRO, 1997; FEITOSA et al., 2000; ALVAR et al., 2004; MATHIAS, 2004; BRASIL, 2006; GREENE et al., 2006; SÃO PAULO, 2006).

A LV humana torna-se um problema real de saúde pública, porque é uma infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos. Com a crescente consciência do controle da doença em seres humanos, pesquisas em cães são desenvolvidas com objetivo de elucidar a epidemiologia, a fisiopatologia da doença, métodos diagnósticos e condutas terapêuticas. Os novos resultados permitem entender melhor a doença, além de auxiliar no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e de controle da infecção em cães (ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; MATHIAS, 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006). As principais medidas de controle da LV no Brasil baseiam-se no diagnóstico e no tratamento de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de inseticidas e na triagem sorológica (RIFI), com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

No Distrito Federal, os primeiros dois casos autóctones diagnosticados de LV humana foram observados no final do ano de 2005, no Condomínio Serra Azul, Sobradinho II – local deste estudo (BRASIL, 2006). Outros casos foram diagnosticados no Distrito Federal, localizando-se tais focos de transmissão da doença em regiões

periurbanas invadidas e ocupadas às custas de desmatamentos, o que contribui para a maior exposição ao vetor da doença. As condições socioeconômicas e ambientais, ao lado dos hábitos de vida, são importantes fatores na epidemiologia da leishmaniose visceral em áreas endêmicas. Tais condições podem contribuir para que a leishmaniose visceral seja perpetuada nas áreas rurais e periurbanas, acometendo habitantes de aglomerados urbanos com baixo nível socioeconômico, cujas famílias vivem em condições precárias de moradia (WHO, 2003; AZEVEDO, 2004; VIGILATO, 2004; COUTINHO, 2005; BRASIL, 2006).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil bioquímico e o proteinograma, inclusive das imunoglobulinas e das proteínas de fase aguda, do soro sangüíneo de cães, bem como avaliar aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em região geográfica com foco de transmissão da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

2.1.1. Agente etiológico

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma antroponose de distribuição cosmopolita causada por protozoários pleomórficos intracelulares com formas promastigotas (com flagelo externo) e amastigotas (não-flageladas), pertencentes ao filo *Mastigophora*, que inclui todos os protozoários com um ou mais flagelos e reprodução assexuada por divisão binária. Pertencem à ordem *Kinetoplastida*, caracterizada pela presença de um cinetoplasto e à família *Trypanosomidae*, gênero *Leishmania* spp. (LAINSON & SHAW, 1987; KONTOS & KOUTINAS, 1993; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA & CORONA, 2003; GREENE et al., 2006). Todas as espécies de *Leishmania* exibem um ciclo heteroxênico semelhante. Formas promastigotas desenvolvem-se no tubo digestivo de um inseto flebótomo hospedeiro; formas amastigotas, arredondadas e sem flagelo, sendo parasitos intracelulares obrigatórios, encontram-se nas células do sistema mononuclear fagocitário de hospedeiros vertebrados (LAINSON & SHAW, 1987; FEITOSA et al., 2000; SÃO PAULO, 2006). Sua multiplicação em ambos os hospedeiros faz-se por divisão binária. O tamanho da forma promastigota varia muito; o corpo mede, em geral, 10,0 a 20,0 x 1,5 a 3,0 μ m, com um flagelo freqüentemente muito maior que o corpo. A forma amastigota mede de 2,5 a 1,5 x 6,8 a 4,5 μ m, dependendo da espécie do parasito (LAINSON & SHAW, 1987; GREENE et al., 2006).

As principais espécies causadoras de leishmaniose são classificadas, de acordo com seu desenvolvimento dentro do vetor, em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As espécies do subgênero *Leishmania* têm seu desenvolvimento limitado ao intestino médio e anterior do vetor; o subgênero *Viannia* adere seus flagelos às paredes do piloro e/ou íleo – intestino posterior, onde se desenvolve antes de migrar para o intestino médio e anterior. O subgênero *Viannia* está dividido em quatro complexos: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* e *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*. O subgênero *Leishmania* divide-se em onze complexos: *Leishmania* (*Leishmania*) *hertigi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana*, *Leishmania* (*Leishmania*)

amazonensis, *Leishmania (Leishmania) enrietti*, *Leishmania (Leishmania) arábica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) gerbilli*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (FEITOSA et al., 2000; MATHIAS, 2004; MELO, 2005). Segundo LAINSON & SHAW (1987), as espécies *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) peruviana* também pertencem ao subgênero *Viannia* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) aristidesi* e *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* ao subgênero *Leishmania*.

A leishmaniose visceral é encontrada em quatro dos seis continentes. Na Índia e no leste da África, é causada pela *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAVERAN & MENSIL, 1903), sendo responsável pela forma visceral clássica (antropnose) e pela leishmaniose dérmica pós-calazar. Na China, na Ásia Central e nos países mediterrâneos da Europa e da África, é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908). Nas Américas, a causa é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), sendo responsável pela leishmaniose visceral (LV) em seres humanos e cães (LAINSON & SHAW, 1987; LAINSON & SHAW, 1992; SÃO PAULO, 2006). Atualmente a *L. (L.) chagasi* tem sido considerada idêntica à *L. (L.) infantum* (AZEVEDO, 2004).

2.1.2. Agente Transmissor

A ocorrência das espécies de *Leishmania* é normalmente limitada à distribuição do vetor, que é determinada geograficamente. Os vetores pertencem à subfamília *Phlebotominae*, que se divide em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Na Europa, na Ásia e na África (Velho Mundo), os vetores das espécies causadoras das leishmanioses visceral e cutânea são do gênero *Phlebotomus* (LAINSON & SHAW, 1987; GREENE et al., 2006). Nas Américas (Novo Mundo), os vetores são do gênero *Lutzomyia* (PEARSON & QUEIROZ-SOUSA, 1996). A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) é o vetor da *Leishmania (Leishmania) chagasi*, enquanto outras espécies de *Lutzomyia* são vetores dos agentes das leishmanioses tegumentares americanas (MATHIAS, 2004; SANTOS, 2006). Diversamente, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (cidades de Corumbá e Ladário), parece que a transmissão também está a

cargo da *Lutzomyia cruzi* (SANTOS *et al.*, 1998; ALVAR *et al.*, 2004; MAROLI & KHOURY, 2004; SÃO PAULO, 2006).

Certas espécies do flebótomo são encontradas em florestas, ao passo que outras são endêmicas em regiões de deserto e algumas são peridomiciliares, residentes em restos de lixo ou entulhos próximos às casas ou construções em áreas rurais (LAINSON & SHAW, 1987), embora também sejam encontradas em áreas urbanas, tais como Teresina (PI), Belo Horizonte (MG), Rio de Janeiro (RJ), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Corumbá (MS), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Palmas (TO), Araçatuba (SP), Bauru (SP), entre outras (WHO, 1998; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

O ciclo biológico do vetor se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto. Desenvolvem-se em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica em decomposição. O desenvolvimento do ovo até a fase adulta ocorre em cerca de 30 dias. Os flebotomíneos adultos vivem em média 20 a 45 dias e caracterizam-se pelo tamanho reduzido (entre 2,0 e 3,0 mm), pelo corpo densamente coberto de cerdas finas, com pernas e antenas relativamente longas e finas e coloração amarelada ou de cor-palha. Por essas características, são também conhecidos como mosquito-palha e asa-dura, e, em algumas regiões do estado de São Paulo, são chamados de birigüi, cangalhinha, entre outros. Quando vivos e em repouso, mantêm suas asas em posição semi-ereta. O abdome é formado por onze segmentos, cuja extremidade posterior é bem diferenciada entre os sexos. Nas fêmeas, a porção final do abdome mostra-se ligeiramente arredondada e os últimos segmentos são telescopados. Nos machos, o nono e décimo segmentos são bifurcados, e compõem, juntamente com outros elementos, a genitália masculina (BRASIL, 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006).

As fêmeas de *L. longipalpis* têm peças bucais do tipo sugador pungitivo, constituídas de labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio. Na altura da hipofaringe, desembocam os ductos das glândulas salivares, que são responsáveis pela produção de uma saliva rica em biomoléculas ativas de grande importância no processo de hematofagia das fêmeas, e pela capacidade de facilitar a implantação da infecção de *Leishmania* sp. nos hospedeiros vertebrados. Os machos de *L. longipalpis* têm mandíbulas rudimentares e não são capazes de penetrar suas peças bucais na pele de vertebrados (SANTOS, 2006).

Os flebotomíneos adultos, cuja capacidade de vôo é de cerca de trezentos metros, têm hábitos alimentares crepusculares e/ou noturnos: raramente são encontrados durante o dia, devido à luminosidade. As formas aladas abrigam-se nos mesmos locais dos criadouros e em anexos peridomiciliares, principalmente em abrigos de animais domésticos. Somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam do sangue para o desenvolvimento dos ovos – alimentam-se de ampla variedade de animais vertebrados de sangue quente, entretanto têm predileção por aves, geralmente, galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), que não mantêm a infecção por *Leishmania*. Por isso, elas não são consideradas fontes de infecção, mas somente elementos importantes para a manutenção do vetor no meio ambiente. Vale a pena ressaltar que a presença de animais domésticos e silvestres em áreas peridomiciliares provavelmente atrai um grande número de espécies de flebotomíneos, contribuindo, assim, para a agregação das espécies vetoras nas áreas rurais e peridomiciliares (ALEXANDER et al., 2002; COUTINHO, 2005; BRASIL, 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006). COUTINHO et al. (2004) sugerem a capacidade vetorial do *Riphiphthalmus sanguineus* para *L. chagasi*, abrindo, assim, novas perspectivas da epidemiologia da LV.

2.1.3. Reservatórios

Os reservatórios do parasito incluem grande variedade de animais mamíferos. As infecções mais comuns ocorrem nos mamíferos silvestres, como cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), raposas (*Dusicyon vetulus*), gambás (*Didelphis albiventris*), roedores, edentados (tamanduá, bicho-preguiça e tatu), procionídeos (mão-pelada e quati), suínos e primatas (inclusive o homem) e, ainda, animais domésticos como cães (*Canis familiaris*) e eqüinos (*Equus caballus*) (LAINSON & SHAW, 1987; BRASIL, 2006; SILVA, 2006). Vários estudos indicam que a metade dos cães com anticorpos anti-*Leishmania* não apresenta sinal algum de doença (assintomáticos), embora infecções subclínicas e/ou assintomáticas sejam potencialmente transmissíveis aos flebotomíneos (FEITOSA et al., 2000; ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2006; GREENE et al., 2006; SÃO PAULO, 2006).

A transmissão dos parasitos para os reservatórios humanos e animais é feita pela picada da fêmea do inseto vetor, quando do repasto sangüíneo, porém outras formas de

transmissão têm sido observadas. Em humanos, há relato de transmissão por via congênita ou por transfusão de sangue contaminado (PEARSON & SOUSA, 1996). Na região do Mediterrâneo, principalmente na Espanha, na França, na Itália e em Portugal, um ciclo antroponótico da leishmania visceral foi observado em pacientes com infecção pelo HIV, usuários de drogas endovenosas (MATHIAS, 2004).

2.1.4. Ciclo Evolutivo

O ciclo biológico da *Leishmania (Leishmania) chagasi* é do tipo heteroxênico e inicia-se com o repasto do flebótomo infectado (fêmeas de *L. longipalpis* ou *L. cruzi*) com a forma promastigota metacíclica (infectante). As formas infectantes são liberadas na epiderme e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). No interior dos macrófagos, elas diferenciam-se em formas amastigotas (aflageladas), que são ovais ou redondas, possuindo geralmente um cinetoplasto visível, as quais se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos, repletos de formas amastigotas, ficam desvitalizados e rompem-se, liberando estas formas, que, em um processo contínuo, serão novamente fagocitadas por tecidos ricos em células do SMF, como fígado, rins, baço, linfonodos, pele, entre outros. Os vetores ingerem as formas amastigotas quando sugam o sangue com macrófagos parasitados de um hospedeiro vertebrado infectado. Os macrófagos parasitados, após passagem pelo intestino anterior, rompem-se no intestino médio abdominal, liberando ali as formas amastigotas. Tais formas sofrem nova divisão binária no tubo digestivo do inseto e diferenciam-se para formas promastigotas (flageladas). Estas, por sua vez, sofrem por divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas, que são formas flageladas fixas encontradas no intestino médio torácico (estomodeu) do vetor. As formas paramastigotas possuem o núcleo adjacente ao cinetoplasto, portanto, não são consideradas promastigotas. Em seguida, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo do parasita no inseto ocorre em torno de 72 horas (CASTRO, 1996; BRASIL, 2006; GREENE et al., 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006). Os sinais clínicos podem apresentar-se de três meses a sete anos depois da infecção (LINDSAY, 2004).

A média de casos verificados em humanos é de 3.400/ano (2003-2004), com incidência de 2/100.000 habitantes e letalidade de 5,3%. A faixa etária mais predisponente

é a de indivíduos com menos de 10 anos de idade (58% dos casos). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), há 2 milhões de novos casos a cada ano e 10% da população do mundo corre risco de infecção. Cães infectados constituem o principal reservatório domiciliar do parasita e têm papel fundamental na transmissão para humanos, que são considerados hospedeiros acidentais, nos quais o parasita produz leishmaniose visceral (ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; MATHIAS, 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

2.1.5. Aspectos Ambientais

No Brasil, a leishmaniose visceral apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Na década de 1990, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de leishmaniose visceral em humanos ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, esta situação modificou-se e, no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já apresentava uma redução para 77% dos casos do país.

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). No estado de São Paulo, há registros de leishmaniose visceral humana em 34 municípios das regiões de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente; em cães, a doença já foi notificada em 45 municípios no estado, ocorrendo nas regiões de Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, Grande São Paulo e São João da Boa Vista (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

A leishmaniose visceral é conhecida comumente como doença própria de área de clima seco com precipitação pluviométrica anual inferior a 800mm, e de ambiente fisiográfico composto por vales e montanhas, onde se encontram os chamados “boqueirões” e “pés-de-serra”. Com a urbanização da LV, principalmente, nas periferias dos grandes centros urbanos, há áreas conhecidas de terra firme nas diferentes regiões e

em faixas litorâneas do nordeste. As transformações no ambiente, provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, a pauperização conseqüente de distorções na distribuição de renda, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno leva à redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias. O ambiente característico e propício à ocorrência da leishmaniose visceral é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, promiscuidade, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades. Estas características vêm-se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a leishmaniose visceral se encontra urbanizada (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

2.1.6. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A leishmaniose visceral canina é uma doença com manifestações clínicas variadas, havendo desde a forma assintomática – encontrada em áreas endêmicas e caracterizada por sorologia positiva para leishmaniose sem nenhuma manifestação clínica –, passando pela forma oligossintomática – caracterizada por sorologia positiva e presença de sinais inespecíficos como febre, linfadenopatia, perda de peso, hepatomegalia e/ou esplenomegalia de pequeno grau –, até a forma clássica ou sintomática, que é a doença plenamente manifesta por hepatomegalia, febre intermitente, lesões de pele não-pruriginosas, caracterizadas por úlceras, nódulos (mais freqüentes em gatos), pústulas locais ou generalizadas, letargia, alopecia, onicogrifose, linfadenomegalia, anorexia, perda de peso, glomerulopatia, lesões oculares (ceratoconjuntivite), epistaxe, com grande comprometimento do estado geral. Os fatores que determinam suscetibilidade ou resistência contra leishmaniose visceral permanecem obscuros, mas a genética do hospedeiro pode desempenhar papel fundamental (BADARÓ et al., 1986; ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; MAROLI & KHOURY, 2004; MATHIAS, 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2006; GREENE et al., 2006; SÃO PAULO, 2006).

Não há evidências de predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção (FERRER, 1992; FEITOSA et al., 2000; IKEDA, 2004). O parasita usualmente causa uma doença sistêmica crônica, no entanto, dependendo de suas propriedades e da

imunocompetência do hospedeiro, a evolução pode ser aguda e grave, o que leva o animal a óbito em poucas semanas (FEITOSA et al., 2000; IKEDA, 2004). Os sintomas tornam-se evidentes dentro de um período que varia de três meses a vários anos (FERRER, 1992; IKEDA, 2004). Ainda, segundo vários autores, uma pequena parcela dos animais pode ser assintomática, contribuindo, assim, para a manutenção da doença no meio ambiente (VIGILATO, 2004, BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Em humanos, febre irregular de longa duração, sinais de desnutrição proteicocalórica, hepatoesplenomegalia e alterações na pele são os principais sintomas da leishmaniose visceral americana nos seres humanos. A evolução é crônica e pode ser fatal, se não for diagnosticada e tratada precoce e adequadamente, sendo as crianças menores de cinco anos e idosos os mais freqüentemente acometidos. Pode ainda estar associada a severa desnutrição (VIGILATO, 2004, BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

2.1.7. Diagnóstico

O diagnóstico, tanto nos seres humanos quanto nos animais, é baseado nos sinais clínicos, nos dados epidemiológicos (ocorrência ou não da enfermidade no indivíduo ou animal) e no diagnóstico laboratorial (VIGILATO, 2004, BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral recomendado para os seres humanos é o exame parasitológico direto, utilizando-se a punção da medula óssea para a colheita do material. As amostras para exame direto são preparadas em lâminas com coloração apropriada (Giemsa ou Leishman) e examinadas à microscopia ótica. Este método tem positividade em torno de 85%, quando se faz leitura em pelo menos duzentos campos, em cinco a seis lâminas (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006). Outros autores relatam que a sensibilidade do esfregaço de medula óssea é de aproximadamente 60% a 91%. Já o aspirado esplênico, apesar do risco de hemorragia fatal em mãos inexperientes, é um dos mais valiosos métodos para diagnóstico de LV com uma sensibilidade acima de 83% (KOUTINAS et al., 2001; SUNDAR & RAI, 2002; BARROUIN-MELO et al., 2006). Formas características estão presentes em macrófagos da medula óssea, linfonodos, baço, fígado, rim e pele. Formas amastigotas são reconhecidas pela presença de um

núcleo roxo pequeno e um cinetoplasto característico, moldado por corante Romanowsky ou outro comercial (WHO, 1998; LINDSAY, 2004; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Nos cães, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido utilizada nas investigações de foco de transmissão em inquéritos sorológicos amostrais ou censitários para avaliar a prevalência da doença e para a confirmação das amostras reagentes pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) (VIGILATO, 2004; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Assim, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) pode ser obtido por meio de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, sendo a RIFI, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o "padrão-ouro", com o qual outros testes sorológicos são comparados, possuindo alta sensibilidade (96%) e especificidade (98%), e cujo diagnóstico constitui um instrumento essencial (FERRER, 1999; CIARAMELLA & CORONA, 2003; WHO, 2003; BRASIL, 2006).

O teste de RIFI consiste na reação de soros com os parasitos, formas promastigotas (*Leishmania* sp.), fixados em lâminas de microscopia. Em uma etapa subsequente, é utilizado um conjugado de anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com produto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína), para evidênciação da reação (BIO-MANGUINHOS, 2004). Animais doentes desenvolvem principalmente resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*, e a soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos (FERRER, 2002). Exames sorológicos por RIFI com uma titulação igual ou maior que 1:40 são normalmente considerados positivos para leishmaniose. Em áreas onde o *Trypanosoma cruzi* também está presente, há uma possibilidade de reatividade sorológica cruzada em muitos testes diagnósticos. Esta reatividade cruzada pode ser superada, utilizando-se um teste ELISA com uma proteína específica isolada da fase amastigota da *Leishmania* (rK39) ou de frações ligantes (fucose-manose ligantes). A rK39 é uma proteína recombinante constituída de uma seqüência de 298 aminoácidos que se repetem 5,5 vezes, e tem peso molecular de 32,7 kDa (WHO, 2003; LINDSAY, 2004; NASCIMENTO et al., 2005; BRASIL, 2006).

A demonstração de DNA-*Leishmania* mediante a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi recentemente desenvolvida como método muito específico e sensível ao diagnóstico (AZEVEDO, 2004; LINDSAY, 2004; GREENE et al., 2006), entretanto

AZEVEDO (2004) relata que o PCR não é um bom instrumento diagnóstico para vigilância epidemiológica da LVC, devido às baixas sensibilidade (55%) e especificidade (67%).

2.1.8. Vigilância Epidemiológica na Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral humana passa a constituir um problema real de saúde pública, porque é uma infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos. Com a crescente consciência do controle da doença em seres humanos, pesquisas em cães estão em desenvolvimento, com objetivo de elucidar a epidemiologia, a patologia da doença e possíveis tratamentos. Estes novos resultados propiciarão maior entendimento da doença e também ajudarão no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e de controle da infecção, como novas drogas, protocolos para tratamento e vacinas de segunda geração, tudo isso com a expectativa de não só reduzir o pesado fardo da doença entre cães, mas também reduzir a incidência da leishmaniose visceral humana (ALVAR et al., 2004; GRAVINO, 2004; ALMEIDA et al., 2005).

A vigilância epidemiológica, segundo a Lei 8.080, tem como conceito o conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou a prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos. Assim, a vigilância epidemiológica tem como propósito fornecer orientação técnica permanente aos responsáveis pela decisão e pela execução de ações de controle de doenças e agravos. Para subsidiar esta atividade, deve tornar disponíveis informações atualizadas sobre a ocorrência dessas doenças ou agravos, bem como dos seus fatores condicionantes, em uma área geográfica ou população determinada. A vigilância epidemiológica constitui-se, ainda, em importante instrumento para o planejamento, a organização e a operacionalização dos serviços de saúde, bem como para a normatização de atividades técnicas correlatas (BRASIL, 2002).

A investigação epidemiológica é um método de trabalho utilizado com muita frequência, em casos de doenças transmissíveis, mas que se aplica a outros grupos de agravos. Consiste em um estudo de campo realizado a partir de casos notificados (cl clinicamente declarados ou suspeitos) e de portadores. Tem como objetivo avaliar a ocorrência, do ponto de vista de suas implicações para a saúde coletiva. Sempre que

possível, deve conduzir à confirmação do diagnóstico, à determinação das características epidemiológicas da doença, à identificação das causas do fenômeno e à orientação sobre as medidas de controle adequadas para impedir a ocorrência de novos casos. É utilizada na ocorrência de casos isolados ou de epidemias (BRASIL, 2002).

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA) tem como objetivo geral a redução da morbidade e da letalidade por LV, e, como objetivos específicos, o monitoramento da distribuição da *L. longipalpis*; a redução da densidade do vetor; a detecção precoce da transmissão da LV; o monitoramento dos níveis de prevalência na população canina nos municípios com transmissão; a redução da prevalência canina; a detecção e o tratamento precoce dos casos humanos; e a redução da morbidade e da letalidade em seres humanos. O PVCLVA é subdividido em atividades relacionadas à vigilância epidemiológica e às medidas de prevenção e controle do vetor, do reservatório doméstico e para seres humanos (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Na vigilância epidemiológica, tem-se como caso canino suspeito todo cão que apresente pelo menos um dos três seguintes sintomas: descamação (mais freqüente na região periorcular e bordas da orelha), úlceras de pele (geralmente nas extremidades) ou onicogribose (alongamento das unhas), em associação com dois ou mais dos seguintes sintomas: ceratoconjuntivite, coriza, apatia, emagrecimento, diarreia, hemorragia intestinal, vômitos, edema das patas, paresia das patas posteriores e/ou caquexia (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Ao mesmo tempo, um caso canino suspeito passa a ser confirmado se, na avaliação laboratorial, ocorrer identificação de *L. (L.) chagasi*, com base na cultura e/ou na inoculação em hamster e/ou por técnicas moleculares; ou o encontro de *Leishmania* sp em exame parasitológico direto, nos municípios onde já houver confirmação de transmissão de LV; ou pesquisa positiva de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* sp, nos municípios onde já houver confirmação de transmissão de LV – aonde se enquadra o local deste estudo. Ainda, um caso canino suspeito passa a ser confirmado por um critério clínico-epidemiológico, se proveniente de área endêmica ou onde esteja ocorrendo surto, sem a confirmação de diagnóstico laboratorial, mas com quadro clínico compatível com LV, isto é, cão que apresente descamação e úlceras de pele e onicogribose,

acompanhados de dois ou mais dos seguintes sintomas: ceratoconjuntivite, coriza, apatia, emagrecimento, diarreia, hemorragia intestinal, vômitos, edema de patas, paresia de patas posteriores e/ou caquexia (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

O inquérito sorológico canino censitário deverá ser realizado em zona urbana de município silencioso receptivo vulnerável com população canina igual a trezentos cães, anualmente; ou em setores urbanos de municípios com transmissão e setores com transmissão humana, anualmente, quando a prevalência canina estimada anteriormente em inquérito censitário ou amostral for igual a 2%; ou em zona rural receptiva (aglomerados ou casas dispersas) de municípios com transmissão e de municípios silenciosos receptivos vulneráveis, com periodicidade bienal (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Em municípios com transmissão, ou seja, com confirmação de casos humanos e/ou caninos autóctones, como é o caso de Brasília – DF, o inquérito canino censitário visa, além de avaliar a prevalência canina, ao controle pela identificação de cães infectados para a realização da eutanásia. Estes inquéritos devem ser realizados, de preferência, no período de agosto a novembro, por no mínimo três anos consecutivos, independentemente da notificação de novos casos confirmados de LV em humanos e/ou caninos e da prevalência canina (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Entre as atividades de prevenção e controle dirigidas ao controle reservatório doméstico canino, está preconizada a eutanásia em cães sem controle de proprietários ou de famílias (errantes), mantidos em canis públicos, devido às atividades de recolhimento, após o tempo de espera estabelecido para o dono recuperá-lo, independentemente de qualquer exame; em cães sem controle de proprietários ou de famílias (errantes) ou domiciliados confirmados pelo critério clínico-epidemiológico em municípios com transmissão confirmada; em cães com resultado positivo de exame sorológico e/ou parasitológico em municípios com transmissão confirmada; e em cães com identificação de *L. (L.) chagasi*, em qualquer município (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Com relação às medidas de prevenção, destaca-se a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina 4%, que é indicada como medida de proteção individual para os cães contra picadas de flebotomíneos, devendo ser utilizadas ininterruptamente e trocadas a cada quatro meses. Em larga escala, quando utilizadas em experimento

populacional controlado, seu emprego mostrou resultados promissores quanto à efetividade na redução da prevalência canina e incidência humana, porém sua aplicação como programa de saúde pública merece ainda mais estudos de custo-benefício (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Quanto à vacina contra a LVC registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda não existe avaliação de seu custo-benefício e efetividade para o controle da LVC em programas de saúde pública. Até o momento, os estudos realizados referem-se somente à eficácia vacinal. Diante disto, o Ministério da Saúde determinou a não-utilização da vacina Leishmune®¹ como medida de controle da leishmaniose visceral no Brasil. Além disto, a vacina possui baixa eficácia vacinal (76%), não tendo sido demonstrado seu efeito na prevenção da infecção e na infectividade do cão para o vetor (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

A estratégia de controle do vetor deve ser organizada com base nas informações obtidas com as atividades de: (i) vigilância entomológica, principalmente as relativas às condições de saneamento dos imóveis; (ii) vigilância da população canina e (iii) ocorrência de casos humanos, devendo ser implementada nos municípios receptivos e, prioritariamente, naqueles com transmissão. Trata-se de uma estratégia de controle integrado cujas atividades visam a modificar as condições sanitárias que favoreçam a proliferação de *L. longipalpis* em áreas urbanas, intensificando as ações, prioritariamente, nos setores com prevalência canina igual a 2%; reduzir a densidade de *L. longipalpis* a níveis próximos de zero no intradomicílio, no período mais favorável ao aumento da densidade do vetor, nas áreas onde tenham sido confirmados casos humanos autóctones de LV (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

O manejo ambiental consiste na poda de árvores, na eliminação de matéria orgânica do solo e de vegetação em quintais e jardins (peridomicílio), praças, parques públicos e terrenos baldios, a fim de reduzir a quantidade de matéria orgânica e locais sombreados, que forneçam condições favoráveis para o estabelecimento de criadouros do vetor. Esta atividade deverá ser realizada em todos os municípios, principalmente nos municípios com transmissão e nos municípios silenciosos receptivos (vulneráveis ou não), prioritariamente nos setores em que o vetor já foi detectado.

¹ Fort Dodge Saúde Animal Ltda. – Campinas – SP – Licenciada no Ministério da Agricultura sob nº 8.627 de 11/06/03.

Para tanto, serão recomendadas as seguintes medidas de manejo aos responsáveis pelos imóveis: poda de árvores, arbustos e gramados, capinação e eliminação de matéria orgânica. Recomenda-se, também, que a opção de criar animais seja acompanhada por posturas de posse responsável, condição que inclui a adoção de hábitos de higiene e de preservação do meio ambiente (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

A pesquisa entomológica em foco de transmissão tem como objetivo mapear os locais favoráveis à proliferação de formas imaturas de *L. longipalpis*, em áreas urbanas, de modo a sistematizar as ações de orientação e vigilância sanitária voltadas aos responsáveis por imóveis que apresentem tal condição. É realizado o diagnóstico ambiental, ou seja, a avaliação sobre as condições sanitárias de todos os imóveis da área urbana dos municípios, pelas equipes municipais responsáveis pelo controle de vetores. Durante a visita casa a casa, os moradores são orientados sobre os cuidados com os jardins e quintais, para evitar criadouros de *L. longipalpis*, além das orientações dos cuidados com a criação de animais domésticos (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Em setores com prevalência canina igual a 2%, as ações dirigidas aos imóveis “de risco” deverão ser intensificadas, por meio de visitas específicas para acompanhamento das condições sanitárias e reforço das orientações para a manutenção adequada do peridomicílio destes imóveis. Em áreas com ocorrência de casos humanos, devem ser intensificadas as ações de manejo ambiental, antes da aplicação de inseticida. A aplicação de inseticida de ação residual deverá ser realizada apenas nos municípios com transmissão humana, em períodos do ano que possam otimizar o poder residual do inseticida e diminuam a densidade do vetor. Quando da ocorrência do primeiro caso humano, o controle químico será adotado para os casos detectados dentro de um período de seis meses contados a partir da detecção do primeiro caso humano autóctone, devendo ser considerada a data de início dos sintomas. A área de borrifação será de, no mínimo, duzentos metros ao redor do local provável de infecção do caso detectado. Também é preciso levar em conta, para a delimitação da área a ser borrifada, a proximidade espacial dos casos e as condições socioeconômicas da população residente, que pode ser estendida, a fim de cobrir toda a população sob risco (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

No Distrito Federal, os focos de transmissão da doença localizam-se em regiões periurbanas originadas de áreas invadidas e ocupadas à custa de desmatamentos,

contribuindo, assim, para a maior exposição ao vetor da doença. As condições socioeconômicas, ambientais e os hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da leishmaniose visceral em áreas endêmicas. Tais condições podem contribuir para que a leishmaniose visceral seja perpetuada nas áreas rurais e periurbanas, acometendo aglomerados humanos com baixo nível socioeconômico, que vivem em condições precárias de moradia (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006).

Estudos na América Latina, baseados em modelos matemáticos, verificaram que inseticidas representam um meio de controle dos mosquitos, portanto um modo mais efetivo de redução da transmissão de *Leishmania chagasi*, comparados à atual estratégia de eutanasiar cães infectados, tendo em vista também ser mais aceitável pela população humana. A interrupção do ciclo pelo controle dos vetores pode oferecer uma solução mais barata e mais prática em relação ao custo do tratamento, além de melhorar o conhecimento das opções disponíveis. Felizmente os insetos permanecem suscetíveis a todos os principais grupos de inseticidas. Em locais de focos de transmissão de leishmaniose visceral canina, onde cães são os reservatórios domésticos, é esperada uma redução na transmissão da *Leishmania*, combinando-se o tratamento de massa efetivo (inexistente) em cães infectados e a proteção para cães saudáveis e infectados, quanto às picadas de insetos. Avaliações laboratoriais e de campo mostraram que coleiras saturadas e aplicação tópica de inseticidas, com efeito repelente e letal, poderiam proteger os cães das picadas dos insetos (ALVAR et al., 2004; MAROLI & KHOURY, 2004).

Levantamentos epidemiológicos realizados no Brasil, após casos diagnosticados de leishmaniose visceral humana e implantação de programas de controle realizados nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, evidenciaram a presença de *Leishmania spp.* na população canina entre 9,5% (Montes Claros – MG) a 25% (Guaratiba – RJ). Verificaram-se maior soropositividade em animais oriundos de regiões rurais e a presença de *Lutzomyia longipalpis* no ambiente peridomiciliar, demonstrando a possibilidade de aparecimento de novos casos humanos (SILVA et al., 2001; CABRERA et al., 2003; FRANCA-SILVA et al., 2003; MADEIRA et al., 2003). Ao mesmo tempo, estudos realizados na Ilha de São Luís (MA) evidenciaram que a presença do cão no domicílio e peridomicílio parece não ser um fator de risco tão significativo para infecção como a presença do vetor. Mediante modelo matemático relativo à dinâmica da transmissão de leishmaniose visceral

na ilha de São Luís, demonstrou-se que o controle vetorial é mais efetivo no combate à doença e que a presença do cão não esteve associada à infecção por *L. chagasi* (NASCIMENTO et al., 2005).

Em estudo realizado em região endêmica para a leishmaniose visceral humana no nordeste brasileiro, foram avaliados os sinais clínicos da leishmaniose visceral canina, o perfil protéico sérico e a produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em 86 cães, sendo utilizados 30 cães de uma área livre de *Leishmania* como grupo controle. Os principais sinais clínicos da LVC observados foram emaciação e úlceras de pele (80%), onicogribose e conjuntivite (73%), alopecia (60%), enquanto linfadenomegalia, esplenomegalia, glomerulopatia foram menos freqüentes ($\leq 20\%$)(ALMEIDA et al., 2005).

2.2. Achados clinicopatológicos

2.2.1. Bioquímica Sérica

As enzimas utilizadas como indicadores de disfunção hepática em cães e gatos são a atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), a gama glutamiltransferase (GGT), a fosfatase alcalina (ALP) (KANEKO, 1997). A determinação da atividade da alanina aminotransferase (ALT), que é uma enzima sensível e específica de dano do hepatócito, é um teste considerado hepato-específico, porque um significativo aumento em sua atividade sérica somente é observado em casos de degeneração ou necrose hepatocelular. A atividade da aspartato aminotransferase (AST) está presente na mitocôndria do hepatócito e nos músculos esquelético e cardíaco. Dessa forma, seu aumento pode ser interpretado como consequência de uma lesão hepática, desde que se excluam lesões musculares e cardíacas (LOPES et al., 1996; KANEKO et al, 1997).

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima mitocondrial que pode ser encontrada em vários tecidos, principalmente no tecido ósseo, no sistema hepato-biliar, na mucosa gastrointestinal e, em menor grau, nos rins, na placenta e no baço. É bastante utilizada para confirmar colestase em cães, pois, nesta espécie, a fosfatase alcalina aumenta consideravelmente em caso de obstrução dos canalículos biliares. Em distúrbios colestáticos, o aumento na atividade da fosfatase alcalina precede a hiperbilirrubinemia (LOPES et al., 1996; KANEKO et al, 1997). A GGT apresenta uma grande atividade nos

rins e no fígado, mas somente a de origem hepática é encontrada normalmente no soro, pois a de origem renal é excretada na urina. O aumento de sua atividade sérica, em todas as espécies, ocorre após desordens colestáticas (KANEKO, 1997).

SLAPPENDEL & FERRER (1998) reportaram que, em um estudo com oitenta cães portadores de leishmaniose visceral, as elevações das atividades séricas de ALT e ALP ocorreram em 61% e 51% dos animais, respectivamente.

A avaliação da função renal pode ser estabelecida mediante obtenção da concentração de creatinina e uréia, catabólitos que podem estar elevados em resposta a fatores pré-renais e, particularmente, à desidratação e a exercícios (KANEKO, 1997). A uréia é um produto nitrogenado não-protéico, resultante do metabolismo das proteínas, sintetizado pelo fígado e eliminado pelos rins. A concentração elevada de uréia no soro sangüíneo (uremia) deve ser acompanhada, sempre, do exame completo da urina, para sua adequada interpretação (LOPES et al., 1996; KANEKO et al, 1997).

A creatinina é um produto nitrogenado não-protéico, resultante do metabolismo da creatina e fosfocreatina, existente em grande quantidade nos músculos esqueléticos e cardíacos, no fígado e nos rins. É uma substância de limiar baixo e toda quantidade que chega aos rins é excretada pelos glomérulos, não havendo reabsorção tubular, propriedade que a torna clinicamente utilizável como índice de filtração glomerular renal. Por ser facilmente eliminada, o seu aumento na circulação sangüínea não é observado tão precocemente quanto a elevação da uréia, quando existe uma lesão renal. O aumento de creatinina no sangue ocorre em todas as doenças renais, em que há diminuição da taxa de filtração glomerular (LOPES et al., 1996; KANEKO et al, 1997).

O aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina ou azotemia pode ser classificada de acordo com a natureza do processo em pré-renal, renal e pós-renal. A azotemia pré-renal pode ocorrer devido ao catabolismo protéico, à ingestão de dieta hiperprotéica, à hemorragia do trato gastrointestinal e, em situações onde exista redução da perfusão sangüínea renal, como nos casos de insuficiência cardíaca, hipovolemia e desidratação. A azotemia renal é evidenciada quando aproximadamente 70% dos néfrons estão afuncionais e ocorre em todas as enfermidades intrínsecas dos rins, particularmente nas nefrites, pielonefrites e glomerulonefrites. A azotemia pós-renal ocorre principalmente

em processos primários de obstrução ou ruptura do trato urinário inferior (LOPES et al., 1996; KANEKO et al, 1997).

Nieto et al. (1992a) estudaram dez cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e verificaram que 70% apresentavam elevação dos níveis séricos de uréia, enquanto apenas três animais também apresentavam hipercreatinemia. Slappendel & Ferrer (1998) reportaram que, em um estudo com oitenta cães portadores de leishmaniose visceral, em 45% dos cães foi observado aumento da concentração sérica de uréia, além de hipercreatinemia em 38% dos animais.

O colesterol é o principal componente das membranas eucarióticas e apresenta um papel crucial na organização da membrana celular, dinâmica e função; metabolizado no fígado e transportado no sangue por lipoproteínas. A lipoproteína LDL tende a ser a fração predominante no cão, representando em torno de 65% do colesterol total na maioria das raças e sendo responsável pelo transporte do colesterol para os tecidos. O aumento dos seus níveis leva ao acúmulo no plasma e conseqüente aderência ao endotélio vascular, o que pode acarretar os chamados ateromas. A função de transporte reverso do colesterol realizado pela HDL confere a estas lipoproteínas o nome de “bom colesterol”, pois contribuem de maneira significativa para a manutenção dos níveis de lipoproteínas fisiologicamente apropriados e saudáveis, ajudando assim a prevenir a aterosclerose por facilitar a captação celular de LDL. Valores normais de HDL variam entre 25% e 60% do colesterol total (KANEKO et al., 1997; SCHMIDT et al, 2006).

Na LV humana, foram observados hipocolesterolemia, leve hipertrigliceridemia, diminuição dos níveis séricos de HDL (lipoproteína de alta densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) (LIBEROPOULOS et al., 2002). Nieto et al. (1992b) relatam que, em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, observaram o aumento dos níveis séricos de colesterol e LDL e a diminuição de HDL. Estudos recentes revelam que o requerimento específico do colesterol na membrana celular e a internalização do parasita em macrófagos dos hospedeiros conduzem a uma infecção produtiva. Além disso, a redução na habilidade do parasita para infectar macrófagos dos hospedeiros pode ser invertida, reabastecendo de colesterol as membranas celulares (PUCADYIL et al. 2004).

Quando desequilíbrios de eletrólitos ocorrem, efeitos (logo, sinais clínicos) não afetam somente um órgão específico ou sistema isoladamente. A homeostasia do cálcio

envolve os ossos, os rins e o trato digestório; este eletrólito afeta a permeabilidade das membranas celulares, portanto, ajuda a regular a atividade neuromuscular. Os níveis de fósforo (em suas várias formas orgânicas e inorgânicas) desempenham vários papéis diferentes e contribuem para a estrutura celular e a função, enquanto ajudam a prover energia (na forma de ATP), e facilitam a entrega de oxigênio aos tecidos (como 2,3-DPG), como um segundo mensageiro intracelular (cAMP). Finalmente, embora o papel de magnésio seja bem menos compreendido que o dos outros eletrólitos, acredita-se que sua deficiência exacerba algumas condições clínicas e pode afetar potencialmente algumas doenças. Manifestações clínicas de hipomagnesemia normalmente incluem arritmias cardíacas, alterações do sistema nervoso e anormalidades neuromusculares (KANEKO et al., 1997; STEELE, 2005).

2.2.2. Proteinograma

Quanto às proteínas plasmáticas, estas são sintetizadas no fígado e constituídas de aminoácidos, obtidos após a quebra e a absorção intestinais. As principais frações são a albumina e as globulinas, representando a albumina de 35% a 50% do total das proteínas séricas. Uma hipoproteinemia pode ocorrer por falha na ingestão, na absorção, na síntese ou na perda protéica (LOPES et al., 1996).

A hiperproteinemia, a hipoalbuminemia, a hiperglobulinemia e a relação de albumina/globulina diminuída ou invertida, inclusive a hipergamaglobulinemia, são os achados mais freqüentemente observados na leishmaniose visceral canina, decorrentes de ativação policlonal de células B e da produção de anticorpos (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005; COUTINHO, 2005). Pode ocorrer hipoalbuminemia resultante de nefropatia e conseqüente perda protéica, ou enfermidade hepática ou de má nutrição (KONTOS & KOUTINAS, 1993; KOUTINAS et al., 1999; NOLI, 1999; COUTINHO, 2005). A eletroforese de proteínas séricas geralmente apresenta diminuição da fração albumina associada a aumento das frações gama e beta globulinas (MARZOCHI et al., 1985; KONTOS & KOUTINAS, 1993, CIARAMELLA & CORONA, 2003).

Martinez-Subiella et al. (2002), por meio de métodos de imunoensaio e colorimétricos em analisador bioquímico, com reagentes destinados à sorologia humana,

avaliaram cães saudáveis e portadores de *L. infantum chagasi*, sintomáticos e não-sintomáticos, e verificaram as concentrações de proteínas de fase aguda como a haptoglobina, ceruloplasmina e proteína C-reativa. Observaram que cães portadores apresentaram maior concentração de proteína C-reativa do que os cães assintomáticos.

Quanto à resposta de fase aguda, esta se refere a uma reação complexa e inespecífica, que acontece logo após qualquer dano tecidual. A origem da resposta pode ser atribuída a processos infecciosos, imunológicos, neoplásicos, traumáticos, ou outras, e o propósito da resposta é restabelecer a homeostase e remover a causa do distúrbio (WHICHER & WESTACOTT, 1992; CERÓN et al., 2005). A resposta de fase aguda é considerada uma parte do sistema de defesa inato do hospedeiro, que é responsável pela sobrevivência deste durante as fases críticas e iniciais da infecção e, em condições evolutivas, antecede a resposta imune adquirida (ECKERSALL, 2000).

A resposta de fase aguda é caracterizada por vários efeitos sistêmicos, inclusive febre, leucocitose, aumento de cortisol sanguíneo e diminuição nas concentrações de tiroxina, mudanças metabólicas (isto é, lipólise, gliconeogênese, catabolismo protéico), e diminuição das concentrações séricas de ferro e zinco. A resposta também inclui mudanças nas concentrações de proteínas plasmáticas, chamadas de proteínas de fase aguda (PFA) (KUSHNER & MACKIEWICZ, 1993; ECKERSALL, 1995), algumas das quais diminuem suas concentrações (PFA negativas; por exemplo, albumina ou transferrina), ao passo que outras aumentam (PFA positivas; por exemplo, proteína C-reativa [CRP], amiloide A sérica [SAA], haptoglobina [Hp], glicoproteína alfa-1-ácida [AGP], ceruloplasmina (Cp), e fibrinogênio). A maioria das PFA positivas são glicoproteínas sintetizadas principalmente pelos hepatócitos devido a estimulação por citocinas pró-inflamatórias e sua liberação na circulação sanguínea. As principais citocinas pró-inflamatórias são a interleucina-6 (IL-6), IL-1 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Em humanos, a IL-6 é considerada a mais importante citocina capaz induzir a síntese de diferentes PFA, como Hp, ou combinadas com IL-1, como no caso de CRP e SAA (KUSHNER & MACKIEWICZ, 1993). Níveis séricos de IL-6 notadamente aumentam durante uma resposta de fase aguda em cães (YAMASHITA et al., 1994). Testes para detecção de citocinas poderiam ser usados para quantificar a resposta sistêmica induzida por uma infecção ou inflamação; porém os testes para detecção e/ou quantificação de PFA

foram desenvolvidos como alternativa consistente para este propósito (CERÓN et al., 2005).

Enquanto as PFA são convencionalmente estabelecidas como derivadas dos hepatócitos, há evidências crescentes de que elas também podem ser produzidas em outros tecidos. Linfócitos produzindo AGP foram identificados, o que poderia explicar seu nível sérico elevado em cães e gatos com linfoma. A produção extra-hepática de AGP também foi descrita em outros órgãos em humanos, como rins, intestinos e coração, e em diferentes tipos de leucócitos. Além disso, AGP pode originar-se da próstata e pode ser detectada no fluido seminal. A produção de SAA foi demonstrada em tecidos como intestino, rins, medula óssea, adipócitos (em casos de hiperglicemia) e glândula mamária (em casos de mastite), em diferentes espécies animais. Pulmões, tecido adiposo, baço e rins podem produzir Hp. Os rins podem produzir CRP em humanos, e CRP pode ser utilizada como um indicador de rejeição ao transplante renal. Foi postulado que a produção de PFA no local da reação de fase aguda inicial além do fígado pode contribuir para manter a homeostase, reduzindo o dano tecidual associado ao processo inflamatório (ECKERSALL et al., 2001; CERÓN et al., 2005).

Devido à complexidade do grande número de alterações fisiológicas, imunológicas e reações bioquímicas, evidenciam-se algumas características da resposta de fase aguda que apresentam aplicação prática do ponto de vista clínico: é muito rápida e desenvolve-se antes mesmo da estimulação da resposta imune específica, em muitos casos, antes do início de sinais clínicos. Assim, pode ser considerada como um dos marcadores mais rapidamente detectados para qualquer processo patológico ou doença; a resposta de fase aguda é altamente inespecífica, pois se desenvolve secundariamente a numerosas condições que podem produzir dano tecidual (infeccioso, imunológico, neoplásico, traumático, etc); a produção e a resposta das PFA variam, dependendo da espécie. Por exemplo, no cão, após estímulo inflamatório, uma forte resposta ocorre com CRP; porém, em gatos, não foram descobertos aumentos significantes de CRP (KUSHNER & MACKIEWICZ, 1993; KAJIKAWA et al., 1999; PETERSEN et al., 2004; MURATA et al., 2004; CERÓN et al., 2005).

Segundo Rodriguez et al. (2003), a leishmaniose visceral canina está associada à imunidade celular reduzida e à elevação significativa de anticorpos de IgG de anti-

Leishmania, porém, enquanto foram estudadas elevações de IgG extensivamente na leishmaniose, a distribuição de outras imunoglobulinas é pouco investigada. Assim o estudo de imunoglobulinas parasita-específico em leishmaniose visceral canina pode evidenciar nas respostas imunes durante a progressão e resolução da infecção. Estudos prévios sugerem que a leishmaniose visceral canina está associada com a regulação de anticorpos específicos de todas as subdivisões de classe de IgG, particularmente IgG1, IgG3 e IgG4 (QUINNEL et al., 2003).

3. OBJETIVOS

São objetivos do estudo:

1. verificar a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) e os aspectos clínicos e epidemiológicos em cães sororreagentes e não-reagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em foco de transmissão no Distrito Federal – DF – Brasil;
2. determinar o proteinograma de cães sororreagentes e não-reagentes à RIFI para LVC, investigando, em especial, as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, em eletroforese em gel de poliacrilamida que contenha dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectrometria de massa em MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*);
3. avaliar componentes do soro sanguíneo de cães sororreagentes e não-reagentes à RIFI para LVC, sendo proteínas totais, colesterol, cálcio, fósforo, magnésio, uréia e creatinina e atividades das enzimas fosfatase alcalina (ALP), gamaglutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), de modo a avaliar parte do metabolismo, balanço de alguns íons e funções renal e hepática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área do estudo

Os parâmetros referentes aos cães (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) avaliados neste estudo foram conduzidos com base na população canina do Condomínio Serra Azul, situado na cidade-satélite de Sobradinho II, no Distrito Federal, delimitada pelas coordenadas 15° 37' 51" S - 47° 50' 23" W (Figura 1; seta amarela).

A instalação do condomínio data de 1990. Constituído de 578 casas, próximo à estrada DF-420, possui todas as ruas asfaltadas e estabelece limites com outros dois condomínios e, ao norte (fundos), com área de cerrado, que inclui vales e montanhas. O condomínio localiza-se a 12km do Plano Piloto e a 8km da cidade de Sobradinho. Sua altitude é de 1.050 e 1.090 metros acima do nível do mar. Atualmente contém 623 lotes, dos quais 48 (7,7%) se encontram desocupados e são utilizados como depósito de lixo. Alguns representam local de proliferação de roedores e insetos. A coleta pública de lixo é realizada três vezes por semana. A maior parte das 578 casas construídas é cercada com muros altos; entretanto, o condomínio é parcialmente murado nos limites com o cerrado. O registro fotográfico do condomínio evidenciando as características descritas acima está disposto no Apêndice A.

A região de escolha para o estudo foi uma área periurbana com foco de transmissão de leishmaniose visceral (Figura 2).

4.2. Inquérito sorológico censitário canino e levantamento epidemiológico

As coletas de dados e a obtenção das amostras de sangue foram realizadas por agentes da Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL) do Centro de Controle de Zoonoses do Distrito Federal, no período de 6 de fevereiro a 11 de março de 2006. Previamente às coletas de sangue, os animais foram submetidos à inspeção física; também se realizou um levantamento epidemiológico (Figura 3). As informações foram anotadas em fichas de identificação que continham dados do proprietário e do cão (nome, endereço, raça, idade, sexo, entre outros) e informações epidemiológicas (por exemplo, presença de aves ou animais silvestres, condições do quintal e presença de canil), e de possíveis alterações clínicas (inclusive alopecia, onicogribose, ceratoconjuntivite, lesões

cutâneas e presença de ectoparasitas) que permitiram definir o quadro clínico da leishmaniose visceral canina em assintomático, oligossintomático e sintomático.

No Condomínio Serra Azul, em Sobradinho II – Distrito Federal, foram colhidas amostras de sangue de 556 cães da região, na qual foram diagnosticados dois casos humanos de leishmaniose visceral (foco de transmissão). As amostras de 3 a 5mL de sangue foram obtidas da veia jugular, utilizando-se agulhas 25×7mm e tubos Vacutainer®² sem anticoagulante. Tais amostras foram centrifugadas a 800 G durante cinco minutos, para obtenção de amostras de soro, que foram armazenadas em temperatura de -20°C até o momento das análises.

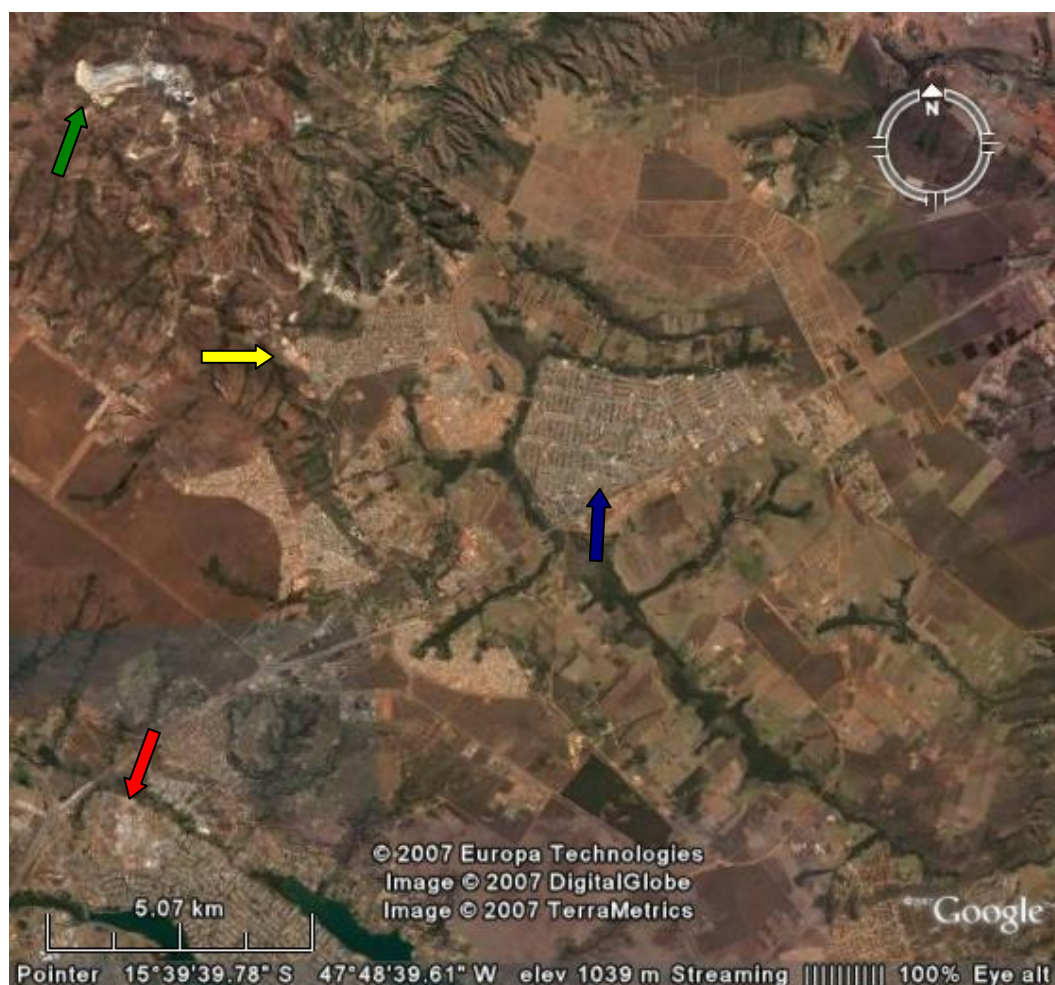


Figura 1 - Foto aérea, obtida por satélite, mostrando as regiões do Distrito Federal: Condomínio Serra Azul (seta amarela), Sobradinho (seta azul), Fercal (seta verde) e Lago Norte (seta vermelha).

² VACUTAINER ®- BENCTON-DICKSON - SÃO PAULO – SP

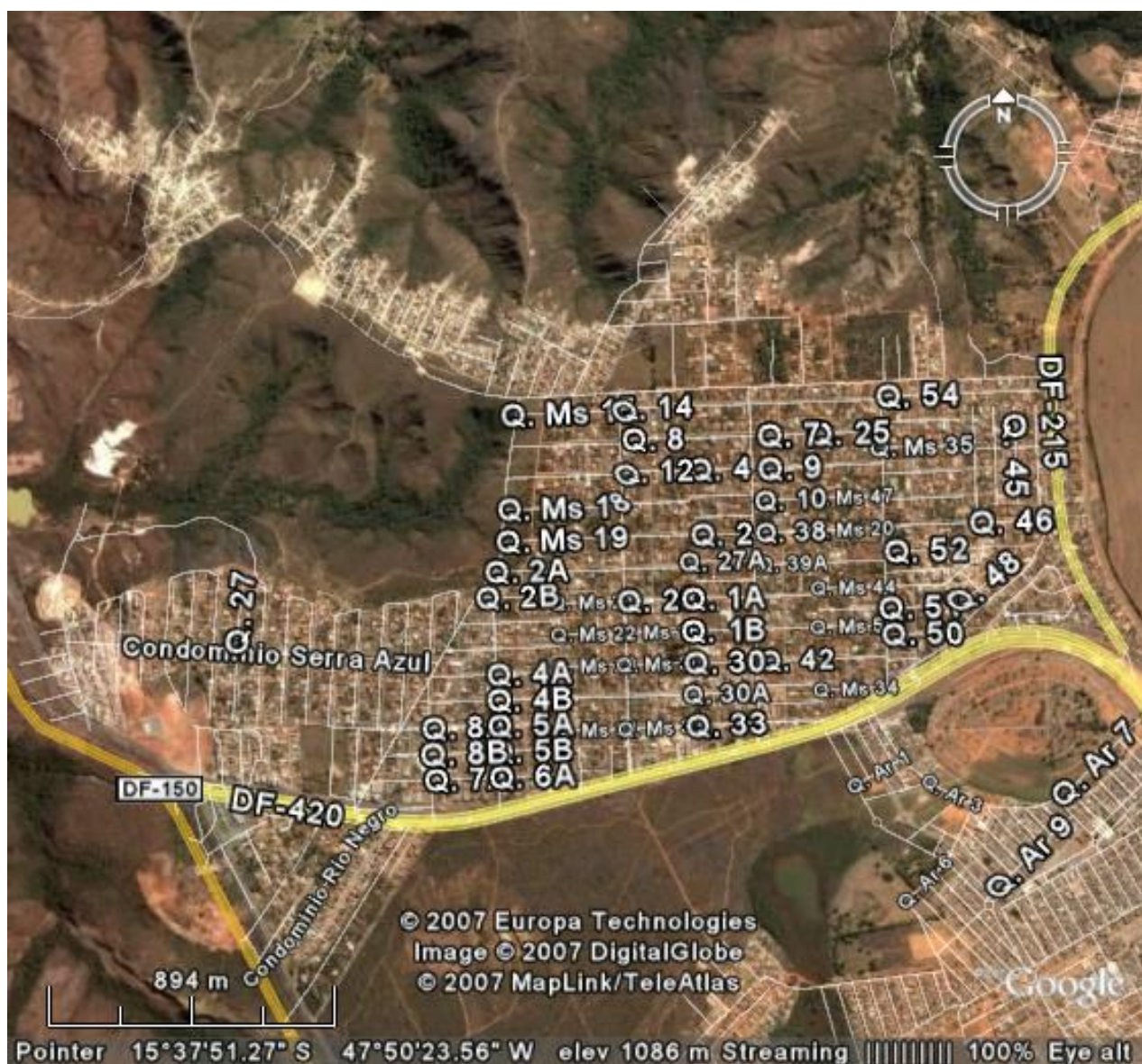


Figura 2 - Foto aérea obtida por satélite ampliada, mostrando em detalhes o Condomínio Serra Azul – Sobradinho II – Distrito Federal.

LEISHMANIOSE CANINA – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

Nº da Ficha: _____ Data da Coleta: ____/____/2006.

Nome Proprietário: _____

Endereço Proprietário: _____

Cidade: _____ Fone: _____

Nome do cão: _____ Raça: _____

Sexo: () Macho () Fêmea Idade: _____

Pelagem: () Curto () Médio () Longo Cor: _____

Endereço do cão: _____

Local onde adquiriu o cão: _____ Quando? _____

Como vive: () Lote fechado () Lote Aberto

Mobilidade: () Acesso a rua () Preso

Onde dorme: () Dentro de casa () Fora de casa: () Livre () Canil

O cão foi para outro lugar nos últimos 6 meses: () Sim () Não

Qual lugar: _____ Usa coleira repelente: () Sim () Não

Sintomas e sinais: () Emagrecimento () Lesão de pele () Unha crescida () Queda de pelo na região dos olhos () Falta de apetite
() Secreção ocular () Sangramento tipo _____

Presença de Ectoparasitos: () Pulgas () Carrapatos
() Outros: _____ () Coletado () Não coletado

Origem do material: () Canil () Inquérito () Particular () Clínica

Qual: _____

Outras informações: _____

Responsável pelo preenchimento: _____

Nº do Laboratório: _____ Resultado: _____ Data: _____

Figura 3 - Ficha da Secretaria de Estado de Saúde para obtenção de dados de identificação, epidemiológicos e quadro clínico de animais suspeitos de leishmaniose visceral canina, no Distrito Federal – DF.

4.3. Inquérito entomológico

A captura de vetores foi realizada por agentes da Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL) e pela Divisão de Controle de Vetores do Centro de Controle de Zoonoses do Distrito Federal, no período de 6 de fevereiro a 11 de março de 2006. Para a realização do levantamento entomológico, foram utilizadas armadilhas de isca luminosa, instaladas em residências da área delimitada com foco de LV humana. As armadilhas foram instaladas a aproximadamente 1 metro do solo, preferencialmente, nos quintais junto aos abrigos ou canis dos animais domésticos. Foram instaladas vinte armadilhas em dez residências do condomínio em estudo. Os insetos coletados foram acondicionados em câmaras coletoras mantidas sob refrigeração até o momento do preparo e da identificação, realizados no Laboratório de Entomologia da Divisão de Controle de Vetores do Distrito Federal.

4.4. Imunofluorescência indireta (RIFI)

As amostras de soro coletadas dos 556 cães foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Leishmania* sp. pelos técnicos da Vigilância Ambiental do Distrito Federal – órgão oficial vinculado ao Ministério da Saúde (Laboratório Central – LACEN); as leituras foram realizadas em triplicada, isto é, a mesma lâmina foi examinada por três técnicos diferentes e, após três leituras positivas ou reagentes, tais animais foram submetidos à nova coleta, com intervalo inferior a quinze dias, e o resultado do exame confirmado.

4.5. Amostragem

4.5.1. Tamanho da amostra e formação dos grupos experimentais

Com base nos resultados da RIFI da população canina do Condomínio Serra Azul fornecidos pela Vigilância Ambiental do Distrito Federal, foram separadas, aleatoriamente, 60 amostras não-reagentes e 60 amostras sororreagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com titulação $\geq 1:80$ para *Leishmania* sp., compondo-se dois grupos experimentais, a saber:

Grupo I: 60 cães, machos ou fêmeas, não-reagentes (RIFI) à *Leishmania* sp.

Grupo II: 60 cães, machos ou fêmeas, sororreagentes (RIFI) à *Leishmania* sp.

4.6. Análises laboratoriais

As análises laboratoriais que incluíram os parâmetros de bioquímica sérica e o proteinograma em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ UNESP/ Campus de Jaboticabal, e no Centro Integrado de Diagnósticos Veterinário – CID-Vet – Brasília – DF; e as análises da espectrometria de massa em MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*)³ foram realizadas nos Laboratórios de Integração Planta-Praga e no de Biologia Molecular/ Espectrometria de Massa do CENARGEN – EMBRAPA – Brasília – DF. O resultado sorológico (RIFI) foi fornecido por órgão oficial (LACEN).

4.6.1. Análise de constituintes bioquímicos séricos

As atividades das enzimas alanina aminotransferase-ALT e aspartato aminotransferase-AST (método cinético UV), fosfatase alcalina-ALP (método de Roy modificado) e gamaglutamiltransferase-GGT (método de Szas modificado) e os teores de cálcio total (método do azul de metiltimol), proteínas totais (método do biureto), uréia (método de urease), creatinina (método de Basques-Lustosa), magnésio (método Labtest) e fósforo (método Daly-Ertingshausen modificado) do soro sanguíneo dos cães foram determinados com a utilização de conjuntos de reagentes de uso comercial LABTEST®^{4,26}. A leitura das amostras foi conduzida em espectrofotômetro semi-automático LABQUEST®⁵, em comprimentos de onda apropriados a cada componente do soro sanguíneo (RIBEIRO et al., 2004).

Na discussão dos resultados das determinações bioquímicas, foram utilizados valores de referência do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, bem como informações de Kaneko et al. (1997).

³ Ultraflex II™ TOF/TOF MS – Bruker - Alemanha.

⁴ LABTEST – Belo Horizonte – MG

⁵ Analisador bioquímico semi-automático LABQUEST – CELM

4.6.2. Proteinograma sérico

O proteinograma foi obtido por fracionamento eletroforético em sistema vertical pela técnica SDS-PAGE, segundo método de preparo de gel descrito por LAEMMLI (1970). Foram utilizadas amostras de soro sangüíneo (10 µL) diluídas em tampão fosfato (30 µL PBS) e gel *mix* (20 µL); estas amostras foram aquecidas sobre água em ebulição durante 10 minutos. Uma fração de 5 µL desta mistura foi depositada no fosso do gel (Apêndice B). A placa que continha o gel foi colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão com pH 6,5 e submetida à corrente elétrica de 50 mA, em fonte apropriada. Terminada a separação, o gel foi corado durante 60 minutos em solução de azul de Comassie 0,2% e, em seguida, descorado em solução de ácido acético glacial a 7%, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados mediante leitura em densitômetro computadorizado⁶ e cálculos manuais (NAOUM, 1999; THOMAS, 2000; FAGLIARI & SILVA, 2002). Para a identificação das proteínas no gel, foram utilizados 12 marcadores de pesos moleculares que variavam de 24 kDa a 205 kDa, além das proteínas purificadas haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, α_1 -antitripsina e imunoglobulina G⁷.

As 120 amostras de soro de cães sororreagentes e daqueles não-reagentes foram processadas para leitura qualitativa das proteínas, em analisador de espectrometria de massa em MALDI-TOF², sendo tais amostras inicialmente dialisadas com sulfato de amônia 4M (0 a 90%), para precipitação das proteínas e retirada de outras substâncias (entre elas, lipídios e carboidratos). Após este período as frações protéicas foram coletadas e armazenadas à -20°C. Aplicando-se o método de Bradford (1976) foi verificada a presença de proteínas em todas as amostras. As amostras foram liofilizadas utilizando centrifuga de *Speed vac*⁸, por 12 horas à temperatura ambiente até obtenção de desidratação completa. Após, foram ressuspendidas com água Milli-Q e tratadas com uma matriz ionizante, o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), que contribui para cristalização das amostras na placa de MALDI-TOF. Na seqüência, as amostras homogeneizadas com a matriz foram aplicadas em placa de ouro, deixadas em temperatura ambiente durante a noite. Em seguida todas as amostras foram processadas

⁶ Densitômetro Shimadzu CS-9301 – Tóquio – Japão.

⁷ Sigma Chemical Company – St. Louis - MO – EUA.

⁸ Centrivap Concentrator – Labconco Corporation – Kansas City – Missouri - USA

em analisador de espectrometria de massa. O espectrômetro de massa² é utilizado para promover o seqüenciamento direto de peptídeos obtidos após processo de separação e refinamento das amostras. Todos os peptídeos de interesse foram fragmentados e seus resíduos de aminoácidos foram obtidos por meio da técnica de indução de dissociação por colisão (*Collision-induced dissociation* -CID) (BLOCH JR et al., 2001; KAMOUN-ESSGHAIER et al., 2005).

4.7. Análise estatística

Para determinar se os resultados da bioquímica sérica, inclusive do proteinograma, diferiram entre os cães não-reagentes e os sororreagentes, os dados foram submetidos à análise estatística pelo programa *Statistical Analysis System* – SAS⁹, obtendo-se média, desvio padrão, coeficiente de variação, limites extremos e análise de variância. Havendo diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

⁹ SAS INSTITUTE. SAS user's guide: Statistics. Sas Institute Cary, 1985, 956p.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Inquérito sorológico censitário e aspectos clínicos e epidemiológicos

No inquérito sorológico e epidemiológico realizado pela Vigilância Ambiental em Saúde do Distrito Federal, notou-se que, do total de 578 residências visitadas no Condomínio Serra Azul, em Sobradinho II – DF (considerada região periurbana do Distrito Federal), em que foram realizadas 556 coletas, somente em 330 havia cães (57%). Ao mesmo tempo, houve pendência em seis casas (1%), que não puderam ser avaliadas por estarem fechadas, e recusa à visitação por parte dos proprietários de duas residências (0,3%).

Os resultados sorológicos obtidos no teste de imunofluorescência indireta (RIFI; Figura 4) para leishmaniose visceral canina (LVC) dos 556 cães examinados e pertencentes ao Condomínio Serra Azul, na cidade de Sobradinho II – DF estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 5.

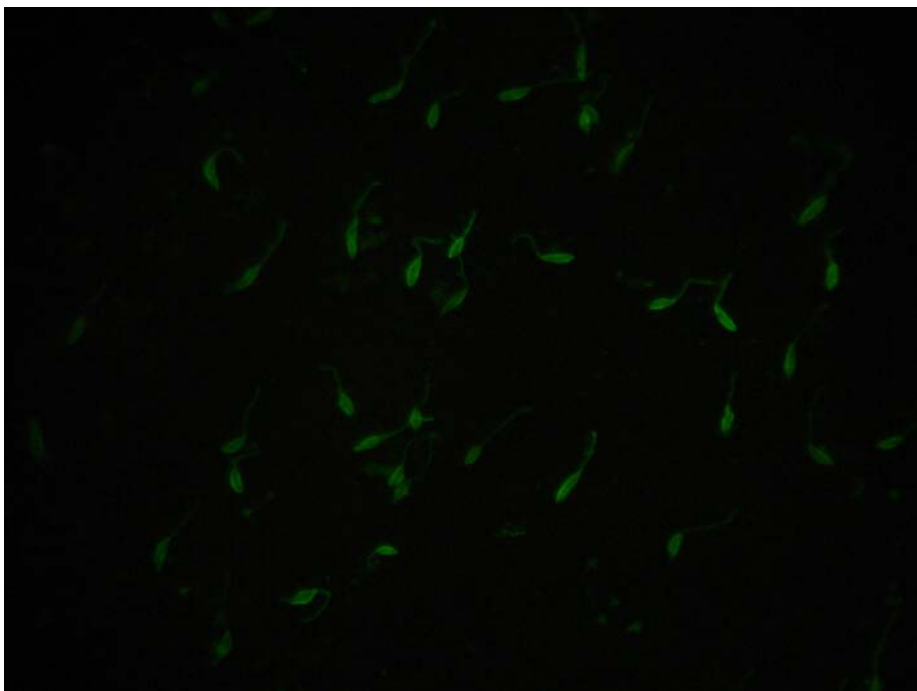


Figura 4 - Fotomicrografia de *Leishmania* sp. evidenciada pela técnica de reação de imunofluorescência indireta (400X).

Tabela 1: Número de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para *Leishmania* sp. em relação à idade, de foco de transmissão no Distrito Federal -DF (Condomínio Serra Azul - fev./ março 2006).

Idade (anos)	Titulação RIFI		Total de reagentes	Não-reagentes	Total de Animais
	1/40	1/80			
<1	9	6	15	65	80
1	11	13	24	51	75
2	6	11	17	45	62
3	5	9	14	69	83
4	8	10	18	35	53
5	2	8	10	25	35
6	3	5	8	25	33
>6	11	13	24	77	101
Ignorada	2	4	6	28	34
Total	57	79	136 (24,5%)	420 (75,5%)	556 (100%)

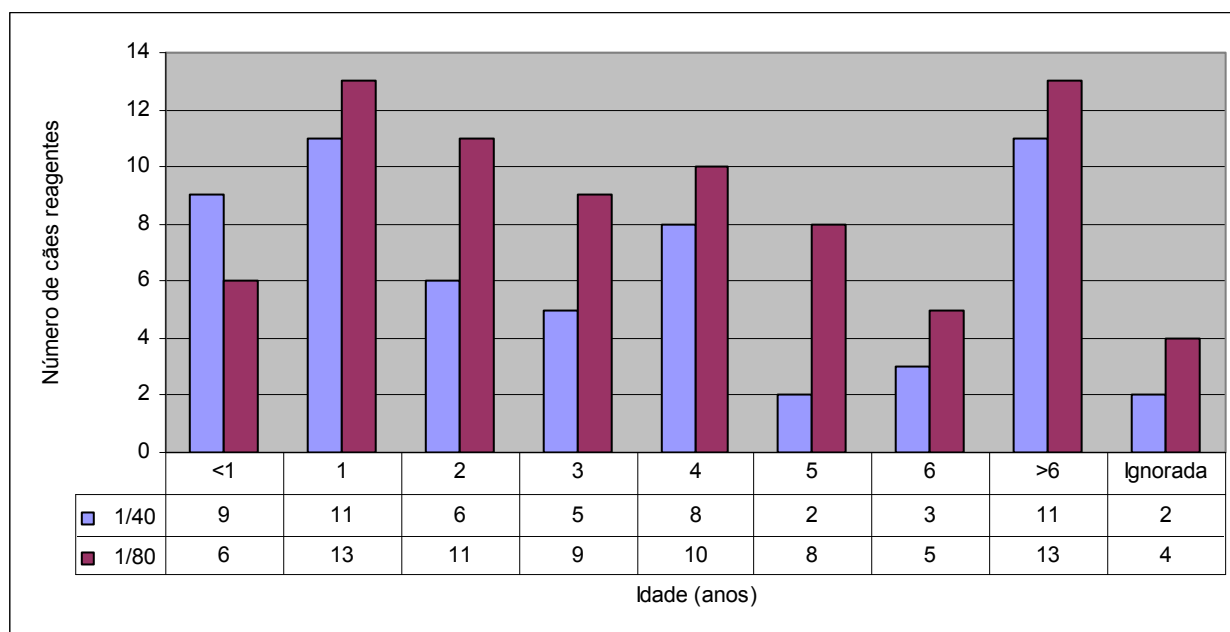


Figura 5 - Representação gráfica do número de cães reagentes à RIFI para LVC em relação à idade.

Apesar de a legislação sanitária propor que o inquérito sorológico canino amostral deva ser realizado em foco de transmissão, de modo a avaliar as taxas de prevalência nos setores não trabalhados anteriormente, como foi o caso do Condomínio Serra Azul, optou-se pelo inquérito sorológico censitário, abrangendo quase a totalidade das residências do

condomínio. O inquérito censitário deu-se pelo fato de que, em se tratando de saúde pública, apresenta ampla avaliação da situação da LVC no condomínio em estudo, levando-se em consideração o método diagnóstico preconizado pelo Ministério da Saúde (RIFI), a escassez de mão-de-obra qualificada e o fator temporal, haja vista que as medidas de controle deveriam ser impostas rapidamente. Cabe ressaltar que este foi o primeiro inquérito sorológico para LVC realizado no Distrito Federal.

Os casos de LV humana, que levaram a este levantamento epidemiológico, acometeram dois adultos: um homem de 50 anos, cujo quintal da residência continha entulho e mato, bem como uma cadela de seis meses de idade, oligossintomática (alopecia de pescoço, linfadenomegalia e intensa pulicose) sororreagente a RIFI para LVC ($>1:80$); e uma mulher de 18 anos de idade que, nos últimos seis meses, havia residido em dois locais diferentes do mesmo condomínio e que não tinha animal doméstico.

No Condomínio Serra Azul, na cidade-satélite de Sobradinho II – DF, das 556 amostras coletadas, 136 (24,5%) foram sororreagentes à RIFI para LVC. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido o método mais utilizado. A alta soroprevalência observada foi compatível com as descrições de Paranhos-Silva et al. (1996), que observaram 23,5% de prevalência em cães do município de Jequié – BA, e de Silva et al. (2005), que verificaram 25,0% de reações positivas na população de cães de Guaratiba (RJ). Difere da taxa de soroprevalência de 12% verificada em Araçatuba – SP por Camargo-Neves et al. (2001); de 11,9% descrita em Itaipu – RJ por Madeira et al. (2003); de 2,94% notificada em Birigüi – SP por Vigilato (2004); de 7,8% relatada em Poxoréo – MT por Azevedo (2004); de 3% constatada em Bom Sucesso – MG por Silva & Santa-Rosa, (2005); de 2,5% descrita em Pernambuco por Dantas-Torres (2006) e de 87% relatada no Estado da Bahia por Barrouin-Melo et al. (2006).

A maioria das residências visitadas (95,9%) apresentava até três cães, de 36 raças diferentes, com predomínio de animais sem raça definida (42%), seguidos por cães das raças Pinscher (10,4%) e Poodle (9,5%). Estes resultados assemelham-se àqueles relatados por Moreira Jr. et al. (2003), ou seja, 91,9% dos cães eram de raça indefinida, e por Vigilato (2004), que constatou que 65,5% dos cães não tinham raça definida.

Pode-se verificar que os cães com até três anos de idade foram os mais acometidos por LVC, representando 51,5% dos casos, entretanto notou-se um declínio gradual em cães até a faixa etária dos seis anos; na faixa etária acima dos seis anos, notou-se acentuado aumento do número de casos por LVC (Figura 5). Provavelmente, isso ocorreu por se tratar do primeiro inquérito epidemiológico realizado nesta população canina, que, possivelmente, mantém ao longo dos anos animais reagentes e assintomáticos (ou seja, município silencioso). Alguns autores, entre eles Vigilato (2004), relatam que a média de idade dos cães reagentes se situa entre três e cinco anos; no entanto, outros pesquisadores como Azevedo (2004) relata média de idade acima de 84 meses. Feitosa et al. (2000), em estudo de cães positivos para LVC em Araçatuba – SP, observaram maior ocorrência em animais de um a três anos de idade. França-Silva et al. (2003) constataram prevalência semelhante em todas as idades de cães avaliados em Montes Claros – MG.

Optou-se por descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos animais utilizados na avaliação da bioquímica sérica e do proteinograma, com o intuito de estabelecer, se possível, correlação entre os dados clínicos e os resultados dos exames laboratoriais. Assim, na Tabela 2, são apresentadas as características clínicas (cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) e alguns dados epidemiológicos de cães sororreagentes e daqueles não-reagentes à RIFI para LVC.

Tabela 2 - Aspectos clínicos e epidemiológicos de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para *Leishmania* sp., de foco de transmissão no Distrito Federal - DF (Condomínio Serra Azul - fev./mar. 2006)

	Não-reagentes (n=60)	Reagentes (n=60)
Sinais Clínicos		
Assintomáticos	42 (70%)	43 (71,7%)
Oligossintomáticos	15 (25%)	15 (25%)
Sintomáticos	3 (5%)	2 (3,3%)
Sexo		
Macho	32 (53,3%)	33 (55%)
Fêmea	28 (46,7%)	27 (45%)
Pelagem		
Curta	35 (58,3%)	37 (61,7%)
Média	13 (21,7%)	19 (31,7%)
Longa	12 (20%)	4 (6,7%)
Como vivem?		
Presos	41 (68,3%)	40 (66,7%)
Soltos / Acesso à rua	19 (31,7%)	20 (33,3%)
Onde dormem?		
Dentro de Casa	5 (8,4%)	0 (0%)
Fora de Casa	55 (91,6%)	60 (100%)

Em relação ao sexo dos cães sororreagentes para LVC, 54% eram machos e 46% eram fêmeas, não havendo influência significativa do sexo entre os cães soronegativos à RIFI. Estes resultados são concordantes com aqueles dos estudos de Carrera et al. (2003), que identificaram 51% de fêmeas; de Moreira Jr. et al. (2003), em que 55,1% eram machos; e de Vigilato (2004), em que 51,8% eram machos.

Em sua maioria, os cães, durante o dia, permaneciam no ambiente domiciliar, sem acesso à rua, porém constatou-se que todos os cães reagentes dormiam fora de casa, em canis ou em abrigos; condição também observada em 91,6% dos cães não-reagentes. Devido aos hábitos alimentares e à dificuldade de vôo do vetor, o fato de um cão dormir fora de casa, em área peridomiciliar, pode facilitar o contato deste com o hospedeiro e predispor à LVC.

A avaliação clínica realizada no momento da colheita da amostra de sangue revelou que 71,7% dos animais reagentes à RIFI eram assintomáticos e que 28,8% destes animais reagentes eram oligossintomáticos ou sintomáticos, mas as características clínicas (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) não diferiram entre os animais reagentes e não-reagentes à RIFI. Em estudo realizado em Poxoréo – MT, somente 6,8% dos animais soropositivos para LV canina foram classificados como assintomáticos, 12,9% eram sintomáticos (AZEVEDO, 2004). Em Teresina – PI, 19% dos cães sororreagentes eram assintomáticos (MENDONÇA et al., 1999).

As características clínicas observadas no inquérito sorológico dos 120 cães do Condomínio Serra Azul, em Sobradinho II – DF estão listadas na Tabela 3. Sinais clínicos como emagrecimento, lesões de pele, úlcera cutânea, alopecia periocular, de orelha e/ou nariz, onicogribose, secreção ocular e presença de ectoparasitas, entre outras afecções, foram verificados.

Tabela 3 - Aspectos clínicos de cães oligossintomáticos e sintomáticos, reagentes e não-reagentes para *Leishmania* sp. (RIFI), de foco de transmissão no Distrito Federal - DF (Condomínio Serra Azul - fev./mar. 2006).

Sinais Clínicos	Não-reagentes (n=18)		Reagentes (n=17)	
	Oligossintomáticos	Sintomáticos	Oligossintomáticos	Sintomáticos
Emagrecimento/caquexia	1 (5,6%)	1 (5,6%)	2 (11,8%)	1 (5,9%)
Lesões de pele (primárias/secundárias)	1 (5,6%)	2 (11,2%)	5 (29,4%)	1 (5,9%)
Alopecia orelha/nariz	1 (5,6%)	1 (5,6%)	5 (29,4%)	1 (5,9%)
Alopecia peri-ocular	1 (5,6%)	1 (5,6%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)
Onicogrifose	3 (16,7%)	2 (11,2%)	-	1 (5,9%)
Pulicose	4 (22,2%)	1 (5,6%)	4 (23,5%)	1 (5,9%)
Ixodidiose	5 (27,7%)	1 (5,6%)	3 (17,6%)	1 (5,9%)
Secreção ocular	-	-	1 (5,9%)	-
Outros (diarréia, úlceras orais)	-	1 (5,6%)	1 (5,9%)	-

Os sinais clínicos identificados em cães sororreagentes para LVC sintomáticos incluíam alterações compatíveis com o quadro clínico clássico induzido pela leishmaniose visceral americana canina, conforme descrito por Santa Rosa & Oliveira (1997) e Soares (2003). As manifestações clínicas das leishmanioses dependem das interações complexas entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune do hospedeiro (PEARSON & SOUSA, 1996).

Os cães sintomáticos (oligossintomáticos e sintomáticos) sororreagentes (17/28,8%) e não-reagentes (18/28%) apresentaram diferentes tipos e graus de sintomas. Os sinais clínicos mais freqüentes em cães sororreagentes sintomáticos (oligossintomáticos e sintomáticos) foram lesões cutâneas que incluíam pústulas, úlceras, descamação, paquidermização e hiperpigmentação (35,3%). Alopecia de orelha e/ou nariz compreenderam 35,3% do total de casos clínicos. Entre os cães não-reagentes sintomáticos (oligo e sintomáticos), o sinal clínico mais freqüente foi onicogrifose (27,9%), ao passo que a infestação por ectoparasitos foi notada em 61,1% dos cães. Vale ressaltar que apenas um cão sororreagente sintomático apresentou vários sinais clínicos concomitantes, que estão descritos na Tabela 3, coluna [reagentes sintomáticos] (Figura 6).



Figura 6 - Foto de cadela, sem raça definida, com três anos de idade, sintomática, criada no Condomínio Serra Azul, Sobradinho II – DF, reagente à RIFI para LVC. Nota-se grau de caquexia acentuado, lesões de pele (alopecia periocular e nos membros, descamação e paquidermização) e onicogribose.

As características clínicas verificadas diferem daquelas descritas por Azevedo (2003), Soares (2003) e Almeida et al. (2005). Azevedo (2003) relata que, nos animais positivos de Poxoréo – MT, os sinais clínicos mais observados foram ceratoconjuntivite (12,1%), lesões cutâneas (11,2%), onicogribose (11%) e linfadenomegalia (10%). SOARES (2003) relata que, nos animais positivos e sintomáticos examinados em Teresina – PI, os sinais clínicos de maior ocorrência foram linfadenomegalia (85,3%), secreção ocular (20,6%) e caquexia (17,6%). Almeida et al. (2005) relataram que os principais sinais clínicos da leishmaniose visceral canina foram emaciação e úlceras de pele (80%), onicogribose e conjuntivite (73%) e alopecia (60%); linfadenomegalia, esplenomegalia, glomerulopatia foram menos freqüentes ($\leq 20\%$).

5.2. Inquérito entomológico

A Divisão de Controle de Vetores vinculada à Vigilância Ambiental em Saúde do Distrito Federal instalou vinte armadilhas em dez domicílios do Condomínio em que havia criação de galinhas ou de alguma espécie de ave silvestre (Figura 7), inclusive nas residências onde habitavam pessoas comprovadamente portadoras de LVA. Em sete destas residências, foram encontrados flebotomíneos (n=84), pertencendo 71 deles à espécie *Lutzomyia longipalpis*. Obteve-se a média de 10,1 flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* por residência pesquisada. Apenas em uma das casas coletadas foram encontrados 49 flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* dentro de um galinheiro (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados de coleta de flebotomíneos em foco de transmissão para LVA r. Distrito Federal – DF (Condomínio Serra Azul – 07 a 09 fev. 2006)

Total de casas trabalhadas	10
Total de armadilhas instaladas	20
Total de casas com flebotomíneos	07
Total de flebotomíneos coletados	84
Média de flebotomíneos/casa	12
Total de <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados	71 (100%)
Média de <i>Lutzomyia longipalpis</i> /casa	10,1
Total de <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados em apenas 1 casa*	49
Total de <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados no galinheiro	49 (70,42%)
Total de <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados no canil / quintal	15 (21,13%)
Total de <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados dentro de casa	6 (8,45%)

* dentro de um galinheiro



Figura 7 - Mapa que mostra pontos de instalação de armadilhas para captura de flebotomíneos (armadilhas positivas: pontos vermelhos; armadilhas negativas: pontos amarelos), distribuição de cães sororreagentes à RIFI para LVC (pontos verde-claro) e distribuição de casos de LVA em humanos (pontos verde-escuro), no Condomínio Serra Azul – DF.

Os dados observados no inquérito entomológico comprovam as informações relatadas anteriormente de que os locais de maior incidência de flebotomíneos vetores da LV foram locais sabidamente de predileção ao repasto das fêmeas hematófagas obrigatórias. Tais fêmeas necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos, alimentando-se de uma ampla variedade de animais vertebrados de sangue quente; todavia, têm predileção por aves, geralmente galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*). Vale a pena ressaltar que a presença de animais domésticos em canis e/ou

quintais em áreas peridomiciliares provavelmente também atrai grande número de flebotomíneos, contribuindo para a agregação das espécies vetoras nestas áreas (ALEXANDER et al., 2002; COUTINHO, 2005; BRASIL, 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006).

5.3. Bioquímica sérica

As atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gamaglutamiltransferase (GGT) e as concentrações de proteínas totais, uréia, creatinina, cálcio, fósforo e magnésio do soro sanguíneo de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para leishmaniose visceral canina estão apresentados na Tabela 5. Os valores individuais obtidos na bioquímica sérica estão apresentados nos Apêndices C e D.

Tabela 5 – Valores normais, médias e desvios-padrão de constituintes do soro sanguíneo de cães reagentes e não-reagentes à RIFI para *Leishmania* sp., de foco de transmissão no Distrito Federal (Condomínio Serra Azul - fev./mar. 2006).

Parâmetros	n	Cães reagentes	n	Cães não-reagentes	Valores Normais (a)
		Média ± Desvio Padrão		Média ± Desvio Padrão	
ALT (U/L)	50	35,85 ± 23,36	52	43,05 ± 15,64	10 - 88
AST (U/L)	50	20,80 ± 11,07	49	18,50 ± 14,50	10 - 88
ALP (U/L)	50	52,71 ± 25,62	52	56,93 ± 29,32	20 - 150
GGT (U/L)	29	8,99 ± 6,70	41	8,16 ± 3,47	0 - 10
Colesterol (mg/dL)	49	161,90 ± 55,36	57	158,38 ± 46,35	125 - 270
Colesterol HDL (mg/dL)	20	44,84 ± 26,65 *	15	62,45 ± 18,32 *	40 - 78
PT (mg/dL)	60	8,25 ± 1,60 *	60	7,33 ± 1,22 *	5,8 - 7,9
Creatinina (mg/dL)	50	1,02 ± 0,34	52	0,98 ± 0,28	0,5 - 1,5
Uréia (mg/dL)	48	34,27 ± 15,74	52	32,51 ± 17,30	15 - 65
Cálcio (mg/dL)	50	9,79 ± 1,38	37	8,95 ± 1,28	8,6 - 11,2
Fósforo (mg/dL)	50	5,90 ± 1,32	53	5,71 ± 1,68	2,2 - 5,9
Magnésio (mg/dL)	49	1,98 ± 0,32	51	1,64 ± 0,24	1,8 - 2,4

ALT (U/L) alanina aminotransferase

AST (U/L) aspartato aminotransferase

PT (mg/dL) Proteínas totais

ALP (U/L) fosfatase alcalina

GGT (U/L) gama glutamiltransferase

(a) Fonte: Kaneko et al., 1997; Thrall, 2007)

Médias seguidas por asterisco (*) na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

As médias das concentrações séricas de uréia, creatinina, colesterol, cálcio, fósforo, magnésio e das atividades da AST, ALT, FAS e GGT dos cães não-reagentes e sororreagentes encontram-se na faixa de normalidade para a espécie canina (KANEKO et

al., 1997; THRALL, 2007), à semelhança dos resultados obtidos por Mattos Jr. et al. (2004) em cães soropositivos à RIFI. Tais achados são diferentes daqueles relatados por Slappendel & Ferrer (1998), que verificaram aumento das atividades séricas de ALT e ALP de 61% e 51%, respectivamente, em animais com LVC.

Quanto às concentrações de uréia e creatinina, Slappendel & Ferrer (1998) observaram que houve aumento da concentração sérica de uréia em 45% dos cães e hipercreatinemia em 38% dos animais. Nieto et al. (1992a), em estudo com dez cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, verificaram aumento do teor sérico de uréia em sete dos animais; três apresentavam concentração de creatinina elevada. Coutinho (2005) relatou aumento da atividade da ALT; entretanto, alterações renais não foram estabelecidas, pois as concentrações de uréia e creatinina se apresentavam normais.

Os teores séricos de proteínas totais e colesterol HDL foram superiores àqueles situados na faixa de normalidade descrita por Kaneko et al (1997), corroborando os relatos de Nieto et al. (1992b), Liberopoulos et al. (2002) e Pucadyil et al. (2004).

Em estudo a respeito da LV humana, Liberopoulos et al. (2002) relatam a ocorrência de hipocolesterolemia, discreta hipertrigliceridemia, diminuição dos teores séricos de HDL (lipoproteína de alta densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade). Nieto et al. (1992b) descrevem que, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, houve aumento das concentrações séricas de colesterol e LDL e diminuição do teor de HDL. Kaneko et al. (1997) relatam que o colesterol é o principal componente das membranas eucarióticas e tem participação fundamental na organização, na dinâmica e na função da membrana celular; é metabolizado no fígado e transportado no sangue por lipoproteínas (cerca de 70% por LDL, 25% por HDL e 5% por VLDL). Estudos recentes revelam, ainda, que o requerimento específico do colesterol na membrana celular e a internalização do parasita em macrófagos dos hospedeiros conduzem a uma infecção latente. Além disso, a redução na habilidade do parasita em infectar os macrófagos dos hospedeiros pode ser observada, reabastecendo de colesterol as membranas celulares (PUCADYIL et al., 2004).

5.4. Proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Após confecção do gel pela técnica SDS-PAGE, coloração e descoloração desta matriz (Figura 8), realizou-se a leitura em densitometria computadorizada, notando-se até 39 proteínas no soro de cães reagentes à LVC (Figura 9) e, no máximo, 32 proteínas no soro de cães não-reagentes (Figura 10). Em razão do grande número de proteínas, optou-se pela análise das proteínas de interesse clínico, entre elas as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas, bem como aquelas não constatadas no traçado densitométrico de cães não-reagentes.

Os valores dos proteinogramas do soro sangüíneo dos cães soropositivos e daqueles soronegativos à RIFI para leishmaniose visceral canina, obtido pela técnica SDS-PAGE, são apresentados na Tabela 6. Os valores individuais das frações protéicas são mostrados nos Apêndices E e F.

A análise por espectrometria de massa em MALDI - TOF das frações protéicas do soro de cães reagentes e não-reagentes (RIFI) para LVC não foi satisfatória, impossibilitando a obtenção de espectros para análise da massa molecular das proteínas. Provavelmente, não houve uma ionização adequada das proteínas, o que impediu a detecção delas e a conseqüente obtenção dos espectros de massa.

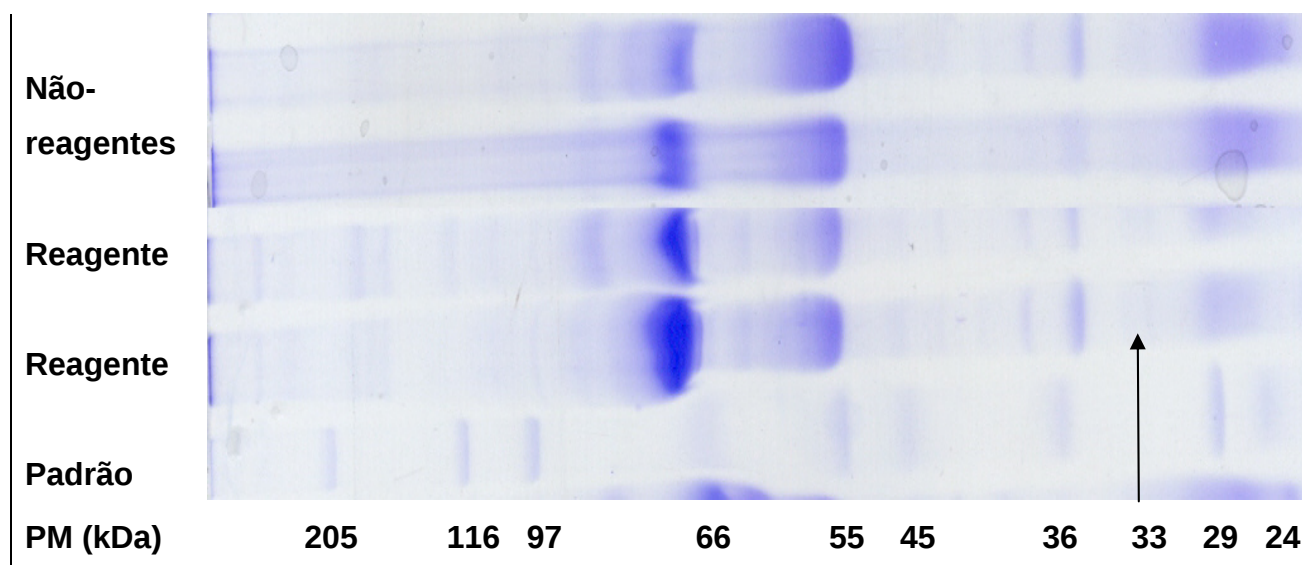


Figura 8 - Traçados densitométricos em SDS-PAGE de amostras de cães não-reagentes e de cães reagentes à RIFI para LVC, bem como traçado padrão com os respectivos pesos moleculares (PM; kDa). Notar presença de proteína com 33 kDa (seta) presente somente nas amostras de soro de cães reagentes para LVC.

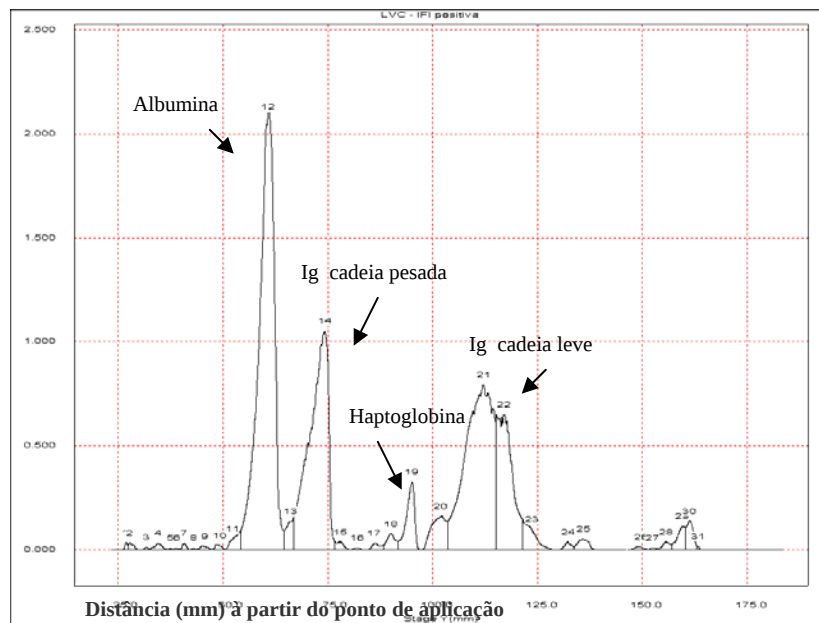


Figura 9- Exemplo de traçado densitométrico (em SDS-PAGE) de amostra de soro sanguíneo de cão reagente à RIFI para leishmaniose visceral canina com 31 proteínas, com destaque para albumina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina e IgG de cadeia leve.

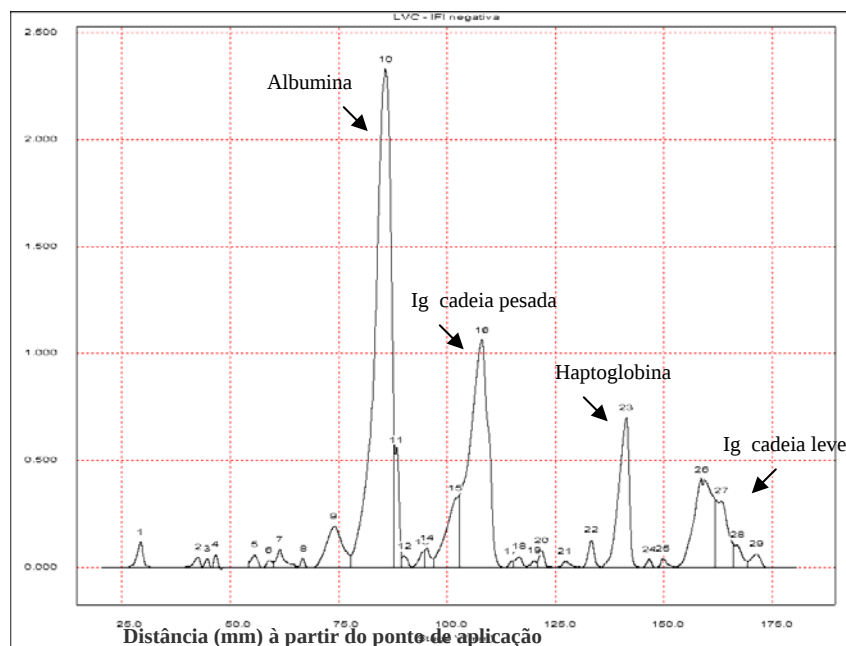


Figura 10 - Exemplo de traçado densitométrico (em SDS-PAGE) de amostra de soro sanguíneo de cão não-reagente à RIFI para leishmaniose visceral canina com 29 proteínas, com destaque para albumina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina e IgG de cadeia leve.

Tabela 6: Média e desvio-padrão das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) constatadas no proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cães soropositivos em comparação aos cães não-reagentes à RIFI para leishmaniose visceral canina, no Distrito Federal - DF - Brasil.

Proteínas/Bandas	PM (kDa)	Cães soropositivos	Cães não-reagentes
		Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
Proteínas Totais	.	8250±1660	7330±1240
Ceruloplasmina	115	24,30±25,76	14,53±14,32
Transferrina	80	142,55±80,93	121,49±94,54
Albumina	66	3003,87±998,40	2758,10±679,82
Proteína 13/14	60	118,83±41,22	169,19±118,05
Proteína 14/15	57	707,03±279,92	680,31±331,13
Imunoglobulina G (cadeia pesada)	55	1320,14±684,39 *	987,01±401,78 *
Proteína 21/24	51	17,59±11,40	14,33±7,53
Proteína 22/25	48	58,52±21,48	39,64±20,84
Haptoglobina	45	231,14±118,91	218,05±166,27
Proteína 25/27	44	54,22±81,84 *	27,95±14,76 *
Glicoproteína α -1-ácida	43	116,21±125,24	71,87±48,09
Imunoglobulina G (cadeia leve)	36	1020,41±662,98 *	773,97±685,27 *
Proteína 28/30	35	492,67±214,44	439,57±287,14
Proteína 29	34	609,28±378,62 *	ausente *
Proteína 30/31	29	107,93±63,03 *	73,44±32,44 *

PM = peso molecular aproximado

Médias seguidas por asterisco (*) na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

No proteinograma, observaram-se teores séricos significativamente maiores de IgG de cadeia pesada, das proteínas nominalmente desconhecidas de pesos moleculares 33 kDa e 29 kDa e de IgG de cadeia leve. É importante ressaltar que apenas os cães soropositivos apresentaram, em seu traçado densitométrico, a proteína de peso molecular 33 KDa, possivelmente importante indicador deste estado sororreagente (Figura 11). Coincidentemente, o rK39, que é proteína específica isolada da fase amastigota da *Leishmania*, utilizada em ensaio imunoenzimático (ELISA), tem peso molecular de 32,7 kDa e tem valor preditivo da doença (SINGH & SIVAKUMAR, 2003; NASCIMENTO et al., 2005). Kamoun-Essghaier et al. (2005) relataram que as proteínas entre 30 e 36kDa da fase promastigota da membrana da *Leishmania infantum* são antígenos imunodominantes para a LV e marcadores sorológicos consistentes desta doença.

É de bom senso destacar, em animais soropositivos, os teores séricos superiores, embora não significativos, mas com provável importância biológica, das proteínas de fase aguda ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina e glicoproteína ácida, corroborando os

achados de Martinez-Subiella et al. (2002), que, entretanto, em cães sororreagentes, evidenciaram maior teor de proteínas C-reativa.

Hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia são os achados mais freqüentemente observados na leishmaniose visceral canina, decorrentes de ativação policlonal de células B e da produção de anticorpos (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005; COUTINHO, 2005). A eletroforese de proteínas séricas em gel de agarose geralmente revela diminuição da fração albumina associada ao aumento das frações gamaglobulina e betaglobulina (MARZOCHI et al., 1985; KONTOS & KOUTINAS, 1993, CIARAMELLA & CORONA, 2003). Neste estudo, embora tenha ocorrido hiperproteinemia e hiperglobulinemia, não foi evidenciada a hipoalbuminemia, pois as concentrações médias de albumina, embora não significativas, apresentaram-se superiores em animais sororreagentes.

Segundo Rodriguez et al. (2003), a leishmaniose visceral canina está associada à diminuição da imunidade celular e ao aumento significativo no teor de IgG induzido pela *Leishmania*. Estudos prévios sugerem que a leishmaniose visceral canina está associada à regulação de anticorpos específicos de todas as subdivisões de classe de IgG, particularmente IgG1, IgG3 e IgG4 (QUINNELL et al., 2003). Apesar da evidenciação do aumento significativo no teor de imunoglobulinas, a técnica utilizada neste estudo não permitiu diferenciação adicional destas imunoglobulinas nos cães examinados. Assim, é provável que o estudo de tais imunoglobulinas em cães soropositivos para leishmaniose visceral possa auxiliar no entendimento das respostas imunes durante a progressão e a resolução da infecção, bem como no diagnóstico.

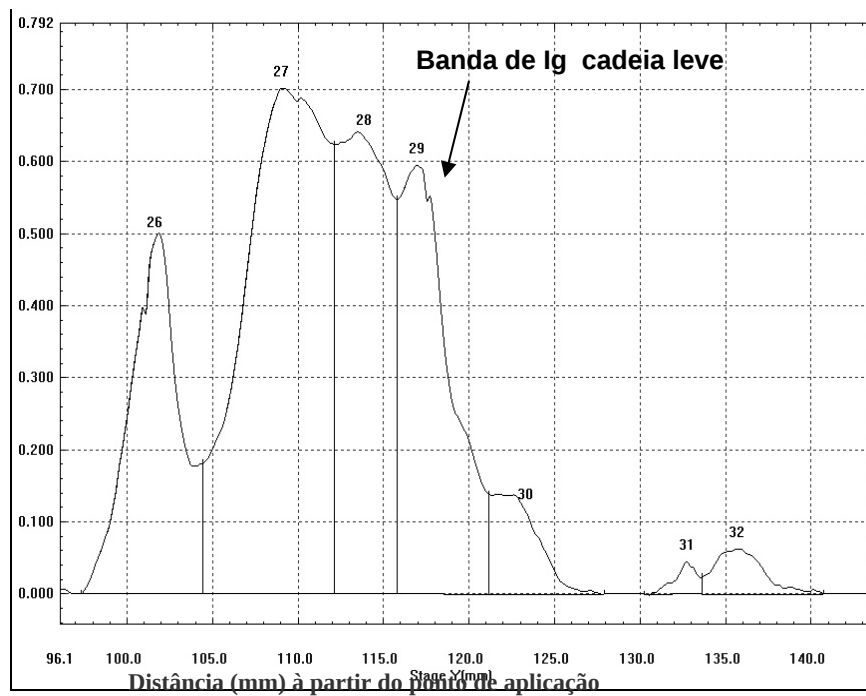


Figura 11 - Segmento de traçado eletroforético obtido em SDS-PAGE de amostra de soro sangüíneo de cão reagente à RIFI para leishmaniose visceral canina, evidenciando banda 29 (33 kDa) de imunoglobulina.

6. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir o que se segue.

- O proteinograma em SDS-PAGE evidenciou a presença de proteína de 33 kDa somente em cães sororreagentes à RIFI para LVC.
- As concentrações séricas de proteína de 29 kDa e as proteínas de fase aguda ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina e glicoproteína ácida foram mais elevadas em cães sororreagentes à RIFI para LVC.
- As concentrações séricas de proteínas totais e imunoglobulinas (cadeia pesada e leve) foram mais elevadas em cães sororreagentes à RIFI para LVC.
- A soroprevalência observada em foco de transmissão no Distrito Federal – DF foi de 24,5%.
- Animais assintomáticos são a maioria dentre os cães sororreagentes ou não-reagentes à RIFI para LVC.
- Em animais sororreagentes oligossintomáticos, os sinais clínicos mais evidentes são as lesões de pele (primárias e secundárias) e alopecia de nariz e/ou orelha.
- Os teores séricos de colesterol HDL foram inferiores em cães sororreagentes à RIFI para LVC.
- As médias das concentrações séricas de uréia, creatinina, colesterol, cálcio, fósforo, magnésio e as atividades da AST, ALT, ALP e GGT encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie canina.
- A análise por espectrometria de massa em MALDI - TOF das frações protéicas do soro de cães reagentes e não-reagentes (RIFI) para LVC não foi satisfatória, impossibilitando a obtenção de espectros para análise da massa molecular das proteínas.

7. COLABORADORES

Prof^a. Dr^a. Paula Diniz Galera – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV – Universidade de Brasília – UnB - DF.

M.V. Péricles Norimitsu T. Massunaga – Diretoria de Vigilância Ambiental – DIVAL – DF

M.V. Denise Salgado – Centro Integrado de Diagnósticos Veterinário – CID-Vet – Brasília – DF.

Dr. Carlos Bloch Júnior – Laboratório de Biologia Molecular/ Espectrometria de Massa - CENARGEN – EMBRAPA – Brasília – DF.

Dr^a Denise de Aragão Costa Martins – Instituto de Letras da Universidade de Brasília (IL-UnB).

8. REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.1480-5, 2002.

ALMEIDA, M.A.; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v.127, n.3-4, p.227-32, 2005.

ALVAR J, CANAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v.57, p.1-88, 2004.

AZEVEDO, M.A.A. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município do Poxoréo – MT / Márcia Ávila Andrade de Azevedo. Botucatu: [s.n.], 2004. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004. 49p.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LOURENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, v. 154, p.639-649, 1986.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANJEIRA, D.F.; ANDRADE FILHO, F.A. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet. J.*, v.171, n.2, p.331-9. march 2006.

BLOCH JR, C.; UNANIAN, M.M.; DIAS, A.L. Preparo de sêmem bovino para análise de proteínas pelo método MALDI-TOF/MS. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2001, Ribeirão Preto. *Anais...*Ribeirão Preto:2001, p.142.

BRADFORD, M. A rapid and sensitiv method for the cuantification of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília : FUNASA, 2002. 842p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

CABRERA, M.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Ver. Inst. Méd. Trop. Sao Paulo.*, v.45, n.2, p.79-83, mar-apr 2003.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C. *et al.* Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância espacial de leishmaniose visceral americana – Araçatuba – São Paulo, Brasil, 1998-99. *Cad. Saúde Pública*, v.17, n.5, p.1263-1267, 2001.

CASTRO, A.G. *Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. (Calazar) – Normas Técnicas.* Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 1996. 86p.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Path.*, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, v.141, n.21, p.539-543, nov. 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.25, n.5, p.358-368, may 2003.

COUTINHO, J.F.V. Estudo clínico-laboratorial e histopatológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com diferentes graus de manifestação física. José Flávio Vidal Coutinho. Natal:[s.n.], 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte / Departamento de Bioquímica, 2005. 102p.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.128, n.1-2, p.149-155, 2005.

ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions *Comp. Haematol. Int.*, v.5, p.93-97. 1995.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; MCCOMB, C. et al.. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.*, v.148, p.38-41, 2001.

ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Irish Vet. J.*, v.53, p.307-311, 2000.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev. Saúde Pública*, v.40, n.3, p.537-41, 2006.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L.. Hemogram and plasma proteins of healthy horses and horses with acute abdomen before and after laparotomy. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-

09352002000600001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10/08/2006. doi: 10.1590/S0102-09352002000600001.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*, v.15, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. *Current veterinary therapy: small animal practice*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. p.266-270.

FERRER, L. Canine leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8., 2002, GRANADA. *Proceedings*.....Disponível em: www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653 Acessoem: 12 dez 2004.

FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.111, n.2-3, p.161-73, feb. 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Normas Técnicas. *Fundação Nacional de Saúde*. Brasília, 1986, 86p.

GRAVINO A.E. Interpretation of laboratory data during cryptic leishmaniasis in dog. *Parasitologia*, v.46, n.1-2, p.227-9, jun. 2004.

GREENE, C.E. *et al.* Leishmaniasis. In : _____. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. ch.73, p.685-697.

IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M. *et al.* Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba - SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Revista Clínica Veterinária*, v.8, n.47, p.42-48, 2003.

IKEDA, F. A. Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento / Fabiana Augusta Ikeda. Botucatu: [s.n.], 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2004, 184p.

KAJIKAWA, T.; FURUTA, A.; ONISHI, T. et al.. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha-1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.68, p.91-98, 1999.

KAMOUN-ESSGHAIER, S.; GUIZANI, I.; STRUB, J.M. et al. Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30- to 36-kilodalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotes, reacting with sera from mediterranean visceral leishmaniasis patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.12, n.2, p.310-320, feb. 2005.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 983p.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.15, n.7, p.949-959, Jul. 1993.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.35, n.5, p.376-383, Sep.-Oct. 1999.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E. et al. A randomized blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.98, n.4, p.247-261, 2001.

KUSHNER, I.; MACKIEWICZ, A.. The acute phase response: an overview In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H, eds. *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications*. London: CRC Press; 1993:3–19

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, v.227, p.680-685, 1970.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R. 2 ed. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press. p.1-121. 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência Cultura*, v.44, 1992.

LIBEROPOULOS, E.; ALEXANDRIDIS, G.; BAIRAKTAN, E. et al. Severe hypcholesterolemia with reduced serum lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. v.32, p.305-308. 2002.

LINDSAY, D.S. [Canine Leishmaniasis in the United States](#). *Proceedings Western Veterinary Conference*, 2004.

LOPES, S.T.A.; CUNHA, C.M.S.; BIONDO, A.W.; FAN, L.C. *Patologia clínica veterinária*. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Departamento de Clínica de Pequenos Animais. Santa Maria, 1996. (Apostila).

PUCADYIL, T.J.; TEWARY, P.; MADHUBALA, R. et al. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. [Mol. Biochem. Parasitol.](#) v.133, n.2, p. 145-52. 2004.

MADEIRA, M.M.F.; UCHOA, C.M.; LEAL, C.A. *et al.* Leishmania (Viannia) braziliensis in naturally infected dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36,n.5, p.551-5, 2003.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P.D.; CERON, J.J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v.150, n.8, p.241-4, feb. 2002.

MAROLI, M.; KHOURY, C. Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches. *Parassitologia*, v.46, n.1-2, p:211-5, jun. 2004.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; SOUZA, P.P.; TOLEDO, L.M.; FILHO, F.B.R. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v.1, n.4, p.432-446, 1985.

MATHIAS, R.. Imunoglobulina na patogenia da leishmaniose visceral em hamsteres / Regiane Mathias. São Paulo: [s.n.], 2004. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2004. 67p.

MATTOS JR, D.G.; PINHEIRO, J.M.; MENEZES, R.C. *et al.* Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.1, p,119-122, 2004.

MELO, F.A. Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados / Ferdinan Almeida Melo. Viçosa: [s.n.], 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2005. 75p.

MENDONÇA, L.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. *et al.* Clinical aspects of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs in the city of Teresina, Piauí. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v.8, n.1, p.23-5, 1999.

MOREIRA JÚNIOR, E.D.; SOUZA, V.M.M; SREENIVASAN, M. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban wellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.69, p.393-7, 2003.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview *Vet J.*, v.168, p.28-40, 2004.

NAOUM, P.C. *Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos*. Rio de Janeiro: Livraria Santos Editora, 1999. 225p.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUZA, E.C.; SILVA, L.M. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.21 n.6. Rio de Janeiro Nov./Dec. 2005.

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. *Vet. Parasitol.*, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992 (a).

NIETO, C.G.; BARRERA, R., HABELA, M.A et al. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with Leishmania infantum. [*Vet. Parasitol.*](#), v.44, n. 3-4, p.175-82, 1992 (b).

PALATINIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇ-SILVA, J.C. et al. Impacto f canine controlo n the epidemiology of canine and human vsiceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65, n.5, p.510-517, 2001.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infec. Dis.*, v.22, p.1-13, 1996.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.*, v.35, p.163-187, 2004.

QUINNELL, R.J.; COURTENA, Y.O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.91, n.3-4, p.161-8, february 2003.

RIBEIRO, C.R.; MARTINS, E.A.N.; RIBAS, J.A.S. et al. Avaliação dos constituintes séricos em eqüinos e muares submetidos à prova de resistência de 76 Km no Pantanal do Mato Grosso – Brasil. *Ciência Rural*, v.34, n.4. p. 1081-1086, 2004.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*. ano3, n.11, p.13-14, 1997.

RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., BERNET, A., QUINTANA, F., ARBOIX, M., ALBEROLA, J. *Specific Immunoglobulin Class Distribution in Dogs with Leishmaniosis*. Proceedings: ACVIM2003. (URL): <http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=ACVIM2003&PID=PR04165&O=VIN> Acesso: 18/07/2006.

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

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v.12, p.315-317. 1998.

SANTOS, V.C. Determinação do pH e estudo dos mecanismos envolvidos em seu controle no intestino médio de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Díptera: Psychodidae) durante a digestão de sangue e açúcares / Vânia Cristina dos Santos. Belo Horizonte: [s.n.], 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas, 2006. 124p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo / Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves - São Paulo: A Secretaria, 2006.158p.

SCHMIDT, C.; LOPES, M.D.; SILVA, M.C. et al. Perfil lipoprotéico de cadelas submetidas à ovariário-histerectomia com e sem reposição estrogênica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.449-456, 2006.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública*. v.21, n.1, jan/fev. 2005.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.96, n.3, p.285-91, apr. 2001.

SILVA, M.R.; SANTA-ROSA, I.C.A. Levantamento de leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso, Minas Gerais. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.33, n.1, p.69-74, 2005.

SILVA, V.C. Identificação de reservatórios de zoonoses em insetos vetores por espectrometria de massa. / Vladimir Costa Silva. Brasília: 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília – UnB / Brasília – DF, 2006. 68p.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* v.10, n.49, p.55-60, 2003. Disponível em: <http://www.jpgmonline.com/article.asp?issn=0022-3859;year=2003;volume=49;issue=1;spage=55;epage=60;aulast=Singh> Acesso em : 12 dez/2006.

SOARES, M.J.V. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-laboratoriais, histopatologia renal e testes específicos para diagnóstico / Maria de Jesus Veloso Soares. Jaboticabal: 2003. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista - UNESP / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2003. 74p.

STEELE, J. Understanding Electrolyte Abnormalities. 2005. *The Veterinary Information Network* (VIN). Disponível em: <http://www.vin.com/Members/SearchDB/Rounds/LC050522.htm> Acesso em: 12 dez/ 2006.

SUNDAR, S.; M. RAI. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.9, n.5, p.951-958, sep. 2002.

THOMAS, J.S. Protein electrophoresis. In: FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. ch. 135, p.899-903.

THRALL, M.A. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

VIGILATO, M.A.N. Distribuição especial da leishmaniose visceral canina e humana no município de Birigui – SP / Marco Antonio Natal Vigilato. Botucatu: [s.n.], 2004. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2004. 84p.

WHICHER, J.T.; WESTACOTT, C.I. The acute phase response In: Whicher JT, Evans SW, eds. *Biochemistry of inflammation*. 1ed. London: Kluwer Academic; 1992, p.243–272.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution. 1998. WHO/CTD. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en>. Acesso em: 12 dez. 2006.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. 2003. Disponível em: [http:// www.who.int/emc/diseases/leish/index/html](http://www.who.int/emc/diseases/leish/index/html) . Acesso em: 12 dez. 2006.

YAMASHITA, K.; FUJINAGA, T.; MIYAMOTO, T. et al.. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs *J. Vet. Med. Sci.* v.56, p.487-492, 1994.

* referências citadas segundo as normas da ABNT-NBR 6023 – Agosto/2002.

APÊNDICES

APÊNCICE A



Apêndice A: fotos do Condomínio Serra Azul – Sobradinho II – Distrito Federal, evidenciando características como ruas asfaltadas, limpas (a –b) e sistema de coleta de lixo (c), limites com mata de cerrado (d – e), presença de galinheiros (f) e materiais orgânicos em decomposição em terrenos desocupados (g – h).

APÊNCICE B

ELETROFORESE – SDS-PAGE

1. Preparação das placas

- Lavar com água corrente, enxaguar com água destilada e secar com álcool ABS.
- Passar vaselina em ambos os lados dos espaçadores.
- Prender as placas com clips (7), sendo 2 em cada lado da placa e 3 na parte inferior.
- Fixar ou manter a placa na posição vertical (em pé).
- Marcar 2 pontos de referência um centímetro abaixo do comprimento do pente (marca para o gel de separação)

2. Preparação do Gel de Separação de Acrilamida 10% (Usar um Becker de 100 mL)

Gel de Separação	30 mL	60 mL	33 mL	66 mL
Água deionizada	11,3 mL	22,6 mL	12,4 mL	24,8 mL
Tris HCl 2 M, pH 8,8 $\pm$ 0,1	5,6 mL	11,2 mL	6,2 mL	12,4 mL
Acrilamida/Bis (30% T/ 2,67% C ou 1,8666 C)	10,0 mL	20,0 mL	11,0 mL	22,0 mL
Glicerol	1,6 mL	3,2 mL	1,8 mL	3,6 mL
EDTA 0,5 M, pH 8,3 $\pm$ 0,1	0,60 mL	1,2 mL	0,66 mL	1,32 mL
Lauril sulfato de sódio (SDS) a 20%	0,60 mL	1,2 mL	0,66 mL	1,32 mL
380 μ L de persulfato de amônio 10%, preparado no dia do uso.	230 μ L	460 μ L	253 μ L	506 μ L
TEMED	25 μ L	50 μ L	28 μ L	56 μ L

3. Preenchimento das Placas

- Preencher com o gel de separação até a marca dos 2 pontos de referência anteriormente anotados.
- Adicionar algumas gotas de álcool absoluto (etanol), suficientes para formar uma película no topo do gel ($\pm 0,5$ mL).
- Aguardar a polimerização (aproximadamente 30 a 60 minutos). Caso não solidifique em 1 hora, fazer nova solução, aumentando a quantidade de TEMED ou de persulfato de amônio.
- Remover o etanol da placa.
- Adicionar o gel de empilhamento **“Stacking Gel”** até preencher totalmente a placa.
- Colocar o pente.
- Aguardar 1 hora para polimerizar. A partir daí pode ser recoberta por plástico e guardada em geladeira por 1 ou 2 dias.

4. Preparação do Stacking Gel 4% (12 mL) / (6 mL) (1 ou 2 placas)

- 7,9 / 3,95 mL de água deionizada
- 1,2 / 0,6 mL de Tris HCl 0,617 M, pH $6,8 \pm 0,1$
- 1,7 / 0,85 mL de Acrilamida/Bis (30% T/ 2,67% C)
- 600 / 300 μ L de glicerol (cortar a ponta da ponteira para pipetar)
- 246 / 123 μ L de EDTA 0,5 M, pH 8,3
- 246 / 123 μ L de SDS a 10%
- 120 / 60 μ L de persulfato de amônio a 10%
- 26 / 13 μ L de TEMED

5. Fixação das Placas na Cuba

- Retirar 3 clips da parte inferior da placa e o espaçador correspondente.
- Retirar os demais clips.
- Retirar o pente.
- Colocar a placa na cuba e fixar com 2 clips (1 de cada lado).

- Adicionar solução tampão de corrida na parte superior da cuba até cobrir o gel com os espaços onde receberão as amostras (**± 1 cm acima do gel**).
- Observar se existe vazamento.
- Colocar as amostras (**5 μ L com pipeta de Hamilton**).

6. Preparação das Amostras e Corrida Eletroforética

- Identificar os eppendorfs e adicionar: 30 μ L de DPBS;
10 μ L da amostra de soro a ser analisada;
20 μ L de gel mix.
- Aquecer sobre água em ebulição por 10 minutos.
- Retirar amostras de **5 μ L** e adicionar na placa contendo o gel e o tampão de corrida. Não esquecer de usar a amostra referência.
- Adicionar tampão na parte inferior da cuba (**no mínimo 1 cm acima do final do gel**), evitando o excesso de espuma. Retirar as bolhas de ar que se formam no local onde existia o separador, com o auxílio de uma seringa e agulha.
- Conectar a cuba à fonte de energia, regulando para **30 a 35 miliamperes**. Após a passagem da amostra para o gel de separação “**separating gel**” (aproximadamente 90 minutos), aumentar para **40 a 45 miliamperes**.
- Terminar a corrida, desligar imediatamente a fonte.
- Retirar o gel da placa cuidadosamente, colocá-lo para corar em **Coomassie blue 0,2%** durante 2 horas.
- Retirar o excesso de corante.
- Fazer leitura em densitômetro.

REAGENTES PARA ELETROFORESE (SDS-PAGE)

TRIZ HCL – 3,78 M – PH 8,9 (GEL DE CORRIDA)

Triz Base (PM: 121,1) 114,375 g

Completar para 250 mL com água deionizada.

Acertar para pH 8,9.

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

TRIZ HCL 0,617 M (GEL EMPILHADOR)

Triz Base (PM: 121,1) 7,475 g

Completar para 100 mL com água deionizada.

Acertar pH 6,8.

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

ACRILAMIDA/BIS (30% T / 1,866% C)

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08) 73,60 g

N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma 1,40 g

Completar para **250** mL com água deionizada. (Aquecer, se necessário.)

EDTA 0,5M

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico (PM: 380,20)..... 19,01 g

Completar para 100 mL com água dionizada.

Acertar para pH 8,3.

LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 10%

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4) 10,00 g

Completar para 100 mL com água deionizada.

COOMASSIE BLUE 0,2% (BRILLIANT BLUE R - 250)

Metanol	500 mL
Ácido acético	100 mL
Água bidestilada	400 mL
Coomassie blue (Brilliant blue R)	2 g

Deixar em repouso durante 2 horas e filtrar.

GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)

Lauril sulfato de sódio 10%	10,0 mL
EDTA 0,5 M.....	4,0 mL
Triz-fosfato 0,617 M, pH 6,8.....	5,0 mL
Mercaptoetanol	3,0 mL
Glicerol	10,0 mL
Água deionizada	18,0 mL
Azul de bromofenol (Bromphenol Blue).....	5,0 mg

Separar em frações de uso (450 ou 900 µL e manter no freezer até o momento do uso).

PERSULFATO DE AMÔNIA 10%

Persulfato de amônia	0,1 g
Água deionizada	1,0 mL

(Preparar no momento da confecção do gel.)

PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO MARKER E DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

8 µL de marker

2 µL de gel mix

Congelar até o momento do fracionamento (ou preparar na hora do uso).

PBS – CÁLCIO FREE (TAMPÃO FOSFATO SALINA)

NaCl	2,00 g
KCl	0,0625 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O.....	0,2875 g
KH ₂ PO ₄	0,050 g

Completar para 250 mL com água deionizada.

Ajustar pH para 7,2. Conservar em geladeira.

DESCORANTE

Metanol	250,00 mL
Ácido acético	100,00 mL

Completar para 1000 mL com água destilada

Para acelerar o processo de descoloração, os géis podem ser colocados em estufa a 40°C.

TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10 X) (novo)

Trizma Base	63,2 g
Glicina	39,9 g
SDS.....	10 g

Completar para 1000 mL com água destilada.

Obs: para uso na corrida, usar o tampão de corrida diluído.

TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (tampão de uso na cuba)

Medir 100 mL do Tampão de corrida concentrado (10 X) e completar o volume para 1000 mL (1 litro).

APÊNDICE C

C - VALORES INDIVIDUAIS DE COMPONENTES DO SORO SANGUÍNEO DE CÃES SORORREAGENTES À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).

Tabela 1C - Valores individuais de componentes do soro sanguíneo de cães sororreagentes à RIFI para LVC, em foco de transmissão do Distrito Federal (2006).

Animal	ALT	ALP	AST	GGT	COLESTEROL	HDL	PT	CRE	URÉIA	CÁLCIO	FÓSFORO	MAGNÉSIO
1	25,1	138,5	5,23	19,09	106,90	13,40	5,37	0,53	20,90	9,15	5,10	2,05
2	19,3	33,1	26,19	12,73	102,70	49,40	7,41	0,55	38,18	9,98	5,80	1,77
3	35,8	47,2	20,95	6,36	234,20	62,90	7,00	0,67	70,91	11,61	6,90	1,49
4	26,2	76,9	15,71	12,73	156,10	72,80	5,93	0,53	30,00	10,66	4,50	2,14
5	14,3	84,0	26,19	6,36	119,50	.	10,76	0,78	24,54	9,92	4,90	2,24
6	45,5	66,4	10,48	6,36	332,70	65,20	6,41	0,75	.	11,44	7,40	1,79
7	35,8	46,0	10,48	6,36	128,50	.	8,38	1,05	51,81	11,07	5,90	1,92
8	13,2	14,7	10,48	6,36	109,90	55,20	9,35	0,73	23,63	10,51	4,10	1,66
9	19,7	79,1	15,71	6,36	138,10	15,30	7,93	0,75	31,81	11,25	6,10	2,03
10	26,9	65,1	10,48	6,36	122,50	51,40	9,94	0,74	33,63	10,65	7,50	1,96
11	85,8	42,4	20,95	.	.	.	7,80	0,82	88,18	10,51	6,00	2,41
12	15,5	19,5	15,71	6,36	132,70	.	6,51	1,55	32,72	9,85	4,40	2,38
13	27,6	37,6	10,48	19,09	210,20	60,20	7,59	0,69	30,90	11,14	8,60	1,83
14	47,6	42,3	15,71	6,36	260,60	.	6,48	1,80	9,69	9,66	6,20	2,07
15	68,5	24,3	20,95	6,36	149,50	19,10	7,31	0,87	34,54	10,35	7,10	1,95
16	22,4	41,2	15,71	6,36	103,90	.	10,70	1,40	61,81	9,57	6,10	1,53
17	15,6	70,3	15,71	.	246,20	34,10	6,73	1,55	37,27	11,01	5,30	1,63
18	41,8	54,7	47,14	6,36	178,30	102,40	6,64	1,50	49,09	8,40	6,80	2,19
19	35,5	42,3	20,95	12,73	116,50	56,70	6,44	1,50	22,72	8,36	4,90	2,42
20	39,4	57,9	20,95	6,36	142,90	46,00	7,47	1,20	28,18	9,52	4,00	2,61
21	11,6	55,1	26,19	6,36	181,30	.	6,56	1,60	14,54	8,56	4,60	2,18
22	92,3	55,9	20,95	6,36	153,70	.	8,31	0,85	28,18	9,59	4,10	2,26
23	68,5	32,0	26,19	6,36	174,70	48,30	6,93	1,30	14,54	11,16	9,10	2,35
24	38,4	66,5	36,67	6,36	127,90	16,40	6,54	0,82	27,27	9,83	4,50	2,02
25	86,5	54,7	26,19	6,36	134,50	13,00	6,50	1,30	25,45	10,95	6,30	2,23
26	33,8	41,2	26,19	6,36	108,10	7,20	6,95	1,25	55,45	10,89	5,90	1,84
27	26,3	82,9	31,43	.	138,10	.	7,29	1,65	14,54	8,94	4,90	2,18
28	21,5	74,3	47,14	6,36	275,00	85,90	6,93	0,71	45,45	11,46	7,60	2,37
29	128,0	109,4	20,95	.	275,00	21,80	7,57	1,00	43,63	12,52	7,90	2,06
30	26,1	28,1	26,19	6,36	105,70	.	7,85	1,55	.	8,94	5,80	.

Continua...

Tabela 1C - Valores individuais de componentes do soro sanguíneo de cães sororreagentes à RIFI para LVC, em foco de transmissão do Distrito Federal (2006). (continuação)

31	24,1	37,0	31,43	.	163,90	.	6,64	1,20	55,45	11,43	6,20	1,60
32	25,5	19,6	15,71	6,36	215,00	.	8,98	1,25	26,36	9,41	7,80	2,07
33	39,4	35,3	26,19	.	126,70	.	11,10	1,50	44,54	9,51	7,00	1,82
34	29,9	24,8	26,19	.	143,50	.	10,50	1,00	50,91	6,89	8,80	2,08
35	40,5	49,0	15,71	.	106,30	.	9,42	1,15	21,81	7,75	5,20	1,46
36	16,6	33,3	57,62	38,18	258,80	.	10,30	1,05	23,63	8,60	5,10	2,39
37	11,8	12,9	10,48	.	137,50	.	9,53	1,05	40,00	7,25	4,50	2,14
38	36,6	89,9	41,90	.	145,30	.	8,99	0,95	32,72	9,35	5,80	2,10
39	29,4	55,9	15,71	.	142,90	.	11,20	0,90	18,18	12,91	4,50	1,89
40	13,5	31,4	15,71	6,36	165,10	.	12,00	0,54	19,09	9,51	3,60	2,31
41	20,6	43,0	15,71	.	120,70	.	10,80	0,49	35,45	11,43	6,60	2,17
42	40,5	75,7	10,48	.	151,90	.	8,31	0,85	53,63	8,56	6,30	1,57
43	52,0	44,7	26,19	.	129,70	.	9,00	0,81	28,18	7,54	5,50	1,89
44	48,8	42,3	10,48	.	167,50	.	10,80	1,15	49,09	8,80	5,90	1,96
45	48,8	55,9	10,48	.	198,70	.	9,41	0,80	28,18	8,43	5,60	1,55
46	19,8	60,5	26,19	.	255,20	.	11,10	1,00	36,36	7,93	6,10	2,30
47	23,2	10,8	15,71	.	167,50	.	7,91	0,74	23,63	8,30	7,10	1,26
48	14,2	99,4	15,71	.	114,10	.	9,73	0,90	39,09	10,52	5,30	1,79
49	23,2	69,9	5,23	.	160,90	.	8,00	0,85	17,27	7,87	7,40	1,22
50	39,4	60,4	5,23	.	97,89	.	8,20	1,02	23,63	10,04	4,40	2,05
51	.	.	10,48	.	236,60	.	8,80	.	23,63	10,38	7,60	1,78
52	.	.	10,48	.	57,65	.	7,66	.	23,69	10,27	4,20	1,82
53	.	.	10,48	.	157,90	.	5,93	.	42,72	9,81	6,20	1,88
54	.	.	10,48	.	107,50	.	8,80	.	43,63	9,45	7,00	1,42
55	.	.	5,23	.	165,10	.	8,51	.	37,27	9,87	5,90	1,85
56	.	.	10,48	.	165,10	.	6,27	.	38,18	11,77	3,70	2,01
57	.	.	26,19	.	153,70	.	7,93	.	19,09	9,26	6,20	1,93
58	.	.	36,67	.	103,90	.	8,59	.	.	10,16	5,40	2,05
59	.	.	20,95	.	207,20	.	7,96	.	.	7,05	6,90	2,03
60	.	.	.	.	253,40	.	9,06	.	.	10,99	6,80	1,72
MÉDIA	35,8	52,7	20,8	9,0	161,9	44,8	8,25	1,02	34,27	9,79	5,94	1,98
DESV PADR	23,4	25,6	11,07	6,70	55,36	26,65	1,60	0,34	15,74	1,38	1,32	0,32
MÍNIMO	11,6	10,8	5,2	6,4	57,7	7,2	5,4	0,5	9,7	6,9	3,6	1,2
MÁXIMO	128,0	138,5	57,6	38,2	332,7	102,4	12,0	1,8	88,2	12,9	9,1	2,6
N	50	50	50	29	49	20	60	50	48	50	50	49
ALT	Alanina Aminotransferase (U AST			Aspartato Aminotransferase (U/L)			Uréia (mg/dL)					
ALP	Fosfatase Alcalina (U/L)			GGT	Gama Glutamyltransferase (U/L)			Cálcio (mg/dL)				
PT	Proteínas Totais (g/dL)			Col	Colesterol (mg/dL)			Fósforo (mg/dL)				
CRE	Creatinina (mg/dL)			Col HDL	Colesterol HDL (mg/dL)			Magnésio (mg/dL)				

APÊNDICE D

D - VALORES INDIVIDUAIS DE COMPONENTES DO SORO SANGUÍNEO DE CÃES SORONEGATIVOS À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).

Tabela 1D - Valores individuais de componentes do soro sanguíneo de cães soronegativos à RIFI para LVC, em foco de transmissão do Distrito Federal (2006).

Animal	ALT	ALP	AST	GGT	COLESTEROL	HDL	PT	CRE	URÉIA	CÁLCIO	FÓSFORO	MAGNÉSIO
50	24,5	35,7	10,48	6,36	177,70	52,90	6,78	0,96	40,91	11,18	6,50	1,40
51	44,8	71,3	10,48	6,36	233,00	39,80	9,58	0,86	75,45	8,13	8,00	1,50
52	81,6	37,1	15,71	6,36	99,70	31,80	7,79	0,78	27,27	8,45	7,90	1,61
53	27,8	44,4	20,95	.	114,70	50,20	6,79	0,71	38,18	.	5,70	1,42
54	.	53,8	10,48	12,73	182,50	51,00	8,50	0,78	12,72	9,36	5,80	1,78
55	29,5	81,3	10,48	6,36	269,60	.	7,23	1,19	19,09	.	4,90	.
56	53,0	101,2	15,71	12,73	127,90	.	7,86	0,76	.	8,60	.	2,10
57	27,9	.	5,23	12,73	208,40	77,80	6,56	0,87	36,36	9,66	6,30	1,25
58	43,5	25,3	10,48	12,73	163,30	.	7,00	1,45	32,72	11,62	2,40	1,69
59	49,4	34,2	5,23	6,36	172,30	.	7,90	1,30	24,54	.	6,50	2,12
60	74,5	37,4	20,95	6,36	243,80	103,90	7,32	1,25	51,81	8,53	4,20	1,52
61	59,0	75,0	10,48	6,36	93,09	.	9,91	1,70	40,00	7,20	4,90	1,74
62	44,4	47,9	15,71	6,36	269,00	81,30	6,58	1,45	30,90	8,28	4,50	1,65
63	44,4	69,2	15,71	.	150,10	.	6,48	1,00	50,00	.	4,20	.
64	22,3	62,8	5,23	12,73	160,90	45,60	6,82	1,00	47,24	11,06	7,90	1,74
65	28,5	59,5	10,48	19,09	127,30	.	7,26	0,65	.	.	.	.
66	48,4	71,8	10,48	6,36	.	.	6,12	1,11	.	.	.	.
67	28,1	53,0	.	12,73	174,10	.	5,93	.	22,72	10,41	3,60	1,79
68	64,5	103,0	5,23	6,36	136,30	.	5,50	1,20	32,72	8,28	3,70	1,74
69	69,5	34,9	10,48	6,36	121,90	.	5,69	1,50	27,27	.	4,60	.
70	27,5	56,0	15,71	6,36	120,10	.	9,35	0,73	24,54	9,72	11,00	1,62
71	54,1	25,5	31,43	19,09	113,50	.	6,60	1,12	15,45	11,05	6,10	1,62
72	26,7	29,4	.	6,36	115,30	.	6,45	1,18	.	.	.	.
73	17,5	50,7	41,90	6,36	144,70	69,80	6,55	0,72	60,00	9,3	7,00	2,12
74	46,2	48,6	20,95	6,36	186,70	.	6,90	1,00	.	.	.	.
75	61,2	36,4	15,71	6,36	142,90	.	5,82	0,80	48,18	9,98	7,10	1,4
76	37,1	42,8	20,95	6,36	146,50	75,50	7,32	1,35	48,18	9,99	8,90	2,01
77	23,5	152,8	26,19	6,36	127,30	69,80	7,95	0,58	112,72	11,61	5,30	1,58
78	43,5	42,2	20,95	6,36	180,70	.	6,07	1,04	30,90	.	4,70	1,52
79	25,2	87,6	.	6,36	206,60	62,50	5,34	0,52	21,81	8,09	4,80	1,58
80	.	50,9	31,43	.	.	.	8,02	0,63	32,72	9,45	7,20	1,67

Continua.....

Tabela 1D - Valores individuais de componentes do soro sanguíneo de cães soronegativos à RIFI para LVC, em foco de transmissão do Distrito Federal (2006).(continuação)

Animal	ALT	ALP	AST	GGT	COLESTEROL	HDL	PT	CRE	URÉIA	CÁLCIO	FÓSFORO	MAGNÉSIO
81	44,1	62,9	10,48	6,36	186,70	.	7,32	1,27	34,54	7,40	5,60	2,37
82	31,2	104,9	26,19	.	124,30	.	8,65	0,76	42,82	7,72	4,80	1,59
83	51,7	24,2	36,67	.	169,30	.	7,43	0,88	49,54	8,74	9,10	1,84
84	33,8	.	15,71	12,73	175,90	.	8,38	0,94	21,81	.	5,20	1,62
85	52,0	45,9	15,71	6,36	.	.	6,89	.	.	8,31	.	1,56
86	52,0	36,7	57,62	6,36	162,70	.	8,56	1,40	20,00	.	6,20	1,56
87	.	44,2	10,48	6,36	41,44	.	7,86	1,15	.	7,77	.	1,36
88	43,3	27,9	15,71	6,36	99,09	.	7,18	1,30	22,72	.	5,70	1,81
89	70,5	62,9	15,71	6,36	197,50	.	6,85	.	19,09	.	2,00	1,75
90	63,0	16,1	10,48	6,36	144,10	.	5,92	1,40	16,36	.	5,70	1,57
91	.	77,3	5,23	6,36	112,30	.	7,08	0,61	37,27	.	4,90	1,94
92	28,3	28,6	47,14	6,36	146,50	.	6,81	1,04	40,00	7,90	6,00	1,48
93	36,1	36,0	.	6,36	209,60	.	5,75	0,77	21,81	7,35	5,10	1,81
94	50,5	.	.	.	200,00	.	6,40	.	40,00	.	5,20	1,56
95	62,7	.	20,95	.	140,50	.	8,00	.	20,00	.	6,00	1,37
96	21,2	133,1	10,48	.	202,40	.	5,72	0,58	.	.	8,50	1,10
97	.	.	10,48	.	121,30	.	8,60	0,76	16,36	10,35	5,30	1,84
98	17,3	117,3	.	.	166,90	.	10,70	0,81	13,63	7,77	5,60	1,74
99	35,8	35,1	.	.	119,50	.	10,00	0,78	18,18	6,90	5,20	1,68
100	24,5	48,1	15,71	.	210,80	.	8,50	0,81	17,27	8,01	8,80	1,47
101	51,6	100,4	10,48	.	149,50	.	8,59	0,58	32,72	.	4,90	1,50
102	56,6	65,5	.	.	139,30	.	5,72	1,04	15,45	9,26	4,30	1,76
103	51,4	33,5	83,81	.	269,00	.	7,38	1,00	27,27	.	5,80	1,41
104	.	.	.	.	130,30	.	8,51	.	31,81	8,77	4,70	1,10
105	.	.	5,23	.	169,90	.	8,80	.	18,18	.	4,40	1,46
106	.	.	.	.	99,70	.	7,93	.	24,54	8,27	3,60	1,52
107	46,7	24,3	.	.	112,90	.	5,65	1,00	20,00	8,19	4,70	2,03
108	43,3	56,6	18,20	8,20	159,40	62,15	7,53	0,98	32,72	9,00	5,70	1,66
109	42,7	57,2	18,80	8,11	157,40	62,65	7,13	0,98	32,22	8,90	5,70	1,62
MÉDIA	43,05	56,93	18,50	8,16	158,39	62,45	7,33	0,98	32,51	8,95	5,71	1,64
DESV PADR	15,64	29,32	14,50	3,47	46,35	18,32	1,22	0,28	17,30	1,28	1,68	0,24
MÍNIMO	17,3	16,1	5,2	6,4	41,4	31,8	5,3	0,5	12,7	6,9	2,0	1,1
MÁXIMO	81,6	152,8	83,8	19,1	269,6	103,9	10,7	1,7	112,7	11,6	11,0	2,4
N	52	52	49	41	57	15	60	52	52	37	53	51
ALT	Alanina Aminotransferase (U/AST			Aspartato Aminotransferase (U/L)			Uréia (mg/dL)					
ALP	Fosfatase Alcalina (U/L)		GGT	Gama Glutamyltransferase (U/L)			Cálcio (mg/dL)					
PT	Proteínas Totais (g/dL)		Colesterol (mg/dL)				Fósforo (mg/dL)					
CRE	Creatinina (mg/dL)		Colesterol HDL (mg/dL)				Magnésio (mg/dL)					

APÊNDICE E

E - VALORES INDIVIDUAIS DO PROTEINOGRAMA SÉRICO OBTIDO EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) DO SORO SANGUÍNEO DE CÃES SORORREAGENTES À REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC), EM FOCO DE TRANSMISSÃO NO DISTRITO FEDERAL - DF.

Tabela 1E - Valores individuais do proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do soro sanguíneo de cães sororreagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral canina (LVC), em foco de transmissão no Distrito Federal – DF.

ANIMAL	PROTEINA 1	2	3	4	5	6	7	8	9	Cerulplasma	Transferrina	Albumina	13
142	9,45	16,48	1,57	25,20	3,36	3,99	7,66	3,04	5,67	.	327,07	4346,58	.
439	4,17	12,52	49,46	17,36	31,76	11,17	4,98	36,47	17,36	.	117,23	1208,11	48,86
583	30,05	19,80	7,76	32,53	3,27	.	39,66	11,40	9,54	.	108,65	2730,30	.
105	9,41	15,97	4,51	23,13	4,31	13,03	2,25	14,41	15,09	.	66,84	3246,35	108,98
538	19,80	44,82	2,79	38,25	2,25	7,83	12,69	22,50	3,69	.	117,72	4181,67	187,38
483	66,34	20,32	49,35	0,54	2,61	0,72	2,25	18,88	26,79	.	89,54	5090,59	.
371	14,46	29,90	19,04	52,17	6,29	3,14	3,41	10,68	23,17	20,19	64,56	3415,45	140,18
163	6,24	46,81	10,62	36,51	3,48	4,77	13,72	3,99	3,22	6,37	.	3275,44	184,19
67	10,15	96,59	96,59	27,20	40,28	4,52	6,42	14,51	55,19	14,99	146,23	2955,91	.
450	9,14	63,02	11,50	29,60	3,40	.	.	.	40,22	6,50	60,95	4405,26	.
203	10,90	20,16	.	4,40	23,92	.	2,72	.	11,20	.	180,56	3103,84	.
187	10,25	19,67	25,69	31,83	3,19	4,40	12,65	3,94	18,05	46,50	.	2076,53	98,81
166	3,30	35,05	.	4,51	26,65	8,71	2,00	5,70	14,60	1,75	37,37	3312,40	.
100	12,94	42,18	18,42	29,46	1,46	3,22	2,27	16,74	12,94	34,36	.	3402,30	97,66
70	8,54	20,63	.	19,21	21,52	.	4,03	8,06	20,16	.	65,58	2866,80	.
59	3,39	16,37	.	19,12	23,98	.	7,48	3,23	19,50	3,08	55,43	2779,45	.
554	6,02	13,64	5,93	48,46	2,35	5,83	10,44	7,62	21,17	4,70	78,10	2318,06	123,00
552	0,65	8,96	.	3,35	45,68	1,73	10,26	.	20,20	35,64	218,16	3016,44	.
401	11,40	19,95	.	16,22	11,53	.	1,43	1,20	2,30	87,40	198,11	3454,75	.
334	15,20	10,22	46,21	29,48	17,86	3,52	11,02	17,73	15,80	10,50	188,91	1723,14	.
262	18,24	35,43	.	54,35	24,37	31,41	13,17	30,43	25,96	20,90	236,56	3230,84	123,84
58	27,37	30,51	.	17,82	30,83	.	3,65	4,55	20,32	.	205,12	2919,55	.
506	12,43	17,81	1,79	35,84	4,48	13,55	2,24	4,48	9,29	79,41	284,25	2558,50	.
497	9,34	26,49	7,72	15,91	5,53	0,38	0,86	8,96	2,86	10,20	194,98	4017,10	.
402	4,98	27,62	.	19,00	14,70	12,38	1,60	9,41	11,41	7,52	41,34	3499,80	.
296	17,09	14,77	.	16,40	30,83	.	6,27	7,04	5,58	10,13	246,87	3476,80	.
254	9,84	11,57	.	22,80	37,21	2,08	11,30	14,69	16,84	11,16	129,11	1086,90	77,89
206	4,45	13,54	.	27,80	29,24	3,40	8,50	16,35	8,70	8,00	104,57	2016,74	.
168*	10,90	56,35	.	29,20	43,56	.	2,43	9,38	21,91	20,73	.	3715,84	116,37
157	17,00	26,43	.	13,68	23,90	5,04	.	40,92	9,90	70,25	.	684,65	.

Continua.....

Continuação..... **Tabela 1E** - Valores individuais do proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do soro sanguíneo de cães sororreagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral canina (LVC) , em foco de transmissão no Distrito Federal – DF.

ANIMAL	14	Ig Gcadeia pesada	16	17	18	19	20	21	22	Haptoglobina	24	25	Glicoproteína ácida
142	888,72	889,98	35,17	1,57	1,78	6,19	4,30	19,00	16,17	212,10	.	.	172,20
439	340,60	2235,64	5,45	23,55	63,87	.	12,52	15,14	70,13	318,26	.	14,34	17,70
583	588,18	1097,90	59,88	.	.	19,22	13,74	12,38	79,03	458,60	14,38	25,28	58,67
105	.	1949,61	29,70	.	5,19	25,68	.	.	64,68	265,58	.	.	244,90
538	919,44	694,89	66,76	.	8,01	.	.	29,43	82,53	328,05	.	32,67	133,74
483	662,92	900,26	91,43	21,31	.	.	23,01	5,03	42,43	198,95	.	20,59	79,56
371	.	2625,84	28,82	8,80	.	.	36,55	.	84,05	202,50	33,40	107,31	678,80
163	1003,29	555,06	68,39	16,61	.	.	18,16	.	45,27	110,51	.	31,49	23,57
67	817,18	1383,23	.	12,53	7,85	9,36	14,11	13,16	77,71	259,55	.	18,24	62,57
450	1423,55	827,45	68,10	.	7,35	5,37	21,50	12,72	59,91	272,33	.	.	109,84
203	899,84	821,00	67,00	4,80	7,36	2,24	3,76	5,70	33,12	228,32	.	.	135,92
187	301,50	494,35	36,73	.	4,69	4,48	8,13	8,26	29,38	161,23	.	13,45	52,04
166	545,30	824,06	43,26	.	.	6,71	.	15,36	60,13	125,84	.	13,10	54,20
100	616,23	982,39	58,48	.	.	.	10,10	25,22	70,18	159,43	.	.	102,30
70	477,36	718,24	38,84	.	.	.	18,03	18,38	46,67	330,36	.	14,53	52,42
59	688,58	1404,06	28,06	.	6,94	10,48	12,03	10,33	47,11	416,11	.	28,45	68,85
554	595,64	1709,61	39,43	.	.	9,97	17,04	47,33	88,00	421,00	.	.	35,20
552	1064,99	1301,84	47,84	.	.	13,18	14,15	34,67	54,43	212,44	.	25,27	197,21
401	.	1842,57	45,40	3,26	.	.	5,80	13,75	75,05	111,06	.	.	98,10
334	1033,60	1446,03	47,70	.	21,52	17,60	8,00	6,04	50,40	64,60	16,53	47,34	109,62
262	416,00	1324,13	47,70	.	.	13,02	25,43	5,90	46,80	153,06	.	35,12	108,33
58	557,48	760,92	47,70	.	7,11	9,36	5,96	8,72	51,41	211,65	.	17,95	30,89
506	.	3005,74	.	.	.	.	57,34	34,83	104,38	352,57	.	38,75	129,92
497	1023,33	999,70	40,40	.	.	.	21,63	13,34	64,80	55,75	.	.	169,92
402	490,33	730,60	42,06	.	.	8,56	8,70	7,10	40,85	149,32	.	.	57,50
296	432,00	1261,44	.	.	.	7,04	17,95	15,80	78,34	537,39	.	20,53	67,77
254	.	2584,89	7,76	11,02	2,49	3,53	8,73	37,77	13,58	125,85	.	138,15	.
206	948,70	1202,55	47,70	.	.	9,81	6,73	6,47	37,54	167,81	.	.	86,00
168*	435,65	617,50	51,82	.	.	.	8,80	26,24	66,60	163,80	.	68,62	.
157	505,23	2412,84	.	.	.	.	7,64	26,89	74,90	160,10	.	373,30	.

Continua.....

Continuação..... **Tabela 1E** - Valores individuais do proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do soro sanguíneo de cães sororreagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral canina (LVC) , em foco de transmissão no Distrito Federal – DF.

ANIMAL	Ig G cadeia leve	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
142	2062,93	.	976,92	258,93	2,94	19,11	62,26	5,56	.	20,58	43,78	49,56	.
439	550,92	661,15	625,15	68,85	.	8,48	72,21	7,54	.	.	18,57	40,31	.
583	468,07	356,43	301,96	120,82	.	7,62	93,48	8,68	.	15,94	156,50	170,38	.
105	2202,45	.	1014,20	157,30	.	25,00	57,33	12,46	5,78	28,81	86,34	96,73	4,12
538	1113,12	.	607,77	110,97	.	22,86	66,33	10,89	.	15,21	31,86	84,15	.
483	562,05	.	813,77	22,48	.	9,71	43,96	19,87	.	9,71	40,90	54,03	.
371	643,24	561,52	77,67	.	29,54	.	20,56	.	.	.	17,06	21,82	.
163	240,73	326,44	303,45	37,29	.	10,76	11,97	.	.	.	15,91	18,35	.
67	1003,94	.	592,21	55,51	.	47,82	14,91	.	.	.	12,29	59,47	.
450	1155,36	.	513,40	86,95	17,33	59,53	7,25	39,60	.	.	47,66	50,30	4,90
203	726,00	910,00	575,12	112,72	7,92	47,20	.	13,00	.	11,76	12,72	16,10	.
187	433,47	.	184,30	.	.	25,31	.	.	.	15,44	10,87	14,94	.
166	287,23	204,40	467,20	.	14,42	20,25	.	7,40	.	22,20	44,10	63,10	.
100	396,27	493,57	504,70	88,67	21,34	23,32	.	13,82	.	29,54	19,08	21,64	.
70	611,38	.	286,36	34,63	7,11	81,71	5,27	9,48	11,20	13,52	65,40	54,61	.
59	637,88	637,88	562,21	50,11	9,56	89,13	8,01	10,02	.	.	9,40	43,79	.
554	2136,07	.	1262,44	181,33	7,62	90,80	10,72	.	30,58	26,16	29,83	25,90	.
552	2313,79	.	1679,72	179,06	21,92	93,20	.	32,83	.	21,92	35,42	97,10	.
401	1071,66	344,63	299,80	117,50	10,10	19,00	.	7,71	.	9,93	19,31	25,04	.
334	992,70	.	529,72	105,20	3,92	8,43	.	.	.	13,74	27,70	.	.
262	924,67	.	400,40	100,53	.	24,37	.	9,31	.	.	46,80	42,92	.
58	820,93	.	383,95	105,20	8,78	43,97	.	10,96	2,69	.	18,07	46,60	.
506	2532,99	.	1662,86	231,73	.	79,18	19,38	35,50	14,11	.	25,42	51,30	.
497	1837,76	.	727,14	211,85	.	27,54	.	12,39	.	.	17,91	6,29	.
402	260,76	186,04	367,30	22,70	10,92	26,77	.	.	.	.	.	10,68	.
296	1471,29	.	556,72	65,62	.	102,73	.	11,76	.	12,63	46,21	53,00	.
254	1056,40	770,47	596,39	118,02	.	23,63	.	.	.	.	.	.	.
206	684,93	460,80	511,30	65,80	6,60	32,83	.	8,63	.	.	.	14,25	.
168*	532,02	.	441,00	.	23,35	30,50	.	11,68	1,25	26,44	12,26	15,81	.
157	881,20	491,43	453,38	96,35	14,28	46,28	.	18,26	11,95	54,45	85,39	34,39	.

APÊNDICE F

F - VALORES INDIVIDUAIS DO PROTEINOGRAMA SÉRICO OBTIDO EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) DO SORO SANGUÍNEO DE CÃES NÃO-REAGENTES À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).

Tabela 1F - Valores individuais do proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do soro sanguíneo de cães não-reagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral canina (LVC), em foco de transmissão no Distrito Federal (2006).

ANIMAL	PT	PROTEINA 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ALBUMINA	14	15	16
1591	5749,77	1,38	7,41	36,86	5,05	8,40	13,62	10,80	7,41	26,62	10,06	21,10	68,25	2909,55	.	.	.
1550	3789,99	1,70	26,53	1,36	1,17	10,84	6,37	7,84	15,40	7,92	27,40	6,60	128,10	1503,60	107,18	13,20	15,92
1633	5720,01	2,69	12,18	19,67	.	41,87	20,59	10,24	3,37	12,30	36,89	14,87	85,17	3230,55	107,18	.	.
1725	5199,97	6,50	20,17	11,34	.	56,06	22,31	27,77	11,20	18,00	5,10	7,12	389,11	2459,40	107,20	13,20	124,75
1653	10700,16	2,78	3,63	1,28	1,71	17,33	32,10	3,00	11,23	2,46	.	10,91	104,11	3173,94	.	.	.
1652	4350,00	14,57	15,10	.	.	44,02	10,05	12,22	.	8,22	21,01	10,35	137,33	2885,36	.	107,18	60,37
1512	8380,13	10,98	2,10	5,53	2,68	7,46	19,94	2,51	16,84	9,47	8,88	18,60	.	3073,86	.	.	.
1772*	5648,14	8,70	19,94	2,43	2,90	13,05	17,85	11,53	6,61	12,54	5,00	7,34	58,70	3186,66	128,53	21,52	43,00
1540	5919,96	1,65	18,50	27,90	12,55	22,70	.	.	5,80	20,36	.	9,00	161,02	2659,91	.	38,80	.
1227	6600,20	2,64	2,00	23,63	13,40	21,52	.	.	.	1,91	6,10	27,12	104,48	2302,28	.	.	.
1708	5721,14	17,62	12,30	15,30	14,90	9,04	.	.	15,16	31,46	.	11,46	85,60	1571,30	.	.	.
1247	6900,23	2,76	1,66	9,94	22,15	.	.	.	2,76	2,35	19,46	19,18	67,27	3184,70	.	.	.
1066	6480,09	23,71	5,83	.	.	27,41	.	.	11,73	2,20	9,85	5,83	183,19	2810,89	.	.	.
1537	6850,00	4,45	4,80	7,81	8,56	13,50	.	.	.	17,00	13,70	84,00	453,74	1320,47	.	.	.
1439	4559,98	2,74	7,50	.	.	6,84	40,13	.	.	.	3,51	10,35	33,65	2170,80	.	.	.
1284	4900,01	15,04	37,09	.	21,75	28,02	.	.	.	.	3,68	10,63	107,75	2768,40	.	.	.
1235*	6550,02	1,00	5,83	2,75	9,23	25,35	.	.	11,07	.	7,66	15,13	23,51	2427,04	.	.	.
1118	6120,00	5,08	17,38	.	.	14,38	.	.	.	1,10	3,24	10,16	98,71	3878,12	.	.	.
1145	5930,07	18,20	25,50	.	6,64	17,37	.	3,08	.	.	.	10,85	71,04	2648,10	.	.	.
1101	6820,04	2,52	3,88	15,20	6,34	21,41	8,59	.	.	.	.	12,75	102,16	2279,04	.	.	.
971	7323,67	2,41	12,58	.	4,10	36,52	38,94	14,13	.	.	9,15	4,46	181,10	3244,00	.	.	.
1713	7380,20	14,54	87,45	.	13,21	18,60	.	.	5,75	12,76	5,46	10,40	72,91	2825,80	.	15,05	97,60
1601	6399,99	15,23	.	16,26	.	14,40	17,92	11,13	.	.	9,60	16,26	64,96	1911,36	.	.	.
1519	7179,98	0,57	1,22	2,90	.	.	.	2,60	.	.	3,23	6,90	82,85	3031,11	.	.	.
1516	6890,01	17,70	12,54	.	12,81	14,33	.	.	.	3,10	5,37	3,37	85,80	2563,60	112,52	34,83	.
1446	5340,22	15,60	10,73	.	3,47	20,72	.	34,55	.	.	.	23,92	54,10	2506,10	.	.	.
1264	7320,00	3,30	39,40	.	6,88	28,91	.	5,92	.	.	2,93	12,30	104,23	4285,86	.	.	.
1259	5820,08	11,81	.	.	5,30	27,88	.	.	.	.	5,18	12,16	116,00	3562,71	.	.	.
1226	6449,85	1,74	10,74	.	30,50	7,35	23,54	.	.	.	.	17,40	.	3781,95	.	.	.
1169	5499,97	7,20	.	.	.	32,34	18,53	.	10,56	2,42	9,02	5,50	176,82	2586,54	.	.	.

Continua.....

Continuação.... **Tabela 1F** - Valores individuais do proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do soro sanguíneo de cães não-reagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral canina (LVC), em foco de transmissão no Distrito Federal (2006).

ANIMAL	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1591	208,89	800,05	560,22	.	.	32,95	5,06	12,03	23,00	119,60	34,04	52,50	736,57	.	.	38,35
1550	21,03	172,25	791,73	5,27	13,60	7,12	16,75	9,36	31,00	296,56	7,27	10,57	316,27	149,63	35,74	24,71
1633	214,27	443,01	646,99	.	.	32,49	8,69	27,00	73,33	168,28	11,44	13,50	238,52	180,35	25,68	38,89
1725	.	.	1091,43	34,16	3,48	16,07	3,60	4,16	41,50	96,36	21,42	34,84	317,41	175,24	.	81,07
1653	514,35	1542,72	955,08	29,32	.	11,66	19,47	24,18	11,98	112,13	.	260,12	3691,60	.	.	163,07
1652	142,81	126,97	254,30	.	.	36,63	17,57	7,70	24,53	89,26	10,30	26,75	130,15	112,71	.	44,54
1512	133,91	587,69	1338,37	.	.	25,56	7,37	15,08	37,12	206,06	.	149,33	1597,65	911,66	.	191,48
1772*	88,03	297,13	967,43	.	13,05	20,40	11,80	8,13	37,30	179,10	17,57	22,94	284,60	.	113,56	40,80
1540	.	1027,80	643,15	.	35,75	2,01	10,65	3,61	29,90	155,40	13,85	42,10	635,45	296,10	46,00	.
1227	.	1132,56	888,29	.	39,20	10,10	11,68	4,16	34,32	190,70	34,12	74,51	752,14	815,50	107,84	.
1708	96,50	731,50	1717,60	.	9,95	3,20	6,35	17,90	37,70	266,80	41,24	79,33	901,30	.	27,63	.
1247	.	1024,86	846,01	.	49,27	.	9,59	15,11	91,30	183,54	73,00	64,86	1117,45	.	93,01	.
1066	.	680,07	1061,29	.	37,06	4,14	8,10	13,48	61,95	289,20	32,66	76,01	397,42	661,28	76,79	.
1537	.	761,80	1862,00	.	6,85	.	13,70	21,16	43,30	201,87	.	80,07	1180,32	642,80	108,10	.
1439	.	267,30	708,40	.	37,30	0,41	7,43	17,80	50,52	605,84	28,50	45,96	252,35	201,55	.	61,10
1284	96,72	.	862,40	.	39,40	18,57	15,60	10,44	57,62	261,22	27,83	42,60	229,61	181,84	.	63,80
1235*	.	538,93	1150,90	.	.	22,27	25,94	25,22	64,98	386,20	38,91	133,36	1534,07	.	100,67	.
1118	.	554,00	508,32	.	52,51	2,31	15,17	4,77	18,80	174,36	.	60,34	414,70	232,50	.	54,05
1145	.	877,52	949,75	.	46,13	3,02	16,54	9,78	1,95	73,41	31,31	61,85	990,96	.	.	67,07
1101	.	658,20	1579,37	.	36,35	7,39	1,77	6,41	40,03	188,23	.	99,71	986,51	710,44	.	53,74
971	.	813,32	1133,06	.	.	63,98	5,92	13,91	55,92	197,42	41,00	73,34	742,90	549,14	.	86,37
1713	.	937,40	1660,05	29,30	48,85	.	.	14,80	24,80	79,00	36,53	62,21	691,73	477,60	.	138,40
1601	147,65	612,16	1753,98	.	21,57	.	.	.	27,97	192,38	18,37	49,41	1435,13	.	54,40	9,85
1519	219,42	797,62	587,82	.	.	29,90	28,80	14,00	9,26	227,10	.	102,96	824,55	1091,65	.	115,52
1516	.	1177,50	876,42	24,51	15,22	.	20,90	10,40	21,50	177,21	.	72,00	808,40	750,94	.	69,04
1446	.	.	1130,42	35,24	27,18	.	6,20	24,72	18,15	894,61	35,00	87,68	171,47	230,26	.	10,10
1264	.	660,04	762,35	26,30	71,60	.	.	17,50	49,92	117,26	25,40	50,65	478,58	473,67	97,00	.
1259	147,01	403,15	616,92	.	54,18	.	2,62	20,02	48,01	107,78	8,26	52,90	357,93	186,70	.	73,56
1226	168,90	366,55	710,33	.	57,30	4,51	9,80	10,25	45,66	224,72	26,83	56,82	405,32	407,60	.	82,04
1169	.	376,31	995,77	.	62,04	.	13,64	32,56	75,80	80,00	.	117,00	598,12	231,44	68,36	.