

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG EM CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL, SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO, E EM
ANIMAIS VACINADOS CONTRA A DOENÇA.**

Fabiana Augusta Ikeda Garcia

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG EM CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL, SUBMETIDOS OU NÃO A TRATAMENTO, E EM
ANIMAIS VACINADOS CONTRA A DOENÇA.

Fabiana Augusta Ikeda Garcia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mary Marcondes

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FABIANA AUGUSTA IKEDA GARCIA – casada, nascida na cidade de Araçatuba – SP, em 10 de março de 1976, médica veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – *campus* de Araçatuba, no ano de 1998. Obteve o título de mestre no curso de Pós-graduação na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* de Botucatu, área de Clínica Veterinária no ano de 2004, com a dissertação intitulada “Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento” e orientação do Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, *campus* de Jaboticabal – SP, em março de 2005, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Mary Marcondes.

DEDICO

Aos meus pais, Nilo e Akemi,

Minha gratidão pelos sacrifícios, esforços e empenho na minha formação, os quais foram de fundamental importância para eu concluir mais esta etapa. Esta conquista é mais de vocês do que minha, sem o amor, compreensão e apoio de vocês, eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Carla e Rogério,

Por terem sido sempre uma fonte de apoio e conforto, amigos e protetores, zelando para que nada de mal jamais me acontecesse.

Ao meu marido, Edvaldo,

Companheiro sempre presente nas dúvidas, decisões e vitórias; com palavras de carinho e incentivo. Nunca me esquecerei de seu apoio e de tudo que fez por mim nestes anos de convivência. Muito Obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Mary Marcondes,

Minha orientadora, obrigada pela orientação constante, pelos ricos ensinamentos, pela dedicação, confiança, paciência e incentivo. Mas especialmente, pela amizade e exemplo profissional. Minha imensa gratidão

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, por me acolher nos momentos de dificuldade, por me mostrar o caminho quando todos os obstáculos pareciam intransponíveis e por estar sempre ao meu lado, me protegendo, me iluminando e guiando meus passos.

À minha família, meu porto-seguro, especialmente aos meus pais pelo apoio e incentivo em todas as decisões da minha vida, aos meus queridos irmãos Carla e Rogério por todo amor, amizade e carinho e aos meus sobrinhos, Guilherme e João Pedro, pelos momentos felizes e por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!!

Ao meu marido, Edvaldo, pelo estímulo e por disponibilizar o seu tempo em meu favor, ajudando-me e prestando contribuições valiosas para o desenvolvimento e viabilização deste trabalho, pelo seu amor e por compreender os momentos de distância...

À Pós-graduação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV / UNESP, *campus* de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Doutorado.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOA / UNESP, *campus* de Araçatuba, por permitir a realização de toda a fase experimental do projeto em sua estrutura física.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba, por autorizar a colheita de amostras e pela receptividade durante todo o período experimental.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho (“papi”), Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, Prof^a. Ass. Dr^a. Rosemeire Vasconcelos de Oliveira e Prof^a. Dr^a. Valéria Marçal Félix de Lima, pelo auxílio na correção deste trabalho e sugestões pertinentes ao contexto da discussão.

Aos membros da Banca de Defesa: Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes, Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, Dr^a. Vera Lúcia Fonseca Camargo-Neves e Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, pelas ricas contribuições na revisão desta tese.

À Prof^a. Ass. Dr^a. Mirela Tinucci Costa, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP, *campus* de Jaboticabal, pela orientação inicial, acolhida e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Valéria Marçal Félix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da FOA / UNESP, *campus* de Araçatuba, pela boa vontade, pela orientação na realização da técnica de ELISA e principalmente pelo interesse e comprometimento no desenvolvimento do trabalho. Obrigada também por ter cedido as dependências do Laboratório de Imunologia para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Michael J. Day, da divisão de Patologia Veterinária, Infecção e Imunidade da Escola de Clínica Veterinária da Universidade de Bristol, Reino Unido, por ter acreditado em nossas idéias e ter gentilmente cedido os anticorpos monoclonais para a detecção das subclasses de IgG caninas.

À empresa Fort Dogde, na pessoa da Dr^a. Ingrid Menz, pelo fornecimento das vacinas contra leishmaniose visceral canina que foram utilizadas na execução deste trabalho.

À Prof^a. Ass. Dr^a. Sílvia Helena Venturoli Perri, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da FOA / UNESP, *campus* de Araçatuba, pela paciência e dedicação na realização da análise estatística.

Aos funcionários da Pós-graduação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV / UNESP, *campus* de Jaboticabal, pela atenção, paciência e apoio nestes anos de doutorado.

Aos funcionários da biblioteca do Curso de Medicina Veterinária FOA / UNESP, *campus* de Araçatuba, em especial à bibliotecária Isabel Pereira Matos, pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas.

Aos amigos Claudio e Maurício pelo auxílio em várias etapas do trabalho, mas principalmente pela alegria, amizade e companheirismo.

Aos pós-graduandos e aos bolsistas de iniciação científica Ana Amélia, Fernando, Juliana, Ludmila, Daniel e Denis pela contribuição e eficiência no auxílio da colheita e processamento de materiais, bem como pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao colega Danilo pelo apoio e por todo o suporte prestado.

Ao funcionário Almir Aparecido Spinosa Lemos, do Laboratório de Imunologia, pela amizade e colaboração no processamento da técnica de ELISA.

Ao meu anjo da guarda pela proteção, cumplicidade, apoio e incentivo principalmente nos momentos difíceis. Promessa cumprida!

Aos animais de estimação, que participaram deste projeto, que tornaram possível a realização desse estudo, minha homenagem e agradecimentos especiais.

Aos proprietários dos cães deste experimento, pelo apoio, pela boa vontade em cooperar e confiança na ciência.

Aos meus queridos Ceci, Caco, Mãezinha, Tigrão, João, Joana, Lilica e Zangado, pelo afeto incondicional, dedicação e fidelidade, que com seus latidos, miados e brincadeiras tornam meus dias mais alegres.

Aos parentes, amigos, residentes, mestrandos e docentes que direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, a minha gratidão e reconhecimento.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS GERAIS.....	16
3.1 Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais utilizados.....	17
4.2 Delineamento experimental.....	19
4.3 Colheita das amostras.....	20
4.3.1 Medula óssea.....	20
4.3.2 Linfonodo.....	20
4.3.3 Sangue total.....	20
4.4 Técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	21
4.4.1 Ensaio para a detecção de anticorpos totais anti- <i>Leishmania</i> <i>chagasi</i>	21
4.4.2 Ensaio para a detecção de IgG1 e IgG2 policlonal.....	22
4.4.3 Ensaio para a detecção de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 monoclonal.	22
4.4.4 Determinação dos pontos de corte.....	24
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Página

- Tabela 1 – Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígdos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 26
- Tabela 2 – Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, em 37 cães hígdos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da primeira (M0), da segunda (M1) e da terceira dose da vacina (M2), 90 (M3) e 180 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M4). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 29
- Tabela 3 – Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígdos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 37 cães hígdos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 32
- Tabela 4 - Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígdos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por

leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 34

Tabela 5 – Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio de ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, em 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0), aos 30 dias (M1), 60 dias (M2), 90 dias (M3) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimonialo de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 36

Tabela 6 – Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 38

Tabela 7 – Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose

	visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	41
Tabela 8 –	Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio de ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, em 37 cães hípidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da aplicação da primeira dose da vacina (M0) e 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M3). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	44
Tabela 9 –	Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hípidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina e 37 cães hípidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	46
Tabela 10-	Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hípidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hípidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	49
Tabela 11-	Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 27 cães portadores de leishmaniose	

visceral canina, antes do início do tratamento (M0) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoniato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 52

Tabela 12- Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hípidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 54

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1 - Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígdos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 27
- Figura 2 - Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, em 37 cães hígdos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da primeira (M0), da segunda (M1) e da terceira dose da vacina (M2), 90 (M3) e 180 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M4). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 30
- Figura 3 - Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígdos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 37 cães hígdos, 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 32

- Figura 4 – Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hípidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hípidos, 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 34
- Figura 5 – Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2 em 27 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0), aos 30 dias (M1), 60 dias (M2), 90 dias (M3) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoniato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 37
- Figura 6 – Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hípidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009)..... 39
- Figura 7- Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hípidos de área não

	endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	42
Figura 8 –	Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 37 cães hígidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da aplicação da primeira dose da vacina (M0) e 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M3). (Unesp – Jaboticabal - SP, 2009).....	44
Figura 9 –	Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	47
Figura 10-	Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral	

	(vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	50
Figura 11-	Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoniato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	53
Figura 12-	Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).....	55

**AVALIAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG EM CÃES NATURALMENTE
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL, SUBMETIDOS OU NÃO A
TRATAMENTO, E EM ANIMAIS VACINADOS CONTRA A DOENÇA**

RESUMO – O presente estudo teve como objetivos comparar a resposta da imunoglobulina G e de suas subclasses nos seguintes grupos de animais; cães hígidos (n=45), animais sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp. (n=45), animais assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp. (n=45), cães portadores de leishmaniose visceral submetidos à tratamento (n=27) e animais hígidos submetidos à vacinação contra a doença (n=37). Inicialmente foram avaliadas IgG1 e IgG2 utilizando anticorpos policlonais e posteriormente as quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com anticorpos monoclonais na tentativa de identificar um perfil de resposta para cada grupo de cães. As determinações sorológicas foram realizadas por meio da técnica de ELISA. A avaliação das subclasses de IgG com anticorpos policlonais não permitiu diferenciar os grupos de cães estudados. Por outro lado, com os anticorpos monoclonais observou-se que o grupo sintomático apresentou estimulação de todas as subclasses de IgG enquanto nos animais assintomáticos apenas a fração IgG1 foi estimulada. Nos cães submetidos a tratamento todas as frações encontravam-se elevadas e nos vacinados ocorreu estimulação de IgG1, IgG3 e IgG4. Desta forma, a avaliação das quatro subclasses permitiu a diferenciação entre animais portadores de leishmaniose visceral com e sem quadro clínico; entre cães vacinados e cães assintomáticos acometidos pela doença; e entre cães com leishmaniose visceral submetidos a tratamento e cães infectados assintomáticos.

Palavras-chave: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, imunoglobulina, *Leishmania chagasi*.

**EVALUATION OF IgG SUBCLASSES IN DOGS NATURALLY INFECTED BY
VISCERAL LEISHMANIASIS, SUBMITTED OR NOT TO TREATMENT, AND IN
ANIMALS VACINATED AGAINST THE ILLNESS**

SUMMARY – The present study aimed to compare immunoglobulin G subclasses in the following groups of animals: healthy dogs (n=45); symptomatic *Leishmania* sp. naturally infected dogs (n=45); asymptomatic *Leishmania* sp. naturally infected dogs (n=45); dogs with visceral leishmaniasis submitted to treatment (n=27) and healthy dogs vaccinated for visceral leishmaniasis (n=37). First of all IgG1 and IgG2 were evaluated using polyclonals antibodies, and later the four subclasses of IgG (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) were evaluated with monoclonals antibodies, in order to identify a profile of reply for each group of dogs. Serological tests were carried out using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The evaluation of the subclasses with polyclonals antibodies did not allow to differentiate the groups of studied dogs. On the other hand, with monoclonals antibodies it was possible to verify that symptomatic dogs presented stimulation of all subclasses of IgG, while in asymptomatic animals only IgG1 was stimulated. In dogs submitted to treatment all fractions increased, and in vaccinated ones occurred stimulation of IgG1, IgG3 and IgG4. In such a way, the evaluation of the four subclasses allowed the differentiation between symptomatic and asymptomatic infected dogs; between vaccinated dogs and asymptomatic infected dogs; and between infected dogs submitted to treatment and asymptomatic infected dogs.

Keywords: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, immunoglobulin, *Leishmania chagasi*.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica que acomete populações dos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais. Na América Latina é chamada de leishmaniose visceral americana ou calazar neotropical. Na Índia era originalmente conhecida como febre Dum-Dum ou Kala-Azar, palavra de origem indiana que significa “doença negra”, devido a um quadro de hiperpigmentação que pode se desenvolver em indivíduos acometidos pela doença.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, a prevalência mundial das diferentes formas clínicas da enfermidade ultrapassa 12 milhões de casos. O Brasil é responsável por 90% dos casos de leishmaniose visceral humana no continente americano, sendo que, dos 27 estados brasileiros, 20 já apresentam casos da doença.

A doença era, até recentemente, considerada como rural, típica de ambientes silvestres, mas hoje pode ser também contraída em zonas suburbanas e urbanas. Atualmente surtos e epidemias de leishmaniose visceral têm sido observados em grandes centros urbanos do Brasil. O crescente número de casos da doença nessas áreas pode ser explicado pelas alterações ambientais que forçaram a adaptação do vetor ao ambiente urbano.

O primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo foi diagnosticado em maio de 1998, no município de Araçatuba. A partir de então, o número de animais acometidos pela doença na região vem aumentando consideravelmente. De acordo com os dados da Direção Regional de Saúde de Araçatuba, 41 municípios já apresentam a enfermidade, que está se difundindo para outras regiões do Estado, inclusive com casos autóctones identificados na região metropolitana de São Paulo desde o ano de 2005. No município de Araçatuba mais de 40.000 cães foram submetidos à eutanásia entre 1998 e 2008, período em que foram confirmados, no estado de São Paulo, 1215 casos humanos dos quais 107 vieram a óbito.

Os inquéritos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas para a doença baseiam-se no diagnóstico sorológico, tanto pela técnica de ELISA quanto pela Reação

de Imunofluorescência Indireta (RIFI). No entanto, estas técnicas podem apresentar resultados falso-positivos e falso-negativos. Além disso, com a introdução de uma vacina contra leishmaniose visceral canina no mercado brasileiro, sérios problemas têm surgido quando da confirmação do diagnóstico e conseqüente eutanásia dos cães. Isto se deve ao fato de que um animal vacinado pode desenvolver títulos de anticorpos, detectados quando do exame sorológico, confundindo-o com um animal naturalmente infectado, reservatório do parasita. Mesmo que o proprietário do cão apresente um atestado de vacinação, não é possível garantir que o animal sorologicamente positivo não tenha sido infectado apesar do uso da vacina, uma vez que a eficácia vacinal segundo o laboratório fabricante é de 76%.

Desta forma, o Ministério da Saúde do Brasil não recomenda a utilização da vacina como método de controle da doença, e indica a eutanásia de cães sorologicamente positivos.

Vários trabalhos têm sido realizados na Europa e no Brasil, na tentativa de determinar se a resposta das subclasses de IgG pode ser utilizada como um marcador para a resistência ou susceptibilidade à leishmaniose visceral canina, para avaliar a eficácia do tratamento e para diferenciar cães vacinados de cães doentes. Entretanto, os resultados são muito contraditórios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma enfermidade causada por um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901) e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A espécie envolvida com a infecção na leishmaniose visceral depende da região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África, e a *Leishmania chagasi* nas Américas (SÃO PAULO, 2003).

Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie, permitindo que alguns autores denominem de *L. infantum* o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999; JERONIMO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006).

As leishmanias são protozoários pleomórficos, com formas flageladas que se desenvolvem no tubo digestório de um inseto vetor, e formas aflageladas ou amastigotas, intracelulares obrigatórias, encontradas no interior de células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (SLAPPENDEL & FERRER, 1998; SÃO PAULO, 2003).

A doença já foi identificada em cães (*Canis familiaris*), gatos (*Felis domesticus*), cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), raposas (*Lycalopex vetulus*), gambás (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris*) e ratos (*Proechymis oris*) (GENARO, 1993; CASTRO, 1996; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; BANETH, 2006). Até o presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença o cão é considerado epidemiologicamente o mais importante, pois apresenta um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (SLAPPENDEL & FERRER, 1998; MELO, 2004).

O calazar canino, do ponto de vista epidemiológico, é considerado mais importante que a doença humana, pois a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos, a infecção em cães é mais prevalente que no homem (CASTRO, 1996;

SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; SCOTT et al., 2001; BANETH, 2006) e também pelo fato de que tanto os cães sintomáticos como os assintomáticos são igualmente infectivos aos vetores (LAURENTI et al., 2007).

A prevalência da leishmaniose visceral em cães de áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% da população. Acredita-se que em áreas com alta infecção na espécie, a incidência na população humana varie de 1 a 2% (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; SLAPPENDEL & FERRER, 1998).

Os vetores implicados na transmissão das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos. A principal espécie nas Américas é a *Lutzomyia longipalpis*, conhecida popularmente no Brasil como mosquito palha, birigui ou tatuquira (REY, 2001; BRASIL, 2003; SÃO PAULO, 2003). No Mato Grosso do Sul a *Lutzomyia cruzi* também foi identificada como transmissor da doença (SANTOS et al., 1998, BRASIL, 2003; SÃO PAULO, 2003).

Quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas alimentam-se em hospedeiros susceptíveis, as formas promastigotas são inoculadas juntamente com a saliva do inseto. Esta possui um potente vasodilatador, denominado maxidila, que exerce importante papel nos eventos que se seguem durante a modulação da resposta imune. Desta forma, a inoculação do parasita na pele promove uma resposta inflamatória local, levando à sua fagocitose por células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente os macrófagos. No interior dos macrófagos as formas promastigotas perdem o flagelo, diferenciando-se em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. As células densamente parasitadas rompem-se liberando estas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, então, a disseminação hematogênica e linfática para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados (FERRER, 2002; BANETH, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

A resistência ao desenvolvimento de sintomas após uma infecção por *Leishmania* sp. é determinada por indução da resposta imune celular mediada por linfócitos CD4+ (MORENO et al., 1999). Estudos experimentais demonstraram que a

infecção por *Leishmania major* em camundongos pode evoluir rapidamente para cura clínica ou para uma doença disseminada, crônica e fatal. Os macrófagos infectados por parasitas atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T do tipo CD4+. Esses linfócitos são estimulados a produzir interleucinas e, dependendo do perfil estimulado, ocorre desenvolvimento de duas sub-populações de linfócitos T auxiliares, Ta1 ou Ta2 (MOSMANN et al., 1986).

O fenótipo em tais modelos, resistente ou susceptível, depende da linhagem do camundongo. Camundongos C57Bl/6, CBA e C3H apresentam uma resposta imune Ta1, protetora, que controla a infecção; enquanto camundongos Balb/c infectados produzem uma resposta Ta2 e sucumbem aos efeitos da doença (HEINZEL et al., 1989). Fenótipos imunológicos equivalentes existem em humanos e cães naturalmente infectados, e vários estudos têm demonstrado a correlação entre a ativação de linfócitos T auxiliares Ta1 e a ocorrência de infecção canina assintomática (PINELLI et al., 1994). Além de agirem como células apresentadoras de antígenos no início da resposta imune, os macrófagos afetam o curso da infecção secretando interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

A IL-12, liberada no início do processo inflamatório, desempenha um papel crucial no controle da doença, já que influencia a resposta imune inata e a subsequente ativação de células T auxiliares CD4+ do tipo 1 (Ta1). Quando ativadas, as células Ta1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres dependentes de oxigênio são tóxicos para os parasitas, podendo levar ao controle do parasitismo com eliminação da infecção (PINELLI et al., 1994; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

Os macrófagos da derme são as células hospedeiras mais parasitadas, sendo também as células efectoras mais importantes na produção de óxido nítrico. Por sua vez,

as células epidérmicas de Langerhans são essenciais na indução da resposta imune específica, por serem responsáveis pelo transporte de parasitas aos linfonodos regionais, local onde esta resposta se inicia. No tocante aos outros tipos celulares que participam da resposta inicial, deve-se considerar os leucócitos polimorfonucleares, que são importantes na fagocitose dos parasitas, os quais, com o auxílio de imunoglobulinas e do sistema complemento, possuem ação leishmanicida (LAURENTI et al., 1996).

Em contraste, quando a infecção está associada com a ativação de linfócitos Ta2, temos a produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), com a subsequente proliferação de células B e produção de anticorpos. A produção de anticorpos, principalmente IgG, é muito elevada. Entretanto, como a ativação de linfócitos B é policlonal, a maioria das imunoglobulinas é inespecífica (PINELLI et al., 1994). As interleucinas IL-4 e IL-5 estimulam a produção de altos níveis de IgM, IgE e isotipos de IgG, tais como IgG1 em camundongos e IgG4 em humanos (RAVINDRAN et al., 2004).

O aumento de IL-10 em sinergismo com IL-4 parece ser fundamental na progressão da doença, uma vez que ambas são capazes de inibir as funções da IL-12, a ativação de macrófagos pelo IFN- γ produzido pelas células TCD4+, e a produção de radicais livres (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007). Adicionalmente, estudos experimentais têm sugerido que existe uma diminuição da resposta Ta1 pela secreção de IL-10, o que previne imunidade estéril, permitindo a persistência de baixos níveis de infecção em hospedeiros recuperados (BELKAID et al., 2002).

Sendo assim a resposta Ta1 está associada à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção, e a resposta Ta2 correlacionada com a progressão da doença. A indução preferencial de linfócitos Ta1 ou Ta2 depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação do antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007). A resposta imune de cães à infecção por *L. infantum* não é exclusivamente celular ou humoral, mas uma combinação de respostas dos tipos Ta1 e Ta2, sendo que a variedade dos sintomas e a gravidade da doença

dependem do equilíbrio entre esses dois sistemas (PINELLI et al., 1994; INIESTA et al., 2007).

Em humanos submetidos à terapia restabelece-se a proliferação de células T em resposta a antígenos de leishmanias, e a produção de IL-2 e IFN- γ . Indivíduos curados, entretanto, apresentam células T reativas, com linfocinas do tipo Ta1 e Ta2 coexistindo após a infecção (ANAM et al., 1999b).

Os animais acometidos por leishmaniose visceral podem apresentar alterações dermatológicas, hematológicas, digestórias, cardiorrespiratórias, renais, locomotoras, neurológicas e oculares (GENARO, 1993; CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000; BLAVIER et al., 2001; JÜTTNER et al., 2001; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BANETH, 2006). O quadro clínico pode se apresentar complicado devido à ocorrência de infecções oportunistas concomitantes (CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; LAMOTHE, 1999; NOLI, 1999).

As principais manifestações clínicas na forma clássica da doença incluem apatia, emagrecimento progressivo, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, hipertermia, hiporexia, anorexia, êmese, diarreia, hematoquezia, melena, disqueratinização, áreas de alopecia ou rarefação pilosa, hiperqueratose, ulceração cutânea, onicogribose, ceratoconjuntivite, blefarite, uveíte, aumento de volume articular e edema de membros (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; SLAPPENDEL & FERRER, 1998; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Os animais assintomáticos podem permanecer assim por toda a vida ou desenvolver sintomas após períodos que variam de três meses a alguns anos (FERRER et al., 1995) mas, uma vez iniciado o processo, a doença evolui inevitavelmente para a morte (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; FEITOSA, et al., 2000). Animais jovens, menores de três anos de idade, que desenvolvem sintomas da doença, são considerados geneticamente predispostos à infecção. Por outro lado, se os sintomas se tornam evidentes em animais adultos que vivem em áreas endêmicas, este fato provavelmente se deve à uma imunossupressão causada por co-infecções, ou utilização de medicamentos imunossupressores (FERRER, 2002).

Estudos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas têm demonstrado que muitos cães assintomáticos apresentam anticorpos anti-*Leishmania* sp. que podem ser mantidos por anos sem o desenvolvimento da doença (INIESTA et al., 2005).

O diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, apesar de não apresentar 100% de sensibilidade ou especificidade, é o método mais utilizado, principalmente em se tratando de inquéritos epidemiológicos. Seus resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que podem gerar resultados falso-positivos e falso-negativos (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). As técnicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina são a imunofluorescência indireta (RIFI) e a técnica de ELISA (BRASIL, 2003).

No que tange ao tratamento, ainda que as medicações utilizadas em seres humanos e em cães sejam as mesmas, estudos têm demonstrado que a leishmaniose visceral é mais resistente à terapia em cães do que no homem (SLAPPENDEL & FERRER, 1998). Apesar do tratamento, muitas vezes, levar a cura clínica dos cães, ele não produz a eliminação completa do parasita, e as recidivas são frequentes (GRADONI et al., 1987; ALVAR et al., 1994; FERRER et al., 1995; GINEL et al., 1998; DENEROLLE & BOURDOISEAU, 1999; RIERA et al., 1999; BANETH & SHAW, 2002; IKEDA-GARCIA et al., 2007).

A remissão dos sintomas, segundo SOLANO-GALLEGO et al. (2001) e RODRÍGUEZ et al. (2006), costuma vir acompanhada de uma diminuição acentuada no título de anticorpos (IgG), os quais, entretanto, permanecem detectáveis por um longo período de tempo.

Em 11 de julho de 2008 foi publicada uma portaria interministerial (Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), proibindo o tratamento de leishmaniose visceral canina em todo o território nacional. Tal portaria baseou-se no fato de que não há, até o momento, nenhum fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão; a existência de risco de cães em tratamento manterem-se como reservatórios e fonte de infecção para o vetor e a existência de risco de indução a seleção de cepas

resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos (BRASIL, 2008).

No Brasil, data de 14 de março de 1963 a publicação do Decreto Lei no. 51.838 que estabelece normas técnicas especiais para o combate às leishmanioses, tendo por objetivo a interrupção da transmissão da doença do animal ao homem, e ou inter-humana. Dentre as medidas exigidas encontram-se a realização de inquéritos epidemiológicos para identificação de cães infectados, com sua posterior eliminação; campanhas sistemáticas contra os flebótomos nas áreas endêmicas e tratamento dos casos humanos. Apesar de estudos experimentais indicarem que a eutanásia de cães soropositivos pode reduzir a incidência da doença tanto em cães quanto em crianças, problemas como um atraso no tempo entre a coleta do sangue, o diagnóstico e a eutanásia do cão, têm gerado a suspeita de que esse programa de controle da doença é inefetivo (MENDES et al., 2002).

Desta forma, considerando que as medidas de controle centradas no cão têm se mostrado inconsistentes, o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral tem sido prioridade e considerado como urgente pela Organização Mundial de Saúde (DA SILVA et al., 2000; BARBIÉRI, 2006).

No ano de 2003 foi produzida a primeira vacina contra a leishmaniose visceral canina no Brasil. Esta vacina consiste de uma fração purificada isolada de *Leishmania donovani* associada ao adjuvante saponina. A fração purificada, denominada de ligante de fucose manose (FML), é um complexo glicoprotéico que inibe fortemente a infecção *in vitro* de macrófagos murinos por promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. Presente na superfície de *L. donovani* por todo seu ciclo de vida, o FML é um potente imunógeno em coelhos e camundongos (MENDES et al., 2003; LEISHMUNE, 2004; DANTAS-TORRES, 2006).

O programa completo de vacinação compreende a aplicação de três doses, com um intervalo de 21 dias entre elas. Em um estudo com 600 animais soronegativos de área endêmica verificou-se que 98% dos cães apresentaram soroconversão 30 dias após o término do programa vacinal. Essa produção de anticorpos vacinais gera um

grave problema quando da realização de inquéritos epidemiológicos, e conseqüente eutanásia de cães sororeagentes. Isto porque cães vacinados podem ser confundidos com animais naturalmente infectados, reservatórios do parasita, que devem ser removidos para eutanásia (LEISHMUNE, 2004).

A equipe de pesquisadores responsável pela vacina realizou testes preliminares com a determinação das subclasses IgG1 e IgG2 objetivando diferenciar esses dois tipos de cães (MENDES et al., 2003). MENDES et al. (2003), avaliando a resposta ao antígeno FML de IgG total e de suas frações IgG1 e IgG2 em animais infectados e submetidos à vacinação, verificaram níveis similares de anticorpos IgG total entre os cães soropositivos naturalmente infectados e animais vacinados. Com relação às frações de IgG, observaram que os animais infectados apresentaram concentrações séricas similares de IgG1 e IgG2, e que os vacinados tiveram predomínio de IgG2. Os resultados indicaram que uma proporção $IgG1/IgG2 \geq 1$ deve caracterizar o soro de animais infectados por leishmaniose visceral evoluindo para uma doença evidente, enquanto a proporção $IgG1/IgG2 \leq 1$ deve caracterizar a resposta do soro de cães vacinados protegidos. Concluíram que o subtipo IgG1 está associado à infecção natural e o subtipo IgG2 correlacionado à proteção pós-vacinal.

SOLANO-GALLEGO et al. (2001), ALMEIDA et al. (2005), INIESTA et al. (2005), REIS et al. (2006), DA COSTA-VAL et al. (2007), RODRÍGUEZ-CORTÉS et al. (2007b), avaliando as concentrações séricas de IgG em cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, observaram altos níveis de IgG total em ambos os grupos, sendo mais elevados nos animais sintomáticos do que nos assintomáticos.

Vários trabalhos com as subclasses de IgG têm sido realizados a fim de determinar se a resposta das mesmas pode ser utilizada como um marcador para a resistência ou susceptibilidade à leishmaniose visceral canina, para avaliar a eficácia do tratamento e para diferenciar cães vacinados de cães doentes (DEPLAZES et al., 1995; BOURDOISEAU et al., 1997; CAVALIERO et al., 1999; NIETO et al., 1999; BOCETA et al., 2000; SOLANO-GALLEGO et al., 2000; LEANDRO et al., 2001; SOLANO-

GALLEGO et al., 2001; CORDEIRO DA SILVA et al., 2003; MENDES et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; INIESTA et al., 2005; REIS et al., 2006; CARDOSO et al., 2007; DA COSTA-VAL et al., 2007; INIESTA et al., 2007; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007a). Entretanto, os resultados são muito contraditórios, uma vez que existem trabalhos indicando que a IgG1 está associada com o desenvolvimento e a IgG2 com a resistência à doença (DEPLAZES et al., 1995; NIETO et al., 1999; INIESTA et al., 2005), muitos pesquisadores afirmaram que a principal resposta imunológica em animais infectados pertence à subclasse IgG2 (BOCETA et al., 2000; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LEANDRO et al., 2001; CORDEIRO DA SILVA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; REIS et al., 2006; CARDOSO et al., 2007; DA COSTA-VAL et al., 2007; INIESTA et al., 2007; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007a) e, ainda, poucos estudos não evidenciaram essa dicotomia na resposta das subclasses (BOURDOISEAU et al., 1997).

Da mesma forma, existem contradições na literatura com relação aos títulos de IgG1 e IgG2 de cães submetidos a tratamento com antimoniais. Enquanto alguns autores verificaram diminuição das concentrações séricas de IgG1 e altos títulos de IgG2 em animais tratados (DEPLAZES et al., 1995; CAVALIERO et al., 1999), outros observaram altas concentrações séricas de IgG1 e IgG2 antes do tratamento com diminuição significativa apenas nos títulos de IgG2 com o passar dos meses (BOURDOISEAU et al., 1997). Por outro lado, também existem relatos da ocorrência de elevadas concentrações séricas de IgG1 e IgG2 antes do tratamento, com diminuição das duas subclasses após o mesmo (SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

De forma contrária, CAVALIERO et al. (1999), analisando as subclasses de IgG em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a tratamento com alopurinol, verificaram que as concentrações séricas de IgG2 encontravam-se elevadas em todos os animais e permaneceram altas mesmo em cães clinicamente curados durante ou após a terapia. De acordo com os autores, as concentrações séricas de IgG1 podem ter valor prognóstico, já que persistiram elevadas em alguns animais que,

após a cura clínica, apresentaram recidiva da doença, e não foram detectadas em um cão que não teve recidiva do quadro clínico após o tratamento.

O primeiro relato do fracionamento da IgG em subclasses em cães com leishmaniose visceral foi feito por DEPLAZES et al. (1995), os quais reportaram que os animais doentes apresentam elevação dos títulos das duas subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) e que, após longo tratamento e melhora clínica, as concentrações séricas de IgG1 diminuem, enquanto os títulos de IgG2 permanecem elevados. Por outro lado, cães que permanecem cronicamente doentes, mesmo com repetidos tratamentos, permanecem com altas concentrações séricas de IgG1.

BOURDOISEAU et al. (1997) avaliando as subclasses de IgG em cães assintomáticos, sintomáticos e em animais submetidos à tratamento, verificaram elevação das concentrações de IgG1 e IgG2 nos cães dos dois primeiros grupos, sendo que os títulos de IgG2 foram quase o dobro dos títulos de IgG1. O acompanhamento de cães tratados evidenciou uma diminuição dos níveis de IgG2 e uma elevação da concentração sérica de IgG1 ao longo do tempo.

A avaliação das subclasses de IgG em cães experimentalmente infectados com promastigotas de *L. infantum*, realizada por NIETO et al. (1999), evidenciou ausência de IgG1 em cães oligosintomáticos e em animais com regressão do quadro clínico. Por outro lado, animais sintomáticos possuíam elevadas concentrações séricas de IgG1.

Discordando dos achados de NIETO et al. (1999), BOCETA et al. (2000) reportaram que em cães severamente acometidos por leishmaniose visceral observa-se uma elevação das concentrações séricas de IgG2, e não de IgG1 como haviam sugerido aqueles autores.

No mesmo ano, SOLANO-GALLEGO et al. (2000), objetivando correlacionar as concentrações séricas de IgG2 com resistência à doença, compararam amostras séricas de cães da raça Ibizan Hound, considerada resistente à doença, com amostras de cães de diversas raças, todos assintomáticos. Os resultados obtidos não permitiram

associar resistência à altos títulos de IgG2, uma vez que não houve diferença entre os grupos de cães estudados.

Ainda no que tange aos títulos de IgG2, LEANDRO et al. (2001) verificaram que cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com sinais clínicos clássicos da doença, possuíam marcante resposta humoral com altos títulos dessa fração de imunoglobulina G.

Em vista de tantas discordâncias na literatura, SOLANO-GALLEGO et al. (2001) determinaram as concentrações séricas de IgG e suas frações em três grupos de cães: assintomáticos, sintomáticos não tratados e sintomáticos submetidos a tratamento. Os autores verificaram que os cães assintomáticos apresentavam baixos títulos de IgG1 durante a infecção, mesmo quando a IgG total e a IgG2 apresentaram elevações significantes. Nos cães sintomáticos observaram altos níveis de IgG total e IgG2, enquanto os níveis de IgG1 variaram de ausentes a sensivelmente elevados. Nos animais submetidos a tratamento verificaram que os títulos de IgG total e IgG2 diminuíram lentamente, enquanto a IgG1 caiu rapidamente nos cães responsivos.

Os resultados obtidos por CORDEIRO DA SILVA et al. (2003), que compararam as concentrações séricas de IgG1 e IgG2 em cães sintomáticos e assintomáticos, identificaram a IgG2 como a subclasse predominante nos casos de cães sintomáticos. O mesmo foi observado por ALMEIDA et al. (2005).

Iniesta e sua equipe, no mesmo ano de 2005, publicaram um ensaio cujos resultados, mais uma vez, demonstraram as discrepâncias existentes na literatura no tocante ao estudo do fracionamento de imunoglobulina G em cães com leishmaniose visceral. Segundo os autores, com relação à IgG2, tanto os animais sintomáticos como os assintomáticos apresentam altos títulos desta subclasse, enquanto somente os cães com quadro clínico da doença apresentam elevação na subclasse IgG1.

Novamente estes resultados foram contestados pelos estudos de REIS et al. (2006), CARDOSO et al. (2007) e DA COSTA-VAL et al. (2007), os quais verificaram títulos de IgG2 mais elevados em cães sintomáticos.

DA COSTA-VAL et al. (2007), ainda, verificaram que os cães assintomáticos apresentaram valores de absorvência da IgG total significativamente mais baixos que os dos animais sintomáticos, não observando diferenças significantes entre as concentrações séricas de IgG1 nos grupos estudados.

Com resultados contraditórios àqueles publicados no ano de 2005, INIESTA et al (2007), analisando novamente a expressão de IgG1 e IgG2 em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, observaram que, quantitativamente, a resposta de IgG1 à antígenos de *Leishmania* sp. foi variável, sem relação com a presença ou não de sintomas. Por outro lado, foram detectados títulos mais elevados de IgG2 nos animais sintomáticos quando comparados aos cães assintomáticos.

Tais resultados confrontam-se com os relatos de RODRÍGUEZ-CORTÉS et al. (2007a), os quais, estudando as concentrações séricas de IgG total e suas subclasses em seis cães experimentalmente infectados por *L. infantum*, verificaram que todos os animais produziram anticorpos IgG total e IgG2, sendo que em quatro deles, que possuíam infecção sintomática, esses níveis apresentaram-se elevados. Por outro lado, as concentrações séricas de IgG1 foram detectadas apenas nos quatro cães sintomáticos, sugerindo uma associação entre este isotipo e o desenvolvimento de sintomas da doença.

Em função da variabilidade dos resultados obtidos quando do fracionamento da imunoglobulina G em duas subclasses, QUINNELL et al. (2003) utilizaram um painel de anticorpos monoclonais específicos para quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), na tentativa de melhor avaliar a resposta imune humoral de cães com leishmaniose visceral. De acordo com os autores, no início da infecção e em animais assintomáticos a única subclasse de IgG detectável é a IgG1, enquanto em animais sintomáticos todas as subclasses encontram-se elevadas sendo que a IgG2 é a que se eleva em menor intensidade. Verificaram também que existe uma grande variação nas concentrações séricas de IgG1 e IgG2 entre os cães, e que seus valores não são marcadores úteis para a resistência ou susceptibilidade de cães. Essas observações

contradizem a grande maioria dos trabalhos que utilizaram IgG1 e IgG2 como marcadores da doença.

Segundo DAY (2007), está claro que não existe um padrão consistente no que diz respeito a uma correlação entre IgG1 ou IgG2 e quadros sintomáticos ou assintomáticos na leishmaniose visceral canina.

A literatura médica descreve alguns estudos em que foram avaliadas as quatro subclasses de IgG em pacientes humanos infectados por *Leishmania donovani*, entretanto, de forma semelhante aos estudos em cães, os resultados obtidos também foram conflitantes. Enquanto ELASSAD et al. (1994) observaram concentrações séricas mais elevadas de IgG3 e IgG4 em pacientes sudaneses, GHOSH et al. (1995) verificaram concentrações séricas decrescentes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em pacientes indianos e ANAM et al. (1999a) estudando as subclasses em pacientes indianos, observaram elevadas concentrações séricas de IgG1, IgG3 e IgG4.

No que se refere ao acompanhamento de pacientes submetidos a tratamento, ELASSAD et al. (1994), avaliando as quatro subclasses de IgG em pacientes sudaneses com leishmaniose visceral submetidos a tratamento com estibogluconato de sódio, verificaram que após o tratamento os títulos de IgG não demonstraram alteração, entretanto, os títulos de IgG1 e IgG3 apresentaram redução significativa. Contrapondo-se aos resultados anteriores, CHATTERJEE et al. (1998) reportaram que, após o sucesso do tratamento de humanos com antimoniais, houve uma diminuição das concentrações séricas de IgG total e de suas quatro subclasses, sendo que os títulos de IgG1 e IgG2 foram os que apresentaram maior redução. Por outro lado, nos pacientes não responsivos à terapia os títulos de anticorpos não se alteraram, ou apresentaram leve aumento.

ANAM et al. (1999b) e DA MATTA et al. (2000), realizando o tratamento de seres humanos portadores de leishmaniose visceral, observaram que após a cura clínica os títulos séricos mantinham-se positivos, apesar de diminuírem. Verificaram, ainda, uma significativa diminuição dos títulos de todas as subclasses, sendo mais significativa a de IgG4. De acordo com DA MATTA et al. (2000), as concentrações séricas de IgG e de

suas subclasses diminuem após o tratamento de acordo com a seguinte seqüência: IgG4, IgG3, IgG2, IgG e finalmente IgG1.

RAVINDRAN et al. (2004) em seus estudos sobre o perfil das subclasses de IgG no soro de pacientes com leishmaniose visceral, salientaram que indivíduos resistentes à terapia possuem diminuição nas concentrações séricas de IgG2 e IgG3, ausência de alteração em IgG4, e elevação das concentrações de IgG1. Todavia, o sucesso do tratamento é acompanhado de um significativo declínio nos títulos de IgG3, IgG4 e IgG1.

3. OBJETIVOS GERAIS

Partindo-se da hipótese de que as subclasses de IgG podem apresentar uma correlação com a resistência ao desenvolvimento de sintomas, ou com a susceptibilidade ao aparecimento de quadro clínico em cães portadores de leishmaniose visceral, o presente estudo teve como objetivos gerais definir se o perfil das subclasses de IgG pode diferenciar cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. sintomáticos e assintomáticos, cães portadores de leishmaniose visceral submetidos à tratamento e cães hípidos submetidos à vacinação contra a doença.

3.1 Objetivos específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos comparar inicialmente a resposta da imunoglobulina G e de suas subclasses IgG1 e IgG2, para posteriormente comparar o perfil das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 entre os seguintes grupos experimentais:

- cães controle, cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com quadro clínico da doença, e cães assintomáticos portadores de leishmaniose visceral;
- cães controle, cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral com quadro clínico da doença, e cães submetidos à vacinação contra a doença;
- cães controle, cães assintomáticos portadores de leishmaniose visceral, e cães submetidos à vacinação contra a doença;
- cães controle, cães assintomáticos portadores de leishmaniose visceral, e cães portadores de leishmaniose visceral submetidos a tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – *Campus* de Araçatuba – SP.

4.1 Animais utilizados

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP – *campus* de Araçatuba e pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP – *campus* de Jaboticabal, registrado no protocolo 29/05 e 006842-05, respectivamente (Apêndices FF e GG).

Foram utilizados cinco grupos de animais de ambos os sexos, de diversas raças e idades variadas. O primeiro grupo foi composto por 45 cães clinicamente saudáveis, encaminhados para vacinação à clínica particular no município de Santos, área não endêmica para leishmaniose visceral, os quais foram utilizados como grupo controle. O segundo grupo foi formado por 45 cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. apresentando infecção sintomática, que foram encaminhados ao centro de controle de zoonoses para a realização da eutanásia. O terceiro grupo foi composto por 45 cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. apresentando infecção assintomática, os quais foram encaminhados ao centro de controle de zoonoses para a realização da eutanásia.

O diagnóstico de leishmaniose visceral foi firmado por meio da identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no exame citológico de punção biópsia aspirativa de linfonodo e de medula óssea, e confirmado através do teste imunoenzimático (ELISA).

O quarto grupo foi constituído de 37 cães clinicamente hígidos submetidos ao

protocolo de vacinação contra leishmaniose visceral canina¹, seguindo as recomendações do laboratório fabricante. Durante todo o experimento, os animais vacinados foram mantidos com coleira à base de deltametrina², a qual era substituída a cada quatro meses, seguindo as recomendações do fabricante, a fim de minimizar riscos de infecção a partir de flebotomíneos infectados. Para a inclusão neste grupo os animais deveriam apresentar um exame físico sem nenhuma alteração digna de nota, um hemograma dentro dos valores de normalidade sugeridos pelo laboratório clínico do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – *campus* de Araçatuba – SP, exames citológicos de punção biópsia aspirativa de linfonodo e de medula óssea negativos para a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. e exame sorológico por teste imunoenzimático (ELISA) negativo para leishmaniose visceral.

O quinto grupo foi formado por 27 cães portadores de leishmaniose visceral encaminhados ao centro de controle de zoonoses e foram submetidos a tratamento com uma combinação do antimoniato de meglumina³ na dose de 75 mg/kg a cada doze horas, por via subcutânea, durante 21 dias, associado ao alopurinol⁴ na dose de 10 mg/kg a cada doze horas, por via oral durante seis meses e, cujas amostras de soro já encontravam-se estocadas antes do início do experimento. Tais animais fizeram parte de um projeto de dissertação de mestrado aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEAA), todos foram submetidos a tratamento e submetidos à eutanásia ao término do experimento (IKEDA, 2004).

Todos os cães dos grupos dois e três foram submetidos à eutanásia com Pentobarbital sódico⁵, na dose de 15 mg/kg por via intravenosa, seguida de uma ampola de 10 ml de cloreto de potássio⁶, em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do

¹ Leishmune® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda.

² Scalibor® - Intervet Production S.A.

³ Glucantime® - Aventis Pharma Ltda.

⁴ genérico – Hexal Ltda.

⁵ Hypnol 3% - Fontoveter – Itapira, SP

⁶ Cloreto de potássio a 19,1% - Darrow – Rio de Janeiro, RJ

Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. O método empregado para a eutanásia seguiu as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

4.2 Delineamento experimental

A colheita das amostras dos animais dos grupos um, dois e três ocorreu em apenas um momento. As amostras dos animais do quarto grupo foram colhidas em cinco momentos: M0 – antes da aplicação da primeira dose da vacina; M1 – antes da aplicação da segunda dose da vacina; M2 – antes da aplicação da terceira dose da vacina, M3 – 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina e M4 – 180 dias após a aplicação da primeira dose da vacina. Já os animais do quinto grupo tiveram as amostras colhidas em cinco momentos: M0 – antes do início do tratamento; M1 – 30 dias após o início do tratamento, M2 – 60 dias após o início do tratamento, M3 – 90 dias após o início do tratamento e M4 – 180 dias após o início do tratamento.

Inicialmente foram realizadas as determinações da IgG total e das duas subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) utilizando anticorpos policlonais. Após a análise dos resultados dessa primeira investigação, foram determinados os melhores momentos para a avaliação das quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) utilizando-se anticorpos monoclonais.

Desta forma, no grupo submetido à vacinação, determinou-se as quatro subclasses em M0 - antes da aplicação da primeira dose da vacina e M3 - 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina, quando os resultados da primeira análise demonstraram que já havia ocorrido soroconversão. No grupo submetido a tratamento, foram utilizadas as amostras colhidas em dois momentos: M0 - antes do início do tratamento e M4 - 180 dias após o início do tratamento, quando se evidenciou maior diferença estatisticamente significativa entre os momentos.

4.3 Colheita das amostras

4.3.1 Medula Óssea

A colheita de medula óssea foi realizada com agulha hipodérmica (40x16), mediante punção na crista ilíaca dos animais. Imediatamente após a punção da medula óssea, foram confeccionados cinco esfregaços por animal. As lâminas foram coradas com o corante hematológico¹ e observadas ao microscópio óptico, em aumento de 100x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

4.3.2 Linfonodos

Com auxílio de uma seringa de 10 mL e agulha hipodérmica (30x7) foi realizada a punção biópsia aspirativa de linfonodo poplíteo. Após a colheita do material, foram realizados dois esfregaços por animal, que posteriormente eram corados com o corante hematológico¹ e observados ao microscópio óptico, em aumento de 100x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

4.3.3 Sangue Total

Após assepsia local, foram colhidos 10 mL de sangue por punção da veia jugular, que eram depositados em frascos sem anticoagulante e mantidos, em temperatura ambiente até a coagulação e retração visível do coágulo. Em seguida, as

¹ Panótico Rápido - Laborclin – Curitiba, PR

amostras eram submetidas à centrifugação a 3.000 r.p.m., durante cinco minutos, para melhor separação do soro. Este, por sua vez, era transferido para frascos de plásticos apropriados, com o auxílio de pipeta automática, e estocado e mantido a 20° C negativos.

4.4 Técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

4.4.1 Ensaio para a detecção de anticorpos totais anti-*Leishmania chagasi*

A presença de IgG anti-*Leishmania* sp. no soro foi determinada por meio da técnica de ELISA, como descrita por LIMA et al. (2003). As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/74/PP75 (apêndice A), numa concentração de 20µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6. Após incubação a 4°C por toda a noite as placas foram lavadas com PBS - 0,05% “Tween” 20 (PBS-T) e bloqueadas por uma hora a temperatura ambiente com 150 µL por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro bovino fetal. Após nova lavagem com PBS - T, as amostras de soro, diluídas 1:400 em PBS - 10% de soro fetal bovino e 0,05% “Tween” 20, foram adicionadas a cada poço e incubados por duas horas a temperatura ambiente. Posteriormente após nova lavagem com PBS - T, adicionou-se à placa 100 µL de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com peroxidase¹, previamente titulado.

Após a incubação por uma hora em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada com PBS - T e foram adicionados 100 µL de uma solução contendo ortofenilenediamina (OPD)² (0,4 mg/mL) em diluente apropriado com peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida adicionando-se 50µL de H₂SO₄ 1M, e a densidade

¹ Sigma – Aldrich Brasil LTDA

² Sigma – Aldrich Brasil LTDA

óptica (D.O.) foi avaliada a 492nm, utilizando-se o leitor automático¹. Controles negativos e positivos foram incluídos em cada placa e os resultados foram expressos pela média da densidade óptica dos soros em duplicata.

4.4.2 Ensaio para a detecção de IgG1 e IgG2 policlonal

Para a padronização das concentrações dos conjugados e soros foi realizada a titulação em bloco. As melhores diluições que discriminaram soro controle positivo e soro controle negativo foram 1:20000 para IgG1 e 1:140000 para IgG2. Os resultados da padronização encontram-se apresentados nos apêndices B a E.

A presença de IgG1 e IgG2 no soro foi determinada por meio da técnica de ELISA como descrita por LIMA et al. (2003), com as seguintes modificações: foi adicionado anticorpo anti-IgG1 e IgG2 de cão², ao invés do anticorpo anti-IgG; a solução reveladora utilizada foi o tetrametilbenzidina (TMB)³ e a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 450nm.

4.4.3 Ensaio para a detecção de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 monoclonal

Os anticorpos monoclonais para detecção das quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) foram gentilmente cedidos pelo Professor de Patologia Veterinária, Michael J. Day, da Divisão de Patologia Veterinária, Infecção e Imunidade da Escola de Clínica Veterinária da Universidade de Bristol, Reino Unido.

¹ LabSystems Multiskan EX - Flow Laboratories International SA, Lugano, Switzerland

² Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA

³ Sigma-Aldrich Co., USA

Para a padronização das concentrações dos anticorpos monoclonais, conjugado e soros foi realizada a titulação em bloco. As melhores diluições que discriminaram soro controle positivo e soro controle negativo foram diluição de 1:50 para o soro, 1:200 para a IgG1, 1:50 para IgG2, 1:50 para IgG3, 1:50 para IgG4 e 1:5000 para o conjugado. Os resultados da padronização encontram-se apresentados nos apêndices S a V.

A presença de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 no soro foi determinada por meio da técnica de ELISA como descrita por QUINNELL et al. (2003), com algumas modificações. As placas foram cobertas com antígeno total *Leishmania chagasi* em uma concentração de 20µg/ml em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6, e incubadas por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, após a lavagem com PBS-tween 20 (PBS-T) por três vezes, as placas foram bloqueadas com 75µl de uma solução de PBS contendo 1% de polivinilpirrolidona¹ e incubadas à temperatura ambiente durante uma hora. Após nova lavagem com PBS-T por três vezes, 50µl do soro controle positivo, do soro controle negativo (animal saudável de área não-endêmica) e das amostras dos soros dos animais diluídas 1:50 em PBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,5% “Tween” 20, foram adicionadas nos respectivos poços e incubadas por duas horas à 37°C. Após três lavagens com PBS-T, adicionou-se à placa 50µl de anticorpo monoclonal anti-IgG1(B6)², usado na diluição de 1:200, anti-IgG2 (E5)², usado na diluição de 1:50, anti-IgG3 (A3G4)², usado na diluição de 1:50 e anti-IgG4 (A5)², usado na diluição de 1:50.

Após incubação por duas horas à 37°C, a placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T, foram adicionados 50µl do anticorpo anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina³ diluído 1:5000 em PBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,5% “Tween” 20 e incubados à 37°C durante uma hora. Após a lavagem da placa, adicionou-se 100µl da solução reveladora p-nitrofenil fosfato⁴ e incubou-se por trinta

¹Sigma – Aldrich Brasil LTDA

²Quinnell et al. (2003)

³Sigma – Aldrich Brasil LTDA

⁴Sigma – Aldrich Co., USA

minutos em temperatura ambiente. A densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 405nm, utilizando o leitor de ELISA¹. Controles negativos e positivos foram incluídos em cada placa e os resultados foram expressos pela média da densidade óptica dos soros em duplicata.

4.4.4 Determinação dos pontos de corte

A determinação do ponto de corte das técnicas de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, foi realizada utilizando-se os soros de cães saudáveis provenientes do município de Santos, São Paulo, área não endêmica para doença. Para tanto, considerou-se a média acrescida de três desvios-padrões. Desta forma, os pontos de corte utilizados para a detecção de IgG total, IgG1 e IgG2 por meio de anticorpos policlonais foram 0,218, 0,069 e 0,181, respectivamente. E os pontos de corte usados para a detecção de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 por meio de anticorpos monoclonais foram 0,110, 0,202, 0,088 e 0,041, respectivamente.

Os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas) dos animais do grupo controle encontram-se expressos nos apêndices F e X.

¹ Labsystems Multiskan EX - Flow Laboratories International SA, Lugano, Switzerland

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas e análise dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância.

Como as variáveis IgG total, IgG1 e IgG2 policlonais não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Friedman para comparar os momentos em cada grupo e o teste de Kruskal-wallis para a comparação entre os grupos.

As variáveis IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 monoclonais não apresentaram distribuição normal e foram analisadas usando o teste de Wilcoxon para comparar os momentos e o teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos. Os resultados foram apresentados através das médias, desvios-padrões e medianas.

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1999).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ainda não existe um consenso entre os pesquisadores quanto à possibilidade das subclasses de IgG serem utilizadas como identificadores de susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* sp., o que seria de grande utilidade na avaliação de animais supostamente infectados, principalmente quando se trata de animais previamente tratados ou vacinados. No presente ensaio os cães portadores de leishmaniose visceral que possuíam sintomas da doença apresentaram os maiores valores de IgG, seguidos dos infectados assintomáticos e, finalmente, dos animais do grupo controle (tabela 1 e figura 1). Os valores de IgG total não permitiram diferenciar cães infectados com quadro clínico daqueles infectados assintomáticos. Apesar de haver diferença estatisticamente significativa entre eles, os dois grupos possuíam mediana acima do ponto de corte (0,218), possibilitando sim, sua diferenciação com cães hígidos. Resultados semelhantes foram obtidos por SOLANO-GALLEGO et al. (2001), ALMEIDA et al. (2005), INIESTA et al. (2005), REIS et al. (2006), DA COSTA-VAL et al. (2007) e RODRÍGUEZ-CORTÉS et al. (2007a).

Tabela 1. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 c	0,032 \pm 0,019	0,027 b	0,110 \pm 0,036	0,109 b
Sintomático	1,166 \pm 0,110	1,162 a	0,069 \pm 0,036	0,062 a	0,773 \pm 0,137	0,779 a
Assintomático	0,704 \pm 0,189	0,686 b	0,131 \pm 0,166	0,073 a	0,644 \pm 0,180	0,676 a

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

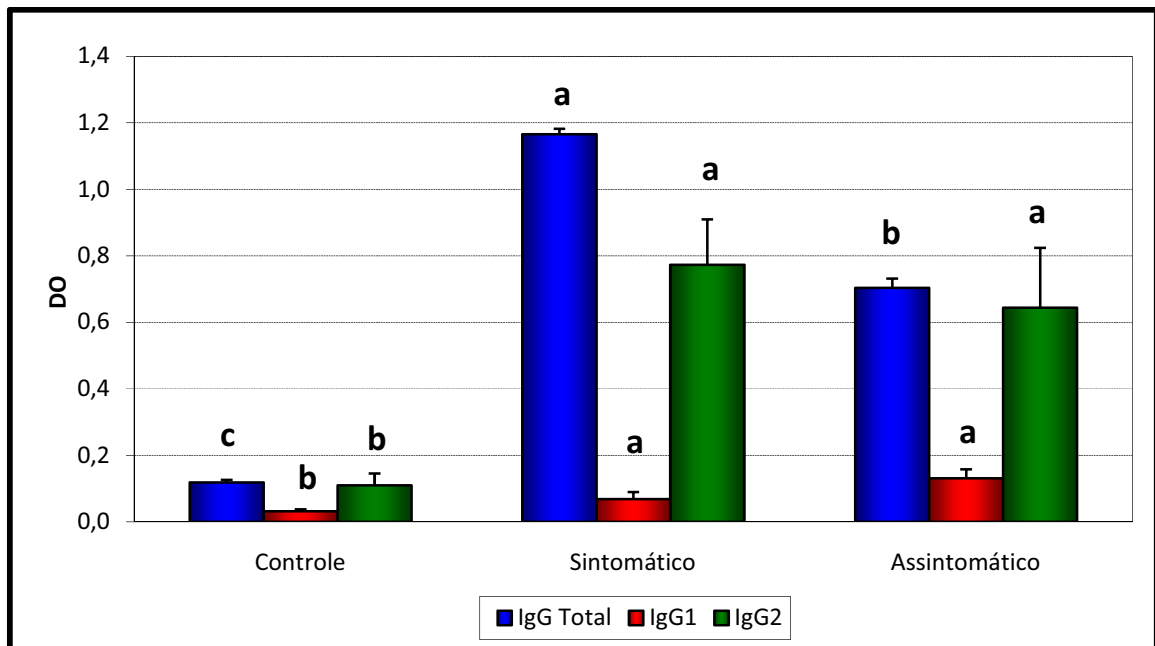


Figura 1. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Apesar desses resultados, é importante salientar que nem todos os cães infectados fazem soroconversão, e que nem sempre existe uma correlação entre quadro clínico e títulos de anticorpos, como descrito por FERRER et al., (1995). Sendo assim, nem sempre as concentrações de IgG poderão diferenciar cães infectados de animais hígidos.

A análise do fracionamento da imunoglobulina G permite verificar que a IgG1 não se presta para diferenciar seguramente cães sintomáticos e assintomáticos, apesar do valor da mediana dos cães sem quadro clínico ter sido superior à dos animais sintomáticos (tabela 1 e figura 1). Somente REIS et al. (2006) encontraram semelhantes resultados, enquanto BOURDOISEAU et al. (1997), SOLANO-GALLEGO et al. (2001), ALMEIDA et al. (2005), CARDOSO et al. (2007), DA COSTA-VAL et al. (2007) e INIESTA et al. (2007) verificaram valores mais elevados desta fração nos cães

sintomáticos. A comparação do valor da mediana da fração IgG1 com o ponto da corte da reação (0,069) no grupo sintomático evidencia uma estimulação muito pequena desta subclasse, fato também verificado por LEANDRO et al. (2001).

Com relação à IgG2, esta foi a predominante nos três grupos experimentais, não permitindo a diferenciação entre os dois grupos de cães infectados, uma vez que ambos apresentaram altos valores de mediana, com elevação maior nos cães do grupo sintomático (tabela 1 e figura 1). Estes resultados corroboram os relatos de BOURDOISEAU et al. (1997), BOCETA et al. (2000), SOLANO-GALLEGO et al. (2001), CORDEIRO DA SILVA et al. (2003), ALMEIDA et al. (2005), INIESTA et al. (2005), REIS et al. (2006), CARDOSO et al. (2007), DA COSTA-VAL et al. (2007) e INIESTA et al. (2007), que reportaram que cães com sintomas da doença apresentam níveis elevados de IgG2.

Diferente das observações desse estudo, DEPLAZES et al. (1995) e NIETO et al. (1999) verificaram predomínio de IgG1 em animais sintomáticos e de IgG2 em cães assintomáticos. Apesar das subclasses de IgG não se mostrarem como indicadores de susceptibilidade ou resistência à infecção, permitiram a diferenciação de cães clinicamente sadios daqueles infectados e assintomáticos, o que parece ser de grande valia quando da realização de inquéritos epidemiológicos ou da avaliação de animais em que outros métodos diagnósticos não possam ser utilizados, tais como o exame parasitológico direto.

Os valores individuais médios das densidades ópticas de IgG total, IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, dos cães hípidos de área não endêmica (controle), dos cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e dos cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático), encontram-se apresentados nos apêndices F a H.

Os únicos trabalhos existentes na literatura que avaliaram as subclasses de imunoglobulinas G em cães vacinados foram realizados pela equipe brasileira responsável pela produção da vacina contra leishmaniose visceral, tornando as informações muito escassas no tocante ao comportamento do fracionamento da IgG.

No presente ensaio as medianas das densidades ópticas de IgG total, IgG1 e IgG2 elevaram-se gradativamente com a realização das doses de vacina, atingindo seus valores mais altos 30 dias após o término do esquema vacinal, e declinando 180 dias após a primeira dose (tabela 2 e figura 2). Esses resultados corroboram os relatos de MENDES et al. (2003), os quais reportaram que o maior valor de absorvância da IgG total ocorreu após a aplicação da última dose da vacina.

Tabela 2. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, em 37 cães híidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da primeira (M0), da segunda (M1) e da terceira dose da vacina (M2), 90 dias (M3) e 180 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M4). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Momentos	IgG total		IgG1		IgG2	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
M0	0,130 ± 0,051	0,126 d	0,032 ± 0,028	0,026 c	0,096 ± 0,047	0,088 d
M1	0,226 ± 0,122	0,193 c	0,043 ± 0,043	0,032 c	0,160 ± 0,090	0,154 c
M2	0,377 ± 0,163	0,369 b	0,127 ± 0,116	0,094 b	0,267 ± 0,093	0,255 b
M3	0,737 ± 0,119	0,754 a	0,231 ± 0,198	0,163 a	0,435 ± 0,146	0,429 a
M4	0,359 ± 0,140	0,333 b	0,094 ± 0,071	0,073 b	0,241 ± 0,112	0,215 bc

Momentos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

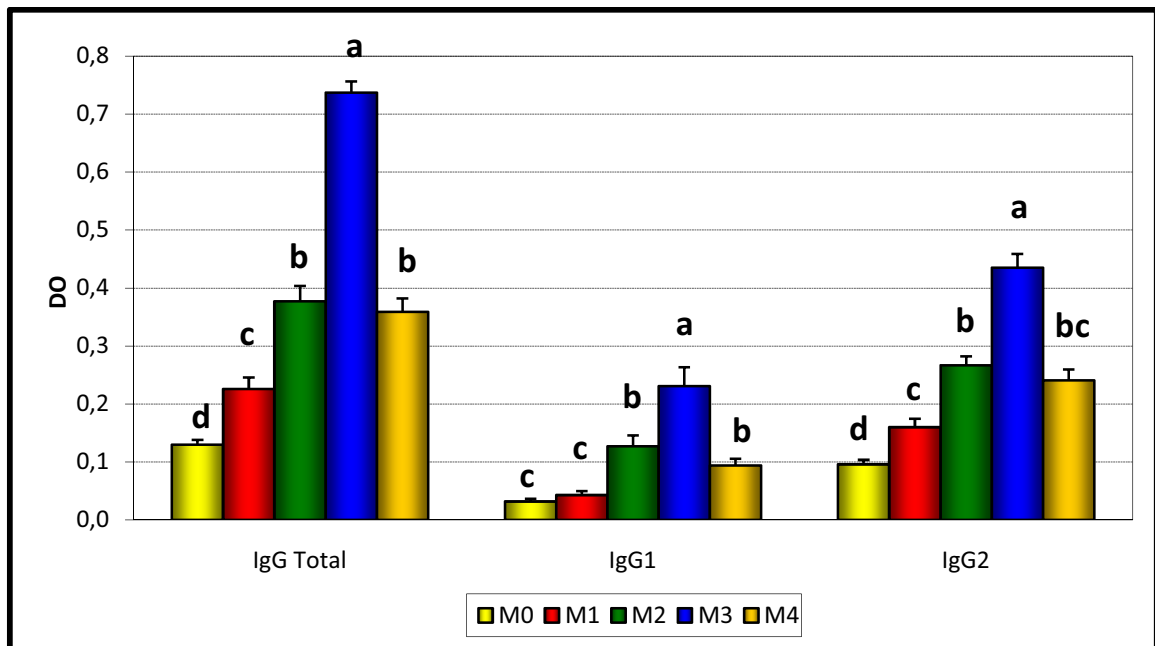


Figura 2. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2 em 37 cães hígdos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da primeira (M0), da segunda (M1) e da terceira dose da vacina (M2), 90 dias (M3) e 180 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M4). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Somente antes da aplicação da terceira dose da vacina (a partir de M2) é que se observou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao início do experimento (M0) nas medianas das densidades ópticas tanto de IgG total quanto de IgG1 e IgG2. Desta forma, optou-se por trabalhar com os valores de M3, por terem sido os que apresentaram a maior diferença com os do início do experimento (tabela 2 e figura 2).

No presente estudo, ao compararmos os momentos M0 e M3, foi possível verificar que apesar dos valores de IgG2 serem superiores aos de IgG1 em M3, proporcionalmente a elevação da IgG total ocorreu mais pela fração IgG1 (626%) do que pela subclasse IgG2 (427%). Esses dados discordam dos achados de MENDES et al. (2003), os quais relataram predomínio de IgG2 em animais vacinados. No entanto,

ao analisarmos os dados dos referidos autores, se compararmos os valores de IgG1 e IgG2 antes da imunização e após a terceira dose da vacina, é possível observar uma elevação proporcionalmente muito próxima das duas subclasses, IgG1 com aumento de 642% e IgG2 de 608%, em detrimento da elevação de IgG1 ter sido um pouco maior.

Apesar da comparação das densidades ópticas medianas de IgG total entre os grupos apresentar diferenças estatisticamente significativas, tanto os animais doentes quanto os vacinados (M3) possuíam densidade óptica média de IgG total maior que a do grupo controle. No entanto, os animais doentes tiveram valores superiores aos dos cães vacinados (tabela 3 e figura 3). Esses resultados discordam dos relatos de MENDES et al. (2003), que verificaram níveis similares de anticorpos IgG total entre os cães soropositivos naturalmente infectados e animais vacinados.

Com relação aos cães com leishmaniose visceral, observou-se um predomínio de IgG2 (tabela 3 e figura 3), discordando dos relatos de MENDES et al. (2003) que observaram concentrações séricas similares de IgG1 e IgG2 em animais infectados. Por outro lado, apesar dos cães vacinados apresentarem mediana de IgG2 superior à de IgG1, a análise dessas medianas em relação ao ponto de corte da reação evidencia que a estimulação das duas frações foi proporcionalmente similar, 236% e 237% para IgG1 e IgG2, respectivamente. Esses resultados discordam dos relatos de MENDES et al. (2003), que afirmaram haver um predomínio de IgG2 em animais vacinados. Entretanto, a comparação dos valores de IgG1 e IgG2 antes da imunização e após a terceira dose da vacina, obtidos por esses autores, revela que a elevação das duas subclasses foi proporcionalmente muito próxima, como verificado no presente estudo.

Tabela 3. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 c	0,032 \pm 0,019	0,027 c	0,110 \pm 0,036	0,109 c
Sintomático	1,166 \pm 0,110	1,162 a	0,069 \pm 0,036	0,062 b	0,773 \pm 0,137	0,779 a
Vacinado	0,737 \pm 0,119	0,754 b	0,231 \pm 0,198	0,163 a	0,435 \pm 0,146	0,429 b

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

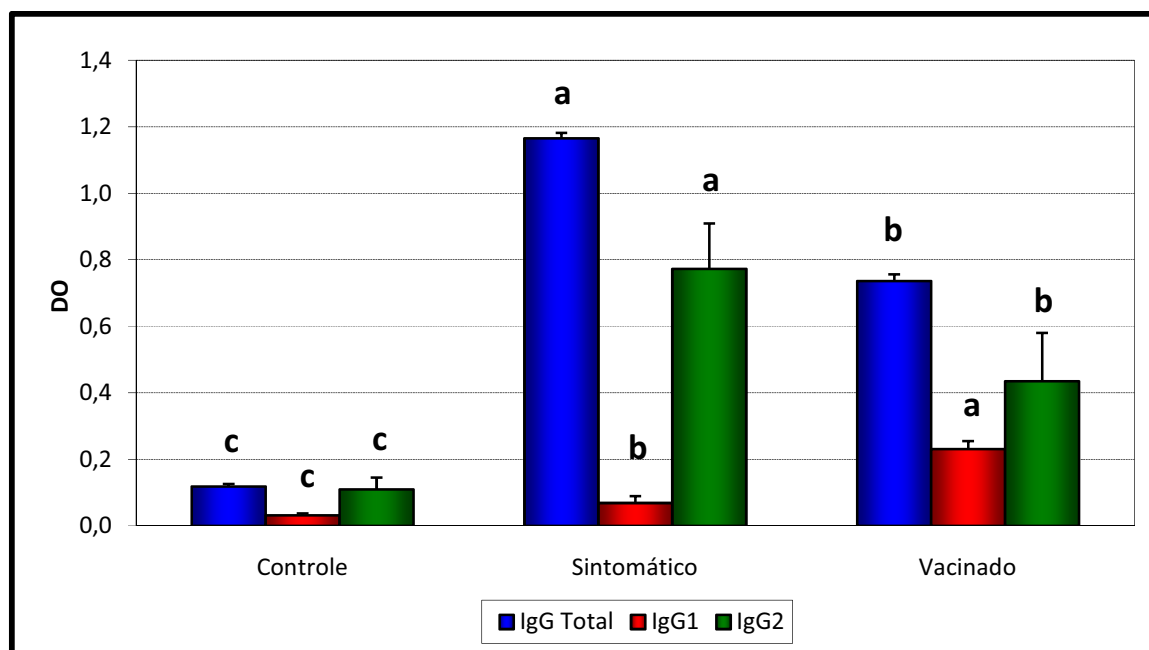


Figura 3. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 37 cães hígidos, 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Apesar das medianas de IgG1 e IgG2 diferenciarem estatisticamente animais vacinados de animais infectados, e ambos de animais hígidos, não é possível estabelecer um limite de elevação, a partir do qual seja possível distinguir cães doentes de animais vacinados, uma vez que a variabilidade dos resultados é muito grande.

De acordo com MENDES et al. (2003), a relação $IgG1/IgG2 \geq 1$ deve caracterizar a resposta de animais infectados por leishmaniose visceral evoluindo para uma doença evidente, enquanto $IgG1/IgG2 \leq 1$ caracteriza o perfil sérico de cães vacinados protegidos. Entretanto, não foi possível verificar essa correlação no presente ensaio, uma vez que os animais sintomáticos e os vacinados possuíam valores de 0,079 e 0,379, respectivamente.

Os valores individuais médios das densidades ópticas de IgG total, IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, dos cães hígidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral canina em cada momento de avaliação, dos cães hígidos de área não endêmica (controle) e de cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático), encontram-se apresentados nos apêndices I a M, F e G, respectivamente.

As densidades ópticas médias de IgG total dos animais assintomáticos e vacinados foram muito similares e apresentaram-se superiores às dos cães do grupo controle, não havendo, entretanto, diferença estatisticamente significativa entre elas (tabela 4 e figura 4). Esses resultados foram semelhantes aos observados por MENDES et al. (2003), que encontraram níveis de IgG total semelhantes entre cães vacinados e soropositivos, entretanto trabalhando com animais infectados sintomáticos.

Tabela 4. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 b	0,032 \pm 0,019	0,027 b	0,110 \pm 0,036	0,109 c
Assintomático	0,704 \pm 0,189	0,686 a	0,131 \pm 0,166	0,073 a	0,644 \pm 0,180	0,676 a
Vacinado	0,737 \pm 0,119	0,754 a	0,231 \pm 0,198	0,163 a	0,435 \pm 0,146	0,429 b

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

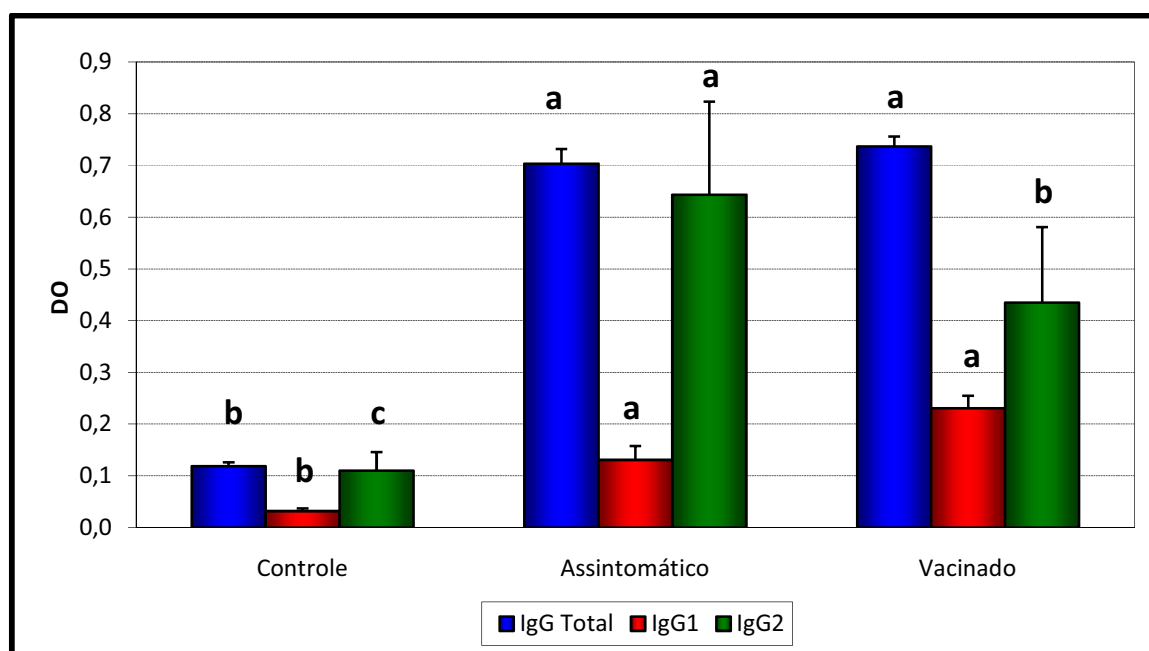


Figura 4. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hígidos, 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Com relação às frações de IgG, os cães assintomáticos apresentaram valores de mediana de IgG2 mais elevados que IgG1, havendo, nesse grupo de animais, um predomínio da subclasse IgG2 (tabela 4 e figura 4), discordando dos relatos de MENDES et al. (2003) que verificaram concentrações séricas similares de IgG1 e IgG2 em animais infectados. Uma possível explicação para essa discordância é que os referidos autores analisaram animais sintomáticos. Já os cães vacinados apresentaram mediana de IgG2 superior à de IgG1, no entanto com uma estimulação proporcional das duas frações de imunoglobulinas (tabela 4 e figura 4). Esses resultados discordam dos relatos de MENDES et al. (2003), que afirmaram haver um predomínio de IgG2 em animais vacinados. Entretanto, ao analisarmos os dados dos referidos autores, verificamos que os resultados do presente estudo corroboram seus achados, uma vez que a elevação das duas subclasses foi proporcionalmente muito semelhante.

As medianas de IgG1 não diferenciaram animais vacinados de cães assintomáticos, mas diferenciaram de animais hígidos (tabela 4 e figura 4). Apesar das medianas de IgG2 diferenciarem estatisticamente animais vacinados de cães infectados assintomáticos, e ambos de animais hígidos, a variabilidade dos resultados não permite estabelecer um limite de elevação a partir do qual é possível distinguir cães doentes assintomáticos de animais vacinados.

A comparação das relações IgG1/IgG2 dos animais assintomáticos e vacinados, apresentou valores de 0,108 e 0,379, respectivamente. Esses, discordam dos achados de MENDES et al. (2003), que relataram que uma relação $IgG1/IgG2 \geq 1$ é característica de animais doentes, enquanto $IgG1/IgG2 \leq 1$ caracteriza a resposta do soro de cães vacinados protegidos.

Os valores individuais médios das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, dos cães hígidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral canina em cada momento de avaliação, dos cães hígidos de área não endêmica (controle) e dos cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) encontram-se apresentados nos apêndices I a M, F e H, respectivamente.

A análise das densidades ópticas de IgG total dos animais submetidos a tratamento identificou uma diminuição das medianas ao longo do tempo, no entanto com valores acima do ponto de corte da reação (0,218) (tabela 5 e figura 5). Esses resultados concordam com os relatos de SOLANO-GALLEGO et al. (2001) e RODRÍGUEZ et al. (2006), os quais reportaram que a remissão dos sintomas normalmente acompanha uma diminuição no título de anticorpos (IgG), que podem permanecer detectáveis por um longo período de tempo.

Tabela 5. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio de ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, em 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0), aos 30 dias (M1), 60 dias (M2), 90 dias (M3) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoniato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Momentos	IgG total		IgG1		IgG2	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
M0	0,701 \pm 0,191	0,728 a	0,139 \pm 0,222	0,067 a	0,617 \pm 0,255	0,619 a
M1	0,639 \pm 0,215	0,626 a	0,109 \pm 0,203	0,030 ab	0,534 \pm 0,252	0,494 ab
M2	0,551 \pm 0,203	0,521 b	0,094 \pm 0,162	0,036 b	0,453 \pm 0,257	0,411 bc
M3	0,522 \pm 0,198	0,463 b	0,084 \pm 0,124	0,035 b	0,447 \pm 0,245	0,478 bc
M4	0,518 \pm 0,197	0,494 b	0,095 \pm 0,146	0,030 b	0,447 \pm 0,251	0,491 c

Momentos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

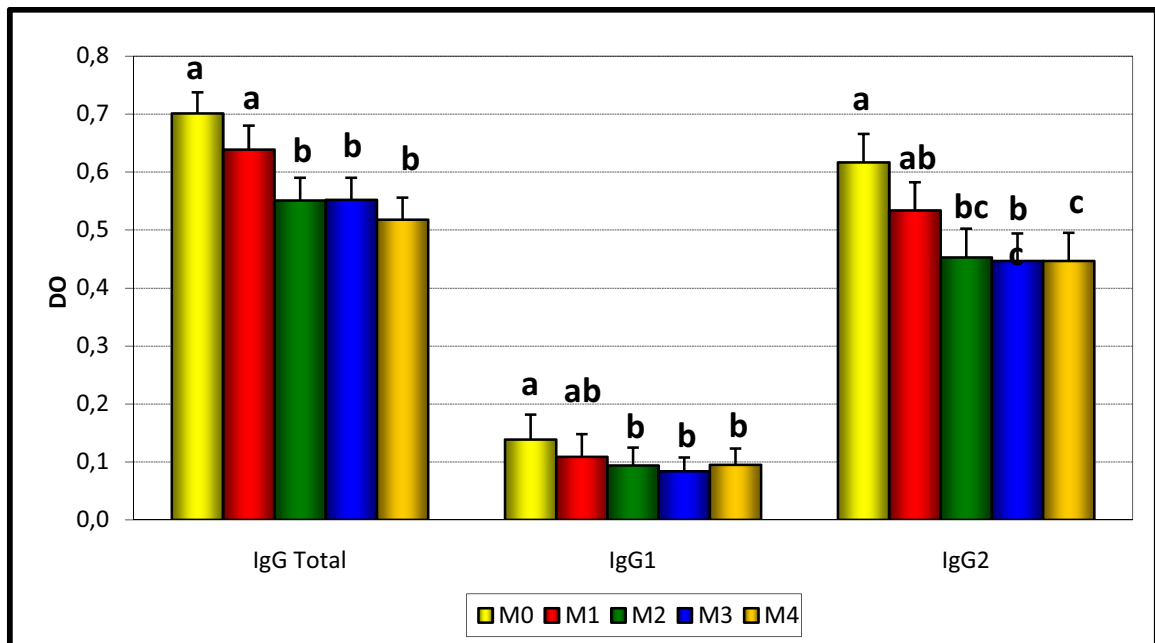


Figura 5. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2 em 27 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0), aos 30 dias (M1), 60 dias (M2), 90 dias (M3) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoniato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Apesar das medianas de IgG1 apresentarem-se abaixo do ponto de corte (0,069) em todos os momentos avaliados, o mais alto valor ocorreu no momento zero (M0), com uma diminuição de sua densidade óptica ao longo do tempo (tabela 5 e figura 5). Verificou-se uma diminuição de 55,22% entre o início do experimento e 180 dias após o início do mesmo, concordando com os achados de DEPLAZES et al. (1995) e SOLANO-GALLEGO et al. (2001), que identificaram uma diminuição das concentrações séricas de IgG1 após o tratamento e a melhora clínica. Entretanto, discordam de BOURDOISEAU et al. (1997), que afirmaram ocorrer uma elevação da concentração sérica de IgG1 ao longo do tempo.

No tocante às densidades ópticas de IgG2, apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas entre alguns momentos avaliados, as medianas apresentaram-se acima do ponto de corte (0,181) em todos os momentos estudados

(tabela 5 e figura 5). Observou-se uma diminuição de 20,86% entre o início do experimento e 180 dias após o início do mesmo, concordando com os relatos de BOURDOISEAU et al. (1997) e SOLANO-GALLEGO et al. (2001), que verificaram que nos animais submetidos a tratamento os títulos de IgG2 diminuem lentamente. Apesar da diminuição, os valores permaneceram acima do ponto de corte da reação (0,181), como observado por DEPLAZES et al. (1995) e CAVALIERO et al. (1999).

Somente a partir de 60 dias após o início do tratamento (M2) é que se observou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao momento inicial nas medianas das densidades ópticas de IgG total, IgG1 e IgG2. Para a comparação das subclasses entre os três grupos de cães optou-se por trabalhar com os valores de M4, por terem sido os que apresentaram a maior diferença em relação ao início do tratamento.

Mesmo após o tratamento os níveis séricos de IgG total permaneceram elevados (tabela 6 e figura 6) como observado por SOLANO-GALLEGO et al. (2001) e RODRÍGUEZ et al. (2006). Essa elevação na concentração sérica foi verificada também em cães infectados assintomáticos, corroborando os relatos de SOLANO-GALLEGO et al. (2001), ALMEIDA et al. (2005), INIESTA et al. (2005), REIS et al. (2006), DA COSTA-VAL et al. (2007) e RODRÍGUEZ-CORTÉS et al. (2007b). Deste modo, não é possível diferenciar cães infectados assintomáticos de cães infectados submetidos a tratamento por meio da determinação de IgG.

Tabela 6. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 b	0,032 \pm 0,019	0,027 b	0,110 \pm 0,036	0,109 c
Assintomático	0,704 \pm 0,189	0,686 a	0,131 \pm 0,166	0,073 a	0,644 \pm 0,180	0,676 a
Tratado	0,518 \pm 0,197	0,494 a	0,095 \pm 0,146	0,030 b	0,447 \pm 0,251	0,491 b

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

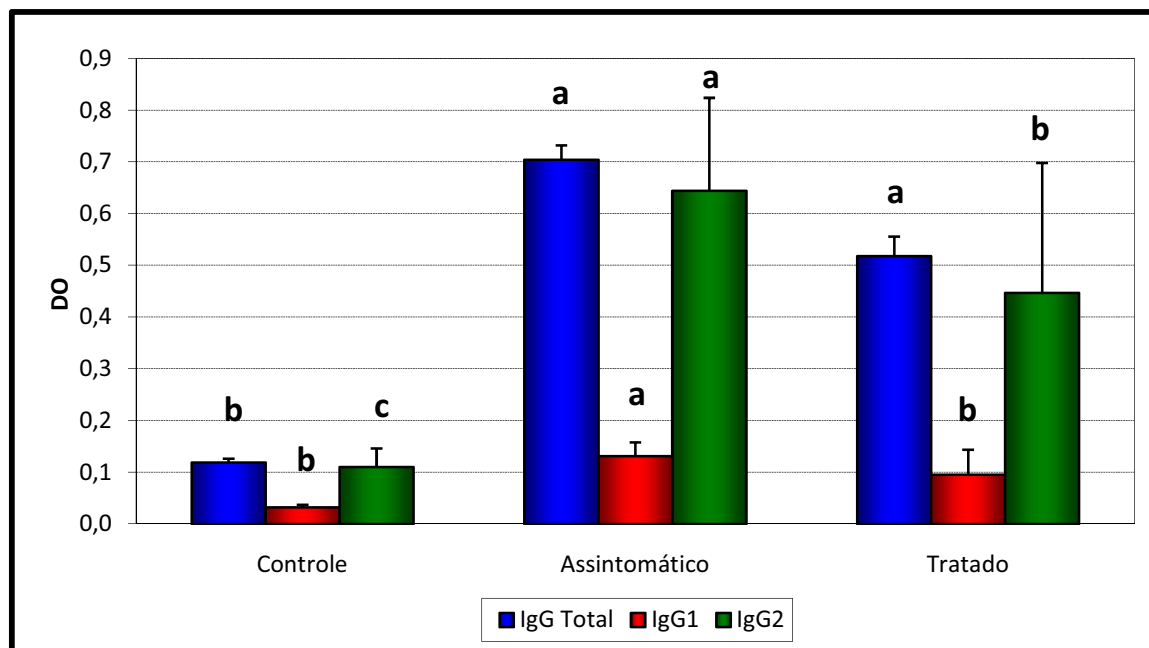


Figura 6. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

O grupo de cães infectados assintomáticos apresentou valores de mediana de IgG1 e IgG2 superiores aos de animais tratados (tabela 6 e figura 6), confirmando as afirmações de BOURDOISEAU et al. (1997), de que há elevação das concentrações de IgG1 e IgG2 nestes animais. No entanto, os cães submetidos a tratamento só puderam ser diferenciados dos hígidos quando da avaliação de IgG2 (tabela 6 e figura 6),.

Apesar das medianas de IgG1 e IgG2 dos cães assintomáticos e tratados possuírem diferenças estatisticamente significativas entre si (tabela 6 e figura 6), não parece ser possível diferenciar os dois tipos de cães devido à grande variabilidade dos resultados e pelo fato de que as duas subclasses apresentam valores acima do ponto de corte em ambos os grupos de animais.

Os valores individuais médios das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, dos cães portadores de leishmaniose visceral canina submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol, em cada momento de avaliação, dos cães hígidos de área não endêmica (controle), de cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático), encontram-se apresentados nos apêndices N a R, F e H, respectivamente.

O fator determinante da grande variabilidade de resultados dos estudos de duas subclasses de IgG encontra-se no tipo de anti-soro utilizado. Os trabalhos publicados na literatura foram desenvolvidos com anti-soros policlonais, vendidos como capazes de identificar IgG1 e IgG2. No entanto, ensaios realizados por DAY (2007) comprovaram que as subclasses detectadas por anticorpos policlonais não se equivalem à IgG1 e IgG2 determinadas quando se utilizam anticorpos monoclonais. O anti-soro policlonal não é subclasse específico, podendo reagir com as quatro subfrações.

Corroborando os relatos de SOLANO-GALLEGO et al. (2001), ALMEIDA et al. (2005), INIESTA et al. (2005), REIS et al. (2006), DA COSTA-VAL et al. (2007) e RODRÍGUEZ-CORTÉS et al. (2007b), os cães com quadro clínico decorrente de leishmaniose visceral apresentaram níveis de IgG total superiores àqueles infectados porém assintomáticos (tabela 7 e figura 7). Os animais com quadro clínico apresentam

uma resposta predominantemente humoral em detrimento da celular, justificando as maiores elevações neste grupo. No entanto, animais infectados, porém assintomáticos, apesar de supostamente desenvolverem resposta celular, possuem também elevações nos títulos de anticorpos, comprovados pelo aumento da IgG em relação ao grupo controle (tabela 7 e figura 7).

Tabela 7. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 c	0,054 \pm 0,028	0,052 c	0,105 \pm 0,048	0,102 b	0,036 \pm 0,026	0,026 b	0,022 \pm 0,009	0,022 b
Sintomático	1,166 \pm 0,110	1,162 a	1,709 \pm 0,453	1,677 a	0,249 \pm 0,143	0,206 a	1,263 \pm 0,446	1,242 a	0,479 \pm 0,187	0,431 a
Assintomático	0,704 \pm 0,189	0,686 b	1,044 \pm 0,370	1,065 b	0,153 \pm 0,056	0,157 a	0,023 \pm 0,012	0,019 b	0,023 \pm 0,016	0,018 b

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

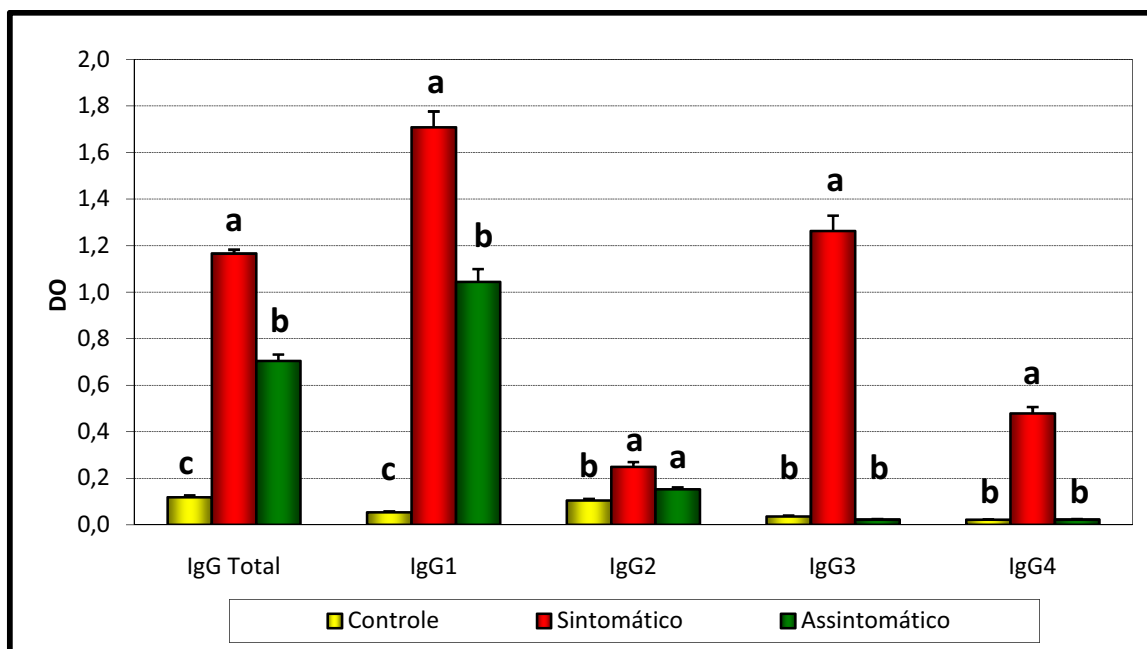


Figura 7. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígdos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Nos animais hígdos a IgG2 foi a fração predominante, fato que não foi observado em nenhum dos dois grupos de cães com leishmaniose visceral, nos quais a fração predominante foi a IgG1 (tabela 7 e figura 7).

Apesar de ter sido verificada diferença estatisticamente significativa entre cães do grupo controle e animais portadores de leishmaniose visceral no que tange à densidade óptica mediana de IgG2, os cães assintomáticos possuíram densidade óptica abaixo do ponto de corte da reação (0,202) e os sintomáticos apresentaram uma elevação muito discreta (tabela 7 e figura7). Desta forma não é possível diferenciar cães hígdos de cães infectados por meio desta subclasse.

Ao analisarmos o ponto de corte da reação, observamos que o grupo sintomático apresentou estimulação de todas as subclasses de IgG, com aumento

predominantemente de IgG1, seguido de IgG3, IgG4 e IgG2 (tabela 7 e figura 7), corroborando os relatos de QUINNELL et al. (2003). Estes resultados são semelhantes aos observados por ANAM et al. (1999a) em seres humanos no Sudão, mas discordam dos achados de ELASSAD et al. (1994) e GHOSH et al. (1995), que verificaram concentrações séricas decrescentes de IgG3 e IgG4 em pacientes humanos sudaneses e de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em pacientes indianos, respectivamente. Por outro lado, no grupo assintomático a única fração estimulada acima do ponto de corte foi a IgG1, confirmando os achados de QUINNELL et al. (2003).

Os valores individuais médios das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, determinados por meio de anticorpos monoclonais, dos cães hípidos de área não endêmica (controle), dos cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e dos cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático), encontram-se apresentados nos apêndices X a AA.

Os resultados do presente ensaio permitiram verificar que 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina todas as variáveis analisadas (IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao momento inicial, corroborando os relatos de MENDES et al. (2003), que reportaram elevação dos valores de absorvância de IgG total após o término do esquema vacinal. Apesar do aumento de todas as subclasses estudadas, a IgG2 apresentou valores de mediana abaixo do ponto de corte (0,202) mesmo após a soroconversão (tabela 8 e figura 8). As subclasses mais estimuladas em decorrência da vacinação foram a IgG1 e a IgG3 (tabela 8 e figura 8).

Tabela 8. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio de ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 37 cães hígdios submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da aplicação da primeira dose da vacina (M0) e 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M3). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Variável	M0		M3		P ⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	
IgG total	0,130 ± 0,051	0,126	0,737 ± 0,119	0,754	< 0,0001
IgG1	0,052 ± 0,021	0,044	0,889 ± 0,372	0,813	< 0,0001
IgG2	0,121 ± 0,042	0,119	0,164 ± 0,070	0,166	< 0,0001
IgG3	0,030 ± 0,018	0,027	0,499 ± 0,355	0,497	< 0,0001
IgG4	0,016 ± 0,009	0,015	0,167 ± 0,155	0,138	< 0,0001

⁽¹⁾ valor descritivo do teste não paramétrico de Wilcoxon (p<0,05)

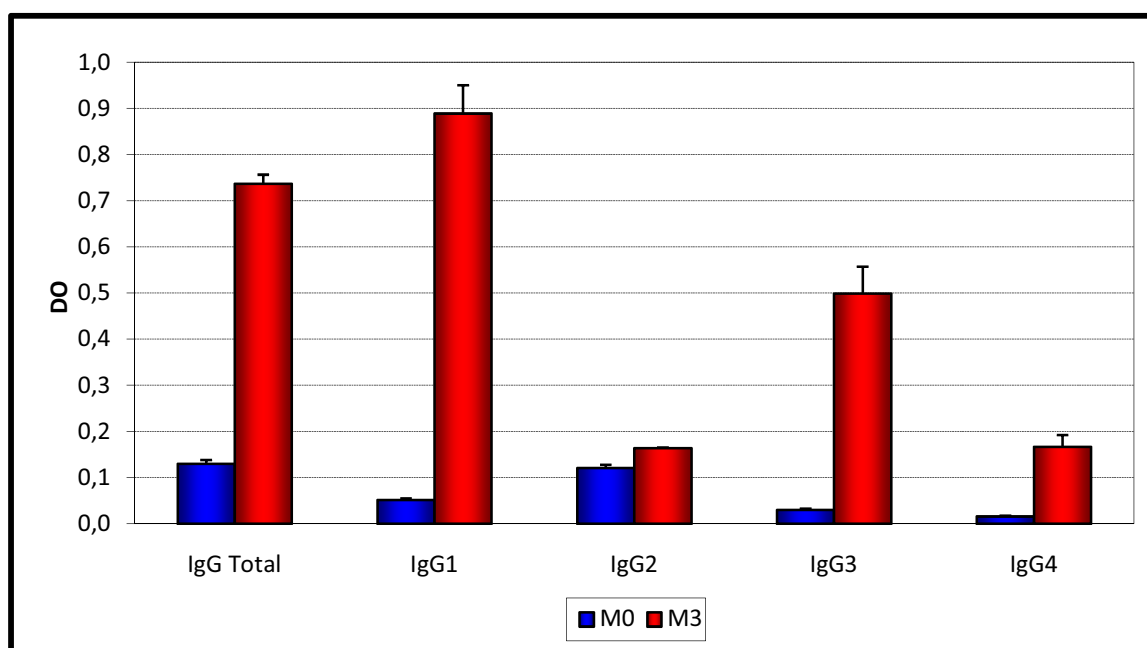


Figura 8. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 37 cães hígdios submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, antes da aplicação da primeira dose da vacina (M0) e 90 dias após a aplicação da primeira dose da vacina (M3). (Unesp – Jaboticabal - SP, 2009).

Apesar de terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre cães vacinados e animais sintomáticos no que diz respeito à IgG total, IgG1, IgG3 e

IgG4, nos dois grupos de cães houve uma elevação acima dos respectivos pontos de corte (tabela 9 e figura 9). Desta forma, não foi possível diferenciar um cão vacinado que tenha sintomas de qualquer outra enfermidade, de um animal naturalmente infectado por *Leishmania chagasi* com quadro clínico da doença. A IgG2 também não permitiu diferenciação entre os grupos uma vez que as medianas das densidades ópticas de cães sintomáticos e de cães vacinados não apresentam diferenças estatisticamente significativa (tabela 9 e figura 9). No presente ensaio a IgG1 apresentou maior estimulação do que a IgG2, tanto em cães sintomáticos quanto em animais vacinados (tabela 9 e figura 9), discordando dos resultados de MENDES et al. (2003), que trabalhando com anticorpos policlonais descreveram que a elevação de IgG1 está associada à infecção natural e de IgG2 à vacinação.

Tabela 9. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 c	0,054 \pm 0,028	0,052 c	0,105 \pm 0,048	0,102 b	0,036 \pm 0,026	0,026 c	0,022 \pm 0,009	0,022 c
Sintomático	1,166 \pm 0,110	1,162 a	1,709 \pm 0,453	1,677 a	0,249 \pm 0,143	0,206 a	1,263 \pm 0,446	1,242 a	0,479 \pm 0,187	0,431 a
Vacinado	0,737 \pm 0,119	0,754 b	0,889 \pm 0,372	0,813 b	0,164 \pm 0,070	0,166 a	0,499 \pm 0,355	0,497 b	0,167 \pm 0,155	0,138 b

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

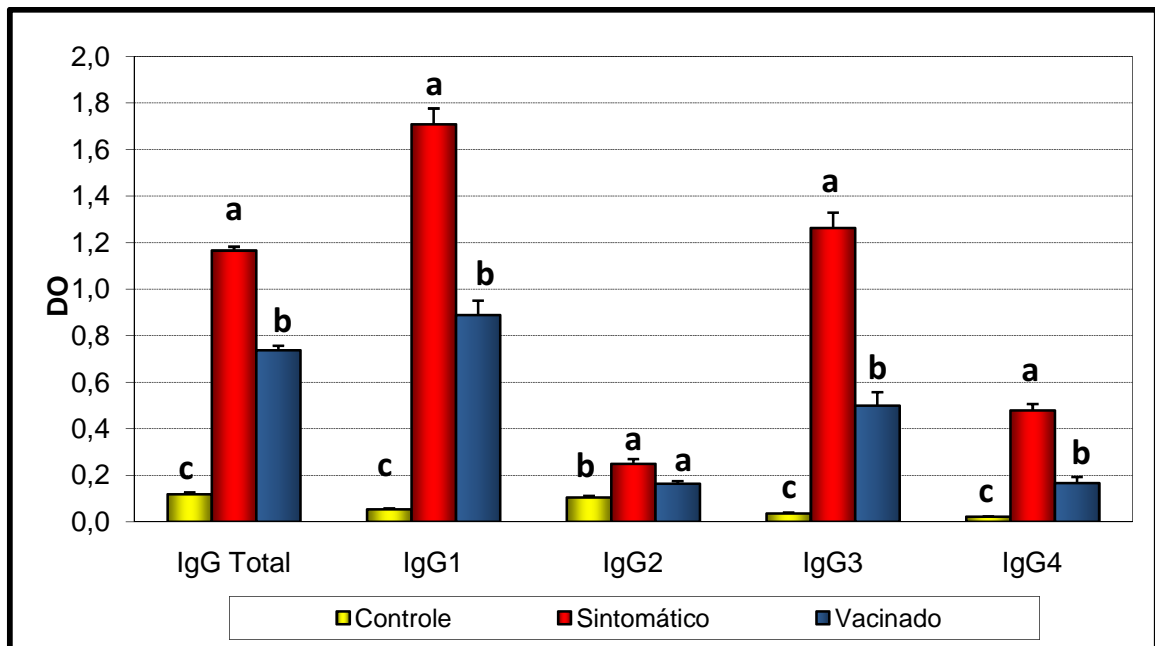


Figura 9. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Nos animais vacinados a subclasse predominante foi a IgG1, seguida da IgG3, IgG2 e, finalmente, IgG4. Nos animais com quadro clínico decorrente de leishmaniose visceral a subclasse predominante foi IgG1, seguida da IgG3, IgG4 e IgG2 (tabela 9 e figura 9), corroborando os achados de QUINNELL et al. (2003), em estudos com cães sintomáticos portadores de leishmaniose visceral.

A discrepância dos resultados observados por MENDES et al. (2003) com os do presente estudo, no que diz respeito à IgG1 e à IgG2, são decorrentes do tipo de anticorpo utilizado. Enquanto os anticorpos monoclonais são mais sensíveis e específicos, os policlonais podem reagir com mais de uma subclasse de imunoglobulina (DAY, 2007).

Os valores individuais médios das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, determinados por meio de anticorpos

monoclonais, dos cães hípidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral canina em dois momentos de avaliação, dos cães hípidos de área não endêmica (controle) e dos cães sintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (sintomático), encontram-se apresentados nos apêndices BB e CC, X e Z, respectivamente.

Cães vacinados e cães assintomáticos apresentaram uma elevação dos níveis de IgG total e IgG1 acima do ponto de corte (0,218 e 0,110, respectivamente), não se observando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (tabela 10 e figura 10). Dessa forma, não foi possível, através da IgG total e da subclasse IgG1, diferenciar um cão vacinado contra leishmaniose visceral de um animal naturalmente infectado por *Leishmania chagasi* sem quadro clínico da doença. A subclasse IgG2 também não permitiu diferenciação entre os grupos, uma vez que as medianas das densidades ópticas de animais assintomáticos e vacinados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (tabela 10 e figura 10). Os resultados obtidos neste estudo discordam dos relatos de MENDES et al. (2003), os quais, utilizando anticorpos policlonais, verificaram haver um predomínio de IgG2 em animais vacinados.

Tabela 10. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 b	0,054 \pm 0,028	0,052 b	0,105 \pm 0,048	0,102 b	0,036 \pm 0,026	0,026 b	0,022 \pm 0,009	0,022 b
Assintomático	0,704 \pm 0,189	0,686 a	1,044 \pm 0,370	1,065 a	0,153 \pm 0,056	0,157 a	0,023 \pm 0,012	0,019 b	0,023 \pm 0,016	0,018 b
Vacinado	0,737 \pm 0,119	0,754 a	0,889 \pm 0,372	0,813 a	0,164 \pm 0,070	0,166 a	0,499 \pm 0,355	0,497 a	0,167 \pm 0,155	0,138 a

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

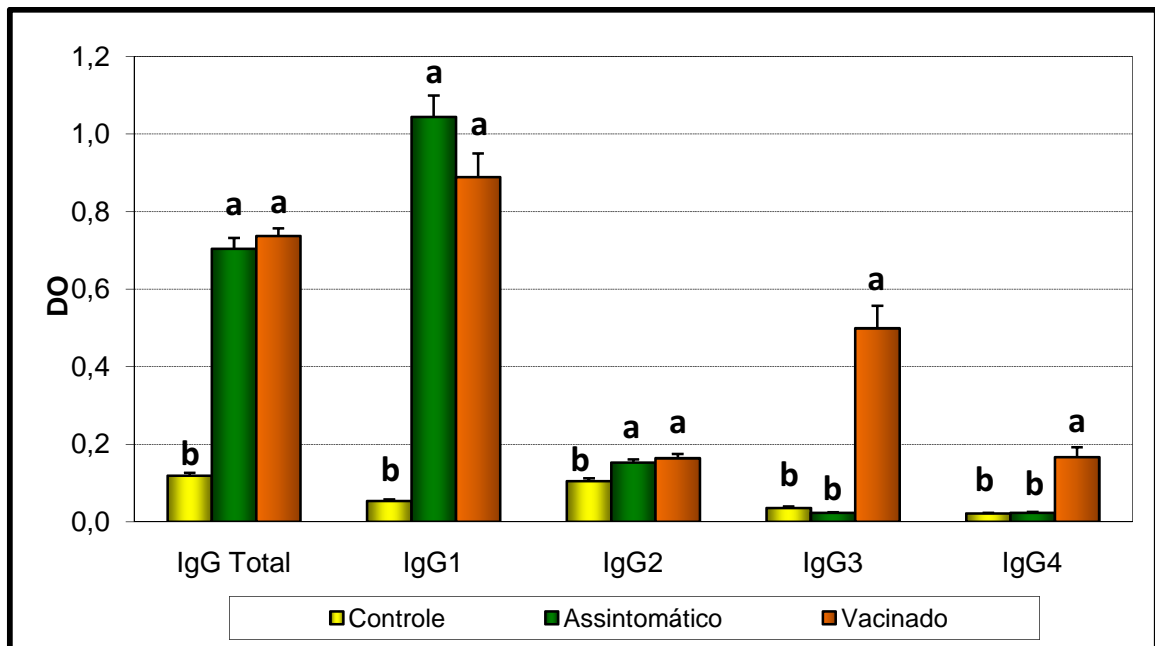


Figura 10. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 37 cães hígidos 90 dias após receberem a primeira dose de vacina contra leishmaniose visceral (vacinado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Por outro lado, as subclasses IgG3 e IgG4 permitiram diferenciar os animais dos dois grupos (tabela 10 e figura 10), pois os animais vacinados tiveram uma elevação das duas subfrações, enquanto os cães assintomáticos não apresentaram estimulação das mesmas, corroborando os relatos de QUINNELL et al. (2003), que afirmaram que em animais assintomáticos acometidos por leishmaniose visceral a única subclasse detectada é a IgG1.

No presente ensaio a IgG1 apresentou uma maior estimulação em relação à IgG2, tanto em cães assintomáticos quanto em animais vacinados (tabela 10 e figura 10), discordando dos resultados de MENDES et al. (2003) que, trabalhando com anticorpos policlonais, descreveram que a estimulação de IgG1 está associada à

infecção natural, enquanto a elevação da fração IgG2 correlaciona-se com estímulo pós-vacinal.

Nos animais vacinados a subclasse predominante foi a IgG1, seguida da IgG3, IgG2 e IgG4 (tabela 10 e figura 10). Nos animais assintomáticos a única subclasse estimulada foi a IgG1, corroborando os achados de QUINNELL et al. (2003).

Os resultados obtidos no presente estudo com a utilização de anticorpos monoclonais foram divergentes dos que utilizaram anticorpos policlonais. Os anticorpos policlonais não são subclasse específica, em virtude de serem produzidos por vários clones de linfócitos B. Isto pode explicar também as grandes divergências encontradas na literatura, uma vez que ao utilizar estes anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2, existe a possibilidade deles reagirem com as quatro subfrações. Por outro lado, a utilização de anticorpos monoclonais na determinação das subclasses de IgG fornece resultados mais confiáveis devido à sua elevada especificidade e pureza.

Os valores individuais médios das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, determinados por meio de anticorpos monoclonais, dos cães hípidos submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral canina em dois momentos de avaliação, dos cães hípidos de área não endêmica (controle) e dos cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) encontram-se apresentados nos apêndices BB e CC, X e AA.

No presente ensaio pudemos observar que 180 dias após o início do tratamento todas as variáveis estudadas, com exceção da IgG2, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao momento inicial (tabela 11 e figura 11). Os resultados da IgG total corroboram os achados de CHATTERJEE et al, (1998), ANAM et al. (1999b) e DA MATTA et al. (2000), os quais reportaram que após o tratamento de seres humanos houve uma redução das concentrações séricas de IgG total e também com os relatos de RODRÍGUEZ et al. (2006), os quais citam que a remissão dos sintomas costuma vir acompanhada de uma diminuição acentuada no título de anticorpos (IgG), os quais, entretanto, permanecem detectáveis por um longo período de tempo. Esses resultados entretanto, discordam dos relatos de ELASSAD et al.

(1994), os quais avaliando a resposta de humanos com leishmaniose visceral submetidos à tratamento, não observaram alteração nos títulos de IgG total.

A observação dos valores das quatro subclasses de IgG nos dois momentos de avaliação (M0 e M4) demonstrou uma redução das densidades ópticas médias de M0 para M4, sendo que as frações IgG1 e IgG3 foram as que apresentaram as maiores porcentagens de redução (tabela 11 e figura 11). Esses resultados concordam com os relatos de ELASSAD et al. (1994) e RAVINDRAN et al. (2004), os quais verificaram diminuição das frações IgG1, IgG3 e IgG4 após o tratamento de seres humanos com leishmaniose visceral. Porém, discordam em parte dos relatos de CHATTERJEE et al, (1998), que além da subclasse IgG1 observaram também diminuição da fração IgG2; e de ANAM et al. (1999b) e DA MATTA et al. (2000), os quais relataram que após o tratamento a fração IgG4 foi a que apresentou maior redução.

Tabela 11. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoniato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Variável	M0		M4		P ⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm s$	Md	$\bar{x} \pm s$	Md	
IgG total	0,701 ± 0,191	0,728	0,518 ± 0,197	0,494	< 0,0001
IgG1	1,744 ± 0,740	1,755	1,058 ± 0,589	0,944	0,0001
IgG2	0,137 ± 0,124	0,101	0,116 ± 0,079	0,095	0,6148
IgG3	1,114 ± 0,689	1,129	0,664 ± 0,507	0,582	0,0006
IgG4	0,454 ± 0,391	0,310	0,196 ± 0,113	0,198	0,0009

⁽¹⁾ valor descritivo do teste não paramétrico de Wilcoxon (p<0,05)

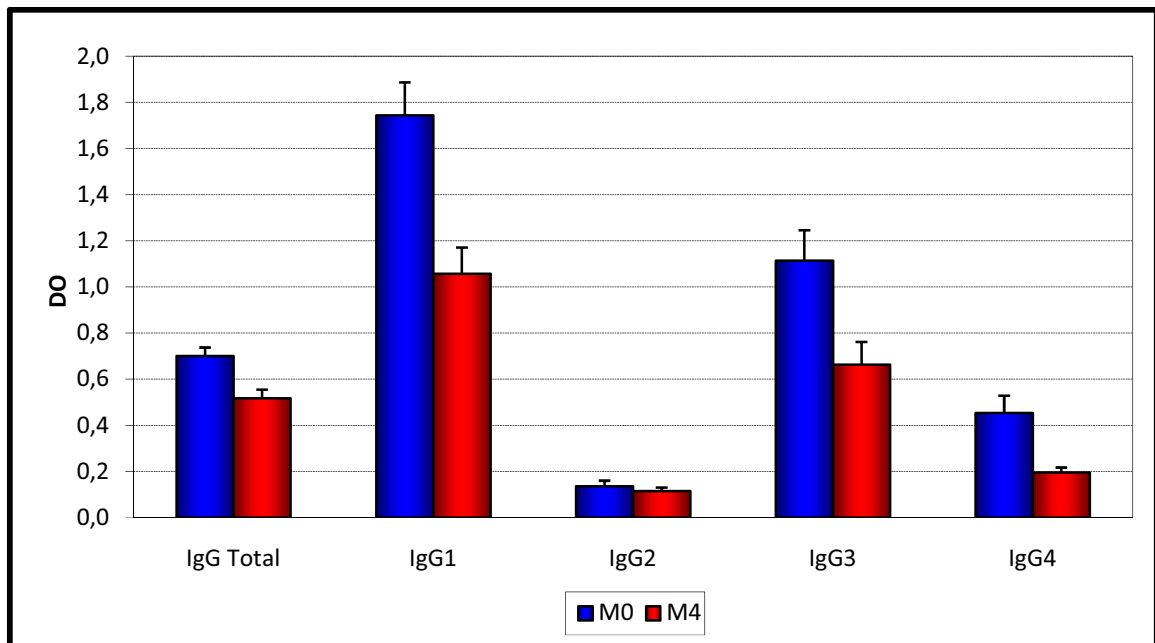


Figura 11. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina, antes do início do tratamento (M0) e 180 dias após o início do tratamento (M4) com antimoníato de meglumina e alopurinol. (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

No que diz respeito à IgG total e IgG1, apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre cães tratados e animais assintomáticos (tabela 12 e figura 12), nos dois grupos de cães houve uma elevação acima dos respectivos pontos de corte. Desta forma, não é possível através da IgG total e da subclasse IgG1 diferenciar estes dois grupos de animais. Quanto à IgG2 não foi possível diferenciar os dois grupos de cães uma vez que as medianas das densidades ópticas de animais assintomáticos e de cães tratados apresentaram valores abaixo do ponto de corte da reação (tabela 12 e figura 12). Por outro lado, as subclasses IgG3 e IgG4 permitiram diferenciar os animais destes dois grupos (tabela 12 e figura 12), já que os cães tratados possuem elevação destas duas subfrações e os animais assintomáticos não apresentam estimulação destas subclasses, corroborando os relatos de QUINNELL et al. (2003).

Tabela 12. Média (\bar{x}), desvio-padrão (s) e mediana (Md) das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Grupos	IgG total		IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md	$\bar{X} \pm s$	Md
Controle	0,119 \pm 0,049	0,123 b	0,054 \pm 0,028	0,052 b	0,105 \pm 0,048	0,102 b	0,036 \pm 0,026	0,026 b	0,022 \pm 0,009	0,022 b
Assintomático	0,704 \pm 0,189	0,686 a	1,044 \pm 0,370	1,065 a	0,153 \pm 0,056	0,157 a	0,023 \pm 0,012	0,019 b	0,023 \pm 0,016	0,018 b
Tratado	0,518 \pm 0,197	0,494 a	1,058 \pm 0,589	0,944 a	0,116 \pm 0,079	0,095 b	0,664 \pm 0,507	0,582 a	0,196 \pm 0,113	0,198 a

Grupos seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

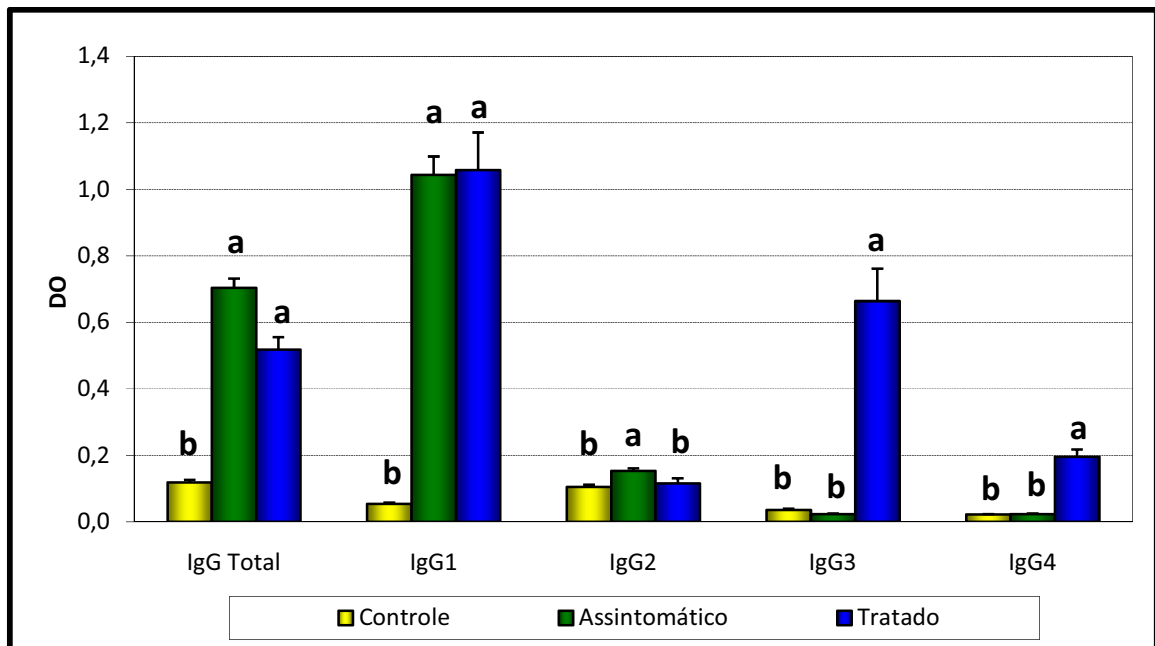


Figura 12. Valores da média e erro-padrão da média das densidades ópticas obtidas em ensaio ELISA indireto de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de 45 cães hígidos de área não endêmica (controle), 45 cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático) e 27 cães portadores de leishmaniose visceral canina 180 dias após o início do tratamento para a doença (tratado). (Unesp - Jaboticabal - SP, 2009).

Nos animais submetidos a tratamento a subclasse predominante foi a IgG1, seguida da IgG3, IgG4 e finalmente IgG2 (tabela 12 e figura 12). Nos animais sem quadro clínico decorrente de leishmaniose visceral a única subclasse estimulada foi IgG1 (tabela 12 e figura 12), corroborando os achados de QUINNELL et al. (2003), em estudos com cães assintomáticos portadores de leishmaniose visceral.

Os valores individuais médios das densidades ópticas de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, determinados por meio de anticorpos monoclonais, dos cães portadores de leishmaniose visceral canina submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol, em dois momentos de avaliação, dos cães hígidos de área não endêmica (controle), dos cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral canina (assintomático), encontram-se apresentados nos apêndices DD e EE, X e AA, respectivamente.

7. CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos nas condições do presente experimento permitiram as seguintes conclusões:

- as subclasses de IgG, determinadas por meio de anticorpos policlonais, não são indicadores de susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* sp.;

- as subclasses de IgG, determinadas por meio de anticorpos policlonais, permitem a diferenciação entre cães hígidos e cães assintomáticos portadores de leishmaniose visceral;

- os níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, de cães portadores de leishmaniose visceral com quadro clínico da doença, e de cães submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral, são superiores aos observados em cães hígidos;

- as subclasses de imunoglobulina G, determinadas por meio de anticorpos policlonais, não diferenciam cães vacinados contra leishmaniose visceral de cães infectados sintomáticos, uma vez que em ambos ocorre uma elevação de IgG1 e IgG2 acima do ponto de corte da reação;

- os níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, não diferenciam cães vacinados contra leishmaniose visceral de cães assintomáticos naturalmente acometidos pela doença;

- a determinação de IgG total não permite distinguir cães assintomáticos portadores de leishmaniose visceral de cães infectados submetidos a tratamento para a doença;

- apesar de diferenças estatisticamente significativas entre os níveis séricos de IgG1 e IgG2, determinados por meio de anticorpos policlonais, em cães assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, e em cães infectados submetidos a tratamento, essas subclasses de imunoglobulina G não permitem diferenciar esses animais;

- cães portadores de leishmaniose visceral com quadro clínico apresentam elevação de IgG total mais significativa do que a observada em cães assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp.;

- a IgG1, determinada por meio de anticorpo monoclonal, encontra-se elevada em cães com leishmaniose visceral independente da presença de sintomas da doença;

- os níveis séricos de IgG2, determinados por meio de anticorpos monoclonais, não permitem diferenciar cães hígidos de animais infectados por *Leishmania chagasi*;

- IgG3 e IgG4, determinadas por meio de anticorpos monoclonais, encontram-se elevadas apenas em cães sintomáticos portadores de leishmaniose visceral, permitindo diferenciá-los de cães infectados assintomáticos e de cães hígidos;

- a única subclasse de imunoglobulina G determinada por meio de anticorpos monoclonais, que permite diferenciar cães infectados por *Leishmania* sp. sem quadro clínico de cães hígidos, é a IgG1;

- a avaliação das quatro subclasses de IgG determinadas por meio de anticorpos monoclonais, não permite diferenciar cães vacinados contra leishmaniose visceral de cães naturalmente infectados com quadro clínico da doença;

- as subclasses IgG1 e IgG2, determinadas por meio de anticorpos monoclonais, não permitem diferenciar cães vacinados contra leishmaniose visceral de cães assintomáticos naturalmente acometidos pela doença;

- as subclasses IgG3 e IgG4, determinadas por meio de anticorpos monoclonais, permitem diferenciar cães vacinados contra leishmaniose visceral de cães assintomáticos naturalmente acometidos pela doença;

- o fracionamento da IgG em quatro subclasses por meio de anticorpos monoclonais, permite diferenciar cães portadores de leishmaniose visceral submetidos a tratamento de animais assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp., uma vez que cães submetidos a tratamento apresentam elevação das quatro subclasses de IgG, e animais assintomáticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral só apresentam estimulação da fração IgG1.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.106, n.1-2, p.151-58, 2005.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZI, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.88, n.4, p.371-378, 1994.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S.K.; GOSWAMI, R.P.; GUPTA, P.N.; SAHA, S.K.; ALI, N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in indian kala-azar patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.2, p.231-235, 1999a.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S.K.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, S.K.; ALI, N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. **Infection and Immunity**, v.67, n.12, p.6663-6669, 1999b.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.685-698.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.4, p.315-324, 2002.

BARBIÉRI, C.I. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, n.7, p.329-337, 2006.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E.M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v.420, n.6915, p.502-507, 2002.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.H.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L. Atypical Forms of Canine Leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v.162, n.2, p.108-120, 2001.

BOCETA, C.; ALONSO, C.; JIMÉNEZ-RUIZ, A. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.22, n.2, p.55-62, 2000.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.59, n.1-2, p.21-30, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.120p.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jul. 2008. Seção 1, p. 37.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.D.F.H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J.N.M.; RODRIGUES, M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, n.1-2, p.35-41, 2007.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, n.4, p.330-334, 1999.

CHATTERJEE, M.; BASU, K.; BASU, D.; BANNERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S.K.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, S.K.; MANDAL, C. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian Kala-azar patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v.114, n.3, p.408-413, 1998.

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, 2003.

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

CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CARDOSO, L.; ARAÚJO, N.; CASTRO, H.; TOMÁS, A.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M.; VERGNES, B.; SERENO, D.; OUAISSI, A. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein

homologue during canine natural infections: pathological implications. **Immunology Letters**, v.86, n.2, p.155-162, 2003.

DA COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v.174, n.3, p.636-643, 2007.

DA MATTA, V.L.R.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIETZE, R.; CORBETT, C.E.P. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of american visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.14, n.1, p.5-12, 2000.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune[®] vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, v.141, n.1-2, p.1-8, 2006.

DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATINIK DE SOUZA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v.19, n.9-10, p.1082-1092, 2000.

DAY, M.J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n.1-2, p. 2-8, 2007.

DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU, G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). **Journal of Veterinary International Medicine**, v.13, n.5, p.413-415, 1999.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and others parasites. **Parasite Immunology**, v.17, n.9, p.451-458, 1995.

ELASSAD, A.M.S.; YOUNIS, S.A.; SIDDIG, M.; GRAYSON, J.; PETERSEN, E.; GHALIB, H.W. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in sudanese visceral leishmaniasis patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v.95, n.2, p.294-299, 1994.

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.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L. Canine Leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8., 2002, GRANADA. **Proceedings....** Disponível em:

<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653>

Acesso em: 17 mar. 2004.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Kirk's current veterinary therapy XI.**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. p.266-270.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update.** Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. p.6-10.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GHOSH, A.K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A.C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.2, n.3, p.291-296, 1995.

GINEL, P.J.; LUCENA, R.; LÓPEZ, R.; MOLLEDA, J.M. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.39, n.6, p.271-274, 1998.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Medical and Veterinary Entomology**, v.1, n.4, p.339-342, 1987.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, n.1, p.59-72, 1989.

IKEDA, F.A. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento**. Botucatu, 2004. 180f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2004.

IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; LIMA, V.M.F.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*

submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p. 254-259, 2007.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.119, n.3-4, p.189-197, 2007.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, p.77-81, 2005.

JERONIMO, S.M.B.; SOUSA, A.Q.; PEARSON, R.D. Leishmaniose. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Tratado de medicina interna**, 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.2434-2441.

JÜTTNER, C.; RODRÍGUEZ SANCHEZ, M.; ROLLÁN LANDERAS, E.; SLAPPENDEL, R.J.; FRAGÍO ARNOLD, C. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.149, n.6, p.176-179, 2001.

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from a (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain, **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 12 - 17.

LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; SOTTO, M.N.; SINHORINI, I.L.; GOTO, H. The role of complement in the acute inflammation process in the skin and in the host-parasite interaction in hamster inoculated with *L. (L.) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v.77, n.1, p.15-24, 1996.

LAURENTI, M.D.; LARANGEIRA, D.F.; TOMOKANE, T.Y.; RIZZARDI, R.L.; IBARRA, M.C.F.; SECUNDINO, N.F.C.; ROSSI, C.N.; IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M.;

PIMENTA, P.F.P.; CORBETT, C.E.P. Evaluation of the humoral and cellular immune response in dogs naturally infected with *L. (L.) infantum chagasi* and its correlations on the parasite transmissibility to the vector. In: Improving Control of Pathogens in the tropics - IV Biennial Netropica Meeting, 2007, La Ceiba - Honduras. Improving Control of Pathogens in the tropics - IV Biennial Netropica Meeting, 2007. p.60-61.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RIÇA CAPELA, M.J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, n.3-4, p.273-284, 2001.

LEISHMUNE. Manual técnico de leishmaniose visceral canina. Campinas: Fort Dodge, [2004]. 52p.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, n.3, p.237-246, 1999.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., 2004. **Anais...Ouro Preto**, 2004.

MENDES, C.O.; DE SOUZA, E.P.; BORJA-CABRERA, G.P.; BATISTA, L.M.M.; DOS SANTOS, M.A.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; DE SOUSA, C.B.P. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. **Vaccine**, v.21, n.19-20, p.2589-2597, 2003.

MENDES, W.S.; DA SILVA, A.A.M.; TROVÃO, J.R.; DA SILVA, A.R.; COSTA, J.M.L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.3, p.227-231, 2002.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.67-83.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D.C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, n.3-4, p.181-195, 1999.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W. Two types of murine helper T cell clone. **The Journal of Immunology**, v.136, n.7, p.3248-2357, 1986.

NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.67, n.2, p.117-130, 1999.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DeI REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral

leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.91, n.2, p.161-168, 2003.

RAVINDRAN, R.; ANAM, K.; BAIRAGI, B.C.; SAHA, B.; PRAMANIK, N.; GUHA, S.K.; GOSWAMI, R.P.; BANERJEE, D.; ALI, N. Characterization of Immunoglobulin G and its subclass response to Indian Kala-azar infections before and after chemotherapy. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.863-870, 2004.

REED, S.G.; SHREFFLER, W.G.; BURRNS, J.M.; SCOTT JUNIOR, J.M.; ORGE, M.G.; GHALIB, H.W.; SIDDIG, M.; BADARÓ, R. An improved serodiantic procedure for visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.6, p.632-639, 1990.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CÔRREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, n.3-4, p.102-116, 2006.

REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.214-240.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.3, n.11, p.13-14, 1997.

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

RODRÍGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; OJEDA, A.; QUINTANA, J.; RIERA, C.; GÁLLEGO, N.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n.3, p.495-498, 2006.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; FERNÁNDEZ-BELLÓN, H.; RAMIS, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.116, n.3-4, p.190-198, 2007a.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.6, p.683-693, 2007b.

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

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; PAIVA, H.M.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v.12, n.3, p.315-317, 1998.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p. Disponível em:< www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_vis/LVA24ago03.pdf>. Acesso em 15 de mar. 2004.

SAS Institute Inc. **SAS OnlineDoc**[®]. Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SCOTT, D.W.; WILLIAM, H.M.; GRIFFIN, G.E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. In:____. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.517-542.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B.Saunders, 1998. p.450-458.

SOLANO-GALLEGU, L.; LIULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizan hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v.90, n.1-2, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGU, L. RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARES, J.E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.4, p.265-276, 2001.

Apêndice A. Produção do antígeno utilizado na técnica de ELISA.

Amostras de baço, fígado ou linfonodo de hamsters infectados por *Leishmania chagasi* cepa MHOM/BR/74/PP75 foram obtidas de forma estéril. Um mL das amostras foi colocado em tubo de tampa de rosca de 13cm, contendo 5mL de meio bifásico NNN.

Para o cultivo, o parasita *L. chagasi* foi regularmente mantido em meio líquido RPMI-1640 acrescido de antibióticos (100UI/mL de Penicilina e 100µg/mL de Estreptomicina), suplementado com 2mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino e 2% de urina masculina previamente inativado a 56°C por 30 minutos e mantidos em estufa B.O.D. (demanda biológica de oxigênio) a 26°C por sete dias.

Para obtenção do antígeno total, ao final da fase log de crescimento, os parasitas foram colhidos por centrifugação do material cultivado a 2.000 r.p.m. por 10 minutos à temperatura ambiente e três lavagens em solução de PBS estéril. Após três ciclos de congelamento procedeu-se à quantificação de proteínas totais no lisado total de parasitas, utilizando-se o método do ácido bicinconinico (BCA – Pierce, Rockford, IL), segundo REED et al. (1990).

Apêndice B. Densidades ópticas médias (D.O.) da padronização das diluições de soro e anticorpo policlonal anti-IgG1, pela técnica de ELISA, realizada com amostras positiva e negativa. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição	D.O.	Diluição	D.O.
C+ 1A	2,401	C+ 3A	1,589
C- 1A	0,259	C- 3A	0,174
C+ 1B	1,491	C+ 3B	1,004
C- 1B	0,167	C- 3B	0,076
C+ 1C	0,760	C+ 3C	0,518
C- 1C	0,079	C- 3C	0,053
C+ 2A	1,670	C+ 4A	0,771
C- 2A	0,175	C- 4A	0,123
C+ 2B	1,097	C+ 4B	0,501
C- 2B	0,108	C- 4B	0,056
C+ 2C	0,548	C+ 4C	0,255
C- 2C	0,061	C- 4C	0,030

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro canino na diluição 1:100, 2 = soro canino na diluição 1:200, 3 = soro canino na diluição 1:400 e 4 = soro canino na diluição 1:800; A = anti-IgG1 na diluição 1:10.000, B = anti-IgG1 na diluição 1:20.000 e C = anti-IgG1 na diluição 1:40.000.

Apêndice C. Densidades ópticas médias (D.O.) da padronização das diluições de soro e anticorpo policlonal anti-IgG2, pela técnica de ELISA, realizada com amostras positiva e negativa. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição	D.O.	Diluição	D.O.	Diluição	D.O.	Diluição	D.O.
C+ 1A	3,422	C+ 2A	3,192	C+ 3A	2,889	C+ 4A	0,964
C- 1A	1,954	C- 2A	1,779	C- 3A	1,542	C- 4A	0,431
C+ 1B	3,215	C+ 2B	2,885	C+ 3B	2,643	C+ 4B	0,862
C- 1B	1,732	C- 2B	1,307	C- 3B	0,974	C- 4B	0,360
C+ 1C	2,385	C+ 2C	2,061	C+ 3C	1,891	C+ 4C	0,669
C- 1C	0,961	C- 2C	0,745	C- 3C	0,425	C- 4C	0,264
C+ 1D	1,986	C+ 2D	1,832	C+ 3D	1,717	C+ 4D	0,588
C- 1D	0,683	C- 2D	0,501	C- 3D	0,401	C- 4D	0,201
C+ 1E	1,724	C+ 2E	1,608	C+ 3E	1,501	C+ 4E	0,452
C- 1E	0,508	C- 2E	0,438	C- 3E	0,366	C- 4E	0,167
C+ 1F	1,621	C+ 2F	1,493	C+ 3F	1,378	C+ 4F	0,386
C- 1F	0,462	C- 2F	0,384	C- 3F	0,298	C- 4F	0,103
C+ 1G	1,540	C+ 2G	1,323	C+ 3G	1,173	C+ 4G	0,311
C- 1G	0,395	C- 2G	0,287	C- 3G	0,116	C- 4G	0,082
C+ 1H	0,987	C+ 2H	0,704	C+ 3H	0,582	C+ 4H	0,252
C- 1H	0,276	C- 2H	0,190	C- 3H	0,098	C- 4H	0,078
C+ 1I	0,543	C+ 2I	0,380	C+ 3I	0,276	C+ 4I	0,169
C- 1I	0,226	C- 2I	0,113	C- 3I	0,085	C- 4I	0,044

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro canino na diluição 1:100, 2 = soro canino na diluição 1:200, 3 = soro canino na diluição 1:400 e 4 = soro canino na diluição 1:800; A = anti-IgG2 na diluição 1:10.000, B = anti-IgG2 na diluição 1:20.000, C = anti-IgG2 na diluição 1:40.000, D = anti-IgG2 na diluição 1:80.000, E = anti-IgG2 na diluição 1:100.000, F = anti-IgG2 na diluição 1:120.000, G = anti-IgG2 na diluição 1:140.000, H = anti-IgG2 na diluição 1:160.000 e I = anti-IgG2 na diluição 1:200.000

Apêndice D. Valores das diferenças das médias das densidades ópticas (D.O.) dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e anticorpo policlonal anti-IgG1, pela técnica de ELISA. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição soros	Diluição anti-IgG1		
	1:10.000	1:20.000	1:40.000
1:100	2,142	1,324	0,681
1:200	1,495	0,989	0,487
1:400	1,415	0,928	0,465
1;800	0,648	0,445	0,225

Apêndice E. Valores das diferenças das médias das densidades ópticas (D.O.) dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e anticorpo policlonal anti-IgG2, pela técnica de ELISA. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição dos soros	Diluição anti-IgG2									
	1:10.000	1:20.000	1:40.000	1:80.000	1:100.000	1:120.000	1:140.000	1:160.000	1:200.000	1:200.0000
1:100	1,468	1,483	1,424	1,303	1,216	1,159	1,145	0,711		0,317
1:200	1,413	1,578	1,316	1,331	1,170	1,109	1,036	0,514		0,267
1:400	1,347	1,669	1,466	1,313	1,135	1,080	1,057	0,484		0,191
1:800	0,533	0,502	0,405	0,387	0,285	0,283	0,229	0,174		0,125

Apêndice F. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, dos soros controle negativos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2 de 45 cães provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral (controle). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,144	0,019	0,101
2	0,172	0,017	0,13
3	0,174	0,039	0,122
4	0,187	0,03	0,142
5	0,217	0,04	0,155
6	0,153	0,01	0,081
7	0,241	0,036	0,103
8	0,222	0,021	0,091
9	0,086	0,033	0,105
10	0,065	0,022	0,134
11	0,042	0,018	0,056
12	0,115	0,017	0,133
13	0,05	0,013	0,068
14	0,054	0,026	0,083
15	0,067	0,018	0,124
16	0,08	0,017	0,131
17	0,082	0,04	0,095
18	0,061	0,011	0,066
19	0,092	0,042	0,129
20	0,047	0,067	0,069
21	0,132	0,04	0,142
22	0,129	0,046	0,171
23	0,066	0,01	0,109
24	0,06	0,05	0,127
25	0,081	0,02	0,114
26	0,074	0,04	0,11
27	0,109	0,013	0,082
28	0,107	0,019	0,095
29	0,133	0,029	0,164
30	0,143	0,029	0,134
31	0,173	0,021	0,091
32	0,104	0,015	0,124
33	0,154	0,016	0,092
34	0,123	0,055	0,048
35	0,14	0,038	0,132
36	0,116	0,059	0,136
37	0,123	0,034	0,115
38	0,108	0,013	0,055
39	0,195	0,098	0,219
40	0,147	0,053	0,072
41	0,125	0,023	0,076
42	0,072	0,027	0,043
43	0,125	0,068	0,163
44	0,136	0,061	0,099
45	0,148	0,025	0,1

Apêndice G. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 45 animais sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp. (sintomático). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	1,074	0,04	0,628
2	1,091	0,043	0,719
3	1,305	0,142	1,045
4	1,259	0,066	0,705
5	0,922	0,028	0,648
6	1,11	0,126	0,878
7	1,287	0,062	0,69
8	1,124	0,071	0,67
9	1,036	0,093	0,83
10	1,288	0,062	0,947
11	1,176	0,027	0,589
12	1,261	0,06	0,767
13	1,203	0,054	0,723
14	1,4	0,081	0,929
15	1,236	0,118	0,972
16	1,11	0,021	0,717
17	1,368	0,035	0,799
18	1,108	0,04	0,663
19	1,255	0,082	0,766
20	1,15	0,063	0,822
21	1,059	0,02	0,622
22	1,067	0,076	0,815
23	1,321	0,142	1,021
24	1,34	0,121	0,892
25	1,262	0,059	0,975
26	1,168	0,13	0,862
27	1,079	0,122	0,803
28	1,167	0,083	0,881
29	1,218	0,118	0,952
30	1,029	0,094	0,793
31	1,187	0,073	0,723
32	1,235	0,113	0,854
33	1,312	0,085	0,752
34	1,121	0,044	0,559
35	1,071	0,032	0,641
36	1,162	0,077	0,763
37	1,204	0,062	0,874
38	1,145	0,061	0,902
39	1,143	0,048	0,803
40	1,093	0,095	0,779
41	1,021	0,038	0,529
42	0,936	0,002	0,402
43	1,152	0,054	0,601
44	1,195	0,028	0,796
45	1,013	0,007	0,679

Apêndice H. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 45 animais assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp. (assintomático). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	1,227	0,101	0,984
2	0,852	0,369	0,813
3	0,778	0,08	0,753
4	1,074	0,106	1,033
5	0,372	0,104	0,383
6	0,777	0,024	0,746
7	0,83	0,086	0,655
8	0,974	0,058	0,739
9	0,409	0,149	0,493
10	0,637	0,073	0,556
11	0,491	0,159	0,692
12	0,717	0,022	0,471
13	0,718	0,807	0,653
14	0,686	0,067	0,682
15	0,556	0,349	0,316
16	0,594	0,043	0,449
17	0,882	0,036	0,786
18	0,555	0,055	0,458
19	0,854	0,056	0,85
20	0,514	0,157	0,432
21	0,924	0,059	0,725
22	0,618	0,047	0,605
23	0,906	0,047	0,781
24	0,703	0,225	0,586
25	0,896	0,038	0,712
26	0,675	0,332	0,551
27	0,923	0,048	0,863
28	0,648	0,054	0,578
29	0,673	0,058	0,759
30	0,602	0,032	0,618
31	0,48	0,044	0,912
32	0,511	0,023	0,71
33	0,6	0,023	0,324
34	0,559	0,079	0,857
35	0,688	0,088	0,607
36	0,944	0,745	0,774
37	0,479	0,084	0,438
38	0,816	0,189	0,709
39	0,627	0,087	0,534
40	0,784	0,174	0,676
41	0,669	0,047	0,536
42	0,768	0,056	0,7
43	0,84	0,105	0,806
44	0,524	0,299	0,464
45	0,334	0,029	0,21

Apêndice I. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 37 animais hígidos, antes da primeira dose da vacina contra a doença (M0). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,138	0,031	0,093
2	0,157	0,026	0,139
3	0,093	0,042	0,085
4	0,126	0,008	0,101
5	0,095	0,013	0,084
6	0,081	0,016	0,045
7	0,053	0,019	0,036
8	0,093	0,028	0,088
9	0,22	0,064	0,086
10	0,196	0,134	0,1
11	0,137	0,009	0,068
12	0,183	0,039	0,12
13	0,162	0,056	0,113
14	0,229	0,03	0,102
15	0,085	0,049	0,048
16	0,117	0,067	0,059
17	0,106	0,033	0,048
18	0,093	0,01	0,08
19	0,107	0,009	0,059
20	0,213	0,031	0,178
21	0,085	0,01	0,091
22	0,185	0,025	0,119
23	0,055	0,007	0,032
24	0,04	0,014	0,078
25	0,097	0,011	0,089
26	0,178	0,018	0,112
27	0,153	0,051	0,154
28	0,158	0,026	0,068
29	0,165	0,051	0,196
30	0,152	0,047	0,088
31	0,139	0,028	0,084
32	0,179	0,034	0,111
33	0,204	0,116	0,262
34	0,078	0,003	0,075
35	0,103	0,016	0,134
36	0,053	0,004	0,033
37	0,085	0,018	0,104

Apêndice J. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 37 animais hígidos, antes da segunda dose da vacina contra a doença (M1). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,168	0,032	0,089
2	0,257	0,044	0,201
3	0,193	0,05	0,086
4	0,195	0,038	0,154
5	0,143	0,017	0,152
6	0,188	0,019	0,063
7	0,122	0,037	0,065
8	0,16	0,019	0,074
9	0,573	0,032	0,289
10	0,235	0,115	0,148
11	0,221	0,017	0,094
12	0,443	0,037	0,233
13	0,519	0,037	0,184
14	0,434	0,023	0,191
15	0,214	0,046	0,159
16	0,289	0,113	0,187
17	0,336	0,137	0,208
18	0,191	0,012	0,077
19	0,249	0,015	0,1
20	0,267	0,029	0,215
21	0,12	0,021	0,119
22	0,149	0,057	0,154
23	0,056	0,013	0,049
24	0,114	0,019	0,105
25	0,111	0,012	0,087
26	0,225	0,011	0,127
27	0,424	0,213	0,323
28	0,253	0,033	0,155
29	0,18	0,041	0,177
30	0,208	0,092	0,211
31	0,148	0,025	0,133
32	0,188	0,036	0,213
33	0,344	0,086	0,542
34	0,096	0,003	0,106
35	0,142	0,017	0,168
36	0,066	0,008	0,128
37	0,145	0,023	0,169

Apêndice K. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 37 animais hígidos, antes da terceira dose da vacina contra a doença (M2). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,358	0,103	0,222
2	0,341	0,055	0,238
3	0,277	0,174	0,189
4	0,471	0,143	0,287
5	0,425	0,031	0,284
6	0,463	0,099	0,258
7	0,252	0,091	0,107
8	0,419	0,269	0,263
9	0,632	0,051	0,335
10	0,564	0,186	0,331
11	0,695	0,156	0,279
12	0,618	0,128	0,472
13	0,608	0,094	0,235
14	0,678	0,243	0,412
15	0,491	0,524	0,353
16	0,589	0,47	0,416
17	0,45	0,179	0,243
18	0,458	0,131	0,255
19	0,369	0,086	0,254
20	0,278	0,088	0,328
21	0,274	0,113	0,257
22	0,198	0,199	0,22
23	0,112	0,059	0,106
24	0,16	0,017	0,236
25	0,212	0,04	0,179
26	0,405	0,042	0,318
27	0,438	0,315	0,316
28	0,507	0,038	0,197
29	0,328	0,171	0,251
30	0,237	0,097	0,218
31	0,173	0,045	0,212
32	0,225	0,035	0,143
33	0,408	0,067	0,545
34	0,142	0,022	0,133
35	0,229	0,028	0,233
36	0,165	0,083	0,263
37	0,305	0,023	0,309

Apêndice L. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 37 animais hígidos, 90 dias após a primeira dose da vacina contra a doença (M3). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,822	0,146	0,571
2	0,741	0,056	0,293
3	0,798	0,414	0,488
4	0,818	0,204	0,583
5	0,788	0,027	0,537
6	0,746	0,163	0,506
7	0,621	0,178	0,376
8	0,725	0,398	0,593
9	0,701	0,062	0,416
10	0,869	0,456	0,523
11	0,736	0,287	0,491
12	0,867	0,159	0,488
13	0,685	0,247	0,429
14	0,874	0,461	0,616
15	0,852	0,753	0,649
16	0,899	0,848	0,702
17	0,699	0,273	0,411
18	0,716	0,33	0,526
19	0,718	0,228	0,54
20	0,471	0,089	0,224
21	0,823	0,237	0,385
22	0,762	0,518	0,535
23	0,471	0,316	0,259
24	0,757	0,024	0,329
25	0,769	0,053	0,289
26	0,855	0,119	0,434
27	0,548	0,203	0,248
28	0,877	0,063	0,261
29	0,743	0,49	0,427
30	0,542	0,136	0,25
31	0,542	0,085	0,335
32	0,486	0,042	0,158
33	0,828	0,119	0,548
34	0,754	0,07	0,216
35	0,73	0,121	0,358
36	0,806	0,137	0,741
37	0,83	0,026	0,365

Apêndice M. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 37 animais hígidos, 180 dias após a primeira dose da vacina contra a doença (M4). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,284	0,044	0,159
2	0,329	0,071	0,193
3	0,59	0,3	0,293
4	0,436	0,044	0,202
5	0,381	0,022	0,185
6	0,319	0,033	0,156
7	0,395	0,129	0,291
8	0,291	0,073	0,21
9	0,629	0,067	0,279
10	0,219	0,078	0,192
11	0,175	0,07	0,145
12	0,392	0,032	0,105
13	0,638	0,042	0,176
14	0,566	0,027	0,181
15	0,41	0,157	0,256
16	0,383	0,209	0,215
17	0,397	0,132	0,215
18	0,4	0,087	0,195
19	0,583	0,079	0,248
20	0,246	0,079	0,21
21	0,202	0,132	0,226
22	0,246	0,217	0,263
23	0,243	0,18	0,225
24	0,384	0,016	0,331
25	0,244	0,032	0,169
26	0,384	0,059	0,323
27	0,303	0,155	0,218
28	0,425	0,066	0,251
29	0,333	0,289	0,355
30	0,275	0,112	0,208
31	0,412	0,074	0,425
32	0,25	0,034	0,118
33	0,18	0,046	0,219
34	0,151	0,052	0,126
35	0,277	0,113	0,322
36	0,7	0,113	0,763
37	0,211	0,029	0,265

Apêndice N. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., antes do início do tratamento (M0). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,829	0,138	0,532
2	0,792	0,093	0,623
3	0,793	0,103	0,757
4	0,759	0,042	0,503
5	0,773	0,067	0,55
6	0,713	0,563	0,538
7	0,619	0,032	0,528
8	0,791	0,058	0,501
9	0,791	0,244	0,639
10	0,855	0,192	0,988
11	0,935	1,065	1,024
12	0,572	0,137	0,642
13	0,993	0,07	0,988
14	1,14	0,074	1,025
15	0,755	0,022	0,819
16	0,519	0,031	0,491
17	0,631	0,013	0,695
18	0,513	0,026	0,535
19	0,728	0,047	0,762
20	0,721	0,057	0,849
21	0,285	0,02	0,049
22	0,347	0,04	0,108
23	0,637	0,041	0,549
24	0,37	0,077	0,131
25	0,602	0,39	0,462
26	0,656	0,072	0,75
27	0,814	0,041	0,619

Apêndice O. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., 30 dias após início do tratamento (M1). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,769	0,11	0,662
2	0,737	0,071	0,445
3	0,783	0,081	0,648
4	0,594	0,015	0,434
5	0,626	0,029	0,449
6	0,631	0,573	0,482
7	0,45	0,024	0,222
8	0,798	0,013	0,378
9	0,911	0,065	0,324
10	0,822	0,098	0,845
11	1,014	0,934	1,007
12	0,592	0,139	0,524
13	0,977	0,03	0,924
14	1,069	0,089	0,972
15	0,788	0,013	0,759
16	0,417	0,02	0,494
17	0,65	0,01	0,618
18	0,571	0,031	0,61
19	0,456	0,015	0,62
20	0,514	0,069	0,736
21	0,239	0,03	0,053
22	0,39	0,019	0,096
23	0,439	0,025	0,486
24	0,265	0,018	0,094
25	0,539	0,319	0,394
26	0,552	0,085	0,638
27	0,648	0,013	0,494

Apêndice P. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., 60 dias após início do tratamento (M2). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,565	0,036	0,294
2	0,511	0,042	0,316
3	0,613	0,03	0,449
4	0,324	0,006	0,245
5	0,351	0,03	0,263
6	0,624	0,526	0,411
7	0,374	0,014	0,102
8	0,739	0,017	0,295
9	0,538	0,061	0,299
10	0,703	0,059	0,756
11	0,955	0,671	0,931
12	0,528	0,136	0,332
13	0,896	0,034	0,94
14	1,064	0,057	0,947
15	0,651	0,021	0,772
16	0,512	0,018	0,345
17	0,603	0,013	0,593
18	0,445	0,011	0,597
19	0,349	0,081	0,523
20	0,402	0,053	0,603
21	0,229	0,035	0,065
22	0,323	0,02	0,086
23	0,497	0,019	0,396
24	0,364	0,071	0,122
25	0,448	0,363	0,458
26	0,521	0,065	0,584
27	0,759	0,048	0,509

Apêndice Q. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., 90 dias após início do tratamento (M3). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,668	0,035	0,478
2	0,392	0,034	0,237
3	0,627	0,016	0,434
4	0,239	0,014	0,145
5	0,289	0,011	0,244
6	0,54	0,482	0,631
7	0,383	0,041	0,125
8	0,525	0,012	0,214
9	0,446	0,058	0,214
10	0,619	0,059	0,697
11	0,975	0,421	0,844
12	0,439	0,12	0,281
13	0,852	0,028	0,904
14	0,932	0,071	0,877
15	0,665	0,019	0,703
16	0,436	0,024	0,336
17	0,615	0,019	0,559
18	0,451	0,031	0,623
19	0,315	0,098	0,579
20	0,358	0,077	0,615
21	0,295	0,037	0,207
22	0,387	0,024	0,086
23	0,605	0,018	0,48
24	0,279	0,077	0,091
25	0,463	0,342	0,446
26	0,541	0,076	0,485
27	0,771	0,027	0,543

Apêndice R. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-IgG1 e anticorpos anti-IgG2, dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., 180 dias após início do tratamento (M4). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2
1	0,556	0,019	0,331
2	0,352	0,018	0,241
3	0,454	0,01	0,346
4	0,149	0,021	0,145
5	0,353	0,012	0,245
6	0,54	0,437	0,529
7	0,351	0,04	0,111
8	0,581	0,026	0,59
9	0,453	0,02	0,087
10	0,494	0,048	0,544
11	1,047	0,525	0,968
12	0,539	0,094	0,326
13	0,867	0,023	0,904
14	0,763	0,029	0,777
15	0,609	0,016	0,572
16	0,453	0,033	0,286
17	0,384	0,016	0,534
18	0,434	0,049	0,465
19	0,208	0,055	0,495
20	0,459	0,206	0,491
21	0,709	0,387	0,806
22	0,338	0,03	0,057
23	0,536	0,007	0,388
24	0,342	0,039	0,065
25	0,67	0,326	0,598
26	0,609	0,068	0,646
27	0,73	0,021	0,527

Apêndice S. Densidades ópticas médias (D.O.) da padronização das diluições de soro, anticorpo monoclonal anti-IgG1 e conjugado, pela técnica de ELISA, realizada com amostras positiva e negativa. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição	D.O.	Diluição	D.O.
C+ 1Aa	1,804	C- 2Bb	0,019
C- 1Aa	0,581	C+ 2Bc	0,852
C+ 1Ab	1,543	C- 2Bc	0,015
C- 1Ab	0,448	C+ 2Ca	0,627
C+ 1Ac	1,336	C- 2Ca	0,029
C- 1Ac	0,353	C+ 2Cb	0,521
C+ 1Ba	1,752	C- 2Cb	0,004
C- 1Ba	0,496	C+ 2Cc	0,367
C+ 1Bb	1,421	C- 2Cc	0,002
C- 1Bb	0,403	C+ 3Aa	0,298
C+ 1Bc	1,274	C- 3Aa	0,015
C- 1Bc	0,386	C+ 3Ab	0,283
C+ 1Ca	1,596	C- 3Ab	0,013
C- 1Ca	0,403	C+ 3Ac	0,266
C+ 1Cb	1,378	C- 3Ac	0,011
C- 1Cb	0,375	C+ 3Ba	0,282
C+ 1Cc	1,198	C- 3Ba	0,012
C- 1Cc	0,354	C+ 3Bb	0,271
C+ 2Aa	1,739	C- 3Bb	0,011
C- 2Aa	0,445	C+ 3Bc	0,249
C+ 2Ab	1,487	C- 3Bc	0,009
C- 2Ab	0,402	C+ 3Ca	0,265
C+ 2Ac	1,295	C- 3Ca	0,010
C- 2Ac	0,283	C+ 3Cb	0,258
C+ 2Ba	1,694	C- 3Cb	0,008
C- 2Ba	0,164	C+ 3Cc	0,201
C+ 2Bb	1,661	C- 3Cc	0,005

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro canino na diluição 1:25, 2 = soro canino na diluição 1:50 e 3 = soro canino na diluição 1:100; A = anti-IgG1 na diluição 1:100, B = anti-IgG1 na diluição 1:200 e C = anti-IgG1 na diluição 1:400; a = conjugado na diluição 1:2500, b = conjugado na diluição 1:5000 e c = conjugado na diluição 1:10000.

Apêndice T. Densidades ópticas médias (D.O.) da padronização das diluições de soro, anticorpo monoclonal anti-IgG2 e conjugado pela técnica de ELISA, realizada com amostras positiva e negativa. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição	D.O.	Diluição	D.O.
C+ 1Aa	3,241	C- 2Bb	0,089
C- 1Aa	0,962	C+ 2Bc	0,681
C+ 1Ab	1,915	C- 2Bc	0,393
C- 1Ab	1,150	C+ 2Ca	0,991
C+ 1Ac	1,298	C- 2Ca	0,204
C- 1Ac	0,826	C+ 2Cb	0,764
C+ 1Ba	2,057	C- 2Cb	0,503
C- 1Ba	0,878	C+ 2Cc	0,529
C+ 1Bb	1,793	C- 2Cc	0,263
C- 1Bb	0,753	C+ 3Aa	0,398
C+ 1Bc	1,389	C- 3Aa	0,179
C- 1Bc	0,516	C+ 3Ab	0,320
C+ 1Ca	1,505	C- 3Ab	0,155
C- 1Ca	0,904	C+ 3Ac	0,203
C+ 1Cb	1,498	C- 3Ac	0,154
C- 1Cb	0,849	C+ 3Ba	0,406
C+ 1Cc	1,114	C- 3Ba	0,179
C- 1Cc	0,814	C+ 3Bb	0,342
C+ 2Aa	2,887	C- 3Bb	0,142
C- 2Aa	0,618	C+ 3Bc	0,210
C+ 2Ab	0,942	C- 3Bc	0,110
C- 2Ab	0,441	C+ 3Ca	0,311
C+ 2Ac	0,587	C- 3Ca	0,197
C- 2Ac	0,327	C+ 3Cb	0,276
C+ 2Ba	1,844	C- 3Cb	0,161
C- 2Ba	0,232	C+ 3Cc	0,232
C+ 2Bb	0,976	C- 3Cc	0,126

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro canino na diluição 1:25, 2 = soro canino na diluição 1:50 e 3 = soro canino na diluição 1:100; A = anti-IgG2 na diluição 1:25, B = anti-IgG2 na diluição 1:50 e C = anti-IgG2 na diluição 1:100; a = conjugado na diluição 1:2500, b = conjugado na diluição 1:5000 e c = conjugado na diluição 1:10000.

Apêndice U. Densidades ópticas médias (D.O.) da padronização das diluições de soro, anticorpo monoclonal anti-IgG3 e conjugado pela técnica de ELISA, realizada com amostras positiva e negativa. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição	D.O.	Diluição	D.O.
C+ 1Aa	4,067	C- 2Bb	0,091
C- 1Aa	0,542	C+ 2Bc	0,632
C+ 1Ab	3,627	C- 2Bc	0,119
C- 1Ab	0,482	C+ 2Ca	0,566
C+ 1Ac	1,136	C- 2Ca	0,211
C- 1Ac	0,231	C+ 2Cb	0,471
C+ 1Ba	3,492	C- 2Cb	0,202
C- 1Ba	0,480	C+ 2Cc	0,398
C+ 1Bb	2,476	C- 2Cc	0,163
C- 1Bb	0,277	C+ 3Aa	1,851
C+ 1Bc	0,921	C- 3Aa	0,204
C- 1Bc	0,253	C+ 3Ab	1,172
C+ 1Ca	0,692	C- 3Ab	0,195
C- 1Ca	0,248	C+ 3Ac	0,483
C+ 1Cb	0,552	C- 3Ac	0,120
C- 1Cb	0,239	C+ 3Ba	1,125
C+ 1Cc	0,417	C- 3Ba	0,197
C- 1Cc	0,199	C+ 3Bb	0,994
C+ 2Aa	3,652	C- 3Bb	0,093
C- 2Aa	0,319	C+ 3Bc	0,488
C+ 2Ab	2,380	C- 3Bc	0,086
C- 2Ab	0,203	C+ 3Ca	0,382
C+ 2Ac	0,865	C- 3Ca	0,101
C- 2Ac	0,197	C+ 3Cb	0,205
C+ 2Ba	3,283	C- 3Cb	0,099
C- 2Ba	0,229	C+ 3Cc	0,177
C+ 2Bb	2,218	C- 3Cc	0,076

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro canino na diluição 1:25, 2 = soro canino na diluição 1:50 e 3 = soro canino na diluição 1:100; A = anti-IgG3 na diluição 1:25, B = anti-IgG3 na diluição 1:50 e C = anti-IgG3 na diluição 1:100; a = conjugado na diluição 1:2500, b = conjugado na diluição 1:5000 e c = conjugado na diluição 1:10000.

Apêndice V. Densidades ópticas médias (D.O.) da padronização das diluições de soro, anticorpo monoclonal anti-IgG4 e conjugado pela técnica de ELISA, realizada com amostras positiva e negativa. (Jaboticabal-SP, 2009).

Diluição	D.O.	Diluição	D.O.
C+ 1Aa	1,202	C- 2Bb	0,002
C- 1Aa	0,104	C+ 2Bc	0,361
C+ 1Ab	1,187	C- 2Bc	0,002
C- 1Ab	0,089	C+ 2Ca	0,480
C+ 1Ac	0,721	C- 2Ca	0,012
C- 1Ac	0,077	C+ 2Cb	0,392
C+ 1Ba	1,182	C- 2Cb	0,009
C- 1Ba	0,088	C+ 2Cc	0,377
C+ 1Bb	1,016	C- 2Cc	0,008
C- 1Bb	0,059	C+ 3Aa	0,489
C+ 1Bc	0,476	C- 3Aa	0,039
C- 1Bc	0,042	C+ 3Ab	0,411
C+ 1Ca	0,773	C- 3Ab	0,021
C- 1Ca	0,081	C+ 3Ac	0,357
C+ 1Cb	0,511	C- 3Ac	0,019
C- 1Cb	0,049	C+ 3Ba	0,416
C+ 1Cc	0,295	C- 3Ba	0,011
C- 1Cc	0,033	C+ 3Bb	0,304
C+ 2Aa	1,007	C- 3Bb	0,007
C- 2Aa	0,088	C+ 3Bc	0,207
C+ 2Ab	0,994	C- 3Bc	0,001
C- 2Ab	0,079	C+ 3Ca	0,201
C+ 2Ac	0,685	C- 3Ca	0,001
C- 2Ac	0,064	C+ 3Cb	0,189
C+ 2Ba	0,942	C- 3Cb	-0,001
C- 2Ba	0,048	C+ 3Cc	0,142
C+ 2Bb	0,911	C- 3Cc	-0,004

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro canino na diluição 1:25, 2 = soro canino na diluição 1:50 e 3 = soro canino na diluição 1:100; A = anti-IgG4 na diluição 1:25, B = anti-IgG4 na diluição 1:50 e C = anti-IgG4 na diluição 1:100; a = conjugado na diluição 1:2500, b = conjugado na diluição 1:5000 e c = conjugado na diluição 1:10000.

Apêndice X. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, dos soros controle negativos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 de 45 cães provenientes de área não endêmica (controle). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	0,144	0,072	0,155	0,058	0,023
2	0,172	0,091	0,068	0,024	0,03
3	0,174	0,064	0,14	0,066	0,025
4	0,187	0,098	0,189	0,043	0,025
5	0,217	0,075	0,069	0,022	0,005
6	0,153	0,03	0,057	0,01	0,015
7	0,241	0,105	0,037	0,02	0,003
8	0,222	0,067	0,062	0,026	0,017
9	0,086	0,089	0,183	0,003	0,037
10	0,065	0,029	0,109	0,003	0,02
11	0,042	0,037	0,118	0,004	0,009
12	0,115	0,03	0,184	0,021	0,016
13	0,05	0,093	0,108	0,056	0,026
14	0,054	0,035	0,051	0,005	0,016
15	0,067	0,044	0,111	0,055	0,023
16	0,08	0,032	0,171	0,01	0,01
17	0,082	0,061	0,151	0,002	0,029
18	0,061	0,032	0,127	0,064	0,002
19	0,092	0,04	0,13	0,006	0,034
20	0,047	0,09	0,182	0,034	0,02
21	0,132	0,096	0,102	0,06	0,025
22	0,129	0,1	0,144	0,066	0,027
23	0,066	0,075	0,087	0,002	0,034
24	0,06	0,014	0,078	0,022	0,016
25	0,081	0,058	0,102	0,058	0,032
26	0,074	0,095	0,084	0,084	0,022
27	0,109	0,074	0,088	0,072	0,032
28	0,107	0,018	0,061	0,068	0,016
29	0,133	0,024	0,173	0,042	0,037
30	0,143	0,03	0,182	0,018	0,034
31	0,173	0,032	0,102	0,007	0,017
32	0,104	0,037	0,184	0,019	0,017
33	0,154	0,049	0,06	0,025	0,026
34	0,123	0,029	0,073	0,047	0,021
35	0,14	0,022	0,035	0,027	0,041
36	0,116	0,06	0,111	0,023	0,034
37	0,123	0,056	0,103	0,088	0,02
38	0,108	0,022	0,099	0,017	0,007
39	0,195	0,094	0,033	0,02	0,013
40	0,147	0,063	0,14	0,09	0,025
41	0,125	0,052	0,033	0,017	0,017
42	0,072	0,027	0,1	0,081	0,009
43	0,125	0,017	0,04	0,041	0,022
44	0,136	0,062	0,053	0,048	0,025
45	0,148	0,029	0,046	0,042	0,025

Apêndice Z. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 dos soros de 45 animais sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp. (sintomático). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	1,074	1,204	0,142	0,676	0,246
2	1,091	1,573	0,206	1,239	0,571
3	1,305	1,798	0,501	1,694	0,516
4	1,259	1,317	0,264	0,473	0,355
5	0,922	1,099	0,25	0,943	0,352
6	1,11	1,708	0,332	1,155	0,658
7	1,287	1,495	0,13	0,807	0,251
8	1,124	2,145	0,128	1,634	0,677
9	1,036	2,941	0,106	2,019	0,731
10	1,288	1,94	0,162	1,504	0,527
11	1,176	1,03	0,141	0,51	0,262
12	1,261	2,219	0,288	1,722	0,495
13	1,203	1,462	0,178	1,27	0,22
14	1,4	1,975	0,633	1,813	0,737
15	1,236	2,493	0,31	1,75	0,843
16	1,11	1,522	0,192	1,182	0,387
17	1,368	1,909	0,328	1,775	0,463
18	1,108	1,535	0,345	1,123	0,364
19	1,255	1,757	0,197	1,587	0,734
20	1,15	1,309	0,152	0,441	0,402
21	1,059	1,486	0,101	0,488	0,371
22	1,067	1,402	0,157	1,194	0,451
23	1,321	1,947	0,278	1,846	0,382
24	1,34	1,891	0,38	1,781	0,542
25	1,262	1,458	0,206	1,38	0,493
26	1,168	2,262	0,431	1,707	0,635
27	1,079	1,187	0,114	0,881	0,431
28	1,167	1,216	0,31	1,143	0,422
29	1,218	1,329	0,356	1,242	0,631
30	1,029	1,009	0,11	0,559	0,378
31	1,187	2,578	0,552	1,909	0,976
32	1,235	2,25	0,603	1,782	0,67
33	1,312	1,784	0,11	0,899	0,371
34	1,121	1,677	0,537	1,415	0,742
35	1,071	1,562	0,196	1,074	0,748
36	1,162	2,097	0,213	1,221	0,338
37	1,204	1,246	0,218	0,904	0,447
38	1,145	1,704	0,327	1,427	0,4
39	1,143	1,685	0,122	1,312	0,225
40	1,093	1,936	0,129	1,515	0,666
41	1,021	1,317	0,128	0,607	0,258
42	0,936	1,571	0,1	0,839	0,252
43	1,152	1,833	0,158	1,575	0,248
44	1,195	2,745	0,287	1,708	0,361
45	1,013	1,308	0,104	1,11	0,304

Apêndice AA. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 dos soros de 45 animais assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp.(assintomático). (Jaboticabal - SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	1,227	1,882	0,174	0,02	0,02
2	0,852	1,431	0,127	0,023	0,006
3	0,778	1,168	0,189	0,012	0,014
4	1,074	1,519	0,142	0,029	0,005
5	0,372	0,326	0,046	0,017	0,003
6	0,777	1,376	0,137	0,015	0,024
7	0,83	1,147	0,131	0,033	0,045
8	0,974	1,387	0,153	0,016	0,013
9	0,409	0,511	0,177	0,023	0,076
10	0,637	0,574	0,123	0,036	0,012
11	0,491	0,659	0,12	0,03	0,013
12	0,717	0,859	0,166	0,011	0,011
13	0,718	0,74	0,193	0,009	0,03
14	0,686	1,118	0,115	0,014	0,02
15	0,556	0,71	0,071	0,022	0,017
16	0,594	0,665	0,072	0,014	0,063
17	0,882	1,489	0,098	0,02	0,019
18	0,555	0,755	0,052	0,019	0,012
19	0,854	1,001	0,08	0,035	0,003
20	0,514	0,72	0,227	0,029	0,013
21	0,924	1,252	0,205	0,021	0,055
22	0,618	0,79	0,194	0,014	0,013
23	0,906	1,349	0,158	0,018	0,021
24	0,703	0,94	0,078	0,012	0,017
25	0,896	1,589	0,208	0,017	0,005
26	0,675	0,976	0,133	0,011	0,045
27	0,923	1,52	0,142	0,025	0,033
28	0,648	0,985	0,117	0,015	0,01
29	0,673	0,886	0,189	0,074	0,017
30	0,602	0,813	0,259	0,019	0,03
31	0,48	1,129	0,207	0,016	0,038
32	0,511	1,065	0,222	0,034	0,005
33	0,6	0,592	0,205	0,034	0,025
34	0,559	1,41	0,211	0,013	0,023
35	0,688	1,183	0,191	0,014	0,006
36	0,944	1,518	0,187	0,014	0,037
37	0,479	0,54	0,088	0,035	0,018
38	0,816	1,493	0,157	0,024	0,047
39	0,627	0,913	0,19	0,037	0,018
40	0,784	1,512	0,157	0,047	0,015
41	0,669	0,821	0,107	0,016	0,025
42	0,768	1,191	0,058	0,022	0,029
43	0,84	1,072	0,14	0,042	0,026
44	0,524	1,123	0,258	0,011	0,013
45	0,334	0,297	0,238	0,013	0,032

Apêndice BB. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 dos soros de 37 animais hígidos, antes da primeira dose da vacina contra a doença (M0). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	0,138	0,041	0,189	0,031	0,016
2	0,157	0,042	0,18	0,066	0,008
3	0,093	0,04	0,133	0,018	0,031
4	0,126	0,041	0,133	0,013	0,026
5	0,095	0,069	0,19	0,008	0,024
6	0,081	0,058	0,187	0,054	0,004
7	0,053	0,021	0,09	0,045	0,014
8	0,093	0,044	0,084	0,054	0,023
9	0,22	0,04	0,128	0,037	0,014
10	0,196	0,09	0,138	0,049	0,007
11	0,137	0,067	0,161	0,044	0,015
12	0,183	0,035	0,121	0,017	0,008
13	0,162	0,071	0,056	0,066	0,006
14	0,229	0,086	0,103	0,022	0,016
15	0,085	0,043	0,132	0,036	0,029
16	0,117	0,05	0,189	0,057	0,005
17	0,106	0,027	0,077	0,034	0,012
18	0,093	0,068	0,134	0,027	0,021
19	0,107	0,034	0,134	0,012	0,025
20	0,213	0,074	0,196	0,031	0,005
21	0,085	0,03	0,09	0,011	0,015
22	0,185	0,063	0,109	0,027	0,018
23	0,055	0,032	0,089	0,011	0,014
24	0,04	0,076	0,117	0,013	0,004
25	0,097	0,041	0,107	0,02	0,023
26	0,178	0,08	0,149	0,017	0,013
27	0,153	0,093	0,104	0,034	0,036
28	0,158	0,081	0,047	0,046	0,027
29	0,165	0,029	0,101	0,008	0,004
30	0,152	0,022	0,056	0,032	0,004
31	0,139	0,018	0,07	0,01	0,022
32	0,179	0,068	0,119	0,017	0,023
33	0,204	0,069	0,103	0,008	0,017
34	0,078	0,062	0,087	0,016	0,005
35	0,103	0,034	0,127	0,056	0,018
36	0,053	0,025	0,19	0,016	0,002
37	0,085	0,047	0,061	0,035	0,026

Apêndice CC. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 dos soros de 37 animais hígidos, 90 dias após a primeira dose da vacina contra a doença (M3). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	0,822	1,145	0,272	0,998	0,377
2	0,741	0,945	0,278	0,388	0,286
3	0,798	0,541	0,171	0,34	0,299
4	0,818	0,64	0,158	0,404	0,173
5	0,788	0,73	0,116	0,519	0,23
6	0,746	0,813	0,354	0,661	0,572
7	0,621	0,707	0,186	0,48	0,197
8	0,725	1,35	0,229	1,052	0,446
9	0,701	0,999	0,206	0,877	0,087
10	0,869	1,339	0,211	1,072	0,329
11	0,736	2,466	0,178	1,105	0,419
12	0,867	1,105	0,032	0,484	0,264
13	0,685	1,112	0,169	1,035	0,288
14	0,874	1,26	0,177	0,991	0,213
15	0,852	1,132	0,242	0,865	0,288
16	0,899	1,251	0,266	0,885	0,308
17	0,699	1,071	0,155	0,069	0,014
18	0,716	0,875	0,15	0,071	0,018
19	0,718	0,729	0,251	0,645	0,308
20	0,471	0,561	0,207	0,531	0,036
21	0,823	0,945	0,129	0,497	0,16
22	0,762	0,55	0,142	0,538	0,024
23	0,471	0,442	0,122	0,306	0,017
24	0,757	0,543	0,095	0,603	0,015
25	0,769	0,753	0,109	0,371	0,017
26	0,855	0,766	0,124	0,777	0,138
27	0,548	0,601	0,089	0,008	0,003
28	0,877	0,919	0,049	0,312	0,037
29	0,743	0,82	0,112	0,034	0,011
30	0,542	0,727	0,073	0,051	0,048
31	0,542	0,632	0,085	0,01	0,037
32	0,486	0,424	0,123	0,011	0,007
33	0,828	0,973	0,17	0,148	0,033
34	0,754	0,58	0,209	0,508	0,32
35	0,73	0,596	0,166	0,083	0,009
36	0,806	1,133	0,196	0,706	0,121
37	0,83	0,7	0,085	0,025	0,043

Apêndice DD. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., antes do início do tratamento (M0). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	0,829	2,402	0,031	1,486	0,395
2	0,792	2,329	0,277	1,894	0,865
3	0,793	2,15	0,521	1,913	1,248
4	0,759	2,369	0,209	1,129	0,345
5	0,773	1,312	0,049	0,692	0,112
6	0,713	2,44	0,101	1,298	0,704
7	0,619	1,225	0,08	0,996	0,325
8	0,791	2,439	0,22	1,528	0,334
9	0,791	2,036	0,191	1,816	1,163
10	0,855	2,448	0,327	2,042	1,049
11	0,935	1,487	0,011	0,047	0,31
12	0,572	1,158	0,007	0,555	0,325
13	0,993	2,81	0,288	1,924	1,245
14	1,14	2,82	0,122	2,453	0,253
15	0,755	2,296	0,073	0,794	0,22
16	0,519	1,43	0,148	1,174	0,287
17	0,631	1,988	0,196	1,226	1,045
18	0,513	1,49	0,092	0,064	0,186
19	0,728	2,576	0,192	1,86	0,641
20	0,721	1,362	0,022	1,08	0,072
21	0,285	0,323	0,008	0,076	0,004
22	0,347	0,428	0,045	0,087	0,043
23	0,637	0,512	0,014	0,494	0,273
24	0,37	0,652	0,007	0,283	0,013
25	0,602	1,755	0,042	1,028	0,262
26	0,656	1,132	0,193	0,685	0,23
27	0,814	1,724	0,231	1,448	0,307

Apêndice EE. Densidades ópticas médias (D.O.), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 dos soros de 27 animais naturalmente infectados por *Leishmania* sp., 180 dias após o início do tratamento (M4). (Jaboticabal-SP, 2009).

Animal	IgG total	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1	0,556	1,232	0,122	0,826	0,33
2	0,352	0,704	0,049	0,309	0,153
3	0,454	0,74	0,019	0,615	0,177
4	0,149	0,885	0,133	0,141	0,034
5	0,353	0,328	0,051	0,29	0,037
6	0,54	1,069	0,37	0,892	0,307
7	0,351	0,349	0,037	0,577	0,189
8	0,581	1,268	0,124	1,018	0,39
9	0,453	0,944	0,078	0,695	0,245
10	0,494	1,493	0,228	1,077	0,265
11	1,047	1,7	0,151	0,362	0,263
12	0,539	0,699	0,071	0,372	0,207
13	0,867	1,61	0,221	1,555	0,274
14	0,763	1,441	0,119	1,272	0,2
15	0,609	0,788	0,087	0,24	0,087
16	0,453	0,895	0,121	0,37	0,198
17	0,384	1,235	0,12	0,789	0,195
18	0,434	1,214	0,091	0,045	0,152
19	0,208	0,149	0,095	0,065	0,044
20	0,459	0,941	0,052	0,775	0,285
21	0,709	2,395	0,085	1,433	0,293
22	0,338	0,149	0,074	0,059	0,054
23	0,536	0,773	0,132	0,582	0,147
24	0,342	0,361	0,012	0,142	0,003
25	0,67	2,151	0,125	1,652	0,4
26	0,609	0,944	0,088	0,163	0,038
27	0,73	2,099	0,274	1,618	0,316

Apêndice FF. Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DAS QUATRO SUBCLASSES DE IgG EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (L.) CHAGASI* E DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM ANIMAIS VACINADOS COM VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA " sob responsabilidade de MARY MARCONDES FEITOSA, FABIANA AUGUSTA IKEDA MIRELA TINICCI COSTA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 26 de abril de 2005, de acordo com o protocolo nº 29/05.

Araçatuba, 26 de abril de 2005.



Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Apêndice GG. Parecer da Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA).

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL 

CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º 006842-05 do trabalho de pesquisa intitulado “**Avaliação das quatro subclasses de IgG em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* e determinação dos níveis de citocinas em animais vacinados com vacina contra leishmaniose visceral canina**”, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, está de acordo, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião extraordinária de 11 de abril de 2005.

Jaboticabal, 13 de abril de 2005.


Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto
Presidente - CEBEA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel 16 3209 2800 fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br