

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA**  
**CAMPUS ARAÇATUBA**

**POLIMORFISMOS DOS GENES SLC11A1 E DLA-DRB1**  
**E SUSCEPTIBILIDADE DE CÃES À LEISHMANIOSE**

**Érica de Souza Ribeiro**  
**Bióloga**

**Araçatuba – SP**  
**2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS ARAÇATUBA**

**POLIMORFISMOS DOS GENES SLC11A1 E DLA-DRB1**  
**E SUSCEPTIBILIDADE DE CÃES À LEISHMANIOSE**

**Érica de Souza Ribeiro**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunta Cárís Maroni Nunes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, campus Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**Araçatuba-SP**

**2011**

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R484p Ribeiro, Érica de Souza.  
Polimorfismos dos genes Slc11a1 e DLA-DRB1 e susceptibilidade de cães à leishmaniose  
Érica de Souza Ribeiro. - Araçatuba: [s.n.], 2011  
64 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária  
Orientadora: Profa. Cárís Maroni Nunes

1. MHC de classe II 2. Nramp1 3. PCR  
4. susceptibilidade e resistência

CDD 636.0896

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Polimorfismos dos genes SLC11A1 e MxA-DRBI e susceptibilidade de cães à leishmaniose

**AUTORA:** ÉRICA DE SOUZA RIBEIRO

**ORIENTADORA:** Dr.<sup>a</sup> CÁRIS MARONI NUNES

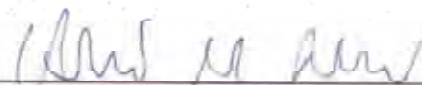
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

  
Dr. PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA

  
Dr.<sup>a</sup> VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA

  
Dr.<sup>a</sup> CÁRIS MARONI NUNES

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 04 de agosto de 2011.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr.<sup>a</sup> CÁRIS MARONI NUNES  
- Orientadora -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

---

**Érica de Souza Ribeiro** – nascida em 08 de dezembro de 1982 no município de Araçatuba - SP. Graduiu-se em Ciências Biológicas pela Fundação Educacional de Penápolis (FUNEPE) em 2004. Em 2005 iniciou estágio no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP onde foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de treinamento técnico, nível 3 no período de 2005 a 2006 e bolsista técnica da Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP) de 2007 a 2008. Em 2009 iniciou-se no curso de Pós-Graduação em Ciência Animal na FMVA/UNESP, na área de Medicina Veterinária, Preventiva e Produção Animal na linha de pesquisa Epidemiologia, Etiopatogenia, Diagnóstico e controle das enfermidades dos animais.

*“Quem pensa por si mesmo é livre e ser livre é coisa muito séria. Não se pode fechar os olhos, não se pode olhar para trás sem se aprender alguma coisa pro futuro”.*

*Renato Russo*

*“Busque a sabedoria com todas as forças e ela se manifestará. No fim, encontrará nela repouso e ela se transformará em alegria”*

*Eclesiástico 6:27-29*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Valdemar e Eunice que através do amor incondicional nunca mediram esforços para me darem a maior riqueza da vida: educação.*

*Minha eterna gratidão.*

*Ao meu irmão Rafael e a minha cunhada Vanessa por ter me dado a minha sobrinha Rafaella que com seu sorriso trás alegria aos nossos dias.*

*Ao meu querido Ádamo Chapenotte pelo companheirismo, carinho e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por me mostrar que todo aquele que pede, recebe e quem bate, a porta será aberta.

Em especial à minha orientadora Professora Dra. Cárís Maroni Nunes e ao Professor José Fernando Garcia pelo voto de confiança, pela incansável paciência durante estes 6 anos de trabalho em conjunto e, por fim, pelos ensinamentos. Minha eterna gratidão.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

As agências de fomento à pesquisa CAPES e CNPq, pelas bolsas de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;

Aos funcionários Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, campus de Araçatuba, Alexandre José Teixeira, Cristiano de Carvalho, Devani Mariano Pinheiro, Gilmara Castilho, Iraci Morais Machado, Luiz Gustavo Ferraz Lima, Marta Paccanaro Peres, Pedro Luís Florindo, Geni Santos Guimarães Boer, Isabel Pereira de Matos, Fátima Maria Metello Bertolucci, Alexandra Bento e Lúcia Emi Kanno pela eficiência em atender, sempre fazendo o melhor para corresponder as necessidades de todos e, sobretudo, pela amizade e pelo carinho que me oferecem.

Ao “então” pessoal do LBBMA, Gustavo Avelar Arbex, Sérgio Aoki, Laércio Porto Neto, Valéria Menosso, Heleno Brandão, José Eduardo Zanon, Fabiane Siqueira e Alexéia Grisolia, Micheli Bispo por terem me auxiliado no momento inicial, compartilhando seus conhecimentos e experiências. Muito obrigada.

Às mestrandas e mestrandos Silvana de Cássia Paulan, Fernanda Müller, Danelly Botoleto, Diego Pacheco dos Santos, Yuri Utsunomiya, Samuel Aragão, aos doutorandos Adriana Santana do Carmo, Rodrigo Vítório Alonso, as laboratoristas Janaína Hernandez, Nayara Aguilera, Altair Martins e as

mestre Amanda Pifanno Neto Quintal e Fúlvia di Pillo, pelo trabalho em equipe e agradável convivência.

À professora Eliane Cervelatti por quem tenho admiração e muito carinho.

Aos mestres e doutores da Faculdade de Odontologia – UNESP-campus de Araçatuba Adriana Demathe, Claudia Kanno, Leandro Toyoji Kawata, Luciana Simonato pela troca de conhecimentos científicos.

Às estagiárias Simone Santos Barros, Vivian Zadra, Vanessa Borges Costa Ferreira e Gabrielle Takeda agradeço toda a disponibilidade e o “apoio de bancada” prestado.

À amiga Micheli das Flores Amorim e a minha prima Ana Carolina Reginaldo, pelo constante apoio e incentivo, além da verdadeira amizade oferecida durante todos estes anos, que me encoraja nos momentos difíceis, transmitindo força para vencer os desafios e almejar novas conquistas.

À querida Valquíria Rissato Gazola, pelo privilégio de sua convivência, por sua enorme bondade e por ter compartilhado comigo momentos de angústia e de alegria. Sua amizade permanecerá por toda a vida. Muito obrigada!

Aos queridos casais de amigos Ana Paula Baziquetto e Tiago Hernandez, Rosemara Chagas e Giuliano Tencate, Sandra Pereira e José Antônio, o meu reconhecimento e eterna dívida pelo incentivo, pelo carinho, pela enorme paciência diante das minhas ansiedades e, principalmente, por acreditarem tanto em mim. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos. Amo vocês...

À Profa. Dra. Silvia Helena Venturolli Perri pela análise desse trabalho, pela atenção dispensada a mim e a presteza com que atendeu a cada um dos meus pedidos.

À Professora Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani a quem devo o início do meu percurso profissional na área da Parasitologia, agradeço a oportunidade que me deu em efetuar um estágio nesta área e pelo incentivo para nela permanecer.

À Profa. Adj. Valéria Marçal Félix de Lima pela avaliação sorológica;

À Profa. Adj. Mary Marcondes e pós-graduandos pela colheita de amostras de cães do Hospital Veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira e também à Milena Araújo Viol pela colheita de amostras de cães domiciliados.

Aos participantes da comissão examinadora do Exame geral de Qualificação, pelas correções e sugestões feitas para melhoria deste trabalho.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para que esta pesquisa fosse desenvolvida e que por falha não intencional, não foram aqui mencionados, o meu sincero agradecimento!

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
Agente Etiológico.....	14
Reservatórios de LV .....	15
Vetores de LV .....	16
Patogenia .....	19
Solute transportador da família 11, membro 1.....	20
Complexo principal de histocompatibilidade.....	23
REFERÊNCIAS .....	25
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE SLC11A1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A LEISHMANIOSE CANINA .....	35
Introdução.....	36
Material e Método.....	38
Área de estudo e amostras .....	38
Reação em cadeia da polimerase (PCR) kDNA de <i>Leishmania</i> sp.....	38
ELISA indireto .....	39
PCR e análise da região microssatélite do íntron 1.....	39
PCR e sequenciamento da Região Promotora.....	40
Análise Estatística .....	41
Resultados.....	41
Positividade à leishmaniose .....	41
Variantes Alélicas .....	42
Discussão .....	44
Conclusão.....	46
Agradecimentos.....	46
REFERÊNCIAS .....	47
CAPÍTULO 3 - POLIMORFISMOS DO GENE DLA-DRB1 E SUSCEPTIBILIDADE DE CÃES À LEISHMANIOSE.....	50

Introdução.....	51
Material e Método .....	52
Área de estudo e amostras .....	52
Reação em cadeia da polimerase (PCR) kDNA de Leishmania sp.....	53
ELISA indireto .....	53
PCR e Sequenciamento .....	53
Análise estatística.....	55
Resultados.....	56
Positividade à leishmaniose .....	56
Variantes Alélicas .....	57
Discussão .....	59
Conclusão.....	60
Agradecimentos.....	61
Referências .....	61

## **Polimorfismos dos genes Slc11a1 e DLA-DRB1 e susceptibilidade de cães à leishmaniose**

**RESUMO** – A importância da leishmaniose visceral no contexto da saúde pública tem aumentado na última década. A manifestação da leishmaniose visceral nos cães é variável e estudos sobre a genética e a sua relação com a leishmaniose visceral têm indicado alguns genes envolvidos na susceptibilidade e resistência a esta doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre as variantes alélicas dos genes Slc11a1 (*solute carrier family 11 member 1*) e DLA-DRB1 (*dog leukocyte antigen*) com a positividade para leishmaniose, determinada por meio da amplificação de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* sp., por PCR, e pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ao teste ELISA indireto. Foram observadas associações estatisticamente significantes entre a positividade para leishmaniose e: i. a presença do alelo (141, 145 ou 149) da região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub> localizada no íntron 1 do gene Slc11a1 ( $P < 0,0001$ ) ii. a variação do número de guaninas (8 ou 9 G) da região promotora ( $P = 0,0280$ ) (em ambos os casos quando analisados separadamente) e iii. a presença de qualquer dos alelos da região microssatélite associado a 8 ou 9 G da região promotora ( $P = 0,0025$ ). A presença do alelo 141 foi estatisticamente associada à negatividade em cães ( $P < 0,0001$ ). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a positividade à leishmaniose e a frequência dos alelos do exon 2 do gene DLA-DRB1, embora tenha sido observada associação significativa entre a frequência dos alelos DRB1-W, DRB1\*00101 ou DRB1-T e o resultado negativo para leishmaniose, podendo ser estes potenciais marcadores para resistência à leishmaniose em cães.

**Palavras-chave:** leishmaniose canina, MHC de classe II e Nramp1

## **Polymorphisms of gene Slc11a1 and DLA-DRB1 of dogs and susceptibility to leishmaniasis**

**SUMMARY-** The importance of visceral leishmaniasis in the context of public health has increased in the last decade. The manifestation of visceral leishmaniasis in dogs is variable and genetic studies and its relationship with visceral leishmaniasis have shown some candidate genes involved in susceptibility and resistance to this disease. This study aimed at evaluating the relationship between polymorphism of the genes Slc11a (*solute carrier family 11 member 1*), and DLA-DRB1 (*dog leukocyte antigen*) and the positivity to leishmaniasis determined by the amplification of *Leishmania* sp. kinetoplast DNA by PCR and the presence of anti-*Leishmania* sp. the indirect ELISA. We observed statistically significant associations between the leishmaniasis positive diagnosis and i. the presence of intron 1 microsatellite region alleles (141, 145 or 149) ( $P < 0.0001$ ), ii. the variation on the guanine number (8 or 9) in the promoter region ( $P = 0.0280$ ) (in both cases when analyzed separately), iii. the presence any of the microsatellite alleles associated to 8 or 9 G in the promoter region ( $P = 0.0025$ ). Microsatellite allele 141 was associated to negativity to leishmaniasis ( $P < 0.0001$ ). There was no association between the presence of any of the exon 2 DLA-DRB1 alleles and the leishmaniasis positive animals, although significant association between the frequency of the alleles DRB1-W, DRB1\*00101 or DRB1-T and negative results to leishmaniasis were observed. These might be potential markers for dog's resistance to visceral leishmaniasis.

**Key-words:** canine leishmaniasis, MHC class II and Nramp1

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na virada do século XIX, Cunningham, Borovsky, William Leishman, Charles Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, cada um independentemente, identificaram o parasita causador da leishmaniose, a que Ronald Ross deu o nome genérico de *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani* o agente etiológico da leishmaniose visceral. Em 1904, Laveran Cathoire encontrou *Leishmania* em crianças com anemia esplênica infantil. Nicolle e Comte em 1908, na Tunísia relataram pela primeira vez o parasito em cães, sugerindo seu possível papel como reservatório da doença (WHO, 2010).

Na América do Sul, o primeiro caso foi relatado por Migone, em 1913, no Paraguai, em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Penna, em 1934 a partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, observou 41 casos positivos para *Leishmania*, sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2006). Posteriormente, *Lutzomyia longipalpis* foi incriminada como espécie vetora e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães. Em 1937, Cunha e Chagas supondo ter encontrado uma nova espécie responsável pela Leishmania visceral, diferente da *Leishmania donovani*, propuseram a denominação da espécie *Leishmania chagasi*. Em 1956, Deane e Alencar estudaram os aspectos epidemiológicos da doença no Ceará (MICHALICK; GENARO, 2005).

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, antroponoses de grande importância no contexto de saúde pública mundial, apresentando diversidade clínica e epidemiológica (DESJEUX, 2004).

No homem, as formas clínicas das leishmanioses são representadas por 4 tipos: leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave, que pode ser letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como

uma doença mutiladora causando deformidades irreversíveis principalmente na face dos pacientes; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença persistente provocada por uma deficiente resposta imune celular; e leishmaniose cutânea (LC), que provoca o aparecimento de uma ou várias úlceras na pele dos pacientes. Dentre todas as formas clínicas a mais severa é a leishmaniose visceral, que tem o cão como principal reservatório do parasita (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose visceral acomete principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos, particularmente adultos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou que estão recebendo drogas imunossupressivas. A doença está fortemente ligada às condições de pobreza e 90% dos casos ocorrem nas regiões mais pobres de Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. A incidência anual de pessoas infectadas com *Leishmania* é de 12 milhões e 350 milhões de pessoas estão em risco de desenvolver a doença (WHO, 2010).

No Brasil, entre 2003 e 2009 foram registrados 34.583 casos de leishmaniose visceral no país. Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Atualmente a LV está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2011).

### **Agente Etiológico**

O agente etiológico das leishmanioses é um protozoário intracelular obrigatório que infecta macrófagos e apresenta duas formas evolutivas principais: uma forma promastigota ou flagelada, de corpo alongado medindo entre 14 e 20 $\mu$ m encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Figura 1-A) e a outra, amastigota ou sem flagelo, de corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2 $\mu$ m nos tecidos dos vertebrados (Figura 1-B) (BRASIL, 2006; PÊSSOA; MARTINS, 1982).

Há cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania* dispersas pelos países do Velho Mundo e do Novo Mundo, sendo pelo menos 20 responsáveis pela infecção nos seres humanos. Estes parasitas são taxonomicamente classificados no Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* (BRASIL, 2006). Os membros da Ordem Kinetoplastida são caracterizados pela presença de uma rede compacta de DNA conhecida como cinetoplasto (kDNA), equivalente ao genoma mitocondrial de mamíferos e é composto de dois componentes principais, maxi e mini círculos (RODGERS, et al., 1990; SIMPSON, et al., 1997). Nas Américas a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania chagasi* espécie considerada por alguns autores semelhante à *Leishmania infantum*, que ocorre no Velho Mundo (DANTAS-TORRES, 2006; SHAW, 2006) e atualmente tidas como idênticas (MAURICIO et al., 2000).

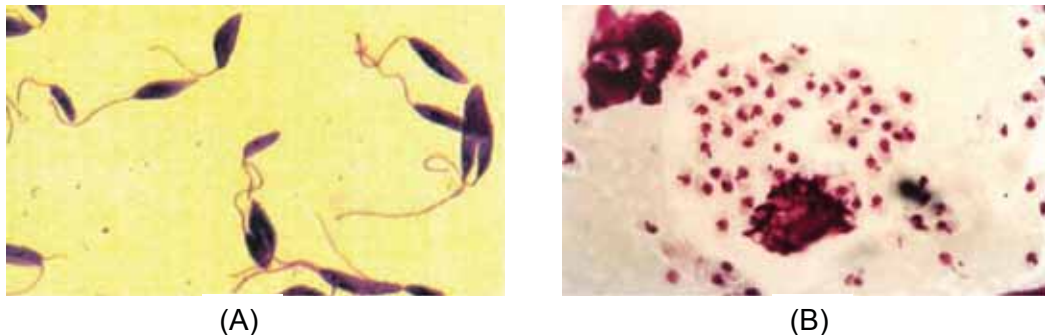


FIGURA 1 - Formas promastigota (A) e amastigota (B) do parasito *Leishmania* sp. Fonte: BRASIL (2006).

### **Reservatórios de LV**

Diversas espécies de mamíferos podem ser infectados por *Leishmania*, sendo alguns hospedeiros acidentais e outros considerados como reservatórios

para os parasitas (ROZE, 2005). Os principais reservatórios são os canídeos, sendo os mais importantes a raposa (no ciclo silvestre e rural) e o cão (no ciclo rural e, particularmente, nas áreas urbanas). Os Marsupiais vêm sendo encontrados infectados por várias espécies de protozoários flagelados, sendo que os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais importantes em Saúde Pública. Estudos revelam estes animais como os de preferência alimentar tanto pela *Lutzomyia longipalpis* no Brasil, assim como pela *Lutzomyia evansi*, na Colômbia (BRASIL, 2006; TRAVI et al., 1994).

### **Vetores de LV**

Os vetores das leishmanioses são dípteros hematófagos da família Psychodidae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. São geralmente de pequeno porte, apresentam o corpo e as patas cobertos de cerdas longas e muito numerosas, freqüentemente misturadas com escamas; possuem ainda asas longas, densamente revestidas de cerdas, assemelhando o inseto a uma minúscula mariposa. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau, ocos de bambu (BRASIL, 2006).

No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi*, embora a *L. cruzi* tenha sido descrita como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (DOS SANTOS et al., 1998). O ciclo biológico da *Lutzomyia longipalpis* se processa no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estágios), pupa e adulto. Após a cópula as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo e com alto teor de matéria orgânica. Os ovos eclodem, geralmente de 7 a 10 dias após a postura e as larvas alimentam-se e desenvolvem-se em média entre 20 a 30 dias, podendo variar de acordo com as condições do meio ambiente. Após

esse período, as larvas de quarto estágio transformam-se em pupas, que, permanecem imóveis e fixas ao substrato, pela extremidade posterior. O período pupal, em condições favoráveis, tem duração de uma a duas semanas. O desenvolvimento do ovo ao inseto adulto decorre um período de aproximadamente 30 a 40 dias de acordo com a temperatura (Figura 2). As fêmeas são hematófagas obrigatórias e podem realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive em humanos. A longevidade das fêmeas é estimada em média de 20 dias (BRASIL, 2006).

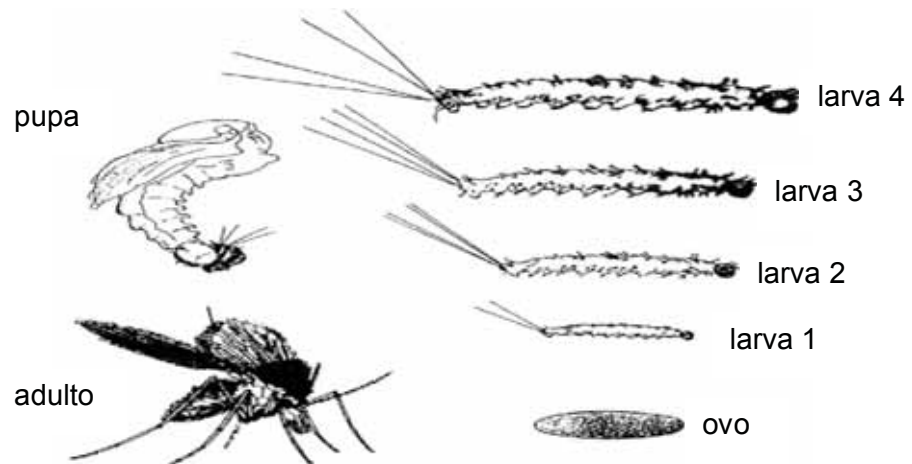


FIGURA 2 - Ciclo Biológico do *L. longipalpis*. Fonte: Young e Arias, 1992.

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas que se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas (promastigotas), as quais também se reproduzem por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes (promastigotas metacíclicas). O ciclo do parasito no inseto

se completa em torno de 72 horas no vetor (Figura 3). Após este período, as fêmeas infectantes liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário e diferenciam-se em amastigotas, multiplicando-se até o rompimento dos mesmos, levando à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (LAINSON; SHAW, 1987; REY, 1991).

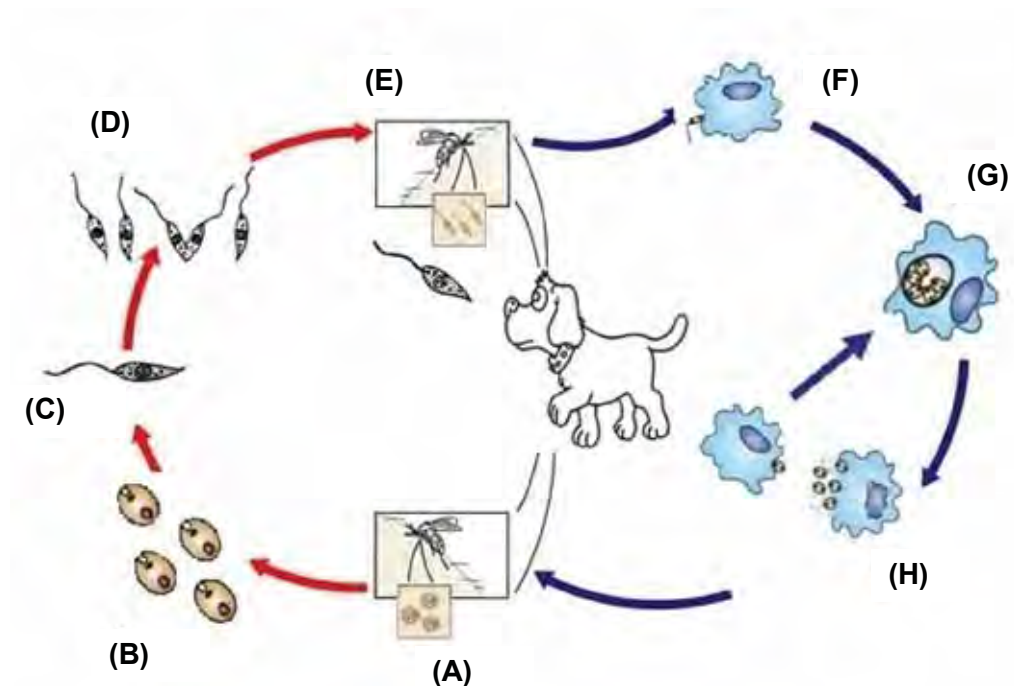


FIGURA 3 - Ciclo evolutivo da *Leishmania chagasi*. (Adaptado). Fonte: Center Diseases Control – CDC

(A) Mosquito ingere sangue infectado do cão

(B) Ingestão de células parasitadas

(C) Amastigotas se transformam em promastigotas no estômago do vetor

- (D) Promastigotas se multiplicam no estômago do vetor
- (E) Vetor retira sangue do hospedeiro e regurgita as promastigotas
- (F) Promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos
- (G) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos
- (H) Amastigotas são liberados e infectam outras células

### **Patogenia**

A sobrevivência de microorganismo patogênicos em um hospedeiro é influenciada pela resposta imunológica do hospedeiro e estratégias microbianas para resistir à imunidade. Na leishmaniose observa-se resposta imunitária dicotômica que tem como base a heterogeneidade funcional das subpopulações de linfócitos Th1 e Th2, descritas inicialmente em ratos e observada em outras espécies, incluindo o cão (BANETH et al., 2008). As células Th1 sintetizam interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e as células Th2 produzem interleucinas como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. A resistência à infecção está associada à ativação de células T CD4+Th1, as quais produzem IFN- $\gamma$  e, portanto, ativam macrófagos para destruição dos parasitas intracelulares (ABBAS et al., 2008).

Por outro lado, a ativação de células Th2 resulta em sobrevivência aumentada do parasita e exacerbação das lesões devido às ações supressoras devido principalmente a ação da IL-4 (ABBAS et al., 2008).

A resposta imunológica na leishmaniose visceral canina parece depender de muitos fatores, incluindo a genética do hospedeiro, ambiente de citocinas e natureza dos antígenos de *Leishmania*. O envolvimento da genética no hospedeiro na LV canina é apoiado pela demonstração de que a susceptibilidade à doença está associada a polimorfismos do gene NRAMP1 (natural resistance associated macrophage protein 1) canina e alelos MHC classe II (major histocompatibility complex ) ( BARBIÉRI, 2006).

### **Soluto transportador da família 11, membro 1**

A resistência ou susceptibilidade de camundongos à infecção por parasitas intracelulares como *Leishmania*, micobactérias e *Salmonella* é regulada por um locus no cromossomo 1 conhecido como *Ity*, *Lsh* ou *Bcg*. Este locus foi caracterizado por clonagem posicional e foi designado proteína do macrófago associada à resistência natural (NRAMP1), sendo posteriormente renomeado *soluto transportador da família 11, membro 1*, *Slc11a1* (ALTET et al., 2002; FORBES; GROS, 2001; GRUENHEID et al., 1997; SKAMENE et al., 1982; VIDAL et al., 1993;1995).

A proteína codificada pelo gene *Slc11a1* é composta de 12 domínios transmembrânicos (TM), um alça extracelular glicosilada e uma seqüência de transporte (Consensus Transport Motif - CTM) conservado entre outras proteínas transportadoras em ambos organismos eucariotas e procariotas (Figura 4) (ALTET et al., 2002; GOVONI et al., 1995; VIDAL et al., 1995). A proteína SLC11a está localizada nos compartimentos de endossomas tardios e lisossomas de células fagocitárias, como monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares sendo rapidamente deslocada para a membrana do fagolisossomo durante a fagocitose (CELLIER et al., 1997; FORBES; GROS, 2001; VIDAL et al., 1993).

A função bioquímica desta proteína ainda não está totalmente clara e são descritas duas teorias: a primeira sugere que a proteína transportaria íons ferro para o interior de fagolisossomas, auxiliando a reação catalítica Fenton ou Haber-Weiss, que gera radicais hidroxilas altamente tóxicos para bactérias. A segunda propõe que a *Slc11a1* realizaria o transporte de íons para fora do fagolisossomo diminuindo o conteúdo iônico dentro dos fagolisossomas, principalmente ferro ( $Fe^{2+}$ ), manganês ( $Mn^{2+}$ ) e zinco ( $Zn^{2+}$ ), que são fundamentais para o crescimento de bactérias, controlando a multiplicação de microrganismos intracelulares dos fagolisossomos (FORTIER et al., 2005; FRITSCHEA et al., 2008; WYLLIE; GOSS, 2002).

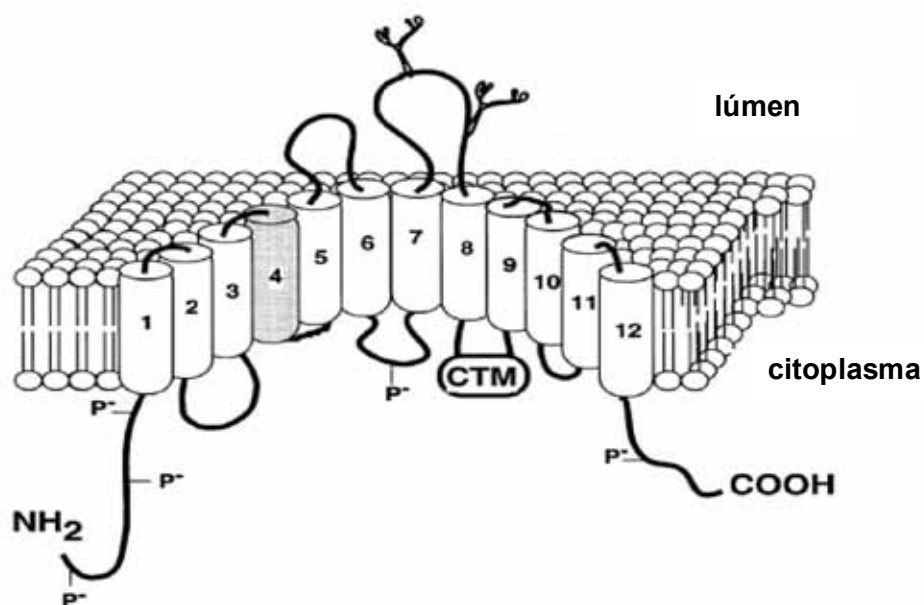


FIGURA 4 - Representação da proteína de membrana codificada pelo gene Slc11a1. Fonte: Govoni e Gros, 1998.

Ortólogos do gene Slc11a1 foram identificados em diversas espécies de mamíferos como em ratos (GE et al., 1996) bovinos (FENG et al., 1996); suínos (TUGGLE et al., 1997), caninos (ALTET et al., 2002), chimpanzés (ROGER et al., 1998) além da espécie humana (CELLIER et al., 1994).

O gene canino Slc11a1 está localizado no cromossomo 37 é composto por 15 exons e está distribuído em um fragmento de DNA de 9 kb. Este gene codifica uma proteína de 547 aminoácidos com identidade de aminoácidos de até 87% com proteínas Slc11a1 de diferentes espécies de vertebrados (Figura 5) (ALTET et al., 2002).

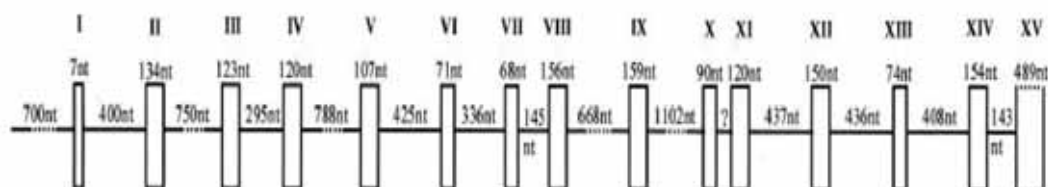


FIGURA 5 - Estrutura genômica do gene canino Slc11a1. nt, nucleotídeos. Fonte: Altet et al., (2002).

O Slc11a1 possui efeitos pleiotrópicos sobre ativação de macrófagos, incluindo a regulação quimiocinas CXC, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), moléculas classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), liberação de óxido nítrico (NO), fluxo L-arginina, explosão oxidativa além de uma atividade tumoricida, assim como, antimicrobiana (BLACKWELL et al., 2001).

No homem, vários estudos foram realizados para verificar polimorfismos do gene Slc11a1 que possam estar associados à susceptibilidade ou resistência a doenças, como artrite reumatóide (SHAW et al., 1996), hanseníase (ABEL et al., 1998), tuberculose (BELLAMY et al., 1998), sarcoidose (MALIARIK et al., 2000), esclerose múltipla (KOTZE et al., 2001), diabetes (BASSUNY et al., 2002), doença de Kawasaki (OUCHI et al., 2003), leishmaniose visceral (BUCHETON et al., 2003), hepatite C (ROMERO-GÓMEZ et al., 2004), úlcera de Buruli (STIENSTRA et al., 2006) e doença de Crohn (GAZOULI et al., 2008). Alguns estudos têm indicado o envolvimento do gene Slc11a1 na susceptibilidade e resistência à leishmaniose canina (ALTET et al., 2002; SANCHEZ-ROBERT et al., 2005).

### **Complexo principal de histocompatibilidade**

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é uma região gênica que inclui genes altamente polimórficos que codificam proteínas que são essenciais para o estabelecimento e regulação da resposta imune, na maioria dos vertebrados (ABBAS et al., 2008; DEBENHAM et al., 2005).

Na década de 1940 através de técnicas genéticas o MHC foi descoberto por causa de seu papel na rejeição de órgãos e tecidos transplantados. Durante 20 anos a única função atribuída ao MHC foi a rejeição de transplantes, o que não se justificava pelo fato deste gene ter sido preservado ao longo dos anos, já que o transplante não é algo natural. Posteriormente observou-se que os genes MHC controlam a resposta imunológica aos antígenos protéicos (ABBAS et al., 2008). Este papel é desempenhado pelas moléculas do MHC através da ligação e apresentação de peptídeos às células T, que resulta na eliminação de células infectadas ou rejeição celular de órgãos transplantados (WAGNER et al., 1999).

Existem dois tipos principais de moléculas MHC, denominadas moléculas de classe I e moléculas de classe II. A de classe I apresentam peptídeos aos linfócitos citolíticos CD8+ (CTLs) e a de classe II, os apresentam às células T auxiliares CD4+. Antígenos de classe I são expressos em todas as células somáticas, enquanto que moléculas de classe II são expressos em células apresentadoras de antígenos como macrófagos (ABBAS et al., 2008; DOXIADIS et al., 1989; WAGNER et al., 2003).

A molécula de MHC de classe I possuem duas cadeias: uma cadeia  $\alpha$  (cadeia pesada), composta de três domínios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , uma região transmembrana, um domínio citoplasmático e uma molécula chamada  $\beta_2$ -microglobulina, não-covalente. A molécula MHC de classe II tem quatro domínios extracelulares, é um heterodímero composto por uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$  e cada sub-região (DR, DP e DQ em seres humanos), contém um gene da cadeia  $\alpha$  funcional e um ou mais genes de cadeia funcional  $\beta$ . A cadeia  $\alpha$  inclui dois domínios extracelulares ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática (Figura 6) (HUGHES; YEAGER, 1998).

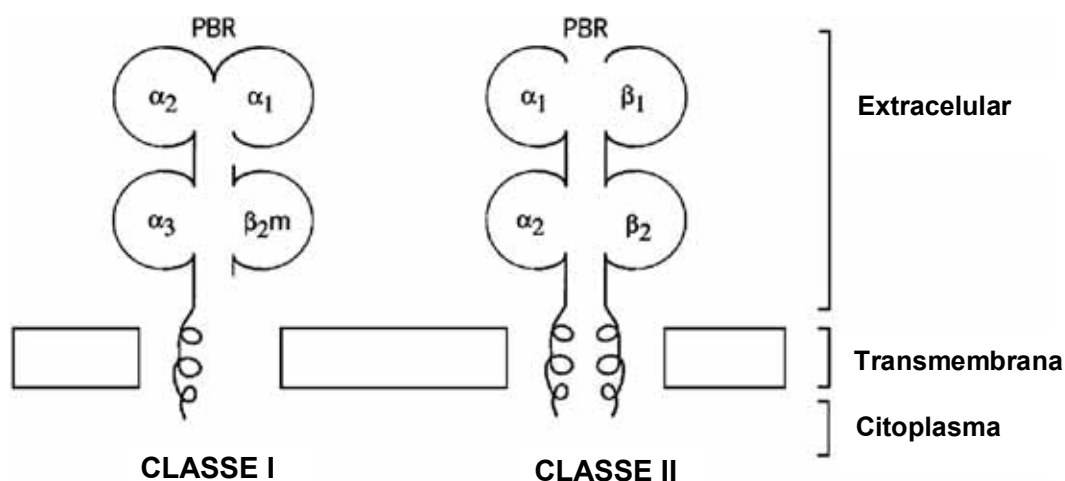


FIGURA 6 - Estrutura da molécula de MHC classe I e II. Fonte: Hughes e Yeager, 1998.

Os genes DQA, DQB e DRB apresentam altos níveis de polimorfismo na maioria dos mamíferos sendo o DRB o que mais varia. Isso faz com que genes MHC estejam entre os mais variáveis em todo o genoma (MEYER; THOMSON, 2001).

O MHC humano é chamado de antígeno leucocitário humano (HLA) e a partir da construção do mapa do locus HLA, foram identificados três genes HLA-A, HLA-B e HLA-C através de ensaios sorológicos. Posteriormente, em estudos de resposta celular, foi identificado um outro *locus* adjacente ao *locus* HLA sendo denominado HLA-D ou HLA-DR. Outros genes semelhantes ao HLA-DR foram localizados e foram chamados HLA-DQ e HLA-DP pela proximidade com a letra R (ABBAS et al., 2008).

Em cães, o sistema MHC é denominado antígeno leucocitário canino (DLA) e está localizado no cromossomo 12. Esta região apresenta conservada sintonia com o cromossomo humano 6p22.1-q22 (DEBENHAM et al., 2005).

O DLA está dividido em três regiões: DLA-A (antígeno de classe I), DLA-B (antígeno de classe II), e DLA-C (antígeno classe I) e DLA-DR, avaliados em cultura mista de leucócitos (MLC) (WAGNER et al., 2002).

O MHC de classe II do cão é considerado um candidato à coadjuvante da susceptibilidade e algumas doenças já foram associadas ao polimorfismo do gene em outras espécies incluindo a leishmaniose visceral já associada ao alelo do *locus* DLA-DRB1 (QUINNELL et al., 2003).

Isto posto, o presente estudo objetivou avaliar a relação entre polimorfismos nos genes Slc11a1 e DLA-DRB1 e infecção a *Leishmania* sp., em cães de área endêmica para leishmaniose visceral canina.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABEL, L.; SÁNCHEZ, F. O.; OBERTI, J.; THUC, N. V.; HOA, L. V.; LAP, V. D.; SKAMENE, E.; LAGRANGE, P. H.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 1 p. 133-145, 1998.

ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L.; RENIER, C.; SANCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2763-2771, 2002.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitology**, v. 7, p. 324-330, 2008

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

BASSUNY, W. M.; IHARA, K.; MATSUURA, N.; AHMED, S.; KOHNO, H.; KUROMARU, R.; MIYAKO, K.; HARA, T. Association study of the NRAMP1 gene promoter polymorphism and early-onset type 1 diabetes. **Immunogenetics**, v. 4, p. 282-285, 2002.

BELLAMY, R.; RUWENDE, C.; CORRAH, T.; MCADAM, K. P.; WHITTLE, H. C.; HILL, A. V. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. **The New England Journal of Medicine**, v. 10, p. 640-644, 1998.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A.; SIBTHORPE, D.; PAPO, N.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; MOHAMMED, H.; IBRAHIM M. Slc11a1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cellular Microbiology**, v. 3, p. 773-784, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31941](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941)>. Acesso em: 16 jul. 2011

BUCHETON, B.; ABEL, L.; KHEIR, M. M.; MIRGANI, A.; EL-SAFI, S. H.; CHEVILLARD, C.; DESSEIN, A. Genetic control of visceral leishmaniosis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. **Genes and Immunity**, v.4, p.104-109, 2003.

BUENO, R.; CARVALHO NETA, A. V.; XAVIER, M. N.; OLIVEIRA, R. G.; DINIZ, S. A.; MELO, M. N.; SANTOS, R. L. cDNA sequencing and expression

of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 332-339, 2009.

CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S. KWAN, T.; GROULX, N.; LIU, J.; SANCHEZ, F.; SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Human natural resistance associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue specific expression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p.1741-1752, 1994.

CELLIER, M.; SHUSTIK, C.; DALTON, W.; RICH, E.; HU, J.; MALO, D.; SCHURR, E.; GROS, P. The Human NRAMP1 Gene as a Marker of Professional Primary Phagocytes: Studies in blood cells and in induced HL- 60 promyelocytic leukemia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 61, p. 96-105, 1997.

Center for Disease Control. Leishmaniasis life cycle. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2011

DANTAS-TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 117-118, 2006.

DEBENHAM, S. L.; HART, E. A.; ASHURST, J. L.; HOWE, K. L.; QUAIL, M. A.; OLLIER, W. E.; BINNS, M. M. Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species. **Genomics**, v.1, p. 48-59, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004.

DOS SANTOS, S. O.; ARIAS J.; RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M.; DE FREITAS R. A, MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v.12, p. 315-317, 1998.

DOXIADIS, I.; KRUMBACHER, K.; NEEFJES, J. J.; PLOEGH, H. L.; GROSSE-WILDE, H. Biochemical evidence that the DLA-B locus codes for a class II determinant expressed on all canine peripheral blood lymphocytes. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, v. 3, p. 219-224, 1989.

FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; SCHURR, E.; GROS, P.; ADAMS, L. G.; TEMPLETON, J. W. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Research*, v.6, p. 956-964, 1996.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, v. 8, p. 397-403, 2001.

FORTIER, A.; MIN-OO, G.; FORBES, J.; LAM-YUK-TSEUNG, S.; GROS, P. Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, p. 868–877, 2005.

FRITSCHER, G.; NAIRZA, M.; THEURLA, I.; MAIRA, S.; BELLMANN-WEILERA, R.; BARTONB, H. C.; WEISS, G. Modulation of macrophage iron transport by Nramp1 (Slc11a1). *Immunobiology*, v. 212, p. 751-757, 2008.

GAZOULI, M.; ATSAVES, V.; MANTZARIS, G.; ECONOMOU, M.; NASIOULAS, G.; EVANGELOU, K.; ARCHIMANDRITIS, A. J.; ANAGNOU, N. P. Role of functional polymorphisms of NRAMP1 gene for the development of Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 10, p. 1323-1330, 2008.

GE, L.; REMMERS, E. F.; DU, Y.; WILDER, R. L. Genomic cloning and genetic mapping of the rat Nramp1 (Bcg) gene on Chromosome 9. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 856-857, 1996.

GOVONI, G.; VIDAL, S.; CELLIER, M.; LEPAGE, P.; MALO, D.; GROS, P. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp1 gene in macrophages. **Genomics**, v.1, p. 09-19, 1995.

GOVONI, G; GROS, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. **Inflammation research**, v. 47, p. 277-284, 1998.

GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. **The Journal Experimental Medicine**, v. 4, p. 717-730, 1997.

HUGHES, A. L.; YEAGER, M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Annual Review Genetics**, v. 32, p. 415-435, 1998.

KOTZE, M. J.; VILLIERS, J. N.; ROONEY, R. N.; GROBBELAAR, J. J.; MANSVELT, E. P.; BOUWENS, C. S.; CARR, J.; STANDER, I.; DU PLESSIS, L. Analysis of the NRAMP1 gene implicated in iron transport: association with multiple sclerosis and age effects. **Blood cells, Molecules, and Diseases**, v.27, p. 44-53, 2001.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution: In: PETER, W; KILLICK-KENDRICK R. (eds.). **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987.

MALIARIK, M. J.; CHEN, K. M.; SHEFFER, R. G.; RYBICKI, B. A.; MAJOR, M. L.; POPOVICH JUNIOR, J.; IANNUZZI, M. C. The Natural Resistance-Associated Macrophage Protein Gene in African Americans with Sarcoidosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 22, p. 672-675, 2000.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, p. 188-189, 2000.

MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Annals of human genetics**, v. 65 p. 1-26. 2001.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. **Leishmaniose Visceral Americana**. In: NEVES, D.P.; DE MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.77.

OUCHI, K.; SUZUKI, Y.; SHIRAKAWA, T.; KISHI, F. Polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 2, p. 326-332, 2003.

PENNA, H. A. Leshmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.

PÊSSOA, S. B.; MARTINS, S. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.448-464.

QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DYE, C.; GARCEZ, L. M.; SHAW, M. A.; CARTER, S. D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E.; Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, p. 23-28, 2003.

REY L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. O complexo "Leishmania donovani" e a leishmaniose visceral. p. 215-226.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

ROGER, M.; SÁNCHEZ F. O.; SCHURR, E. Comparative study of the genomic organization of DNA repeats within the 5'-flanking region of the natural resistance-associated macrophage protein gene (NRAMP1) between humans and great apes. **Mammalian Genome**, v. 6, 435-439, 1998.

ROMERO-GÓMEZ, M.; MONTES-CANO, M. A.; OTERO-FERNÁNDEZ, M. A.; TORRES, B.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, D.; AGUILAR, F.; BARROSO, N.; GÓMEZ-IZQUIERDO, L.; CASTELLANO-MEGIAS, V. M.; NÚÑEZ-ROLDÁN, A.; AGUILAR-REINA, J.; GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M. F. SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. **Gut**, v.53, p. 446-450, 2004.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. a spreading disease. Diagnosis and treatment. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.15, 39-52, 2005.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. **Journal of Heredity**, v. 96, p. 755-758, 2005.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M.; GIGER, U.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, p. 36- 48, 2008.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 577-579, 2006.

SHAW, M. A.; CLAYTON, D.; ATKINSON, S. E.; WILLIAMS, H.; MILLER, N.; SIBTHORPE, D.; BLACKWELL, J. M. Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. **Journal of Medical Genetics**, v. 33, p. 672-77, 1996.

SIMPSON, L. The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, p. 133-141, 1997.

SKAMENE, E.; GROS, P.; FORGET, A.; KONGSHAVN, P. A.; CHARLES, C.; TAYLOR, B. A. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. **Nature**, v. 297, p. 506-509, 1982.

STIENSTRA, Y.; VAN DER WERF, T. S.; OOSTEROM, E.; NOLTE, I. M.; VAN DER GRAAF, W. T.; ETUAFUL, S.; RAGHUNATHAN, P. L.; WHITNEY, E. A.; AMPADU, E. O.; ASAMOA, K.; KLUTSE, E. Y.; TE MEERMAN, G. J.; TAPPERO, J. W.; ASHFORD, D. A.; VAN DER STEEGE, G. Susceptibility to Buruli ulcer is associated with the SLC11A1 (NRAMP1) D543N polymorphism. **Genes and Immunity**, v. 3, p. 185-189, 2006.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C. D.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A e VELLEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir

of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 557-565, 1994.

TUGGLE, C. K.; SCHMITZ, C. B.; GINGERICH-FEIL, D. Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. **Journal of Animal Science**, v. 1, p. 277, 1997.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell Press**, v. 3, p. 469-485, 1993.

VIDAL, S. M.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. **The Journal Experimental Medicine**, v.182, p.655-666, 1995.

WAGNER, J. L.; BURNETT, R. C.; STORB, R. Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives. **The Journal of Heredity**, v. 90, p. 35-38, 1999.

WAGNER, J. L.; SARMIENTO, U. M.; STORB, R. Cellular, serological, and molecular polymorphism of the class I and class II loci of the canine major histocompatibility complex. **Tissue Antigens**, v. 59, p. 205-210, 2002.

WAGNER, J. L. Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. **The Journal of Heredity**, v. 94, p. 23-26. 2003.

WHO. **Control of the leishmaniasis:** report of a meeting of the WHO expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, v. 949, p. 1-185, 2010.

WYLLIE, P. S.; GOSS, J. A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formely Nramp1) and iron metabolism in macrophages. **Microbes and Infection**, v.4, p. 351-359, 2002.

YOUNG, D.; ARIAS, J. R. *Phlebotomus*: vectores de la leishmaniasis en las Américas. **Cuaderno Técnico**, n. 33, 1992.

## **CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE SLC11A1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM A LEISHMANIOSE CANINA**

**Resumo** - A leishmaniose visceral é um grave problema de saúde pública, cujo reservatório principal é o cão doméstico. Há indícios de que os polimorfismos dos genes *Slc11a1* (*solute carrier family 11 member 1*) e DLA de classe II (*dog leukocyte antigen*) estariam envolvidos com a manifestação da susceptibilidade e resistência à leishmaniose canina. O presente estudo analisou a região microssatélite localizada no íntron1 do gene *Slc11a1*, assim como três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e uma sequência rica em guaninas (G) na região promotora deste gene, em amostras de cães sem raça definida de área endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba, SP, Brasil). O objetivo do trabalho foi avaliar a relação entre as variantes alélicas do gene *Slc11a1* e positividade à leishmaniose, determinada por meio da amplificação de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* sp. por PCR, e pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ao teste ELISA indireto. Foram observadas associações estatisticamente significantes entre a positividade para leishmaniose e: i. a presença do alelo (141, 145 ou 149) da região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub> localizada no íntron 1 do gene *Slc11a1* ( $P < 0,0001$ ) ii. a variação do número de guaninas (8 ou 9 G) da região promotora ( $P=0,0280$ ) (em ambos os casos quando analisados separadamente) e iii. a presença de qualquer dos alelos da região microssatélite associado a 8 ou a 9 G da região promotora ( $P= 0,0025$ ). A presença do alelo 141 foi estatisticamente associada à negatividade em cães ( $P < 0,0003$ ), assim como sua presença combinado à ocorrência de 8 guaninas na região promotora, podendo ser este um marcador para resistência à leishmaniose em cães.

**Palavras-chave:** cão, PCR, resistência genética e NRAMP1

## Introdução

A leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas em todo o mundo, acometendo principalmente pessoas de baixa renda de países em desenvolvimento (WHO, 2010). No Brasil, caracterizada inicialmente como uma doença rural, dados epidemiológicos dos últimos anos revelam sua periurbanização, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL, 2011).

As formas clínicas das leishmanioses são representadas por quatro tipos: a leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave e que pode ser letal quando não tratada; a leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como doença mutiladora causadora de deformidades irreversíveis principalmente na face dos pacientes; a leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença persistente provocada por resposta imune celular deficiente; e a leishmaniose cutânea (LC), que provoca o aparecimento de inúmeras ulcerações na pele dos pacientes (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose visceral, forma clínica mais grave da doença, nas Américas é transmitida pelo vetor *Lutzomyia longipalpis* e tem no cão seu principal reservatório (DESJEUX, 2004).

O desenvolvimento da doença nos cães depende de diversos fatores tais como o estado nutricional, infecções concomitantes, parasitismo, virulência do parasita, exposição prévia à leishmaniose e fatores genéticos (BANETH, et al., 2008). Trabalhos recentes têm indicado o envolvimento de genes específicos na manifestação de susceptibilidade e resistência à leishmaniose canina, como por exemplo, polimorfismo do gene *Slc11a1* (*solute carrier family 11 member 1*) (ALTET et al., 2002; BUENO et al., 2009; SANCHEZ-ROBERT et al., 2005; SANCHEZ-ROBERT et al., 2008) e DLA de classe II (*dog leukocyte antigen*) (QUINNELL et al., 2003).

Em estudo realizado por Solano-Gallego et al. (2000) em grupo de cães assintomáticos, revelou-se que cães da raça Ibizian Hound apresentam forte

resposta imunocelular para leishmaniose, raramente apresentando doença clínica, ressaltando o papel da resistência genética.

O gene *Slc11a1* codifica proteína transportadora de íons envolvida no controle da replicação intrafagossomal de parasitas e na ativação de macrófagos (ALTET et al., 2002). No homem, a proteína *Slc11a1* está associada à resposta a enfermidades virais (HIV), bacterianas (tuberculose, hanseníase, meningite meningocócica) ou causadas por protozoários como a leishmaniose visceral (BLACKWELL et al., 2001).

Altet et al. (2002) sequenciaram e mapearam o gene *Slc11a1*, situado no cromossomo canino 37 (CFA37), e que abrange 9 quilobases, descrevendo a região promotora de 700 pares de base (pb), os 15 exons e região microssatélite polimórfica (TAAA)<sub>n</sub> no íntron 1. Observaram ainda que havia diferença estatisticamente significativa quanto à frequência de ocorrência do alelo 145 da região microssatélite do íntron 1 em cães susceptíveis à leishmaniose.

Sanchez-Robert et al. (2005) avaliaram polimorfismos no gene *Slc11a1* em um grupo de 57 cães saudáveis e 40 cães diagnosticados com leishmaniose e observaram a ocorrência de três perfis haplotípicos de marcadores SNP (TAA, TGA e CGA), e polimorfismo da região rica em guaninas (7 a 9 Gs), ambos na região promotora do gene. Observaram ainda a associação entre cães da raça Boxer que possuíam haplótipo TAG-9-145 e resistência à leishmaniose bem como cães com o haplótipo TAG-8-141, da mesma raça, susceptíveis à leishmaniose visceral.

O presente estudo avaliou a relação entre os diferentes perfis polimórficos do gene *Slc11a1* previamente descritos, com a infecção para *Leishmania* sp. em cães de área endêmica para leishmaniose visceral. A hipótese assumida foi de que os mecanismos de resistência de cães à leishmaniose estejam associados à combinação de variantes alélicas (haplótipos) no gene *Slc11a1*, e que estas possam ser utilizadas como marcadores genéticos para melhor entendimento da participação deste gene no desenvolvimento desta zoonose.

## **Material e Método**

### **Área de estudo e amostras**

O estudo foi realizado no município de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil (latitude 21°12' sul e longitude 50°25' oeste), área endêmica para leishmaniose visceral canina. Um banco com amostras biológicas de 400 cães foi constituído, compreendendo cães atendidos no Hospital Veterinário “Luís Quintilhiano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - campus Araçatuba, cães encaminhados para eutanásia junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal deste mesmo município e cães domiciliados estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolo 2008-001309).

Para a constituição do banco de amostras, após o consentimento dos proprietários, foram colhidas amostras de sangue dos cães com idade superior a dois anos, tempo considerado mínimo para exposição dos cães a infecção por *Leishmania* sp. na área (NUNES et al., 2008). Dados epidemiológicos como idade, sexo e raça foram registrados no momento da colheita de sangue.

Foram considerados positivos ou negativos para leishmaniose os cães que apresentaram resultados concordantes ao diagnóstico por PCR e ELISA indireto, constituindo dessa forma o sub-grupo de cães utilizados para as análises genéticas subsequentes.

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR) kDNA de *Leishmania* sp.**

A purificação do DNA a partir do sangue dos cães foi realizada pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação com etanol, após lise celular e digestão protéica com proteinase K (SAMBROOK et al., 1989).

Para a detecção do DNA do parasito foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990), que amplificam região conservada de 120 pb de cinetoplasto de *Leishmania* sp.

A amplificação ocorreu em volume de 25 µL contendo entre 10 e 20 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies®). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com solução de nitrato de prata. Em todas as reações foram incluídos controle positivo (amostra de DNA de cão com diagnóstico sorológico positivo e sinais clínicos de leishmaniose), controle negativo (DNA de cão com diagnóstico sorológico negativo e sem sinais clínicos de leishmaniose) e controle negativo da reação (sem DNA).

### **ELISA indireto**

As amostras de soro dos cães foram avaliadas quanto a presença de anticorpos anti-*Leishmania* por meio do teste ELISA indireto realizado no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP - campus Araçatuba, segundo descrição de Lima et al. (2005).

### **PCR e análise da região microssatélite do íntron 1**

A região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub>, localizada no íntron 1 do gene *Slc11a1*, foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Altet et al. (2002), que amplificam fragmento de DNA com tamanhos variando entre 133 e 149 pb.

A amplificação ocorreu em volume de 25 µL contendo entre 10 e 20 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U de Taq DNA polimerase recombinante (Life Technologies®). As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por

5 minutos seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30s e 72°C por 30s, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, 0,25 µL do padrão de peso molecular ET-400 ROX (GE Healthcare®) foram adicionados às amostras para posterior cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados com auxílio do software MegaBACE Fragment Profiler v1.2 (GE Healthcare®). A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare®), segundo o protocolo do fabricante.

### **PCR e sequenciamento da Região Promotora**

Para a análise dos polimorfismos da região promotora do gene *Slc11a1* empregaram-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Altet et al. (2002) que amplificam fragmento de DNA de aproximadamente 539 pb daquela região. A amplificação foi realizada em volume de 50 µL contendo 200 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Life Technologies®). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, 64°C por 30s e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram purificados com os sistemas *illustra GFX™ PCR DNA* e *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare®). Para reação de sequenciamento foi utilizado o sistema *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit* (MegaBACE™), empregando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores internos descritos para a PCR, sendo a leitura realizada em sequenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare®) segundo as especificações do fabricante.

A formação do consenso entre as sequências geradas automaticamente foi realizada com o auxílio do software *Codoncode Aligner* v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), os quais foram posteriormente alinhados com a sequência descrita por Altet et al. (2002) disponível no

GenBank (AF091049) através do software *Bioedit Sequence Alignment Editor*® (HALL,1999).

### **Análise Estatística**

Associações entre a presença de alelos específicos da região microssatélite do íntron 1 e o número de guaninas (G) da região promotora do gene *Slc11a1*, e a positividade/negatividade para leishmaniose canina foi realizada utilizando-se o teste do  $\chi^2$  (Qui-quadrado), com correção para testes múltiplos (*False Discovery Rate - FDR*) realizado com o programa computacional SAS 2004, considerando-se estatisticamente significativo quando  $P < 0,05$  (BENJAMINI e HOCHBERG).

### **Resultados**

Do total de 400 cães utilizados para a formação do banco de amostras biológicas utilizados no presente estudo, cães sem raça definida (SRD) corresponderam a mais da metade do contingente (66,7%), embora tenham sido identificadas 27 raças diferentes, sendo as mais freqüentes a Poodle (11,2%), Pinscher (2,5%), seguidos de Rottweiler, Boxer e Basset (2,0%). As fêmeas representaram 48,4% da população avaliada e os machos 51,6%.

A freqüência de cães com idade entre 2-4 anos foi de 66,8% (267/400), entre 4-6 anos, 14,0% (56/400) e maiores de 6 anos, 19,3% (77/400).

### **Positividade à leishmaniose**

Das 400 amostras analisadas quanto à presença de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* por PCR, 46% (185/400) foram positivas; ao teste ELISA indireto observou-se positividade em 36% (144/400) das amostras. Para realizar os testes de associação genótipo-fenótipo foram selecionadas

somente as amostras em que os resultados dos dois testes diagnósticos foram concordantes, tendo o número de amostras sido reduzido para 304, sendo 127 (41,8%) cães positivos e 177 (58,2%) negativos.

Considerando-se somente os resultados da PCR ou do teste ELISA indireto não se observou associação alguma entre a positividade/negatividade e polimorfismos do gene *Slc11a1*.

### **Variantes Alélicas**

Durante a análise da região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub> do íntron1 do gene *Slc11a1* foram identificados 6 alelos na população estudada (133, 137, 139, 141, 145 e 149), sendo os mais freqüentes os alelos 149 (26,6%), 145 (37,2%) e 141 (34,9%).

Após sequenciamento direto do DNA da região promotora observou-se que todas as amostras foram monomórficas para os três SNPs da região promotora (somente ocorrendo o haplótipo TAG) e que 60,5% das amostras apresentaram sequência com 8 guaninas (8G), 35,5% com 9G e 3,9% com 7G.

Os resultados do diagnóstico da leishmaniose foram associados à presença dos alelos (141, 145 e 149) da região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub> do íntron1 ou com a variação de 8 ou 9 guaninas (G) na região promotora, não tendo sido observada associação estatisticamente significativa ( $P= 0,3585$ ) quando estas variáveis genéticas foram analisadas conjuntamente.

Entretanto, observou-se associação estatisticamente significativa entre a presença de 8G ou 9G e o resultado para leishmaniose ( $P=0,0280$ ), quando analisados separadamente. Da mesma forma, também se observou associação significativa ( $P<0,0003$ ) entre a presença de qualquer um dos alelos (141, 145 ou 149) e o resultado para leishmaniose. Quando se analisou a presença destes alelos (141, 145 ou 149) combinados com a variação de 8 ou 9G e o resultado para leishmaniose também se observou associação estatisticamente significativa ( $P=0,0025$ ) (Figura 1).

A análise, dois a dois, da presença dos alelos revelou associação estatisticamente significativa entre a presença do alelo 141 e 145 e negatividade à leishmaniose ( $P < 0,0003$  e  $P = 0,0116$ , respectivamente) e entre a presença dos alelos 149 ( $P = 0,0006$ ) e positividade à leishmaniose em cães. A presença do alelo 141 foi observada em 74,7% das amostras negativas, sugerindo estar este alelo mais freqüentemente associado à negatividade em cães. A associação estatisticamente significativa também foi observada entre a negatividade à leishmaniose e a presença dos haplótipos 141-8G ( $P = 0,0012$ ) e 149-8G ( $P = 0,0231$ ).

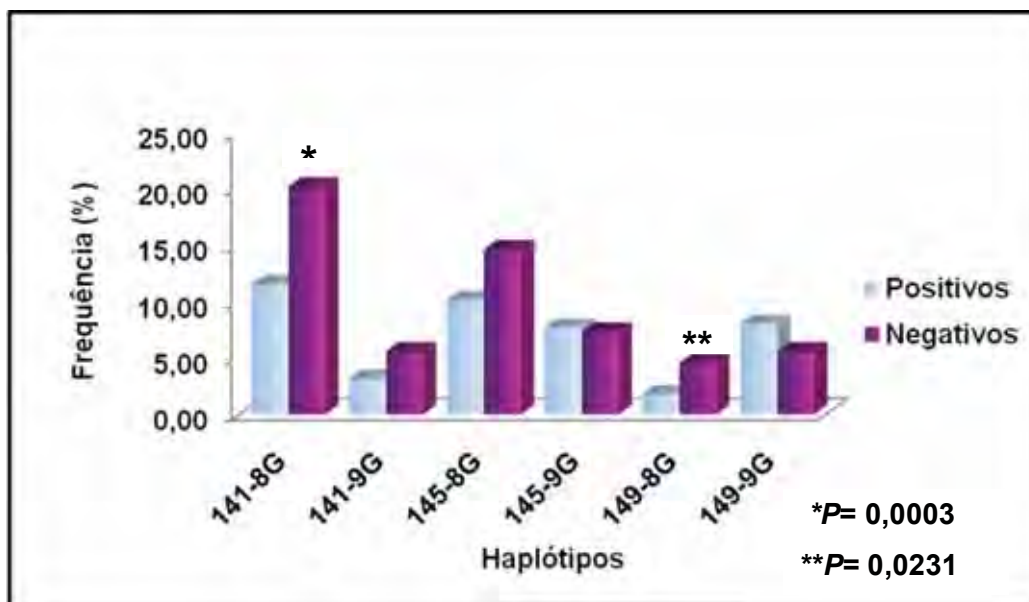


FIGURA 1 - Frequência dos diferentes haplótipos dos alelos da região microssatélite  $(TAAA)_n$  do íntron 1 e da região rica em guanina da região promotora do gene *Slc11a1* segundo o resultado para leishmaniose.

## Discussão

O presente estudo objetivou avaliar se as variantes alélicas do gene *Slc11a1* descritas por Altet et al. (2002) e Sanchez-Robert et al. (2005) como sendo associadas à positividade a *Leishmania sp.* também mantinham algum tipo de relação com as condições da região brasileira estudada, onde a população canina é composta predominantemente por cães sem raça definida (SRD) e em área endêmica para leishmaniose na qual o principal agente é a *L. chagasi* (BRASIL, 2011).

A presença dos alelos 141, 145 ou 149 revelaram associação estatisticamente significativa com o resultado para a infecção por *Leishmania* avaliada por PCR e teste ELISA indireto. Os alelos 141 e 145 estão relacionados à resistência e o alelo 149 à susceptibilidade. Contrariamente, associação significativa entre cães susceptíveis e portadores do alelo 145 foi observado por Altet et al. (2002). As diferenças observadas no presente trabalho, em comparação ao previamente descrito por Altet et al. (2002), podem ser decorrentes das diferenças entre a composição genética (padrão racial) e o tamanho das populações analisadas. Além disto, a análise estatística inicial também revelou associação significativa entre o alelo 145 e positividade, porém, a correção pela análise FRD não manteve tal associação significativa na presente pesquisa.

Entretanto, de particular interesse no presente trabalho foi à associação entre a presença do alelo 141 e a negatividade à leishmaniose, sugerindo estar este alelo de alguma forma relacionado à resistência. Além da presença do alelo 141, a presença de 8G, combinada ou não ao alelo 141 também está relacionada à negatividade à leishmaniose e poderia ter algum efeito na expressão deste gene, conforme já mencionado por Altet et al. (2002).

Ao contrário dos resultados da presente pesquisa e daqueles observados por Altet et al. (2002), Sanchez-Robert et al. (2005) não observaram diferenças significativas entre o resultado para positividade à

leishmaniose tanto com relação a presença dos alelos da região microssatélite do íntron 1 quanto com a variação na região rica em guanina na região promotora do gene *Slc11a1*, quando analisados separadamente. Porém, ao analisarem os SNPs e o número de guaninas na região promotora, juntamente com a região microssatélite do íntron 1, em cães da raça Boxer com leishmaniose, observaram que os cães portadores do haplótipo TAG-8-141 (SNP-região rica em G alelo do íntron 1 da região microssatélite do gene *SLC11a1*) eram mais suscetíveis à leishmaniose. Por outro lado, tal estudo também revelou que cães da raça Boxer, portadores do haplótipo TAG-9-145 homocigotos, eram mais resistentes à leishmaniose resultados estes contrários ao da presente pesquisa. Tais discrepâncias entre os estudos carecem de mais análises para melhor entendimento, entretanto os mesmos fatores apontados anteriormente como diferenças na constituição genética da população e tamanho amostral podem estar relacionados a elas.

Com o intuito de pesquisar a expressão do gene *Slc11a1* e variações na sequência do DNA complementar (cDNA) Bueno et al. (2009) avaliaram cDNAs de macrófagos de cães fenotipicamente resistentes e suscetíveis à leishmaniose visceral não observando diferenças significantes nas sequências analisadas, tampouco na expressão. Ainda que na presente pesquisa tenhamos analisado polimorfismos do gene e não sequências expressas os resultados observados reafirmam que a ocorrência destes polimorfismos e sua associação com resistência ou suscetibilidade à leishmaniose ainda não está claro.

A heterogeneidade dos cães SRD e o tamanho da população estudada podem contribuir para explicar as diferenças observadas entre o presente estudo e aqueles previamente descritos. Conforme já apontado por Sanchez-Robert et al. (2008) e Bueno et al. (2009), os mecanismos genéticos relacionados à resistência a leishmaniose devem ser multigênicos. Dessa forma, outros estudos deverão ser realizados com ferramentas que permitam avaliar vários genes e/ou marcadores concomitantemente, para a identificação

precisa de marcadores genéticos associados com o fenótipo susceptibilidade/resistência à leishmaniose canina.

## **Conclusão**

Na população canina brasileira estudada, composta predominantemente por cães sem raça definida de área endêmica de leishmaniose causada principalmente pela *L. chagasi*, o tipo de alelo da região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub> do íntron 1 do gene Slc11a1 e o número de guaninas da região promotora do mesmo gene estão associados à negatividade ou positividade à leishmaniose em cães quando analisados separadamente, o mesmo não ocorrendo quando analisa-se os haplótipos combinando ambas regiões. O alelo 141 da região microssatélite (TAAA)<sub>n</sub> do íntron 1 do gene Slc11a1 foi mais frequente em cães negativos sozinho ou combinado à presença de 8 guaninas na região promotora deste gene, podendo ser este um marcador para resistência à leishmaniose em cães.

## **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 2009/01934-1) pelo auxílio financeiro; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Processo nº 133695/2010-7) pelas bolsas de estudos; à Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mary Marcondes e pós-graduandos pela colheita de amostras de sangue de cães do Hospital Veterinário da FMVA – UNESP, Araçatuba; à pós-graduanda Milena Araújo Viol pela colheita de amostras de cães domiciliados e a Yuri Tani Utsunomiya pelas contribuições.

## REFERÊNCIAS

ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L.; RENIER, C.; SANCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2763-2771, 2002.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)** v. 57, p. 289-300, 1995.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitology**, v. 7, p. 324-330, 2008.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A.; SIBTHORPE, D.; PAPO, N.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; MOHAMMED, H.; IBRAHIM M. Slc11a1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cellular Microbiology**, v. 3, p. 773-784, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a co-infecção *Leishmania-HIV***. Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BUENO, R.; CARVALHO NETA, A. V.; XAVIER, M. N.; OLIVEIRA, R. G.; DINIZ, S. A.; MELO, M. N.; SANTOS, R. L. cDNA sequencing and expression of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 332-339, 2009.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p 95-98, 1999.

LIMA, V. M. F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C.; CORREA, A. P. F. L.; LUVIZZOTO, M. C. R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 25, p. 215-218, 2005.

NUNES, C. M.; LIMA, M. F.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p.19-23, 2008.

QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DYE, C.; GARCEZ, L. M.; SHAW, M. A.; CARTER, S. D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E.; Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, p. 23-28, 2003.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. **Journal of Heredity**, v. 96, p. 755–758, 2005.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M.; GIGER, U.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, p. 36- 48, 2008.

SAS Institute Inc. **SAS OnlineDoc®** 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

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

WHO. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, v. 949, p. 1-185, 2010.

### **CAPÍTULO 3 - POLIMORFISMOS DO GENE DLA-DRB1 E SUSCEPTIBILIDADE DE CÃES À LEISHMANIOSE**

**RESUMO** - As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, de grande importância em saúde pública no contexto mundial. A resposta protetora dos cães a estes parasitas está relacionada a imunidade celular e fatores genéticos influenciam na susceptibilidade à leishmaniose visceral, particularmente regiões do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de polimorfismo alélico do exon 2 do gene DLA-DRB1 (*dog leukocyte antigen*) e sua associação à positividade para leishmaniose, determinada por meio da amplificação de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* sp. por PCR e pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ao teste ELISA indireto. Dos 284 cães com resultados concordantes aos dois testes diagnósticos, 88% foram heterozigotos para os alelos existentes. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a positividade à leishmaniose e a frequência dos alelos do exon 2 do gene DLA-DRB1, embora tenha sido observada associação significativa entre a frequência dos alelos DRB1-W, DRB1\*00101 e DRB1-T e o resultado negativo para leishmaniose, podendo ser estes potenciais marcadores para resistência à leishmaniose em cães.

**Palavras-chave:** cão, leishmaniose, MHC classe II, polimorfismo

## Introdução

As leishmanioses são zoonoses parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* de grande importância no contexto de saúde pública mundialmente, apresentando diversidade clínica e epidemiológica (DESJEUX, 2004). A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave e acomete principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos. A doença está fortemente ligada à pobreza e 90% dos casos ocorrem nas regiões mais pobres de Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2010).

O desenvolvimento da doença em cães, reservatório desta zoonose, depende da resposta imunológica que é influenciada por muitos fatores incluindo a genética do hospedeiro, produção de citocinas e natureza dos antígenos de *Leishmania* (BARBIÉRI, 2006).

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) consiste de um locus cromossômico que inclui genes altamente polimórficos que codificam proteínas essenciais para o estabelecimento e regulação da resposta imune na maioria dos vertebrados (ABBAS et al., 2008; DEBENHAM et al., 2005).

Em cães, o MHC é denominado de antígeno leucocitário canino (DLA) classe II cuja organização genética é similar à de outras espécies (KENNEDY et al., 1998) sendo constituída por três genes altamente variáveis: DLA-DRB1, DLA-DQA1 e DLA-DQB1, além de um gene monomórfico (DLA-DRA) (KENNEDY, 2007). As principais variantes alélicas do gene DLA-DRB1 são determinadas por mutações localizadas no exon 2 que codifica o domínio- $\beta$ 1 da molécula DR e estão agrupados em três regiões hipervariáveis (SARMIENTO et al., 1990).

O MHC é um candidato a coadjuvante da suscetibilidade à leishmaniose visceral em cães, tendo sido observada associação entre genótipo DLA-DRB1 e níveis mais altos de IgG anti-*Leishmania*, sugerindo que o locus DLA-DRB1 desempenha algum papel na suscetibilidade para LV canina (QUINNELL et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de polimorfismo alélico do exon 2 do gene DLA-DRB1 e sua associação à positividade para leishmaniose, determinada por meio da amplificação de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* sp. por PCR e pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ao teste ELISA indireto.

## **Material e Método**

### **Área de estudo e amostras**

O estudo foi realizado no município de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil (latitude 21°12' sul e longitude 50°25' oeste), área endêmica para leishmaniose visceral canina. Banco com amostras biológicas de 442 cães foi constituído, compreendendo cães atendidos no Hospital Veterinário “Luís Quintilhiano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - campus Araçatuba, cães encaminhados para eutanásia junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal deste mesmo município e cães domiciliados estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolo 2008-001309).

Para a constituição do banco de amostras, após o consentimento dos proprietários, foram colhidas amostras de sangue de cães com idade superior a dois anos, tempo considerado mínimo para exposição dos cães a infecção por *Leishmania* sp. na área (NUNES et al., 2008). Dados epidemiológicos como idade, sexo e raça foram registrados no momento da colheita de sangue.

Foram considerados positivos ou negativos para leishmaniose os cães que apresentaram resultados concordantes ao diagnóstico por PCR e ELISA indireto constituindo, dessa forma, o subgrupo de cães utilizados para as análises genéticas subsequentes.

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR) kDNA de *Leishmania* sp.**

A purificação do DNA a partir do sangue dos cães foi realizada pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação com etanol, após lise celular e digestão protéica com proteinase K (SAMBROOK et al., 1989).

Para a detecção do DNA do parasito foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990), que amplificam região conservada de 120 pb de cinetoplasto de *Leishmania* sp.

A amplificação ocorreu em volume de 25 µL contendo entre 10 e 20 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies®). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com solução de nitrato de prata. Em todas as reações foram incluídos controle positivo (amostra de DNA de cão com diagnóstico sorológico positivo e sinais clínicos de leishmaniose), controle negativo (DNA de cão com diagnóstico sorológico negativo e sem sinais clínicos de leishmaniose) e controle negativo da reação (sem DNA).

### **ELISA indireto**

As amostras de soro dos cães foram avaliadas quanto a presença de anticorpos anti-*Leishmania* por meio do teste ELISA indireto realizado no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP - campus Araçatuba, segundo descrição de Lima et al. (2005).

### **PCR e Sequenciamento**

Para amplificação do fragmento de DNA de 358 pb do exon 2 do gene DLA-DRB1 foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por

Wagner et al. (1996) e, assim como descrito por Kennedy et al. (1998), foi utilizada uma sequência universal (derivada do fago M13) na extremidade dos oligonucleotídeos iniciadores para facilitar o processo posterior de seqüenciamento do DNA. A amplificação foi realizada em volume de 50 µL contendo 200 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 U de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Life Technologies®). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram purificados com os sistemas *illustra GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare®). Para reação de seqüenciamento foi utilizado o sistema *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit* (MegaBACE™), empregando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores internos descritos para a PCR, sendo a leitura realizada em seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare®) segundo as especificações do fabricante.

A formação do consenso das sequências geradas automaticamente foi realizada com o auxílio do software *Codoncode Aligner v. 2.0.4* (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA)

Os softwares *Bioedit Sequence Alignment Editor®* (HALL, 1999) e CodonCode foram utilizados na correção manual das sequências de DNA. O fragmento que inicialmente era de 358 pb foi reduzido a 270 pb após a deleção das extremidades contendo sequências de baixa qualidade e oligonucleotídeos iniciadores. As amostras foram codificadas como haplóides (uma sequência por indivíduo). Os picos observados no eletroferograma foram conferidos tanto nos produtos de seqüenciamento *forward* e *reverse*. Todas as vezes que foi observada sobreposição de picos, o indivíduo foi considerado heterozigoto para aquela posição e um código ambíguo atribuído a base nitrogenada (Quadro 1), de acordo com nomenclatura estabelecida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1984).

Quadro 1 - Código utilizado para atribuir sequências com posições heterozigotas

Símbolo	Significado	Origem da designação
G	G	Guanina
A	A	Adenina
T	T	Timina
C	C	Citosina
R	A + G	Adenina + Guanina
Y	T + C	Timina + Citosina
M	A + C	Adenina + Citosina
K	G + T	Guanina + Timina
S	G + C	Guanina + Citosina
W	A + T	Adenina + Timina

Os dados em modelo haplóide foram então exportados para o formato FASTA e o programa seqPHASE (FLOT, 2009) foi utilizado para identificar regiões constantes e isolar *loci* variáveis. Desta forma, foi possível reconstruir um modelo diplóide no qual cada sítio de variação da sequência foi transformado em um *locus* independente (*locus* marcador), tendo suas posições relativas registradas.

### Análise estatística

O software PHASE v2.1.1 ([http://depts.washington.edu/ventures/UW\\_Technology/Express\\_Licenses/PHASEv2.php](http://depts.washington.edu/ventures/UW_Technology/Express_Licenses/PHASEv2.php)) foi utilizado para a construção de haplótipos e cálculos de frequências haplotípicas a partir dos *loci*

independentes gerados pelo seqPHASE. Para facilitar a identificação de haplótipos já descritos, 63 sequências de referência do exon 2 do gene DRB1 foram resgatadas do *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e incluídas no conjunto de dados. A partir desta análise, os blocos haplotípicos construídos foram considerados como alelos de um único *locus*.

A associação entre a presença de alelos do exon 2 do gene DLA-DRB1 e a positividade/negatividade para leishmaniose canina foi realizada utilizando-se o teste do  $\chi^2$  (Chi-quadrado) com auxílio do programa computacional SAS, considerando-se estatisticamente significativo quando  $P < 0,05$ .

A partir dos *loci* independentes gerados pelo seqPHASE, calculou-se o desequilíbrio de ligação ( $r^2$ ) utilizando-se apenas os *loci* bi-alelicos, com o auxílio do programa Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/index.shtml>). Todos os possíveis pares de *loci* marcadores foram considerados na análise, totalizando a formação de 820 cálculos.

## Resultados

### Positividade à leishmaniose

A análise da presença de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* por PCR revelou 50,45% (223/442) dos cães positivos e 49,55% (229/442) negativos; ao teste ELISA indireto observou-se positividade em 38,0% (168/442) das amostras. Foram incluídas nas análises de associação somente as amostras com resultados concordantes aos dois testes resultando em 41,9% (119/284) de cães positivos e 58,1% (165/284) negativos.

A população foi composta por 32,0% de cães com raça definida, 60,2% de cães sem raça definida, e 7% de cães que não tiveram este dado registrado. Em relação ao gênero, 45,4% dos cães eram fêmeas, 45,8% machos e em 8,8% das amostras este dado não foi registrado. A frequência de cães com

idade entre 2 e 4 anos foi de 68,7%, entre 4 e 6 anos de 13,4%, em maiores de 6 anos de 14,4% e 3,5% das amostras não apresentavam registro de idade.

### **Variantes Alélicas**

Durante a revisão manual do sequenciamento das 284 amostras, observou-se que todos os casos de sobreposição de picos corresponderam às regiões hipervariáveis. Esses casos foram considerados heterozigose real e não artefato de técnica, resultando em 88% de cães heterozigotos.

Após recodificação das sequências em informações diplóides, obteve-se 72 *loci* independentes, dos quais 42 eram bi-alélicos e 30 multi-alélicos. A análise conduzida pelo algoritmo PHASE revelou 31 haplótipos que se agruparam com referências do banco de dados *GenBank* e outros 170 ainda não identificados em outros estudos. Assim, os 201 haplótipos foram então considerados diferentes alelos de um mesmo *locus* para posterior teste de associação.

Como 96% (187/202) dos alelos estiveram presentes em frequência inferior a 2%, optou-se por avaliar apenas os oito alelos mais frequentes. Não foi observada associação estatisticamente significativa ( $P=0,1432$ ) entre a presença de qualquer destes alelos e o resultado para leishmaniose (Tabela1). Entretanto, observou-se associação significativa entre a presença dos alelos DRB1-W ( $P=0,0006$ ), DRB1\*00101 ( $P=0,0028$ ) e DRB1-T ( $P=0,0004$ ) e o resultado negativo para leishmaniose, o que sugere que estes podem ser potenciais haplótipos para resistência à leishmaniose em cães.

O valor médio de desequilíbrio de ligação observado foi de 0,0370, sendo que 90% das combinações possuíam  $r^2 < 0,089$  (10º percentil). O valor mínimo obtido foi de  $1,370 \times 10^{-6}$  para um par de marcadores separados por 214 pb, sendo o máximo de 1,000 para uma distância de 1 pb. Mesmo tratando-se de uma região pequena (270 pb), a plotagem dos valores revelou uma tendência de queda do  $r^2$  com o aumento da distância em pares de base (Figura 1).

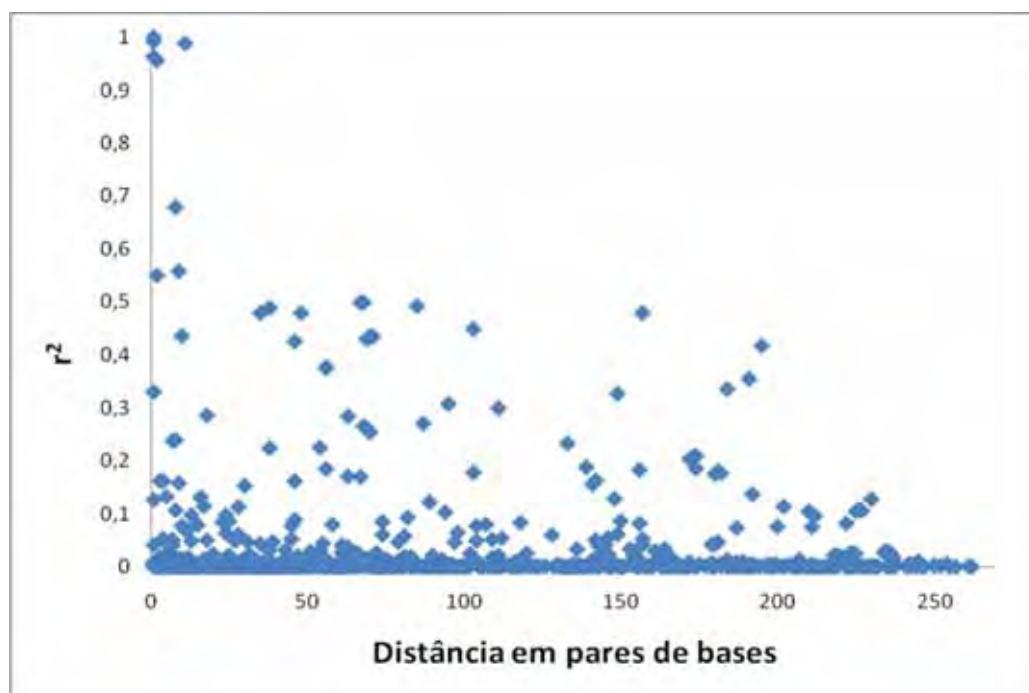


FIGURA 1 - Desequilíbrio de ligação ( $r^2$ ) segundo a distância, em pares de base (pb), para o fragmento de DNA amplificado (270 pb) do exon 2 do gene DLA-DRB1.

Tabela 1 - Frequência (%) e número de alelos do gene DLA-DRB1 segundo o nome e número de acesso no *GenBank*

Alelos	Número de Acesso	Número de Alelos	Frequência (%)
DRB1*01502	AJ003013.1	27	4,7
DRB1*10201	FJ415066.1	34	6,0
DRB1-W	DQ056281.1; AJ459830.1	58	10,2
DRB1*00101	M57529.1	59	10,4
DRB1-T	DQ056277.1	23	4,0
DRB1*01503	AJ003014.1	14	2,5
DRB1*00201	M57537.1; DQ056280	16	2,8
DRB1*01301	U44778.1	26	4,6

## Discussão

A associação observada na presente pesquisa entre maior frequência dos alelos DRB1-W, DRB1\*00101 e DRB1-T e negatividade para leishmaniose, sinaliza para potenciais marcadores para resistência à leishmaniose em cães, a exemplo do observado em camundongos que apresentaram mutação específica do MHC classe II cadeia I-Ab (homólogo ao DLA) a qual foi associada à resistência para infecção por *Leishmania donovani* (SEN; ROY, 1998).

Avaliou-se o polimorfismo dos alelos do exon 2 do gene DLA-DRB1 em cães sem raça definida e de área endêmica para leishmaniose não tendo sido observada associação entre a presença do alelo e positividade/negatividade à leishmaniose. Sing et al. (1997) avaliaram o envolvimento de três *loci* do gene HLA (correspondente ao DLA em cães) na susceptibilidade à leishmaniose visceral em pessoas da Índia e também não observaram associação. Meddeb-Garnaoui et al. (2001) também não observaram associação entre a susceptibilidade à leishmaniose visceral mediterrânea e os *loci* MHC classe II e classe III.

Já Quinnell et al. (2003) avaliaram polimorfismos dos genes do complexo DLA de classe II (DRB1, DQA1 e DQB1) em cães sem raça definida e observaram associação significativa entre a presença do alelo DRB1\*01502 do gene DLA-DRB1 e maior susceptibilidade à leishmaniose. Como somente 4% dos alelos ocorreram em frequência maior que 0,02 no presente estudo, e como a população avaliada era relativamente pequena, estes fatores podem não ter permitido a observação da relação entre os alelos e o resultado para leishmaniose.

O DRB1 é o mais variável entre os genes do complexo DLA classe II (DRB1, DQA1 e DQB1) (MEYER; THOMSON 2001). Uma hipótese para as diferenças destes resultados com os de outros estudos é a de que o caráter hipervariável do gene DRB1 está relacionado a uma alta taxa de recombinação local. Os valores de  $r^2$  obtidos são muito inferiores à expectativa para uma região de 270 pb, apresentando um decaimento acentuado em baixas

distâncias. Este dado sugere uma baixa correlação entre os *loci* e pode ser uma causa de inflação na construção de haplótipos, o que explica o aumento do número de alelos observados e o fato de que 96% destes ocorreram em frequências inferiores ou iguais a 2%. Desta forma, mesmo que um dos *loci* independentes esteja correlacionado com a positividade ou a negatividade para leishmaniose visceral, o seu efeito é mascarado por não haver associação entre este *locus* e os demais nesta região.

O cão doméstico, ao longo dos anos, vem sofrendo enorme seleção para determinadas características fenotípicas (principalmente morfológicas), o que influencia na concentração de certos alelos e haplótipos em algumas raças, podendo resultar em uma gama muito maior de alelos DLA em alguma raça do que em outras (KENNEDY et al., 2002). Quando consideramos populações sem padrão racial para este tipo de análise causamos a formação de subpopulações e a estratificação dos dados, diminuindo o poder analítico.

Se considerarmos que a análise das sequências foi realizada como um único *locus* e não fragmentando as regiões variantes para fazer diversas análises independentes, um viés de baixo desequilíbrio de ligação entre estes *loci* deve ter sido incluído, diluindo o possível efeito de alguma associação em cada *locus* pelo fato da análise ter sido realizada em grupo. Por outro lado, a utilização de uma amostragem pequena diminui a probabilidade de captura de alelos raros, o que neste caso torna-se um fator atenuante na inflação da construção de haplótipos. Estes achados sugerem que estudos futuros com o gene DRB1 devem utilizar as informações de cada ponto de variação na análise ao invés de considerá-los em bloco.

## **Conclusão**

No presente trabalho observou-se associação significativa entre a frequência dos alelos DRB1-W, DRB1\*00101 e DRB1-T e o resultado negativo

para leishmaniose, podendo ser estes potenciais marcadores para resistência à leishmaniose em cães.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 2009/01934-1) pelo auxílio financeiro; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Processo nº 133695/2010-7) pelas bolsas de estudos; à Prof<sup>a</sup>. Dra. Mary Marcondes e pós-graduandos pela colheita de amostras de sangue de cães do Hospital Veterinário da FMVA – UNESP, Araçatuba; à pós-graduanda Milena Araújo Viol pela colheita de amostras de cães domiciliados.

### **Referências**

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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

DEBENHAM, S. L.; HART, E. A.; ASHURST, J. L.; HOWE, K. L.; QUAIL, M. A.; OLLIER, W. E.; BINNS, M. M. Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species. **Genomics**, v.1, p. 48-59, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004.

FLOT, J-F. SeqPHASE: a web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p. 162-166, 2009.

FRANCINO, O.; AMILLS, M.; SÁNCHEZ, A. Canine Mhc DRB1 genotyping by PCR-RFLP analysis. *Animal Genetics*, v. 2841-2845, 1997.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p 95-98, 1999.

KENNEDY, L. J. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on joint study on canine DLA diversity. *Tissue Antigens*, v. 69, p.269-271, 2007.

KENNEDY, L. J.; CARTER, S. D.; BARNES, A.; BELL, S. C; BENNETT, D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. R. Nine new dog DLA-DRB1 alleles identified by sequence based typing. *Immunogenetics*. v.48, p.296–301, 1998.

KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; HAPP, G. M.; QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; CARTER, S. D.; OLLIER, W. E.; THOMSON, W. Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. *Tissue Antigens*, v. 60, p. 43–52, 2002.

LIMA, V. M. F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C.; CORREA, A. P. F. L.; LUVIZZOTO, M. C. R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Brazilian*

**Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 25, p. 215-218, 2005.

MEDDEB-GARNAOUI A, GRITLI, S.; GARBOUJ, S.; BEN FADHEL, M.; EL KARES, R.; MANSOUR L.; KAABI, B.; CHOUCANE, L.; BEN SALAH, A.; DELLAGI, K. Association analysis of HLA-Class II and Class III gene polymorphisms in the susceptibility to Mediterranean visceral leishmaniasis. **Human immunology**, v. 62, p. 509-517, 2001.

MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Annals of human genetics**, v. 65 p. 1-26. 2001.

NC-IUB. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. **Biochemistry Journal**, v. 229, p. 281–286, 1985.

NUNES, C. M.; LIMA, M. F.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p.19-23, 2008.

QUINNELL, R.J.; KENNEDY, L.J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DYE, C.; GARCEZ, L.M.; SHAW, M.A.; CARTER, S.D.; THOMSON, W.; OLLIER, W.E.; Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**. v.55, n. 1, p. 23–28, 2003.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SARMIENTO U. M.; SARMIENTO J. I.; STORB R. F. Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex. **Immunogenetics**, v. 32, p.13–19, 1990.

SAS Institute Inc. ,**SAS OnlineDoc**® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SEN, E.; ROY, S. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. The I-A (Bm12) mutation specifies resistance to infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 47, p. 431-435, 1998.

SINGH, N.; SUNDAR, S.; WILLIAMS, F.; CURRAN, M. D.; RASTOGI, A.; AGRAWAL, S.; MIDDLETON, D. Molecular typing of HLA class I and class II antigens in Indian kala-azar patients. **Tropical medicine and international health**, v.2, p. 468-471, 1997.

WAGNER, J. L.; BURNETT, R. C.; WORKS, J. D.; STORB, R. Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism. **Tissue Antigens**, v. 48, p. 554-56, 1996.

WHO. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, v. 949, p. 1-185, 2010.