



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GABRIEL ISAÍAS LEE TUÑON

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DO PARASITA
ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E
HUMANA**

ARACAJU

2013

GABRIEL ISAÍAS LEE TUÑON

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DO
PARASITA ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA E HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

ARACAJU

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

T926a Tuñon, Gabriel Isaías Lee
Aspectos epidemiológicos e fatores do parasita associados à leishmaniose visceral canina e humana / Gabriel Isaías Lee Tuñon; orientador Roque Pacheco de Almeida. – Aracaju, 2013.
78 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde - Núcleo de Pós-Graduação em Ciências da Saúde), Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania chagasi. 3. Eletroforese. 4. Geoprocessamento. 5. Parasitologia médica. 6. Parasitologia veterinária. I. Almeida, Roque Pacheco de orient. II. Título.

CDU 619:616.993.161

GABRIEL ISAÍAS LEE TUÑON

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DO
PARASITA ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA E HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 27/08/2013

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

1º Examinador: Prof^a. Dra. Amélia Ribeiro de Jesus

2. Examinador: Prof^a. Dra. Maíra Santos Severo

3º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Scher

4º Examinador: Prof^a. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes

PARECER

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Aos meus pais, Antonio e Gloria Elena, *in
memoriam*, verdadeiros incentivadores do estudo e
da leitura.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade em realizar o curso de Doutorado em Ciências da Saúde.

Ao Prof. Doutor Roque Pacheco de Almeida, meu orientador, pela oportunidade e pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação..... um Muito Obrigado!

À Professora Amélia Maria Ribeiro de Jesus, pela competência científica, pelas críticas e sugestões ao trabalho, sempre oportunas, e pelo apoio indispensável para a conclusão do curso.

À Professora Tatiana Rodrigues de Moura, pela competência científica e pelo inestimável incentivo e apoio para a conclusão deste trabalho, pela disponibilidade sempre manifestada e pela amizade.

Aos meus colegas do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, pelo apoio, e em especial à amiga e professora Maria Regina Pires Carneiro, por seu apoio e incentivo permanentes.

Aos professores Ricardo Scher e Roberta Pereira Miranda Fernandes pelas valiosas sugestões na apresentação dos resultados.

À colega professora Maíra Santos Severo, por ter aceitado o convite de compor a banca e pelas críticas e sugestões ao trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio Pacheco de Almeida do Núcleo de Geologia da UFS, pelo apoio e sugestões com as análises de geoprocessamento e ao seu estagiário Sanmy Lima.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário/UFS, pelos momentos de entusiasmo partilhados em conjunto, em especial a Ricardo Vieira, Fabrícia Alvisi, Priscila Santos e Aline por sua colaboração e disposição, meu muito obrigado.

Ao Dr. Vicente Larraga, do Laboratório de Parasitologia Molecular do Centro de

Investigações Biológicas (Conselho Superior de Investigações Científicas) de Madri, Espanha, pela oportunidade de me orientar e estagiar em seu laboratório. Agradecimentos especiais a Pedro José Alcolea pelas análises e ensinamentos, e ao resto da equipe pela sua acolhida e colaboração: Ana Maria Alonso, María Degayón, Silvia Ruiz e Miguel Moreno.

Ao Dr. Edmilson Simões da Silva, da Clínica Veterinária Prontovet, por disponibilizar o seu precioso tempo, os cães e o sangue canino para o cultivo de macrófagos, muito obrigado!

À Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe – EMDAGRO, na figura do coordenador do Parque da Cidade, Dr. Joubert Pimentel Santana por autorizar a coleta de sangue das raposas.

Aos ex-alunos, colegas e amigos que me auxiliaram com as coletas de amostras de cães e de raposas, Flávio Moreno Andrade dos Santos, Rodrigo Pereira de Azevedo e Raphael de Carvalho Clímaco.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Aracaju, por permitir a coleta de amostras em cães; aos coordenadores Dra. Gina Blinoffi, Dr. Paulo Tiago dos Santos e Dra. Roseane Nunes.

À minha esposa Janaina e meus filhos, Daniel e Isabela, pelo inestimável apoio familiar que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos. Vocês são a razão do meu viver!

Aos meus irmãos Gabriela, Gioconda, Gloriela e Gustavo pelo amor e apoio permanente, e à minha segunda mãe, minha madrinha Celsa, pelo amor, incentivo e presença constante na minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, a todos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Aspectos epidemiológicos e fatores do parasita associados à Leishmaniose Visceral canina e humana. Gabriel Isaias Lee Tuñon. Aracaju. 2013.

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma zoonose de canídeos silvestres e domésticos, causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* e transmitida entre os canídeos e destes ao homem pelo vetor *Lutzomyia longipalpis*. Os objetivos deste estudo são analisar a distribuição temporo-espacial de casos de leishmaniose visceral canina e humana em Aracaju, Sergipe de 2005 a 2012; avaliar e comparar a regulação de macrófagos de cão e de raposas na infecção por isolados de *L. chagasi* através do índice de infecção de macrófagos, e realizar análise proteômica das fases de crescimento logarítmica e estacionária de promastigotas de isolados de *L. chagasi* resistentes e susceptíveis ao óxido nítrico, através da técnica de eletroforese bidimensional. Na análise da distribuição espacial da doença aconteceram 2060 casos caninos e 110 casos humanos. Foi verificado que os bairros da Zona de Expansão e Mosqueiro, áreas periféricas, com mais baixas densidades populacionais, ocupação recente, baixa renda e infraestrutura urbana pouco presente, tiveram um número de casos caninos e humanos expressivos. Nos bairros Dezoito do Forte, Santos Dumont e América, foram isoladas *Leishmania* resistentes ao óxido nítrico de cães e humanos, o que poderia confirmar o cão como fonte de infecção para o homem e, talvez, uma confirmação que a doença em cães pode preceder a ocorrência da doença em humanos. A infecção de macrófagos de raposa por cepas de *L. chagasi* resistentes e susceptíveis ao óxido nítrico, revelou que esses controlam rapidamente a infecção independentemente se a cepa é resistente ou não ao óxido nítrico. Este resultado corrobora o fato de que os canídeos silvestres, como as raposas, têm um papel importante no ciclo silvestre da leishmaniose visceral, servindo de reservatório para a doença e raramente apresentando a forma clínica da doença, diferente do cão doméstico. Foi realizada a análise proteômica de promastigotas em fase logarítmica e em fase estacionária revelando uma diferença na expressão de várias proteínas em ambas as fases de crescimento do promastigota. Como fato mais interessante observou-se um aumento acentuado na expressão de uma malato desidrogenase citosólica e que provavelmente apresenta relação com a resistência intrínseca deste isolado ao óxido nítrico. Relacionada com a resistência ao óxido nítrico, um aumento na expressão da tripanotona peroxidase foi constante em todas as fases de curva de crescimento. Também foi observado um aumento na expressão de uma calpaína que poderia ser responsável por induzir susceptibilidade maior aos antimoniais e menor susceptibilidade à miltefosina.

Descritores: leishmaniose visceral. *Cerdocyon thous*. Geoprocessamento. Eletroforese bidimensional.

ABSTRACT

Epidemiological aspects and parasite factors associated with canine and human visceral leishmaniasis. Gabriel Isaias Lee Tuñon. Aracaju. 2013.

Visceral leishmaniasis or kala-azar is a zoonotic disease of domestic and wild canids, caused by the protozoan *Leishmania chagasi* and transmitted between dogs and man by the vector *Lutzomyia longipalpis*. The purpose of this research was to analyze the spatial distribution of human and canine cases of visceral leishmaniasis in Aracaju, Sergipe from 2005 to 2012; characterize a nitric oxide resistant and susceptible isolates of *L. chagasi* from dogs in Aracaju, performing proteomic analysis of it by bidimensional electrophoresis and checking their interaction between dog and fox macrophages. In the analysis of the spatial distribution of the disease during the study period, there were 2060 canine and 110 human cases. It was found that the neighborhoods, Zona de Expansão and Mosqueiro, peripheral areas with lower population densities, recent occupation, poor urban infrastructure, had a number of significant human and canine cases. In Dezoito do Forte, Santos Dumont and America neighborhoods, were isolated nitric oxide resistant *Leishmania* in dogs and in humans, which could confirm the dog as a source of infection for humans and maybe could confirmation that disease in dogs precedes the occurrence of the disease in humans. Infection of fox macrophages by strains of *L. chagasi*, revealed that the macrophages control the infection rapidly regardless of whether the strain is resistant or not to nitric oxide. This result corroborates the fact that wild canids such as foxes, have an important role in the sylvatic cycle of visceral leishmaniasis, serving as a reservoir for the disease and rarely displaying clinical forms of the disease, unlike the domestic dog. Proteomic analysis was performed in promastigotes in logarithmic and stationary phase showing a difference in the expression of many proteins in both the promastigote growth phases. As an interesting fact we observed an over-expression of a cytosolic malate dehydrogenase and that it may probably be related to an intrinsic resistance of this isolate to nitric oxide. Related to resistance to nitric oxide, overexpression of trypanothione peroxidase was constant at all stages of the growth curve. Also observed was the overexpression of a calpain that may be responsible for inducing greater susceptibility to antimonials and lower susceptibility to miltefosine.

Key-words: Visceral leishmaniasis. *Cerdocyon thous*. Geoprocessing. Bidimensional electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa descritivo e bairros que compõem o município de Aracaju.....	38
Figura 2. Casos de leishmaniose visceral humana e canina, por bairro, no município de Aracaju de 2005 a 2012.....	40
Figura 3. Número de isolados caninos e humanos de <i>Leishmania chagasi</i> resistentes ao óxido nítrico, por bairros do município de Aracaju ocorridos entre 2005 e 2012.....	46
Figura 4. Mapa mostrando isolados de <i>Leishmania chagasi</i> resistentes ao óxido nítrico, humanos e caninos, por bairro de Aracaju	47
Figura 5. Infecção de macrófagos caninos e de raposa.....	49
Figura 6. Curva de crescimento médio de três amostras de promastigotas de <i>L. chagasi</i> sensível (LVCSE-19) e resistente (LVCSE-30) ao óxido nítrico.....	50
Figura 7. Detecção de proteínas de promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> LVCSE-19 através de eletroforese bidimensional (2-DE).....	51
Figura 8. Perfil proteico do isolado de <i>L. chagasi</i> susceptível ao óxido nítrico (LVCSE-19).....	52
Figura 9. Perfil proteico do isolado de <i>L. chagasi</i> resistente ao óxido nítrico (LVCSE-30).....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Casos de leishmaniose visceral humana e canina por bairros do município de Aracaju ocorridos entre 2005 e 2012.....	42
Quadro 2. Proteínas de expressão diferenciada em promastigotas do isolado de <i>Leishmania chagasi</i> LVCSE-19 (susceptível ao NO) em fase logarítmica, estacionária e em promastigotas metacíclicos.....	49
Quadro 3. Proteínas de expressão diferenciada em promastigotas do isolado de <i>Leishmania chagasi</i> LVCSE-30 (resistente ao NO) em fase logarítmica, estacionária e em promastigotas metacíclicos.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	14
2.2 RESERVATÓRIOS	14
2.3 VETORES	17
2.4 EPIDEMIOLOGIA	17
2.4.1 Uso do geoprocessamento na leishmaniose visceral	19
2.5 TRANSMISSÃO	23
2.6 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA	23
2.7 DIAGNÓSTICO	24
2.8 TRATAMENTO	25
2.9 PREVENÇÃO E CONTROLE	26
2.10 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL	27
2.11 ESTUDO DA PROTEÔMICA DE LEISHMANIA	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 GERAL	33
3.2 ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 DESENHO DO OBJETIVO 1	34
4.1.1 Local de estudo	34
4.1.2 Distribuição espacial de casos de Leishmaniose visceral humana e canina em Aracaju	34
4.2 DESENHO DO OBJETIVO 2	35
4.2.1 Coleta de sangue	35
4.2.2 Separação do soro e teste sorológico para leishmaniose visceral	35
4.2.3 Isolamento de PMBC (peripheric mononuclear blood cells - células mononucleares de sangue periférico)	35
4.2.4 Infecção dos macrófagos	36
4.2.5 Análise estatística	36
4.3 DESENHO DO OBJETIVO 3	37

4.3.1 Isolamento de <i>L. chagasi</i> e formação do criobanco.....	37
4.3.2 Cultura do parasita.....	37
4.3.3 Extração de proteínas.....	38
4.3.4 Precipitação e quantificação de proteínas.....	38
4.3.5 Eletroforese bidimensional.....	38
4.3.6 Coloração, captura de imagem e corte de géis.....	39
4.3.7 Identificação das proteínas por espectrometria de massa.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE CASOS CANINOS E HUMANOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL	41
5.2 COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS DE CÃES E RAPOSAS.....	46
5.3 PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA GLOBAL DE ISOLADOS DE L. CHAGASI.....	47
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO	63
8 PERSPECTIVAS.....	64
9 FONTE DE FINANCIAMENTO.....	65
10 REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma zoonose de canídeos silvestres e domésticos (como o cão), causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* e transmitida entre os canídeos e destes ao homem pelo vetor *Lutzomyia longipalpis*. A incidência da LV no mundo é de 12,3 casos para 100.000 habitantes, além disso, já foi descrita em 12 países da América Latina sendo que a maioria dos casos (90%) ocorre no Brasil, principalmente na Região Nordeste. São escassos os dados recentes sobre a distribuição de casos no Estado de Sergipe, assim dos determinantes relacionados à ocorrência da doença. Fatores do hospedeiro, ambiente e do agente etiológico já foram largamente descritos como determinantes da doença, porém, ainda há muito a ser esclarecido.

O sistema de informações geográficas integra diversas operações como captura, armazenamento e manipulação de dados, e quando utilizado na saúde permite a integração de análises ambientais, socioeconômicas e espaciais e métodos de ocorrência de doenças, permitindo realizar predição de áreas de risco de ocorrência de doenças. Em relação aos aspectos ambientais, a geografia da saúde estuda as relações entre diversos aspectos geoespaciais, climáticos e relações entre o homem e o hospedeiro intermediário, podendo assim esclarecer as lacunas sobre transmissão. O cão é o principal reservatório em ambiente urbano, mantendo o ciclo de transmissão nesses locais. O cão apresenta uma reduzida capacidade de controlar a infecção, e mesmo após o tratamento apresenta recidivas com alta carga parasitária, facilitando a transmissão.

Estudos com geoprocessamento de casos caninos e humanos em várias cidades têm sido utilizados como parâmetro de risco de transmissão da LV. No entanto, não há um mapeamento conjunto de casos humanos e caninos em Aracaju. O uso do geoprocessamento em conjunto com imagens de satélite é uma ferramenta extremamente útil porque permite uma maior dinâmica na geração de informações, permitindo maior produtividade, rapidez de atualização e versatilidade na manipulação de dados. Essas técnicas também têm sido utilizadas em estudos epidemiológicos de doenças endêmicas transmitidas por vetores como a leishmaniose visceral, ou com foco em determinação de áreas de risco de transmissão, a distribuição espacial e temporal ou incidência da doença. No presente estudo utilizamos a metodologia do geoprocessamento para mapear os casos caninos e humanos de LV e as cepas isoladas desses dois hospedeiros buscando entender a dinâmica da transmissão da doença na cidade de Aracaju.

Diversos mamíferos podem se infectar por *Leishmania* sp; entretanto, não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem. No Brasil, dos canídeos silvestres, somente a raposa (*Cerdocyon thous*) é considerada reservatório natural da leishmaniose visceral. O achado de canídeos, confinados em zoológicos do Brasil, com infecção por *L. chagasi*, denota a relevância de novos estudos com estes animais, visando conhecer o papel dos mesmos na epidemiologia dessa zoonose e promover o monitoramento adequado dos mesmos, além do maior controle desta enfermidade, já que estes animais estão em ambientes de recreação pública. Não é conhecida a capacidade das raposas de responder à infecção por *L. chagasi*. Assim, o presente estudo realizou uma comparação da capacidade microbicida de macrófagos caninos e de raposas para entender o papel desses animais na transmissão.

Aspectos genéticos do parasita influenciam nas formas clínicas da leishmaniose. As formas tegumentares da leishmaniose são causadas pelas espécies *L. amazonenses* e *L. braziliensis*. Diferenças genotípicas e fenotípicas foram descritas mesmo dentro de uma espécie de *Leishmania*. O papel de variáveis fenotípicas e genotípicas do parasita na apresentação clínica das leishmanioses é bem documentado. Estudos prévios mostram cepas *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* resistentes ao óxido nítrico, produto tóxico produzido pelo fagócito que destrói agentes intracelulares. No entanto, não é conhecido o mecanismo dessa resistência ao óxido nítrico. A tecnologia proteômica é uma valiosa ferramenta para ampliar a nossa compreensão dos diversos resultados de infecção por *Leishmania* e acelerar a busca de novas proteínas do parasita.

As abordagens proteômicas para estudar *Leishmania*, em geral, estão em um estágio inicial e mapas proteômicos parciais, com base na eletroforese bidimensional em gel, têm sido recentemente relatados. A espectrometria de massa é um método de determinação precisa de massas molares. Esse método vem-se consolidando como ferramenta insubstituível para a determinação de estruturas químicas, principalmente de compostos orgânicos pequenos e voláteis. Atualmente, é o método de escolha para simultaneamente separar e quantificar uma complexa mistura de proteínas. Esta pesquisa realizou análise comparativa de isolados de *L. chagasi* resistente e sensível ao óxido nítrico, através análise proteômica na busca de possíveis genes envolvidos na resistência ao óxido nítrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

De acordo com a sua distribuição geográfica, a leishmaniose visceral ou calazar, é causada por uma das três espécies de protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (LAINSON; SHAW, 1987). No continente americano, *L. (L.) i. chagasi* é responsável pela doença, inicialmente denominada *Leishmania chagasi* por Chagas e Cunha (1938). Mais recentemente, os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* têm sido usados separando taxonomicamente os dois organismos em subespécies em função das análises feitas por diversos pesquisadores (LAINSON; RANGEL, 2005).

Leishmania chagasi pertence ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Seu ciclo de vida é do tipo heteroxeno, isto é, compreende o desenvolvimento em dois hospedeiros diferentes, um invertebrado e outro vertebrado, apresentando-se sob duas formas evolutivas distintas quando presentes em seus diferentes hospedeiros. A forma promastigota é extracelular, flagelada e móvel, de aparência fusiforme, medindo cerca de 20 µm de comprimento, sendo encontradas no sistema digestivo do inseto transmissor. A forma amastigota é intracelular, sem flagelo livre aparente e imóvel. Possui aspecto arredondado ou oval, medindo de 2 a 4 µm de diâmetro e é encontrada no interior das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente no baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Ambas as formas multiplicam-se pelo processo de divisão binária (LAINSON; SHAW, 1992).

2.2 RESERVATÓRIOS

Nas Américas, a principal fonte de infecção da doença em ambiente urbano está representada pelo cão doméstico, *Canis familiaris*, responsável pela manutenção do ciclo no ambiente domiciliar e peridomiciliar. As raposas, *Lycalopex velutus* e *Cerdocyon thous* correspondem aos reservatórios em áreas rurais e silvestres. Na Índia e em parte da África os seres humanos atuam como reservatórios do protozoário. Embora no Brasil a doença seja inicialmente zoonótica e o homem participe do ciclo da doença como um hospedeiro

acidental, foi demonstrado que seres humanos infectados, e em particular os sintomáticos, podem funcionar como reservatórios e infectar flebotomíneos, aumentando as possibilidades de infecção se houver alta densidade vetorial (LAINSON; SHAW, 1987).

Lainson e Shaw (1987) entendem que o homem não teria importância como fonte de infecção para o vetor, a transmissão da infecção seria dependente da presença de cães infectados. Esses animais podem apresentar alto parasitismo cutâneo o que facilitaria a infecção dos flebotomíneos. Sendo assim, o cão é considerado o principal reservatório doméstico do parasita, podendo infectar o vetor ao ser picado e exerce um papel fundamental na introdução da doença em áreas novas (MARZOCHI, M.; MARZOCHI, K., 1997).

O papel do cão como reservatório de *Leishmania* foi sugerido inicialmente por Nicolle, em 1908, na Tunísia, quando experimentalmente foi comprovada a infecção deste animal. Posteriormente, em inquérito realizado naquele país, foi comprovada a transmissão natural em cães e assim registrado o primeiro foco de LV canina no mundo. No Brasil, as primeiras evidências de transmissão da LV canina foram em Abaeté no Pará. Porém, apenas em 1955, é que foi estabelecido por Deane e Deane (1955) o papel do cão como reservatório quando constatada a transmissão em cães residentes em zona urbana do município de Sobral, Ceará, verificando-se frequentemente intenso parasitismo cutâneo (CABRERA et al., 2003).

O papel do cão como reservatório doméstico potencial da LV é bem estabelecido. A infecção canina precede o aparecimento dos casos humanos, e, a maioria dos cães que tem sorologia reagente não apresenta sintomas da doença, mas atuam como ótimos reservatórios, com grande poder de infectar os vetores (ALVES, 2006). Diante de sua importância no ciclo de transmissão da LV, a principal medida de controle, no Brasil, tem sido sua eliminação quando infectado e/ou soropositivo (MONTEIRO; LACERDA; ARIAS, 1994; WHO, 2006).

Alguns estudos mostram que poderia haver uma predisposição genética de resistência ou susceptibilidade à doença. A resistência do Ibizaian Hound é bem conhecida (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Estudos epidemiológicos realizados no Brasil por França-Silva (2003) mostra que não há uma prevalência da doença com o aumento da idade do cão, sendo as raças mais acometidas o cocker spaniel de pelo longo e o boxer de pelo curto. Com relação ao gênero, Mouta-Confort, López e Mendonça-Lima (2010) encontraram altas taxas de cães machos soropositivos em determinadas regiões endêmicas.

Diversos mamíferos podem se infectar por *Leishmania*, entretanto, não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem. Na Europa, a doença já foi descrita em lobos (*Canis lupus*) e raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), inclusive em regiões tradicionalmente não-endêmicas (DIPINETO et al., 2007; SASTRE et al., 2008; SOBRINO et al., 2008). No Brasil,

somente a raposa ou guaraxaim (*Cerdocyon thous*) é considerada reservatório natural da LV (SILVA et al., 2000). Todavia, diversas espécies já foram relatadas com infecção como lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e cachorro-vinagre (*Speotus venaticus*), podendo ser reservatórios potenciais de *Leishmania* (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006). Além dos canídeos, marsupiais, roedores e edentados também foram encontrados infectados com *L. chagasi*. Estes animais silvestres provavelmente são o elo de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (BRASIL, 1996).

Souza et al., (2010) relataram a infecção de canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Speotus venaticus*) por *L. chagasi* mantidos em zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso. Lima et al. (2009) utilizaram vários testes diagnósticos para verificar a presença de *Leishmania* em cachorros-vinagre de Ilha Solteira-SP. Em outra pesquisa, Luppi et al. (2008) confirmaram a presença da infecção em vários canídeos silvestres em um zoológico de Belo Horizonte-MG, havendo animais assintomáticos, assim como, animais com sinais clínicos característicos de LV. No Estado de São Paulo, Catenacci et al. (2010) não encontraram nenhuma reação positiva para LV nas 52 amostras de soros de *C. thous* provenientes de 17 zoológicos.

Há uma preocupação constante sobre a transmissão de doenças na interface entre animais silvestres, animais domésticos e o homem. Mudanças ambientais influenciando esta transmissão podem ser de origem natural ou antropogênica incluindo atividades humanas de expansão, fragmentação de habitat, reflorestamento, aquecimento global e poluição, e aumento da incidência de zoonoses (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006).

Com o processo de urbanização da leishmaniose visceral, o cão detém maior importância como reservatório do parasita. Como nos canídeos domésticos, as raposas (*C. thous*) frequentemente apresentam-se assintomáticas, e a sua infectividade ao vetor é menor quando comparada com os canídeos domésticos. Entretanto, a circulação descontrolada desses animais, entre zoológicos, promove a disseminação e introdução do agente para áreas não endêmicas. Populações de *C. thous* não mantêm o ciclo de transmissão independente do cão doméstico, sendo incapazes de introduzir o parasita em populações caninas livres de *Leishmania* (COURTENAY et al., 2002).

O achado de canídeos, confinados em zoológicos do Brasil, com infecção por *L. chagasi*, denota a relevância de novos estudos com estes animais, alguns deles ameaçados de extinção, submetidos a perda e fragmentação do seu habitat natural e maior contato com animais domésticos e o homem, e sua importância no ciclo de transmissão da LV (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006)

2.3 VETORES

A partir de 1936, Evandro Chagas já havia observado a presença de *Lutzomyia longipalpis* nos principais focos de calazar do nordeste brasileiro. Este inseto está sempre presente onde há transmissão da doença, sendo sem dúvida a espécie mais importante na epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil (LAINSON; RANGEL, 2005). Entretanto outras espécies foram também incriminadas como *Lutzomyia cruzi* no Estado de Mato Grosso do Sul e *Lutzomyia evansi* na Colômbia e Venezuela (SANTOS et al., 1998).

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, apresentando ampla distribuição geográfica, sendo encontrado sob as mais diversas condições climáticas e de altitude e em ambientes silvestres, rurais e urbanos. No Brasil, são popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira, asa branca, cangalhinha e flebótomo. Estes insetos medem de 2 a 4mm de comprimento, possuem o corpo densamente coberto de pêlos finos e são de coloração clara. Na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes e na fase de larva desenvolvem-se em ambientes úmidos, sombrios e ricos em matéria orgânica (MICHALICK; GENARO, 2005).

Na Amazônia, *L. longipalpis* é uma espécie basicamente silvestre, mas com a entrada do homem na mata houve a migração desses insetos para o entorno das habitações onde eles encontraram um vasto número de hospedeiros podendo ainda ser encontrados em áreas de mata primária longe de habitações humanas (LAINSON; RANGEL, 2005).

Recentemente, verificou-se a adaptação deste vetor ao ambiente urbano principalmente na região Sudeste, podendo ser encontrado tanto no peridomicílio – galinheiros, chiqueiros, canil, paiol, e outros – como também no intradomicílio. Existem indícios de que o período de maior transmissão da LV ocorra durante e logo após o período de chuva, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2006).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses encontram-se amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, atingindo 88 países dos continentes americano, europeu, asiático e africano (WHO, 2010). Desde 1990, os limites da distribuição geográfica das leishmanioses têm se expandido significativamente. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de aquisição de leishmaniose e que mais de 12 milhões estejam infectadas (WHO, 2006).

A transmissão autóctone de leishmaniose visceral (LV) no Brasil foi registrada em 20 dos 27 estados com aproximadamente 1.600 municípios, sendo que até o ano de 2002, cerca de 90% dos casos humanos ocorriam na região nordeste (SIMPLÍCIO et al., 2002). Entretanto, a partir desse ano, outras regiões geográficas mostraram significativo aumento do número de novos casos. Assim, no ano de 1993, enquanto a região nordeste foi responsável por 93,7% dos casos de LV notificados no país, 3,3% foram da região norte, 0,7% do centro-oeste e 2,3% da região sudeste. Com a expansão da transmissão para diferentes áreas do território brasileiro, em 2004, de um total de 3.267 notificações, 53,2% procediam do nordeste, 16,1% do norte, 8,0% do centro-oeste e 22,6% do sudeste do Brasil (BRASIL, 2006).

Na década de 1980, a infecção humana, fora das zonas rurais do nordeste brasileiro, era relativamente rara e esporádica, mas a doença avançou para regiões indenes dos estados do Pará, Roraima, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Rio de Janeiro e São Paulo. A constante migração do homem, com seus cães (infectados), de áreas altamente endêmicas para aquelas nas quais a LV não é endêmica, explicaria a introdução do agente etiológico e a manifestação de novos focos, sendo o risco maior para a população humana residente que convive com *L. longipalpis* e com as raposas e/ou outras fontes silvestres locais (SERVICE, E.; SERVICE, M., 1989).

A leishmaniose visceral encontra-se em franca expansão geográfica e em processo crescente de urbanização. Além da ação antrópica que resultou em alterações ambientais e paisagísticas, o processo de urbanização desordenada aliada a alta densidade populacional é uma das causas da LV. De um padrão de endemia tipicamente rural, vem assumindo perfis epidemiológicos distintos: tem sido apontada como uma doença reemergente, à medida que, cada vez com maior frequência e intensidade, atinge áreas urbanas e suburbanas de várias capitais da região Norte (Boa Vista), Nordeste (Teresina, São Luiz, Natal, Aracaju), Centro-Oeste (Cuiabá, Campo Grande) e Sudeste (Belo Horizonte, Rio de Janeiro), apresentando altas taxas de infecção em todas as faixas etárias e sobreposição das áreas de ocorrência desta infecção e HIV/AIDS (GONTIJO; MELO, 2004).

Em Aracaju, Sergipe, 20 a 25% dos cães que são levados ao Serviço de Zoonoses do município, apresentam sorologia positiva para LV. Por lei, estes animais devem ser eutanasiados por recomendação do Ministério da Saúde. Apesar desta medida de controle, a prevalência da doença tem persistido elevada em diversas regiões (BURATTINI et al., 1998). O tratamento da leishmaniose visceral é feito com antimonial pentavalente, droga com efeitos colaterais importantes no homem e, em algumas áreas, a resistência ao tratamento tem sido

relatada (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006). Cães não respondem adequadamente às medicações utilizadas para tratamento de seres humanos, persistindo com parasitos e apresentando recidiva da doença (NOLI; AUXILIA, 2005). A leishmaniose visceral é caracterizada por uma diminuição da resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania*. Após o tratamento e cura da doença, essas funções de células T são restauradas no homem (BACELLAR et al., 1991; CARVALHO et al., 1988).

Segundo Chappuis et al. (2007), dois tipos de LV ocorrem de acordo com as características de transmissão: LV zoonótica, é aquela transmitida do animal para o homem através de um vetor (animal-vetor-homem), e a LV antroponótica, é aquela transmitida de homem para homem através de um vetor (homem-vetor-homem). Sendo assim, o homem é considerado hospedeiro ocasional, enquanto que os animais, principalmente o cão, são reservatórios do parasita (ALVAR et al., 2004). A LV zoonótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. infantum chagasi* e *L. infantum infantum* enquanto que a LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. donovani* (CHAPPUIS et al., 2007).

O calazar já foi descrito em pelo menos 12 países da América Latina, sendo só o Brasil responsável por 90% dos casos (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1988). Segundo Gontijo e Melo (2004), no Brasil, a LV atinge pessoas de todas as faixas etárias, entretanto nas áreas onde a doença é endêmica as principais vítimas, cerca de 80% dos casos registrados, são crianças menores de 10 anos.

O primeiro relato de LV no território brasileiro ocorreu em 1934 quando Henrique Penna analisando amostras de fígado de pacientes supostamente falecidos com febre amarela, encontrou 41 casos positivos para *Leishmania* em indivíduos das regiões norte e nordeste (LAINSON; SHAW, 1992). A partir de então, a doença vem ocorrendo em várias regiões brasileiras, com exceção da região Sul que permanece indene (BRASIL, 2006).

2.4.1 Uso de geoprocessamento na leishmaniose visceral

O geoprocessamento é definido como um conjunto de tecnologias voltadas para a coleta e tratamento de informações espaciais com determinado objetivo, executadas por sistemas específicos para cada aplicação. Nas últimas décadas, esses sistemas têm sido empregados para avaliação ambiental, planejamento urbano, meteorologia, entre outros campos de aplicação. Ao contrário do que acontece nessas áreas, na Saúde, os dados não são obtidos por meios remotos. Dados sobre as condições de saúde das pessoas devem ser adquiridos mediante inquéritos e censos demográficos, ou pelos sistemas de vigilância. São

dados de atributos da pessoa e um grande esforço tecnológico e metodológico tem se desenvolvido para captá-los e tratá-los como característica de território. Essa transformação resulta em uma abstração e simplificação de processos sociais e ambientais presentes na determinação de doenças (BARCELLOS et al., 2008).

As bases cartográficas digitais, que são, muitas vezes, o produto final de projetos de geoprocessamento de outros setores, constituem apenas o ponto de partida das análises espaciais de saúde. Para que sejam utilizadas como meio de análise, as bases de dados de saúde devem ser georreferenciadas, integradas a dados ambientais e socioeconômicos, e submetidas a procedimentos de avaliação de sua distribuição espacial. O georreferenciamento de um dado com endereço é definido como o processo de associação desse dado a um mapa e pode ser efetuado de três formas básicas: associação a um ponto, a uma linha ou a uma área. O resultado desse processo é a criação de elementos gráficos que podem ser usados para a análise espacial (BARCELLOS et al., 2008).

Na área da saúde, os sistemas de informações geográficas (SIG) têm se tornado ferramentas de grande utilidade. Sua capacidade de integrar diversas operações, como captura, armazenamento, manipulação, seleção e busca de informação, análise e apresentação de dados, auxilia o processo de entendimento da ocorrência de eventos, predição, tendência, simulação de situações, planejamento e definição de estratégias no campo da Vigilância em Saúde. A incorporação dos SIG pela Saúde tem história relativamente recente e ainda depende de um conjunto de bases tecnológicas e metodológicas em fase de implementação. Os últimos anos vêm sendo marcados pela crescente disponibilidade e facilidade de acesso e análise de dados mediante sistemas computacionais simples (SANTOS; BARCELLOS, 2006).

No Brasil, o setor Saúde é detentor de um extenso banco de dados, que abrange dados vitais, de morbidade, gerenciais e contábeis. Esses dados vêm sendo armazenados em diversos sistemas de informações: Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS), Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SIA/SUS), entre outros. Seguindo a lógica do Sistema Único de Saúde (SUS), de um sistema de cobertura nacional e arquitetura hierárquica, os dados desses sistemas de informações são gerados no nível local e repassados, no sentido ascendente, às demais esferas de governo. É de responsabilidade da gestão municipal, portanto, a captação dos dados e o correto preenchimento dos campos dos formulários desses sistemas de informações, inclusive daqueles reservados à localização geográfica, como nome e código de logradouro e bairro de residência (SANTOS;

BARCELLOS, 2006).

No Brasil, o cenário atual da aplicação dos SIG em saúde é extremamente favorável e pode ser resumido segundo quatro eixos de desenvolvimento: disponibilidade de bases de dados; aperfeiçoamento de programas computacionais; desenvolvimento tecnológico; e capacitação de pessoal. Esses eixos são inter-relacionados e cada solução tecnológica pode ter reflexos sobre os programas e exigir um redirecionamento das iniciativas de capacitação. As soluções para a democratização desse conjunto de ferramentas são, portanto, integradas e exigem a coordenação de esforços entre a Saúde e outros setores. Para que os dados gerados pelos sistemas de informações em saúde sejam mapeados, os eventos de saúde devem ser relacionados a um conjunto de objetos geográficos ou unidades espaciais previamente construídas, como bairros, setores censitários, lotes ou trechos de logradouros. Assim, um dos primeiros passos para o georreferenciamento desses dados é o reconhecimento do estágio atual da cartografia urbana existente nas cidades (SANTOS; SOUZA, 2006).

Os sistemas de informações em saúde, por sua vez, devem coletar e armazenar dados de endereço compatíveis com essa estrutura de dados cartográficos. Ao longo do processo de georreferenciamento, diversas decisões são tomadas, tais como a escolha de uma unidade espacial de referência, a solução de alguma incoerência ou complementação de endereço incompleto ou, ainda, a aproximação de sua numeração. Essas decisões afetam a disposição final dos eventos sobre a base cartográfica e, por conseguinte, os possíveis resultados da análise espacial desses eventos. Recentemente, esta tecnologia tem sido utilizada amplamente como uma forma de especializar informações coletadas em pesquisa de campo, melhorando o direcionamento das estratégias de prevenção de doenças infecciosas (SANTOS; BARCELLOS, 2006; SANTOS; SOUZA, 2006; SANTOS; SOUZA-SANTOS, 2006).

As técnicas de geoprocessamento e análise espacial foram utilizadas em vários trabalhos relacionados às doenças vetoriais, como por exemplo, na leishmaniose tegumentar. Cross, Newcomb e Turcker (1996) geraram um modelo de distribuição geográfica e sazonal de *Phlebotomus papatasi* no sudeste da Ásia através de sensoriamento remoto de informações advindas de artigos científicos sobre a distribuição geográfica e sazonal do inseto durante todos os meses do ano.

Miranda et al. (2002) realizaram uma análise da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em Lagoinha, São Paulo. A geografia e ecologia da leishmaniose tegumentar foram estudadas por Júnior (2000) no Espírito Santo, através de um levantamento dos casos de 1989 a 1998 por município. No Rio de Janeiro, Kawa e Sabroza (2002) analisaram a espacialização da

leishmaniose tegumentar no Rio de Janeiro, observando determinantes históricos e espaciais da implantação, persistência e difusão da leishmaniose tegumentar na cidade e sua articulação com processos de organização e ocupação do espaço urbano na periferia, no início do século até o final da década de oitenta.

O geoprocessamento também foi utilizado para entender os fatores de risco da leishmaniose visceral em certas regiões. Mendes, Trovão e Silva (2000) analisaram a ocupação da leishmaniose visceral na cidade de São Luís, Maranhão, percebendo que a epidemia se concentrou justamente nos focos migratórios, em áreas periféricas da cidade.

Em Araçatuba, São Paulo, Camargo-Neves et al. (2001) utilizaram ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral, no período de 1998 a 1999, encontrando maior concentração de casos humanos em áreas com maiores taxas de prevalência de cães positivos. No entanto não se evidenciou associação entre número de imóveis positivos e maior número de *L.longipalpis* capturadas.

Santos e Santos (2011) utilizaram o geoprocessamento para verificar a prevalência da leishmaniose visceral no bairro Promoar de Teresina, Piauí. Eles consideraram que a prevalência dos casos de LV no bairro Promoar está associada aos fatores de risco ambiental (temperatura, pluviosidade, umidade relativa do ar) e habitacional (moradias de alvenaria com presença de vegetação).

Silva et al. (2011) acompanharam 100 cães infectados na Barra de Guaratiba, no Rio de Janeiro. Sua pesquisa concluiu que através do mapeamento geográfico de cães soropositivos para LV era possível predizer onde haverá locais com alto risco de transmissão para homem em áreas endêmicas de LV. Os mapas de risco produzidos neste estudo poderão ser úteis para o controle de LV, pois as áreas de incidência da doença coincidem com locais caracterizados apresentarem cães com títulos sorológicos altos para LV .

Brazuna et al. (2012) descreveram o perfil e a distribuição geográfica de 951 casos de LV humana em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, de 2002 a 2009. Eles concluíram que os casos de LV humana e canina assim como a presença do vetor ocorrem em todas as regiões urbanas de Campo Grande.

O uso dos sistemas de informação geográfica, permitiu a Paulan et al. (2012) identificar os padrões atuais de distribuição espacial da LV canina na área urbana de Ilha Solteira em São Paulo, demonstrando que a vegetação urbana que ainda resta não aumenta a incidência de casos positivos de LV em cães.

2.5 TRANSMISSÃO

A infecção de *Lutzomyia longipalpis* por *L. chagasi* ocorre quando as fêmeas hematófagas se alimentam em hospedeiros vertebrados infectados e ingerem com o sangue, macrófagos e monócitos parasitados. No tubo digestivo do inseto essas células são rompidas liberando as formas amastigotas que, após divisão binária, transformam-se em promastigotas. De 48 a 72 horas após o repasto alimentar, as formas promastigotas migram para o esôfago e faringe do inseto onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem e para o cão (MICHALICK; GENARO, 2005).

O parasita é transmitido quando as fêmeas infectantes realizam um novo repasto sanguíneo no homem ou em outro hospedeiro vertebrado, liberando juntamente com a saliva do inseto as formas promastigotas metacíclicas. Na pele do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema fagocitário monocítico, principalmente os macrófagos. No interior dos macrófagos, se diferenciam em amastigotas e se multiplicam até o rompimento dessas células, ocorrendo a sua liberação e fagocitoses por novos macrófagos, com disseminação hematogênica principalmente para os órgãos linfóides como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea (LAINSON; SHAW, 1987).

2.6 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

Segundo Desjeux (2004) as principais manifestações clínicas da LV no homem são: febre intermitente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e linfadenopatia. A tosse não produtiva, diarreia e dor abdominal são queixas frequentes na fase aguda da infecção. Progressivamente, no curso da doença, o paciente pode apresentar hemorragia gengival e digestiva, edema, icterícia, ascite, anorexia e desnutrição. Nestes pacientes, o óbito é geralmente determinado pelas hemorragias e infecções intercorrentes (MICHALICK; GENARO, 2005).

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante a infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (KRAUSPENHAR et al., 2007). O período de 2 a 12 meses é necessário para que um cão infectado desenvolva sinais clínicos e o período de incubação, observado em condições experimentais, pode alcançar 25 meses (OLIVEIRA; SANTORO; SADIGUSKY, 1993). O quadro clínico é variável e depende da

resposta imune do cão e da cepa do parasita inoculado pela picada do inseto vetor (MICHALICK; GENARO, 2005).

Na LV o cão desenvolve lesões cutâneas, principalmente descamações e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, ulcerações na pele localizadas frequentemente na orelha, focinho, cauda e articulações, e pêlo opaco. Na fase avançada observa-se onicogribose, esplénomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjutivite, coriza, apatia, diarreia, vômito, hemorragia intestinal, edema de membros e hiperqueratose. Na fase terminal ocorre paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte (SILVA, 2007).

Os quadros clínicos da LV canina podem ser classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os cães assintomáticos podem ser responsáveis por 40 a 80% dos casos sororreagentes e não desenvolvem a doença ou então apresentam cura espontânea (ALBUQUERQUE et al. 2007). Nestes cães, citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) podem desempenhar um papel protetor contra o desenvolvimento da doença clínica (PINELLI et al., 1994). Além disso, esse estado de resistência tem sido associado com o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células T específica para *Leishmania*, enquanto que a doença ativa tem sido associada com altos níveis de anticorpos e uma resposta imune suprimida (CORTES et al., 2007; PINELLI et al., 1994).

2.7 DIAGNÓSTICO

A visualização microscópica de formas amastigotas de *Leishmania*, pela análise de aspirado de linfonodo, medula óssea e de baço, continua sendo o teste confirmatório para a LV. Apesar da especificidade ser elevada, a sensibilidade varia, sendo maior para o baço (93-99%) do que para medula óssea (53-86%) ou linfonodo (53-65%) (BABIKER et al., 2007).

Devido às dificuldades para a demonstração direta do parasita e pela alta proporção de cães assintomáticos, métodos sorológicos são essenciais para o diagnóstico da LV canina. A grande produção de anticorpos durante a LV facilita o diagnóstico através de testes sorológicos, evitando os métodos parasitológicos, que são invasivos (CORTES et al., 2007; ROSARIO et al., 2005).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da LV canina e humana são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*, ELISA), sendo este último considerado, teste de escolha para inquéritos populacionais. O teste de RIFI é reconhecido como “padrão-ouro”, tanto para LV

humana quanto canina. Apesar de apresentar menor sensibilidade e especificidade que o ELISA, tem sido o método mais comumente utilizado sendo a prova adotada pela Fundação Nacional de Saúde. Reações cruzadas têm sido observadas com esse teste (GONTIJO; MELO, 2004).

A identificação de antígenos recombinantes ou purificados, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos, tem contribuído para melhorar a sensibilidade e a especificidade destes métodos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Recentemente, testes sorológicos rápidos, baratos e de fácil execução, baseados na detecção de anticorpos contra o antígeno rK39, foram desenvolvidos. Essa proteína está localizada no ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto, apresentando sequência idêntica em sete espécies de *Leishmania*. Estudos realizados tanto com cães quanto com humanos, demonstraram que a sensibilidade deste teste varia entre 82 a 100% enquanto que a especificidade varia de 95 a 100%, dependendo da região estudada (BISUGO et al., 2007; CARVALHO et al., 2003; CHAPPUIS et al., 2005; SUNDAR et al., 2006).

Vários sistemas baseados na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) têm sido desenvolvidos para *Leishmania*. O melhor alvo para a PCR e para sondas de DNA tem sido o DNA presente nos minicírculos do kDNA da região conservada ou a amplificação do minicírculo completo (GONTIJO; MELO, 2004).

2.8 TRATAMENTO

No Brasil a droga de escolha é o antimoniato de N- metilglucamina, o Glucantime®, que é distribuído gratuitamente na rede de saúde pública. A dose recomendada pelo Ministério da Saúde (MS) é de 20mg Kg/dia, por via endovenosa ou intramuscular, durante 20 dias e, no máximo, por 40 dias (MICHALICK; GENARO, 2005).

Seu mecanismo de ação ainda não está elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Esta droga é extremamente tóxica, e o seu principal efeito colateral é sobre o aparelho cardiovascular, causando arritmias cardíacas e outras manifestações de cardiotoxicidade (BRASIL, 2006).

A segunda linha de tratamento compreende a anfotericina B, o isotiocianato de pentamidina e o alopurinol, que são drogas mais tóxicas que os antimoniais pentavalentes (REY, 2002). A anfotericina B convencional tem substituído os antimoniais como tratamento

de primeira escolha da LV em algumas áreas da Índia onde a taxa de falha do tratamento com os antimoniais é maior que 60%, enquanto que a anfotericina B lipossomal é a droga de primeira escolha na Europa e nos Estados Unidos (CHAPPUIS et al., 2007). A miltefosina tem-se mostrado efetiva no tratamento da LV na Índia, sendo tratamento de primeira escolha em algumas áreas deste país (DESJEUX, 2004).

O tratamento do cão não é recomendado e as tentativas de tratamento da LV canina por meio de drogas tradicionalmente empregadas tem tido baixa eficácia. O uso constante de medicamentos em cães provoca à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos, além de ter o risco de selecionar parasitas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano. Portaria do Ministério da Agricultura proíbe o tratamento de cães com medicamentos de uso humano (BRASIL, 2008).

2.9 PREVENÇÃO E CONTROLE

As características epidemiológicas e o conhecimento insuficiente sobre os elementos que compõe a cadeia de transmissão da LV fazem com que as estratégias de controle desta doença sejam pouco efetivas. Atualmente essas estratégias se baseiam no diagnóstico e tratamento precoce dos doentes, redução da população de flebotomíneos através do uso de inseticidas nas casas, eliminação dos cães soropositivos e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006).

A recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) quanto à identificação e sacrifício do cão está respaldada, dentre outras, na consideração de que esse animal é um importante reservatório para LV humana. Portanto, se a doença canina precede a humana, conseqüentemente, colabora para a sua disseminação. Esta estratégia, entretanto, tem apresentado resultados controversos, demonstrando que muitos aspectos relacionados ao papel do cão na epidemiologia da LV ainda são desconhecidos, sugerindo a necessidade de uma reformulação das medidas empregadas para o seu controle (SILVA et al., 2005).

Outra alternativa para o controle desta doença é a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina – cujo efeito dura aproximadamente 34 semanas – que protegeu 96% dos cães contra as picadas dos flebotomíneos, conforme citado em um estudo realizado na França por Killick-Kendrick et al. (1997). O uso dos colares em todos os cães reduziria o contato entre o vetor e este reservatório de maneira significativa para diminuir o risco de infecção tanto no homem quanto no cão (LAINSON; RANGEL, 2005).

Courtenay et al. (2002) utilizando um modelo matemático concluíram que os programas de controle da LV que se baseiam na eliminação de cães soropositivos não são efetivos, em virtude da alta incidência de infecção e infectividade canina; da falta de sensibilidade nos testes de diagnóstico para a identificação de cães infectantes; e devido ao intervalo de tempo entre a realização do diagnóstico e a morte dos cães.

Na Amazônia, Courtenay et al. (2007) demonstraram que mosquiteiros impregnados com inseticida tiveram um ótimo impacto na proteção humana contra as picadas de *L. longipalpis*. Esta medida já foi empregada em outras regiões do mundo com bons resultados, sendo uma boa alternativa no controle da LV, pois além de ser um método mais econômico e eficaz no combate ao vetor, é duradouro – permanecendo por cinco anos – evitando assim o uso convencional de borrifações (DESJEUX, 2004).

O desenvolvimento de novas drogas e vacinas, melhores diagnósticos e o acesso dos pacientes a todos esses benefícios, são os principais desafios para o controle da LV. Portanto, o investimento em pesquisas é necessário para minimizar os problemas com doenças negligenciadas como é o caso das leishmanioses. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras instituições devem juntar-se aos setores públicos e privados como forma de investir no controle eficaz dessa infecção (DESJEUX, 2004).

2.10 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Geralmente o cão infectado e susceptível à doença apresenta ausência de linfoproliferação, enquanto que os resistentes apresentam hipersensibilidade tardia (DESPLAZES et al., 1995; MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995). Em cães infectados natural e experimentalmente com *L. infantum*, nos ensaios de proliferação, as células do sangue periférico não respondem especificamente aos antígenos de *Leishmania*, mas o fazem frente a outros estímulos (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995). A redução no número de células B CD21⁺ e de células T CD4⁺ em cães infectados pela *L. infantum* pode estar associada ao estabelecimento da doença canina, visto a ausência destas células nos cães sadios (BOURDOISEAU et al., 1997).

Alguns autores (CABRAL et al., 1998; LEANDRO et al., 2001; PINELLI et al., 1994) verificaram que células mononucleares de sangue periférico de cães natural e experimentalmente infectados com amastigotas exibiram in vitro resposta proliferativa contra antígenos do parasita, demonstrando que pode haver uma resposta celular específica nos cães infectados com *Leishmania*. Campino et al. (2000) observaram que somente os linfócitos de

cães sintomáticos proliferaram frente antígenos específicos de *Leishmania*. Geralmente um percentual de cães assintomáticos evolui para cura espontânea, apresentando, resposta imune celular positiva (MICHALICK; GENARO, 2005).

Na LV, os cães sintomáticos geralmente apresentam altos títulos de anticorpos antileishmania e os cães resistentes à infecção exibem baixos níveis ou ausência de destes anticorpos (BOCETA; ALONSO; JIMENEZ-RUIZ, 2000; DESPLAZES et al., 1995; MARTINEZ-MORENO et al., 1995; SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Muitos aspectos da patogênese da LVC, vistos anteriormente, são atribuídos aos anticorpos produzidos, os quais formam imunocomplexos que se depositam em diversos tecidos, gerando lesões inflamatórias. Em cães assintomáticos a cura espontânea pode ser seguida de sorologia negativa (MICHALICK; GENARO, 2005).

O óxido nítrico (NO) é efetivo contra vários patógenos intracelulares. O NO é sintetizado a partir da oxidação do átomo de nitrogênio guanidínico terminal da L-arginina por ação da enzima óxido-nítrico-sintase induzida (iNOS). As citocinas são importantes moduladoras da expressão da iNOS. De uma maneira geral, citocinas do perfil Th1 induzem a iNOS, enquanto as do padrão Th2 inibem a sua indução. Especificamente em relação à leishmaniose, macrófagos peritoneais de camundongos estimulados in vitro com IFN- γ , em presença de lipopolissacarídeo (LPS), liberam grandes quantidades de NO e destroem o parasito eficientemente (CEZARIO et al., 2011).

Os tripanossomatídeos como a *Leishmania* mantêm o balanço de óxido-redução (redox) por um mecanismo singular, pois são desprovidos de glutatona redutase que, na maioria dos outros organismos, é responsável pela manutenção de um ambiente intracelular redutor/protetor dependente de GSH. Em substituição, eles possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona como principal tiól reduzido e que serve de substrato para três óxido-redutases: tripanotiona redutase (TryR), tryparedoxin (TryX) e triparedoxin peroxidase (TryP). A tripanotiona é responsável pela defesa contra oxidantes, metais pesados e xenobióticos (ARIYANAYAGAM; FAIRLAMB, 2001).

A tripanotiona é mantida em sua forma reduzida pela enzima tripanotiona redutase (TryR), de modo que a TryR exerce um papel central na proteção de *Leishmania* spp. contra espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio (produzidos pelo hospedeiro) por meio da reciclagem de tripanotiona oxidada. Desse modo, uma função fisiológica vital tem sido descrita para a TryR na manutenção dos níveis de tripanotiona, particularmente no interior de células do hospedeiro, sob condições altamente oxidantes geradas durante a resposta de defesa (ROMÃO et al., 2006).

A resposta imune contra *Leishmania* é altamente dependente de macrófagos, os quais têm um papel importante na defesa contra infecções por parasitas intracelulares. Macrófagos maduros de tecidos animais não estão disponíveis com facilidade para cultura e análise funcional. O uso de macrófagos derivados de monócitos para estudos funcionais é uma alternativa bastante atraente, por requerer um método de obtenção menos invasivo quando comparado com macrófagos derivados de monócitos de medula óssea ou peritônio. Essa noção é importante ao considerarmos o bem-estar animal (BUENO et al., 2005). Vários estudos têm utilizado macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico de cães em pesquisas sobre leishmaniose visceral (BUENO et al., 2005; CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005; PANARO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; SAMPAIO et al., 2007; SANCHEZ-ROBERT et al., 2008; VOULDOUKIS et al., 2006; ZAFRA et al., 2008).

Até o momento, não há relatos na literatura sobre o cultivo e uso de macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico de raposas ou outro canídeo silvestre em pesquisas de laboratório.

2.11 ESTUDO DA PROTEÔMICA DE *LEISHMANIA*

Proteômica é definida como a análise do conjunto completo de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinada situação, podendo ser modificado pelas condições e estímulos às quais este organismo está exposto. O termo proteoma foi utilizado primeiramente por Wasinger et al. (1995) como proteínas complementares ao genoma. A análise proteômica clássica fornece métodos que permitem determinar a identidade e a abundância de proteínas constituintes do proteoma e o conhecimento da função proteica pode ser inferido pela variação da sua expressão.

O parâmetro crítico que define o sucesso ou não da análise proteômica é a habilidade de resolver proteínas de uma mistura complexa. Uma das técnicas mais efetivas para atingir esse objetivo é a eletroforese bidimensional (2DE) que apesar de apresentar algumas limitações relacionadas com a solubilização de proteínas de membrana (altamente hidrofóbicas) e segregação de proteínas de pontos isoelétricos (pI) e tamanhos extremos (entre 10 e 120 kDa) é uma abordagem com capacidade de analisar milhares de proteínas simultaneamente (GORG et al. 2004; VERCAUTEREN et al. 2007).

Subsequente à separação, as proteínas são reveladas por corantes para a visualização dos spots proteicos, removidas e digeridas no gel com tripsina. Os fragmentos resultantes são extraídos do gel e analisados por espectrofotometria de massas (MS), sendo a tecnologia

MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) uma das mais utilizadas. A abordagem proteômica por eletroforese 2D-MS tem sido utilizada para obter perfis de expressão proteica de *Leishmania* (NUGENT et al. 2004; WALKER et al. 2006).

O perfil proteômico de promastigotas de *L. infantum* foi descrito pela primeira vez por Alcolea, Alonso e Larraga (2011). Extratos proteicos foram preparados em fases logarítmica inicial e estacionária e processadas por eletroforese bidimensional para elucidar os padrões de expressão diferencial da flavoproteína de transporte de elétrons, do fator de alongação eucariótico 1 alfa e alfa-tubulina.

A metaciclogênese é um processo vital no ciclo de vida de *Leishmania*. Promastigotas metacíclicos são altamente resistentes à lise mediada por complemento, e são capazes de evadir a resposta microbicida de macrófagos em hospedeiros mamíferos. A metaciclogênese é acompanhada por um espessamento do revestimento celular parasita. Durante a metaciclogênese, a virulência dos promastigotas para os modelos experimentais de mamíferos, aumenta significativamente. A expressão de um número de fatores de virulência expostos na superfície aumenta, incluindo o lipofosfoglicano, protease maior de superfície e o antígeno de superfície do promastigota (YAO; DONELSON; WILSON, 2010).

A identificação de novos antígenos é essencial para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas. Costa et al. (2011) analisaram *L. chagasi* através da eletroforese bidimensional diferenciada e identificaram 25 proteínas de interesse para o sorodiagnóstico da LV, sendo também mapeadas para epítomos em células B e T.

Trindade (2011) utilizou a eletroforese bidimensional com objetivo de destacar e identificar proteínas diferencialmente expressas entre formas promastigotas de isolados clínicos de *L. chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina, obtidos de pacientes com LV. Entre as proteínas identificadas, a peroxirredoxina (expressão aumentada nos resistentes) e uma cisteína peptidase semelhante à calpaína (exclusiva dos sensíveis) foram destacadas por indicar que os isolados resistentes são menos susceptíveis ao processo de morte celular programada. Estes dados sugerem que estas proteínas podem estar relacionadas com o fenótipo resistência à miltefosina.

Uma análise proteômica comparativa entre isolados susceptíveis e resistentes ao antimônio através da eletroforese bidimensional, foi realizada por Matrangolo et al. (2013) e concluíram que a resistência ao antimonial é complexa e multifatorial. Esses autores observaram que a triparedoxina peroxidase era diferencialmente expressada em *L. chagasi* e *L. braziliensis* resistentes ao antimonial. A pteridina redutase é mais abundante em *L. braziliensis* susceptível ao antimonial. A ciclofilina não foi diferencialmente expressada em

ambos isolados.

A tecnologia de *microarrays* pode ser utilizada para a determinação de perfis de expressão gênica, ou para o estudo de genômica funcional. Nesse tipo de estudo, a molécula de interesse é o RNA mensageiro (RNAm). Aqui, busca-se identificar variações na expressão de determinados genes que possam ocorrer como respostas biológicas naturais devido à presença de uma patologia, ou alguma outra condição experimental, à qual a amostra em estudo foi submetida (CHEUNG et al., 1999)

A estabilidade dos transcritos em tripanossomatídeos é controlada por mecanismos similares aos de organismos eucariotas modelo, como as leveduras. As técnicas para a análise da expressão simultânea de um grande número de genes, levou ao estudo da expressão diferencial global de *Leishmania* spp (BEVERLEY et al., 2002).

Saxena et al (2003) utilizaram pela primeira vez, microarranjos de DNA parciais construídos por fragmentação aleatória em *L. major* para analisar a variação do transcriptoma na diferenciação de promastigotas. Também se descreveu em promastigotas em fase estacionária de cultura axênica logarítmica, a sobre-expressão de genes associados com o metabolismo, expressão gênica, síntese e maturação de proteínas, transdução de sinais e aqueles relacionados com a síntese de moléculas antigênicas e a subexpressão de genes relacionados com a organização celular e transporte. Os dados obtidos mostraram uma alta correlação com os resultados obtidos pela técnica de Northern blot.

Em outro estudo, descreveu-se a análise transcriptômica parcial comparativa entre promastigotas logarítmicos, estacionários e amastigotas de *L. major* através de ensaios de hibridização com *microarrays* de DNAc, que representavam aproximadamente 22% dos genes (ALMEIDA et al., 2004).

Holzer, McMaster e Forney (2006) descreveram em *L. major* e *L. mexicana* uma análise transcriptômica comparativa de promastigotas em fase logarítmica e amastigotas de cultivo axênico e intracelular através de *microarrays* de oligonucleótidos que representavam os genes anotados no genoma de *L. major*. Essa foi a primeira estratégia global de análise do transcriptoma de *Leishmania* spp baseada em *microarrays*.

Desde então, foram realizadas diversas análises transcriptômicas com *microarrays* parciais (SAXENA et al., 2007; SRIVIDYA et al., 2007) e totais (ROCHETTE et al., 2009) para a comparação dos amastigotas axênicos e/ou intracelulares com os promastigotas. Também realizou-se uma análise proteômica da diferenciação dos promastigotas em amastigotas através da técnica cromatográfica de marcadores isobáricos para quantificação absoluta e relativa (iTRAQ) com um alto grau de representatividade (ROSENZWEIG et al.,

2008) e uma análise transcriptômica com microarrays de muito baixa representatividade em *L. braziliensis* (DEPLEDGE et al., 2009).

Como consequência de todos esses estudos, já foi relatada a regulação diferencial de uma considerável quantidade de genes nos processos de diferenciação dos promastigotas em amastigotas. Porém, os perfis de expressão gênica na diferenciação do promastigota não têm sido explorados apesar de estar disponível a informação genômica de três espécies de *Leishmania*: *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Concretamente, somente se encontraram 207 genes em três estudos de expressão diferencial entre promastigotas logarítmicos e estacionários (AKOPYANTS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; SAXENA et al., 2003). Todas essas pesquisas se basearam na comparação transcriptômica entre estágios do ciclo biológico do parasita, pelo que não se estabeleceram até agora relações causais diretas entre um fator concreto que participe em um processo de diferenciação de *Leishmania* e a expressão diferencial dos genes.

Recentemente, Alcolea et al. (2010a) na Espanha, analisaram *L. infantum* pela técnica de microarrays. Há uma expressão gênica diminuída que predomina em amastigotas intracelulares em relação aos promastigotas, incluindo numerosos genes relacionados com a expressão gênica e sua regulação. Na progressão da diferenciação de promastigota a amastigota, foi detectada a diminuição da expressão de genes relacionados com a biossíntese de nucleotídeos de purina, a farnesilação e n-glicosilação de proteínas, catabolismo de glicose, biossíntese do grupo heme e prostaglandina F e das estruturas flagelar e paraflagelar. Também foi observado que os promastigotas metacíclicos em fase estacionária têm maior capacidade infectiva ao expressar de forma aumentada genes relacionados com a infectividade.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar os aspectos epidemiológicos e fatores do parasita associados à leishmaniose visceral canina e humana em Aracaju, Sergipe.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Analisar a distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral canina e humana no município de Aracaju entre os anos de 2005 e 2012, assim como das cepas isoladas de *L. chagasi* resistentes ao óxido nítrico.

Hipótese: Há uma superposição na distribuição de casos caninos e humanos em Aracaju-SE.

2. Comparar a capacidade microbicida de macrófagos de cão e de raposas na infecção por isolados de *L. chagasi* através do índice de infecção de macrófagos.

Hipótese: macrófagos de raposas tem uma maior capacidade microbicida do que os macrófagos de cães.

3. Comparar o perfil de expressão proteica global entre isolados *L. chagasi* resistentes e susceptíveis ao óxido nítrico, em diferentes fases de crescimento.

Hipótese: Isolados de L. chagasi, resistentes e susceptíveis ao óxido nítrico, expressam proteínas em níveis diferentes durante o seu crescimento

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO OBJETIVO 1

Analisar a distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral canina e humana no município de Aracaju entre os anos de 2005 e 2012, assim como das cepas isoladas de *L. chagasi* resistentes ao óxido nítrico.

4.1.1 Local de Estudo

O município de Aracaju, capital do Estado de Sergipe, está localizado no litoral e ocupa uma área de 181,8 km². Conta com uma população de 614.577 habitantes segundo dados do IBGE de 2013 e uma densidade demográfica de 3.380,51 hab/km². Limita-se com os municípios de São Cristóvão, Nossa Senhora do Socorro, Laranjeiras e Barra dos Coqueiros. Possui uma precipitação média anual de 1.590 mm e uma temperatura média anual de 26°C.

4.1.2 Distribuição espacial dos casos de Leishmaniose visceral humana e canina

Foi realizado um levantamento na base de dados do Programa de Controle de Leishmaniose Visceral Canina cedido pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Aracaju e da leishmaniose visceral humana cedido pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica Hospitalar do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Sergipe, referente aos anos de 2005 a 2012. O HU é o hospital de referência em Sergipe para o tratamento da leishmaniose visceral e constata a maioria dos casos humanos. Esses dados foram transpostos para o programa Excel para a análise dos dados e construção de gráficos com a informação do endereço residencial do caso humano ou do cão doente.

Para as etapas de modelagem do banco de dados epidemiológicos, plotagem e montagem do sistema de informações geográficas foi utilizado o software ArcGis 10, sendo executadas no Núcleo de Geologia da UFS.

Na co-localização dos casos humanos e caninos nos mapas foi dada ênfase aos casos causados por isolados resistentes ao NO devido à importância desse tipo de isolado em provocar doença acentuada e grave tanto no homem como no cão.

4.2. DESENHO DO OBJETIVO 2

Comparar a capacidade microbicida de macrófagos de cão e de raposas na infecção por isolados de *L. chagasi* através do índice de infecção de macrófagos.

4.2.1 Coleta de Sangue

O sangue das raposas foi obtido de três exemplares de *Cerdocyon thous* (um macho e duas fêmeas) mantidos no zoológico do Parque da Cidade, localizado dentro da área de conservação do Morro do Urubu em Aracaju-SE. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe pelo protocolo nº 96/11. A autorização para a coleta do sangue das raposas foi dada pelo Ministério do Meio Ambiente/ICMbio/Sisbio pelo protocolo nº 26637-2.

A coleta de sangue das raposas foi realizada após sedação com o uso de zarabatana com cloridrato de xilazina 10% (2 mg/kg) e cloridrato de quetamina 20% (8 mg/kg) ou por contenção. Foram coletados 10 mL por punção da veia jugular em tubos estéreis heparinizados. Após a coleta, o sangue foi processado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Hospital Universitário, Universidade Federal de Sergipe em Aracaju-SE.

O sangue canino foi coletado em uma clínica veterinária particular, onde os cães são mantidos como doadores de sangue. São animais saudáveis, sem acesso à rua e periodicamente realizam exames de controle. A coleta foi realizada apenas com contenção dos cães por punção da veia cefálica.

4.2.2 Separação do soro e teste sorológico para leishmaniose visceral

Para a separação do soro, foi utilizado 1 mL do sangue coletado e centrifugado a 3000 rpm. Foi realizada sorologia para leishmaniose visceral com a utilização de teste rápido pela utilização de fita imunocromatográfica Kalazar Detect® Rapid Test, seguindo-se estritamente as instruções do fabricante InBios International Inc.

4.2.3 Isolamento de PMBC (*peripheral mononuclear blood cells* - células mononucleares de sangue periférico)

O sangue foi diluído com solução salina estéril 1:1 e logo depois foi adicionada solução de Ficoll-Paque® (na proporção de 3mL de Ficoll para 10 mL de sangue diluído). O tubo com a mistura foi centrifugado a 1500rpm a 20°C por 40 min. Retirou-se a “nuvem” de PMBC e colocou-se em outro tubo, completou-se o volume com 10-15 mL de salina estéril e centrifugou-se a 1500rpm a 4°C por 10 min. A contagem das células foi realizada e ajustou-se a concentração para 5×10^6 por mL. Desprezou-se o sobrenadante e se adicionou solução nutriente RPMI 1640 Gibco®. As células foram então incubadas a 37°C com 5% CO₂ durante 7 dias. Cinquenta por cento do RPMI foi trocado no terceiro dia.

Foi utilizado o mesmo protocolo para obtenção de PMBC em cães e raposas.

4.2.4 Infecção dos macrófagos

Antes da infecção foi realizada a viabilidade das leishmanias e ajustada a concentração a 3×10^6 células por mL. Para a infecção e avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos, foi utilizado o isolado de *L. chagasi* resistente ao óxido nítrico (LVCSE-30). Esse isolado foi escolhido para realizar as infecções por sua facilidade de crescimento. Os macrófagos cultivados com 7 dias de infecção foram infectados e após duas horas de incubação foi feita a lavagem do meio para retirar leishmanias não aderidas. Quando foi utilizado estímulo (lipopolissacarídeo) o mesmo foi adicionado na cultura de macrófagos 30 minutos antes de realizar a infecção. Após a inoculação dos promastigotas e incubação, as células foram analisadas 2, 24, 48 e 72 horas depois e medida a taxa de infecção com a contagem de amastigotas viáveis dentro dos macrófagos. O sobrenadante da cultura foi congelado para análises posteriores.

4.2.5 Avaliação estatística

Foi feita uma avaliação quantitativa em que se compararam as taxas de infecção no cão e na raposa através do teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney com intervalo de confiança de 95% sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes a depender dos dados obtidos.

4.3 DESENHO DO OBJETIVO 3

Comparar o perfil de expressão proteica global entre isolados *L. chagasi* resistentes e susceptíveis ao óxido nítrico, em diferentes fases de crescimento.

4.3.1 Isolamento de *L. chagasi* e formação do criobanco

O isolamento de parasitas de amostras biológicas de cães com leishmaniose visceral canina foi obtido pela punção de medula óssea dos cães soropositivos encaminhados para eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses. Os parasitas foram cultivados em meio ágar sangue NNN (Novy-MacNeal-Nicolle). As culturas foram mantidas em estufa B.O.D a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Semanalmente foi observada a motilidade e morfologia dos parasitos e estes foram reinoculados pela transferência de 1×10^6 promastigotas/mL para uma nova garrafa de cultura contendo meio Scheneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro bovino fetal 10% (Cripion, Brasil), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/mL e streptomomicina 100 μL /mL (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A curva do crescimento parasitário foi obtida, a partir da contagem diária de parasitas em cultura. As leishmanias em fase estacionária foram estocadas a -70°C , para manter as características fenotípicas do parasito. No momento da utilização desses isolados no experimento, a viabilidade ao óxido nítrico já tinha sido avaliada pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Foram avaliados 21 isolados caninos e 21 isolados humanos.

4.3.2 Cultura do Parasita

Com base nos resultados da avaliação da viabilidade ao óxido nítrico, foi selecionado um isolado de *L. chagasi*, susceptível (LVCSE-19) e um resistente (LVCSE-30) ao NO, para a análise da expressão proteica. Os isolados foram cultivados a uma densidade inicial de 2×10^6 células/ml em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (Cambrex®), soro fetal bovino 10% (Cambrex®) e 100 μg /mL estreptomomicina – 100 UI/mL penicilina (Cambrex®) a 37°C . A densidade celular foi registrada diariamente e os promastigotas foram coletados a 2000g por 10 minutos nos dias 2, 4 e 6.

4.3.3 Extração de proteínas

Promastigotas de fase logarítmica e estacionária foram ressuspensas em tampão de lise (8,4 M de ureia, 2,4 M tiouréia, 5% [w / v] 3 - [(3-colamidopropil) dimetil-amônio] - 1-[propanosulfonato CHAPS], 50 mM ditioneitol [DTT], 1% Triton X-100, 1 mM preparada em fenilmetilsulfonilfluoreto metanol 0,1 M, 10 mg / mL de leupeptina, 10 mg / mL de aprotinina, 5 mg / mL pepstatina, e 50 mg / mL de ADNase) a uma densidade celular de 2×10^9 /150 mL.

Os extratos de proteínas totais obtidos foram agitados levemente por inversão a 4°C durante 30 min, centrifugados a 15.000 g durante 10 min e purificados com o kit de limpeza ReadyPrep 2-D (BioRad, Hemel Hempstead, Reino Unido), para evitar formação de bandas na 2-DE subsequente. As amostras foram secadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e ressuspensas em tampão de reidratação para 2DE (uréia 8M, 2% [v / v] CHAPS, DTT 50 mM, 0,2% [v / v] Bio-Lytes® 3/10 anfólito carreador [BioRad], 0,002% [w / v] azul de bromofenol) por agitação vigorosa durante 30s, combinado com intervalos de 1 min de incubação por cinco vezes.

4.3.4 Precipitação e quantificação da proteína

Extratos foram precipitados usando o protocolo metanol/clorofórmio de Wessel e Flugge (1984). As amostras foram diluídas com água até um volume total de 400 µL. Metanol gelado (400 µL) e clorofórmio (700 µl) foram adicionados a cada tubo de amostra. Após centrifugação (13.000 g a 4° C durante 15 min), a fase clorofórmica superior foi removida e a interfase proteica lavada e centrifugada duas vezes com metanol (700 µL) (13.000 g, a 4°C durante 30 min). Pellets de proteína foram secos e ressuspensos em tampão de reidratação 2X (7 M de ureia, 2 M tioureia, 4% [w/v] CHAPS e 0,0003% [w/v] de azul de bromofenol). A concentração de proteína foi quantificada com RC DC Protein Assay® (Bio-Rad).

Para a eletroforese 2D, alíquotas de 50-100 µg de proteína foram diluídas para um volume total de 140 µL com tampão 2X, com 18,2 M de DTT e 0,5% de solução tampão de IPG (pH 3-10) (BIO- RAD) como concentrações finais.

4.3.5 Eletroforese bidimensional

Cada tira de gel foi equilibrado em 2 ml de tampão de equilíbrio (50 mM Tris • HCl

pH 8,8, 2% [w / v] de SDS, ureia 6 M, 30% [v / v] de glicerol) que continha 52 mM de DTT, durante 15 min. e, em seguida em 2 mL de tampão de equilíbrio contendo 130 mM de iodoacetamida durante 15 minutos.

A focalização isoeétrica foi realizada em tiras de IPG (pH 3-10 NL, 7 cm) (BIO-RAD), em um sistema celular Protean IEF (BIO-RAD), como recomendado pelos fabricantes, com um programa de 7 fases (50 V durante 12 h, 250 V durante 1 h, a 500 V durante 1 h, 1000 V durante 1 h, 2000 V durante 1 h, 8000 V durante 1 h [rampa linear] e 8000 V de tensão até que a voltagem tempo atingisse 3500 V • h nesta fase. Mais de 12 mil V • h foram alcançados em todos os casos.

A segunda dimensão foi realizada pelo fracionamento das proteínas focalizadas isoeletricamente em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio 12% a 0,5 watts / gel durante 30 min e, em seguida, 1,5 watts / gel até 5 min. Após o corante atingir a borda inferior (em cerca de 2 h) foi deixado em mistura arrefecida Mini-Protean 3 Dodeca-Cell (BIO-RAD). O marcador foi utilizado na quantidade de 2,5 µL de solução Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD).

4.3.6 Coloração, captura de imagem e corte de géis

Foi realizada a coloração pela prata compatível com MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem time of flight) da seguinte maneira: fixação com 40% de ácido acético/ 10% acetona durante 1 h; sensibilização com 30% de etanol, 0,2% (w/v) de tiosulfato de sódio, e 6,8% (w/v) de acetato de sódio, durante 30 minutos; três lavagens de 5 min; coloração com 0,25% (w/v) de nitrato de prata durante 20 minutos; duas lavagens de um minuto com água; revelação com 0,25% (w/v) carbonato de sódio/0,04% (w/v) de formaldeído por 5min; 1,46% (w/v) EDTA por 10 min; três lavagens de 5 minutos com água. As imagens foram obtidas com um densitômetro calibrado GS-800 (BioRad) e analisadas com o software PDQuest 2D 7.4.0. Todos os spots foram automaticamente detectados e posteriormente verificados manualmente. A intensidade normalizada foi calculada pela quantidade total no método de pontos válidos contido neste software. A análise estatística teste-t foi realizada com o mesmo software.

O EXQuest Spot Cutter (BIO-RAD), foi utilizado para a captura de imagens e géis e excisão dos pontos selecionados.

4.3.7 Identificação das proteínas por espectrometria de massa

Os spots foram lavados com bicarbonato de amônio 50 mM e depois com acetonitrilo. Depois disso, a redução foi realizada com DTT 10 mM, 25 mM de bicarbonato de amônio a 56°C por 20 min e alquilação com iodoacetamida em uma solução 50 mM de bicarbonato de amônio. Os dois passos de lavagem foram repetidos e os spots secados a 40°C. As digestões de proteínas foram realizadas por incubação com 16 ng/mL tripsina suína modificada (Promega, Madison, WI), em uma solução de acetronila 25%/50mM de bicarbonato de amônia a 37°C por 6 horas. As reações foram paradas adicionando de 0,5% (v/v) de ácido trifluoroacético que também foi utilizado para a extração de peptídeos durante 15 min. Os peptídeos trípticos eluídos foram secos por centrifugação à vácuo e ressuspensos em 4 µL de uma solução aquosa composta por 30% acetonitrile/15% isopropanol/0.1% de solução de ácido trifluoroacético.

Uma gota de 0,8 µL de peptídeos em ressuspensão foi depositado em uma placa de OptiTOFTM (Applied Biosystems, Framingham, MA) e seca à temperatura ambiente; uma gota de 0,8 µL de uma solução do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 3g/L (Sigma, Buchs, Suíça) foi também depositado e seco. O prato foi introduzido em um espectrofotômetro de massa ABI 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) e executado no modo refletor positivo em 25 kV para MS e 1 kV para calibração . Os espectros foram processados com um ABI 4000 Series Software Explorer 3.6 (Applied Biosystems). As massas dos peptídeos foram introduzidas no MASCOT 2.1 com o Global Protein Explorer Server 4.9 (Applied Biosystems), a fim de realizar a busca no banco de dados NCBIInr.

As análises foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Microbiologia Molecular e Biologia das Infecções do Centro de Investigações Biológicas (CIB) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), Madrid, Espanha.

5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE CASOS CANINOS E HUMANOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM ARACAJU

O município de Aracaju possui uma população estimada pelo o IBGE em 2013, de 614.577 habitantes. A população de Aracaju e regiões limítrofes vêm crescendo aceleradamente, devido à imigração de pessoas provenientes de outros municípios de Sergipe, especialmente de áreas rurais, bem como de outros estados da Federação, especialmente de cidades do norte da Bahia, por serem municípios que fazem fronteira com o estado de Sergipe. O município é dividido administrativamente em 39 bairros (FIGURA 1).



Fonte: Mapa Municipal Oficial, Prefeitura Municipal de Aracaju

Figura 1 - Mapa descritivo e bairros que compõem o município de Aracaju.

A população canina corresponde a aproximadamente 12% da população humana do município, ou seja, aproximadamente 74.000 cães.

Inicialmente, os dados referentes aos casos de leishmaniose obtidos no Centro de Controle de Zoonoses e no Hospital Universitário da UFS, foram organizados e tabulados para a análise dos dados e construção de gráficos com a informação do endereço residencial do caso humano ou do cão doente. Para a modelagem do banco de dados epidemiológicos, plotagem e montagem foi utilizado o software ArcGis10.

No período de 2005 a 2012 foram detectados no município de Aracaju, 110 casos de LV humana e 2.060 casos de LV canina e a localização espacial dos casos humanos e caninos mostra ampla distribuição geográfica da doença que foi registrada em 28 (72%) dos 39 bairros do município (QUADRO 1). Casos caninos aconteceram em 24 (61,5%) bairros do município, e casos humanos em 26 (66,6%) dos 39 bairros de Aracaju. Em 11 (28,2%) bairros da cidade, não aconteceram casos nem caninos e/ou humanos.

Quadro 1 - Casos de leishmaniose visceral humana e canina por bairros do município de Aracaju ocorridos entre 2005 e 2012.

BAIRRO	Humanos	Caninos	BAIRRO	Humanos	Caninos
Atalaia	-	-	América	15	291
Farolândia	4	33	Capucho	-	-
Coroa do Meio	-	-	São José	-	-
Inácio Barbosa	-	-	Novo Paraíso	7	114
São Conrado	2	-	José Conrado	6	69
Jabotiana	-	46	Lamarão	-	-
Grageru	-	-	Getúlio Vargas	1	8
Jardins	-	-	Cirurgia	3	5
Luzia	-	-	Suissa	6	26
Ponto Novo	1	-	Palestina	1	2
13 de Julho	-	-	Santo Antônio	1	1
Salgado Filho	-	1	Centro	1	-
Siq. Campos	6	10	18 do Forte	4	99
Cidade Nova	2	58	Industrial	2	1
Soledade	2	47	Olaria	3	59
Zona de Expansão	16	697	Aeroporto	1	10
Bugio	1	39	Santa Maria	4	151
Jd. Centenário	3	79	Pereira Lobo	3	14
Santos Dumont	13	210	Japãozinho	-	-
Porto Dantas	2	-			
				Casos Humanos	Casos caninos
TOTAL				110	2.060

Pode ser observado que dos 2.060 casos caninos, mais da metade (70,9%) ficaram restritos a cinco bairros da cidade: Zona de Expansão (33,8%), América (14,1%), Santos Dumont (10,2%), Santa Maria (7,3%) e Novo Paraíso (5,5%). Esses bairros têm alta

densidade demográfica. Metade (50%) dos 110 casos humanos se localizaram nesses mesmos bairros. A proporção encontrada entre cães e humanos doentes para a área foi de 18,7. Vários bairros da região norte (Japãozinho e Lamarão), central (Inácio Barbosa, Grageru, Jardins, Luzia, 13 de Julho, Capucho, São José) e sul (Atalaia e Coroa do Meio) não tiveram nenhum registro de casos humanos ou caninos (FIGURA 2).

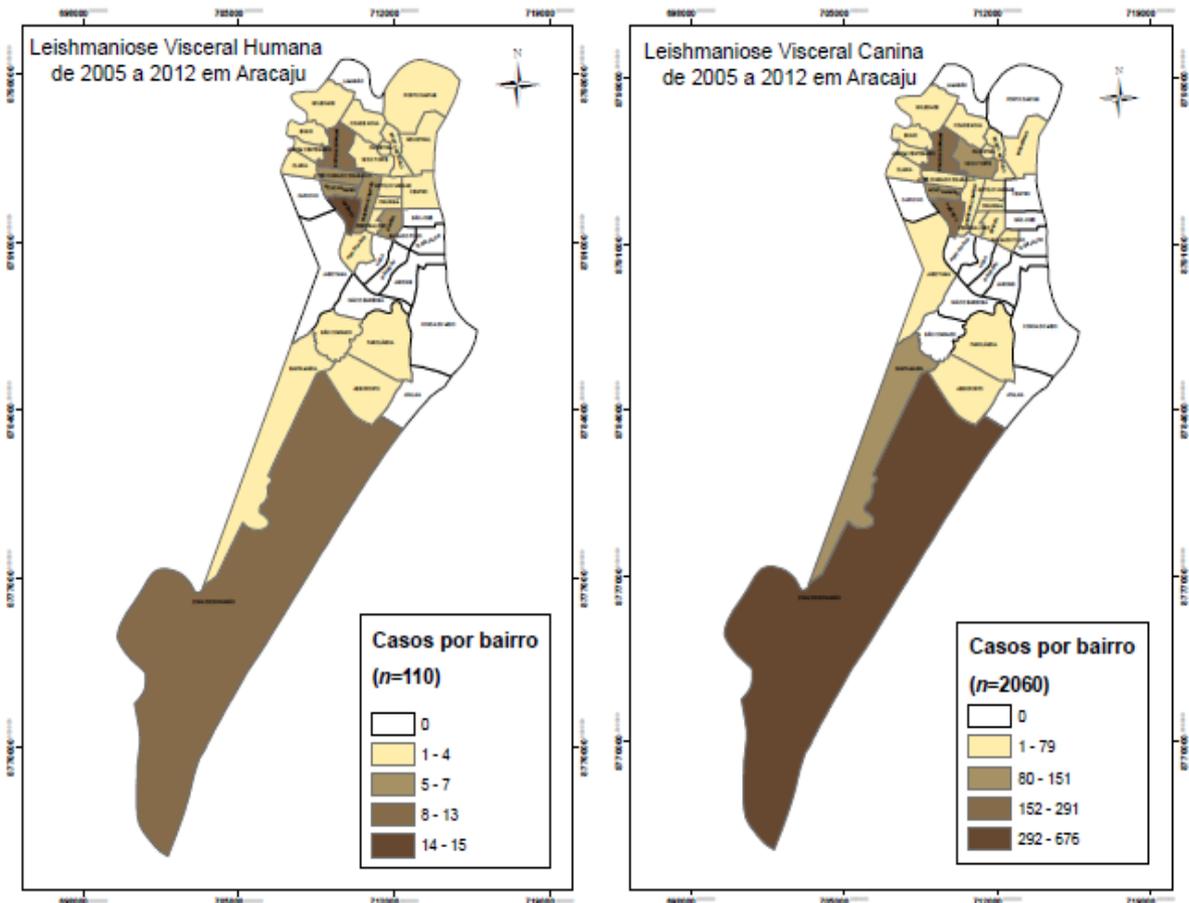


Figura 2 - Casos de leishmaniose visceral humana e canina, por bairro, no município de Aracaju de 2005 a 2012.

Pode ser observado na Figura 2, que existem bairros onde ocorreram casos humanos como São Conrado, Ponto Novo, Porto Dantas e Centro, mas segundo o inquérito soropidemiológico canino, não houve cães soropositivos no período pesquisado. Da mesma forma, há bairros com presença de cães soropositivos como Jabotiana e Salgado Filho, mas sem registros de casos humanos.

Dos 42 isolados analisados para resistência ao NO, 12 isolados caninos e 6 isolados humanos foram resistentes ao óxido nítrico (NO). Nos bairros Farolândia, Salgado Filho, Siqueira Campos, Palestina e Cidade Nova foi encontrado em cada um, um isolado canino

resistente ao NO. Na Zona de Expansão e no bairro Industrial foi encontrado um isolado canino e um isolado humano resistente ao NO. No bairro Dezoito do Forte foram dois isolados humanos para um canino. Nos bairros América e Santos Dumont foram ocorreram dois isolados humanos em cada um, e 2 e 3 isolados caninos, respectivamente (FIGURA 3).

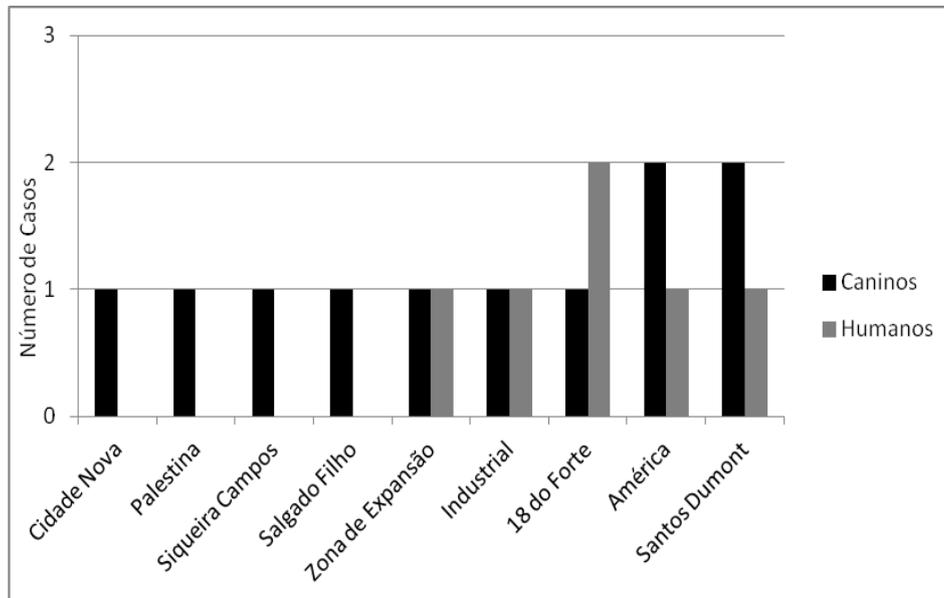


Figura 3 - Número de isolados caninos e humanos de *Leishmania chagasi* resistentes ao óxido nítrico, por bairros do município de Aracaju ocorridos entre 2005 e 2012.

A presença de 18 isolados resistentes ao óxido nítrico, humanos ou caninos, aconteceu em diferentes regiões do município de Aracaju, mostrando a dispersão da doença. A presença desses isolados foi observada em bairros de grande densidade demográfica como América, Industrial e Palestina (FIGURA 4). A maior parte dos isolados resistentes ao óxido nítrico (15/ 83,3%) ficou restrita aos bairros próximos do centro da cidade, sendo que apenas 3 foram encontrados na região sul do município, um de origem canina no bairro Farolândia, e um canino e um humano, na Zona de Expansão.

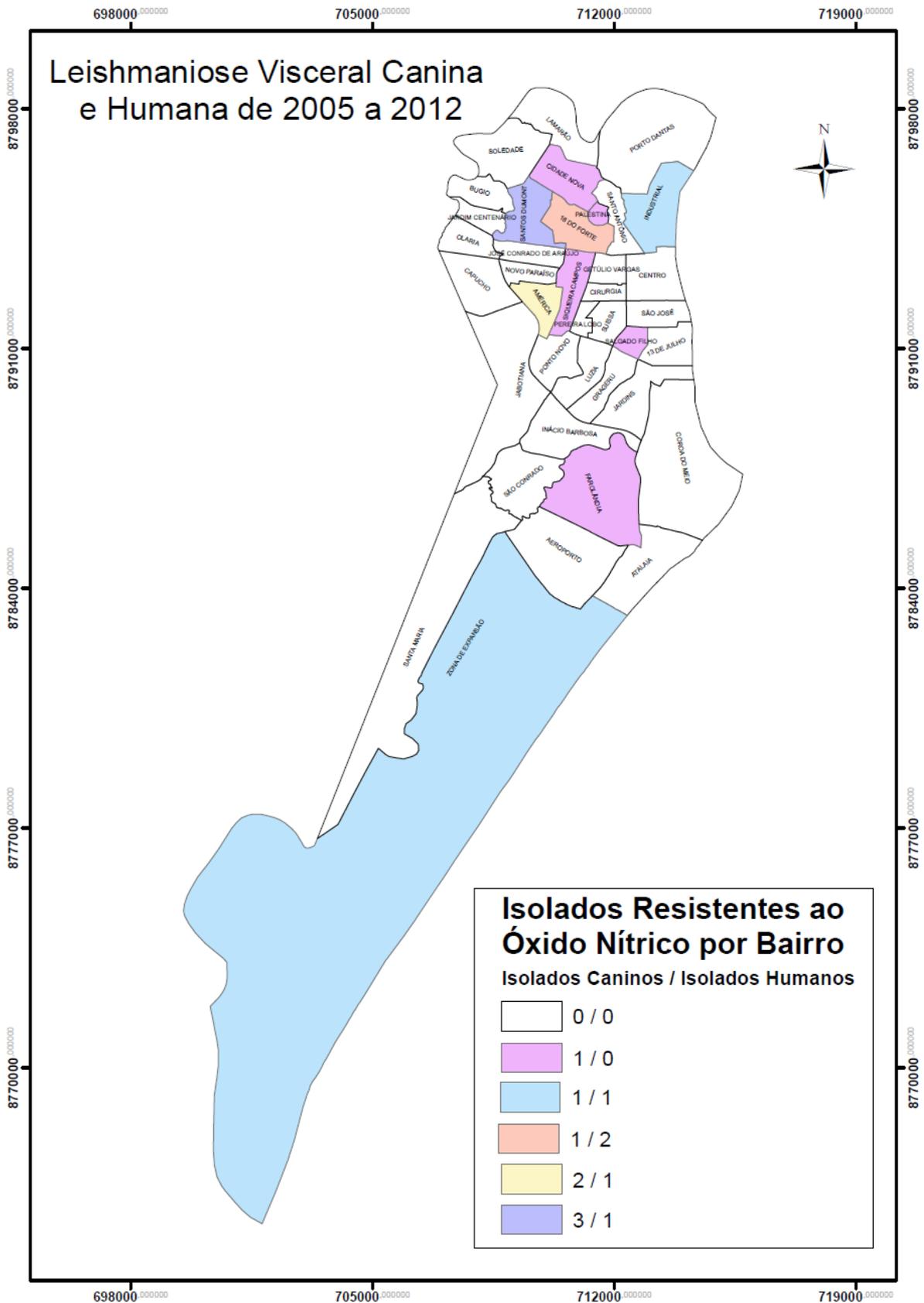


Figura 4 - Mapa mostrando isolados de *Leishmania chagasi* resistentes ao óxido nítrico, humanos e caninos, por bairro de Aracaju.

5.2 COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS DE RAPOSAS E CÃES

Para o cultivo de macrófagos, foi utilizado sangue de três raposas do zoológico do Parque da Cidade de Aracaju, e de três cães saudáveis domiciliados. Todos foram negativos para leishmaniose visceral pelo teste rápido Kalazar Detect® Rapid Test. Os macrófagos foram cultivados em placas Labtek® e a infecção realizada no sétimo dia. Foi utilizado o isolado canino LVCSE-30, resistente ao NO, pela sua facilidade de crescimento. Os experimentos foram realizados simultaneamente com raposa e cão, em quadruplicata. Nos tempos de 2, 24, 48 e 72 horas após a infecção foi coletado o sobrenadante, as lâminas coradas e realizada a contagem de macrófagos infectados e do número de amastigotas intracelulares. Os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism 5 (FIGURA 5).

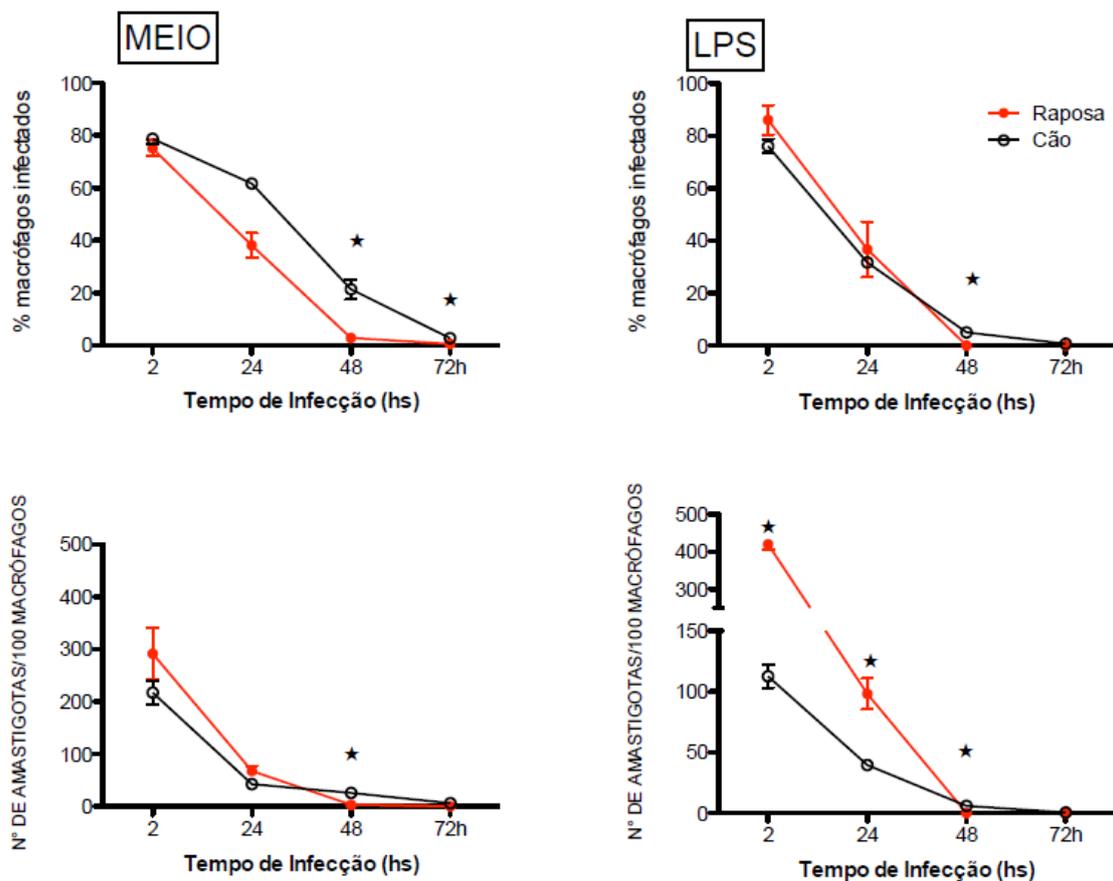


Figura 5 - Infecção de macrófagos caninos e de raposa. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* LVCSE30 originado de um cão infectado na relação 10:1. Nos tempos 2, 24, 48 e 72 horas de cultivo, a porcentagem de células infectadas/100 macrófagos e o número de amastigotas intracelulares/100 macrófagos foi quantificado microscopicamente. O estímulo com lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/ml) ocorreu duas horas antes da infecção. Os valores representam a média de quatro experimentos. $n = 3$ para cão e raposa. (* $p < 0,05$ Mann Whitney test).

A porcentagem de macrófagos infectados e de amastigotas intracelulares/100 macrófagos foi semelhante tanto no cão como na raposa às duas horas após a infecção. Após 24 e 48h houve uma redução expressiva no número de macrófagos infectados e de amastigotas intracelulares, sendo praticamente não detectados às 72 horas após a infecção. No entanto, pode ser observado que a redução é maior na raposa do que no cão e após 48 horas essa diferença é significativa.

5.3 PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA GLOBAL EM ISOLADOS DE *L. chagasi*

Uma abordagem global, tal como os perfis de proteínas gerados por 2-DE, é uma ferramenta útil para definir o repertório de proteínas de um microrganismo. O objetivo do nosso estudo foi estabelecer a 2-DE como uma ferramenta para estudar os padrões de expressão de proteínas em promastigotas de *L. chagasi* resistente e susceptível ao óxido nítrico, com o objetivo de empregar a tecnologia proteômica para procurar proteínas de *L. chagasi* espécie-específicas. Usamos promastigotas axenizados neste estudo, uma vez que promastigotas de *L. chagasi* podem ser facilmente cultivados em grandes quantidades *in vitro*, quando comparados com os amastigotas.

Os isolados foram cultivados durante sete dias. A densidade celular foi registrada diariamente e os promastigotas foram coletados a 2000g por 10 minutos no dias 2, 4 e 6. Na Figura 6 pode ser observada a curva de crescimento dos isolados de *L. chagasi* susceptível (LVCSE-19) e resistente (LVCSE-30) ao óxido nítrico. Pode ser observado que a LVCSE-19 teve um crescimento ligeiramente superior a LVCSE-30.

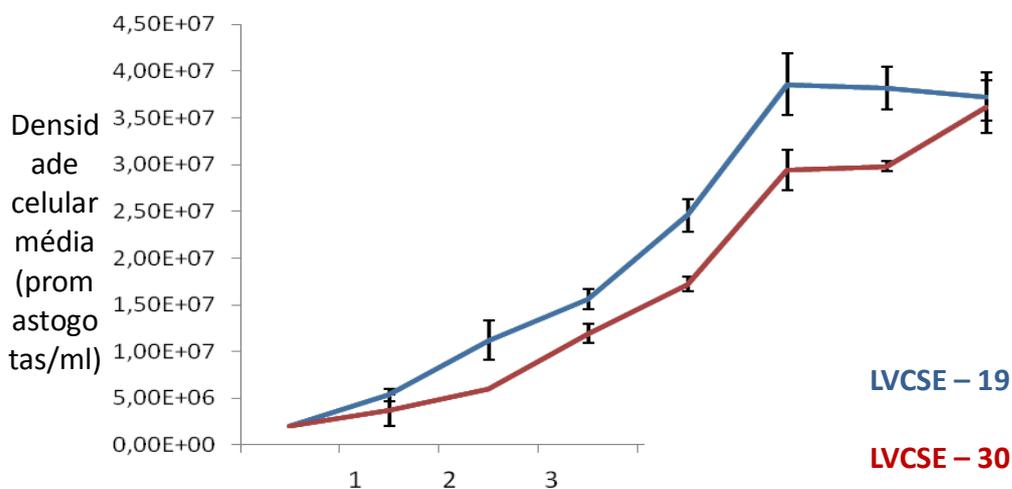


Figura 6 - Curva de crescimento de promastigotas de *L. chagasi* susceptível (LVCSE-19) e resistente (LVCSE-30) ao óxido nítrico. Extratos proteicos totais foram obtidos nos dias 2 (fase logarítmica inicial), 4 (fase logarítmica média) e 6 (fase estacionária). Cultivo realizado em meio RPMI em triplicata.

Foram gerados mapas 2-DE representativos de LVCSE-19 e LVCSE-30. Após edição minuciosa automática e manual, para corrigir artefatos, a análise de imagem detectou aproximadamente 398 spots para LVCSE-19 (FIGURA 7) e 418 pontos para LVCSE-30. Em geral, houve uma semelhança notável na distribuição de proteínas e de posicionamento entre os dois isolados de *L. chagasi*, com a maioria das proteínas localizadas no intervalo de pI de 4 a 7. A focalização isoeletrica foi realizada entre pH 3-7.

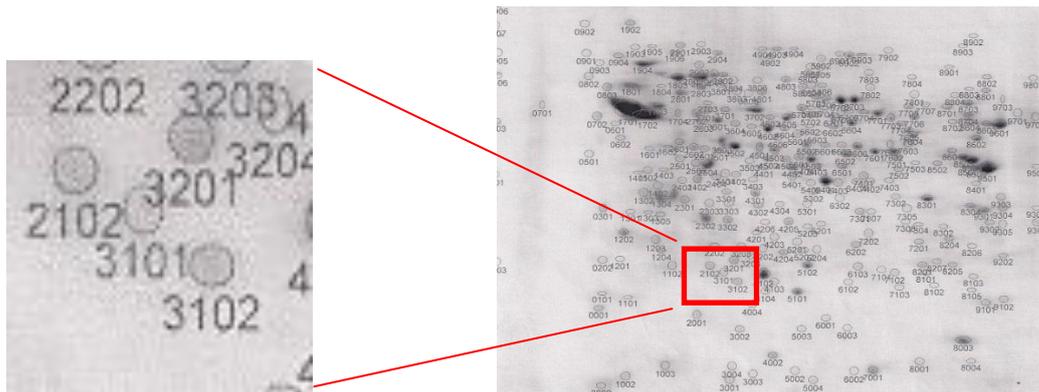


Figura 7 - Detecção de proteínas de promastigotas de *Leishmania chagasi* LVCSE-19 através de 2-DE. Lisados de proteínas solúveis foram realizados em tiras de IPG pH de 3-10 (17 cm) e em seguida separada com 10% tricina SDS-gel (18 x 20 cm). Os géis foram corados com Sypro® Protein Gel stain. Spots que foram confirmados para mostrar um aumento de 2 vezes ou mais foram marcados com círculos na imagem correspondente. Os números indicados correlacionam-se com os números de referência atribuídos através do software PDQuest 2D 7.4.0. nos Quadros 1 e 2. Spots que foram encontrados no gel de LVCSE-19, mas não foram detectados em LVCSE-30, ou vice-versa, também foram circulado em ambos os géis. Em destaque, pode ser observado o spot 3101 correspondente a proteína triparedoxina peroxidase de expressão diferenciada em promastigotas metacíclicos.

Os spots protéicos com expressão diferenciada entre os isolados de *L. chagasi* susceptíveis e resistentes ao NO, foram extraídos dos géis e processados para a análise por espectrometria de massas em sistema MALDI/TOF-TOF. A combinação dos espectros de massas resultantes (MS e MS/MS) foi utilizada na identificação das proteínas, por meio de busca no banco de dados do NCBIInr pelo software MASCOT não foi sequenciado, a validade dessa estratégia de identificação das proteínas foi baseada no alto grau de sequências conservadas entre as espécies de *Leishmania* spp. A interpretação automática dos espectros de massas combinados permitiu a identificação de 141 spots analisados.

Os dados obtidos das proteínas identificadas, com expressão quantitativa diferenciada e com expressão exclusiva em cada isolados estão listados nos Quadros 1 e 2.

Quadro2 - Proteínas de expressão diferenciada em promastigotas do isolado de *Leishmania chagasi* LVCSE-19 (susceptível ao NO) em fase logarítmica, estacionária e em promastigotas metacíclicas.

Spot	Nome (espécie)	Nº NCBI	MW (kDa)	MASCOT score proteico (p<0,05)
FASE LOGARITMICA INTERMEDIARIA				
Lch19.1402	beta tubulin (<i>Trypanosoma grayi</i>)	91983201	35.93	121
Lch19.1704	alpha tubulin (<i>Leishmania braziliensis</i> .)	389600613	53.99	251
Lch19.2101	cytochrome c oxidase subunit V (<i>L. braziliensis</i>)	154338084	23.01	194
Lch19.3101	tryparedoxin peroxidase (<i>Crithidia fasciculata</i>)	3851500	23.46	352
Lch19.3305	Chain A, Purine Nucleoside Hydrolase	1827759	34.48	435
Lch19.3605	enolase (<i>L. infantum</i>)	146081643	48.52	812
Lch19.5402	conserved hypothetical protein (<i>L. braziliensis</i>)	154334821	35.57	82
Lch19.5404	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase-like (<i>L. braziliensis</i>)	154331555	38.10	88
Lch19.6704	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (<i>T. cruzi</i>)	407849981	55.73	83
Lch19.6707	putative glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (<i>L. major</i>)	157875408	55.05	101
Lch19.7101	triosephosphate isomerase (<i>L. braziliensis</i>)	389603880	24.32	284
Lch19.7306	malate dehydrogenase (<i>L. infantum</i>)	146098508	34.34	283
Lch19.8304	glycosomal malate dehydrogenase (<i>T. brucei</i>)	71749346	32.89	92
Lch19.8506	glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial (<i>Leptomonas</i> sp)	156523920	38.79	808
Lch19.8703	putative glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase (<i>L. major</i>)	389593467	60.26	115
FASE ESTACIONARIA				
Lch19.1101	beta-tubulin (<i>L. braziliensis</i>)	154343842	20.86	196
Lch19.1401	alpha tubulin (<i>L. donovani</i>)	51847763	37.50	84
Lch19.1402	beta tubulin (<i>T. grayi</i>)	91983201	35.93	121
Lch19.3102	cytochrome c oxidase subunit V (<i>L. braziliensis</i>)	154338084	22.33	413
Lch19.7101	triosephosphate isomerase (<i>L. braziliensis</i>)	389603880	24.32	284
Lch19.8601	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	129909	43.36	433
PROMASTIGOTAS METACICLICOS				
Lch19.2801	chaperonin HSP60, mitoc. precursor (<i>L. major</i>)	157876872	64.63	345
Lch19.2902	paraflagellar rod protein (<i>Crithidia fasciculata</i>)	45686191	82.65	238
Lch19.3101	tryparedoxin peroxidase (<i>Crithidia fasciculata</i>)	3851500	23.46	352
Lch19.3102	cytochrome c oxidase subunit V (<i>L. braziliensis</i>)	154338084	22.33	413
Lch19.5902	putative threonyl-tRNA synthetase (<i>L. major</i>)	389594623	90.77	238
Lch19.7704	putative elongation factor Tu (<i>L. major</i>)	157867853	51.42	398

Número de spot, nome da proteína/organismo relacionado, nº NCBI GenInfo, MW= peso molecular em kDa, score MASCOT (p<0,05)

Na fase logarítmica intermediária do isolado LVCSE-19 houve uma expressão diferenciada de proteínas relacionadas com a glicólise e a gluconeogênese como 3-fosfoglicerato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, malato desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Na fase estacionária predominaram proteínas relacionadas com motilidade como alfa e beta tubulina; e nos promastigotas metacíclicos predominaram proteínas relacionadas com dobramento proteico como chaperonina Hsp60 e resposta de defesa como triparedoxina peroxidase.

Em promastigotas de *L. chagasi* susceptíveis ao óxido nítrico (LVCSE-19) foram identificadas 65 proteínas e pode-se observar que 19% das proteínas identificadas integram a

classe de proteínas com atividade chaperona e/ou de dobramento proteico, sendo esta categoria a mais frequente. A proporção das demais categorias funcionais foram, respectivamente: proteínas associadas ao citoesqueleto (14%), metabolismo de carboidratos (11,6%), síntese protéica (12%), metabolismo de aminoácidos (4,1%), metabolismo de nucleosídeos, nucleotídeos ou ácido nucléico (4,7%), processos de detoxificação/antioxidação (4%), crescimento e morte celular (3,9%), proteólise (2,3%), processos de modificações protéicas (2%), síntese de ATP (2%), e desfosforilação (2%). As proteínas com função desconhecida nos processos biológicos representaram 18,3% do total de proteínas identificadas (FIGURA 8).

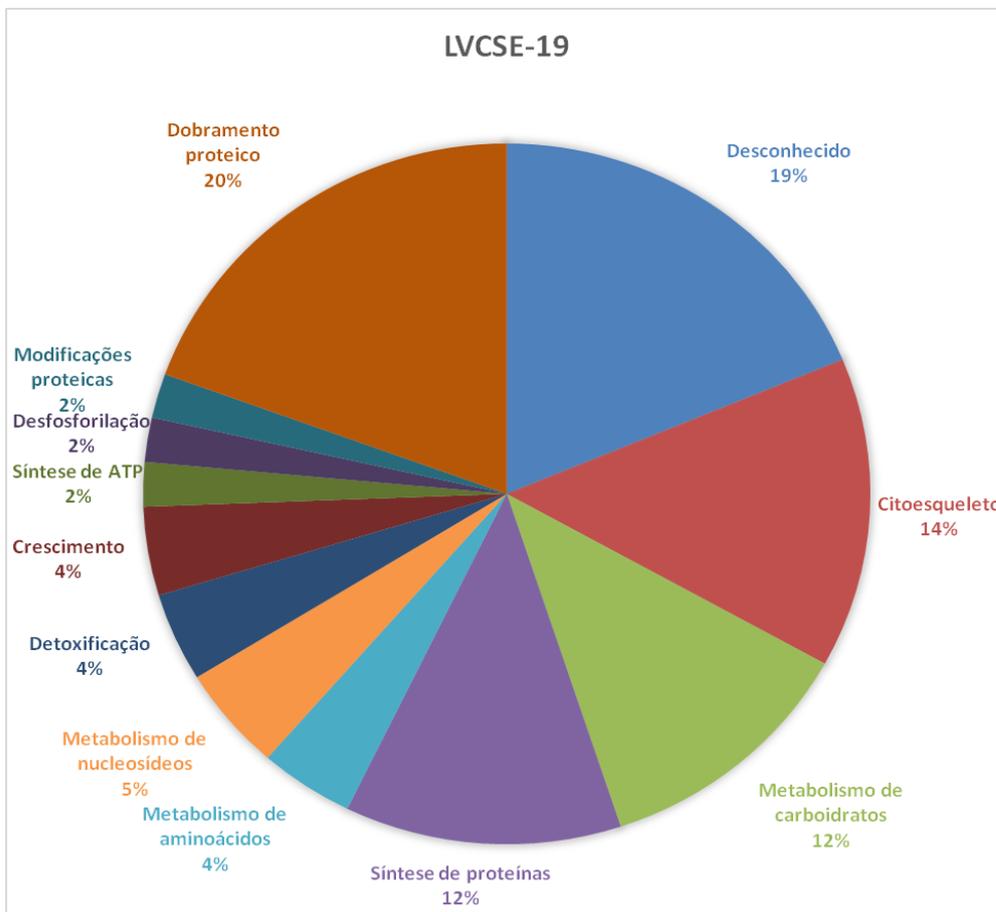


Figura 8 - Perfil proteico do isolado de *L. chagasi* susceptível ao óxido nítrico (LVCSE-19).

No Quadro 3 podem ser observadas as proteínas diferentemente expressadas em promastigotas de *L. chagasi* LVCSE-30 (resistente ao NO) em fase logarítmica, estacionária e em promastigotas metacíclicos.

Quadro 3 - Proteínas de expressão diferenciada em promastigotas do isolado de *Leishmania chagasi* LVCSE-30 (resistente ao NO) em fase logarítmica, estacionária e em promastigotas metacíclicos.

Spot	Nome (espécie)	Nº NCBI	MW (kDa)	MASCOT score proteico (p<0.05)
FASE LOGARITMICA INTERMEDIARIA				
30Lch1805	Secreted acid phosphatase 1 (<i>L. mexicana</i>)	603855	73.17	102
30Lch3708	Beta tubulin (<i>L. donovani</i>)	299829504	54.79	491
30Lch5802	Putative serine peptidase (<i>L. braziliensis</i>)	154340142	84.80	87
30Lch7604	Elongation factor 1 alpha (<i>Leptomonas</i>)	226347441	51.70	252
30Lch8103	Cyclophilin (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	71412806	19.72	82
30Lch4705	Putative glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (<i>L. braziliensis</i>)	154336135	68.68	95
FASE ESTACIONARIA				
30Lch2907	Heat shock protein (<i>L. braziliensis</i>)	62944644	188.53	207
30Lch3104	Cytochrome c oxidase subunit V (<i>L. braziliensis</i>)	154338084	22.57	233
30Lch6201	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	26395149	24.46	352
30Lch6706	Putative dihydrolipoamide dehydrogenase (<i>L. braziliensis</i>)	154343531	62.29	147
30Lch7001	Cytochrome c oxidase subunit VI, putative	398015070	16.22	61
30Lch7201	ATP synthase (<i>T. cruzi</i>)		27.32	82
30Lch7706	Putative propionyl-CoA carboxylase beta chain (<i>L. braziliensis</i>)	154340253	55.54	96
30Lch8503	Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial (<i>Leptomonas</i> sp.)	156523920	39.31	750
PROMASTIGOTAS METACICLICOS				
30Lch1011	Alpha tubulin (<i>L. braziliensis</i>)		16.30	84
30Lch1305	Beta tubulin (<i>L. mexicana</i>)		33.15	140
30Lch2810	Chaperonin hsp60, mitochondrial precursor (<i>L. major</i>)	157876872	69.97	160
30Lch4607	Enolase (<i>L. donovani</i>)	190335775	47.38	110
30Lch5407	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (<i>L. mexicana</i>)	401419964	37.44	91
30Lch7311	Malate dehydrogenase (<i>L. infantum</i>)	146098508	32.38	206

Número de spot, nome da proteína/organismo relacionado, nº NCBI GenInfo, MW= peso molecular em kDa, score MASCOT (p<0,05)

Na fase logarítmica intermediária do isolado LVCSE-30 houve uma expressão diferenciada de proteínas relacionadas com motilidade e dobramento proteico como beta tubulina, serina peptidase e ciclofilina. Na fase estacionária predominaram proteínas relacionadas com glicólise e gluceogênese como dihidrolipoamida desidrogenase, propionil-CoA carboxilase e gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase; e nos promastigotas metacíclicos predominaram proteínas relacionadas com glicólise como enolase, frutose 1,6 bifosfato aldolase e malato desidrogenase.

Aproximadamente 16% das proteínas não tiveram a sua função biológica identificada. A proporção de proteínas foi similar ao isolado LVCSE-19, onde a maioria foi identificada como estando relacionada com a síntese proteica (17%) e com atividade de chaperona e/ou desdobramento proteico (17%) e 12% no metabolismo de carboidratos (FIGURA 9).

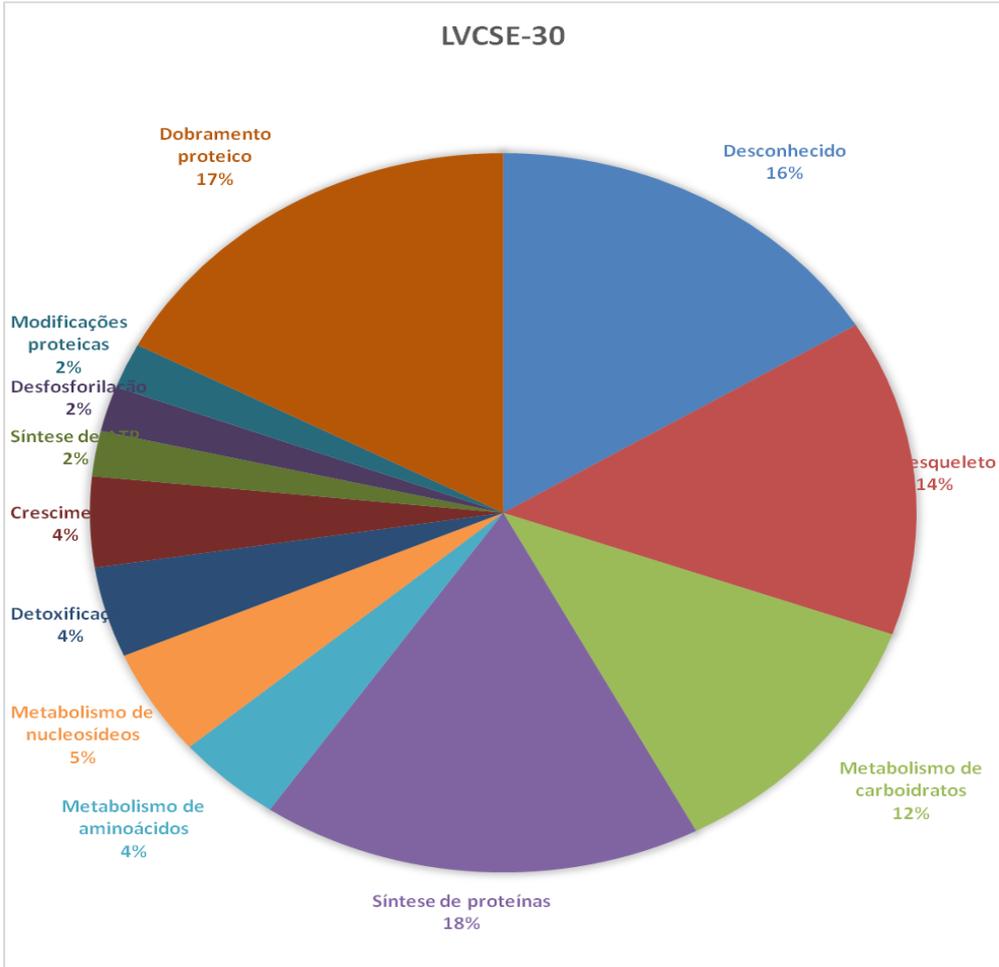


Figura 9 - Perfil proteico do isolado de *L. chagasi* resistente ao óxido nítrico (LVCSE-30).

6 DISCUSSÃO

No período de 2005 a 2012 foram detectados no município de Aracaju, 110 casos de LV humana e 2.060 casos de LV canina. Pela ocorrência de casos por bairros do município, pode ser observado que há uma semelhança na distribuição da doença, tanto humana quanto canina. Segundo Marzochi, M., Marzochi, K. (1997), o cão apresenta todas as características de um bom reservatório por possuir área de distribuição sobreposta à humana, é fonte de alimentação para o vetor, desenvolve alto parasitismo cutâneo, apresenta alta taxa de infecção e a ocorrência de casos caninos precede a ocorrência de casos humanos.

A localização espacial dos casos humanos e caninos mostra ampla distribuição geográfica da doença em 28 (75%) dos 37 bairros do município de Aracaju. Sendo esta distribuição quantitativamente distinta, não deixa de ser reveladora, mostrando que existem condições favoráveis para o endemismo dessa zoonose, com riscos diferenciados, provavelmente associados à densidade demográfica humana e canina e dispersão do vetor. Este achado tem correspondência com os resultados da pesquisa de Souza (2005) ao analisar a espacialização da LV em Belo Horizonte.

Um fato que chama a atenção é a ausência de casos humanos ou caninos em bairros próximos ao centro da cidade como São José, Luzia, Treze de Julho e Jardins onde encontramos a maior concentração de prédios com mais de 5 andares. Este fato poderia ser explicado pelo comportamento do brasileiro de todas as camadas sociais que têm o cão como principal animal de estimação e considerado por muitos como membro da família, dedicando mais tempo e cuidados ao animal. Estes animais são criados cada vez mais no intradomicílio, fato explicado pela verticalização da cidade e pela preferência das pessoas por cães de pequeno porte, o que facilitaria a sua criação. Carmo (2002) também percebeu esse fato ao estudar a representação da LV por médicos veterinários do serviço público e privado de Belo Horizonte – MG.

Dezoito (16,3%) dos casos humanos e 676 (32,8%) dos casos caninos aconteceram na região sul do município, nos bairros da Zona de Expansão e Mosqueiro. Comparando a distribuição espacial das incidências, podemos constatar que os bairros mais atingidos foram aqueles das áreas periféricas, com mais baixas densidades populacionais, ocupação recente, baixa renda e infraestrutura urbana pouco presente. O mesmo fato foi observado por Oliveira e Maciel (2003) em João Pessoa-PB. Em pesquisas realizadas em Teresina-PI por Cerbino-Neto (2003) e Porteirinha-MG por França-Silva et al. (2003) mostrou-se a distribuição da LV

em áreas precárias na periferia da cidade. Borges (2006) também encontrou esta situação em Belo Horizonte-MG, diferentemente de Souza (2005) que não encontrou relação entre a LV e bolsões de pobreza.

Na Espanha, Barón et al. (2011) elaboraram mapas de risco para verificar a ausência ou presença de *Phlebotomus perniciosus*. Eles concluíram que a altitude, uso da terra e drenagem do solo seriam os únicos parâmetros adequados para prognosticar a distribuição do vetor. Solos mal drenados com umidade constante favorecem o ciclo biológico do vetor. A região sul do município de Aracaju, que abrange a região do Mosqueiro e a Zona de Expansão, próxima ao litoral e a nível do mar, apresenta extensas áreas alagadas e criações de animais domésticos como aves, pequenos ruminantes e cavalos, o que determinaria a presença do vetor e facilidade de contágio entre o homem e os cães. Bhunia et al. (2011), ao pesquisar a distribuição e o papel dos corpos de água interiores e a ocorrência de focos de LV, concluíram que aqueles esses tem papel fundamental na manutenção dos vetores e a ocorrência de focos de doença.

A região do Mosqueiro e da Zona de Expansão, vem experimentando um aumento na incidência da LV. Esta mudança pode ser devida a alterações do perfil paisagístico que a caracterizava como área periurbana de aspecto rural e vem gradativamente se transformando em área residencial, o que tem provocado desmatamento da área e possível migração de vetores da LV. A Zona de Expansão apresenta problemas de esgoto e lixo a céu aberto, má qualidade das vias de circulação e de áreas de lazer, má conservação de canais, da mata ciliar, dos mangues e das dunas, além de ocupação de áreas embrejadas que foram aterradas para a instalação de conjuntos habitacionais e condomínios destinados às classes média e média alta.

Igualmente, bairros mais populosos como Olaria, Santos Dumont, Jardim Centenário e América, próximos ao centro da cidade, de baixa renda e infra-estrutura urbana, também apresentaram casos expressivos de LV humana e canina. A grande população canina e a infraestrutura deficiente também facilita a disseminação da doença. Segundo Dias et al. (2004), a Organização Mundial da Saúde e o Instituto Pasteur de São Paulo, estimam a razão entre a população canina e humana de 10:1. Tem sido observado que na região Nordeste essa razão chega a 12:1.

Em alguns isolados caninos e humanos foi avaliada a resistência ao óxido nítrico (FIGURAS 2, 3 e 4). Na figura 2, treze isolados caninos foram identificados como sendo resistentes ao óxido nítrico. Esses isolados resistentes ficaram distribuídos em bairros tanto da periferia como próximos ao centro da cidade. Nos bairros Santos Dumont e América foram encontrados 3 e 2 isolados resistentes, respectivamente. Não encontramos relatos na literatura

sobre a distribuição espacial de *Leishmania* resistente ao óxido nítrico

Nosso trabalho não mostrou informações relacionadas com a distribuição do vetor e sua correlação com casos humanos de LV. Casos de LV humana e canina aconteceram em áreas domiciliares e peridomiciliares de captura de flebótomos.

O uso das técnicas de geoprocessamento juntamente com as informações pertinentes ao município estudado possibilitou a visualização da distribuição geográfica dos casos de LV e, portanto, das características ambientais das áreas onde interagiu a tríade parasitária canino-vetor-homem. Uma vez que a tipologia vegetal exerce uma forte influência na ocorrência deste agravo, sugerimos que através de produtos derivados de imagens de satélite, esta variável seja inserida nos estudos de modelagem para predição da enfermidade e na delimitação de suas áreas de risco.

Os isolados humanos resistentes ocorreram nos bairros Industrial, Dezoito do Forte, Santos Dumont e América, um caso por bairro. Exceto o isolado humano do bairro Industrial, nos outros três bairros também foram isoladas *Leishmania* resistente ao óxido nítrico originadas de cães. Em análises posteriores será definido se os mesmos isolados foram responsáveis pela doença em humanos e em caninos.

Macrófagos têm sido descritos como células pioneiras capazes de sobreviver em condições axênicas e têm sido utilizados em diferentes condições experimentais e obtidos a partir de diferentes sítios anatômicos de diversas espécies animais. Essas células representam uma população ideal de células alvo, principalmente para estudos de parasitas intracelulares como *Leishmania* (MADEIRA; BARBOZA-SANTOS; MARZOCHI, 1999).

Ao contrário de macrófagos derivados de monócitos de outras espécies animais como suínos, ovinos, bovinos, caprinos e caninos (BUENO et al., 2005), não há relatos do cultivo de macrófagos em raposas. Considerando a falta de informações sobre a caracterização de macrófagos de raposas derivados de monócitos, bem como um procedimento padrão para a cultura, isolamento, e a infecção destas células com *Leishmania*, foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa de macrófagos derivados de monócitos isolados a partir de sangue periférico de raposas. Além disso, essas células foram inoculadas com promastigotas de *L. chagasi* para avaliar sua atividade fagocitária.

Poucas pesquisas têm caracterizado macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico canino e utilizando uma técnica padronizada para o isolamento, cultivo e infecção dessas células com *Leishmania*.

Pode ser observado que após a infecção com cepas resistente e susceptível ao óxido nítrico, os macrófagos de raposa, cultivados em meio sem estímulo de LPS, conseguem

controlar rapidamente a infecção e com 48 horas após a infecção não se observam amastigotas de *Leishmania* dentro das células. Da mesma forma, as células cultivadas com estímulo de LPS, também conseguem controlar rapidamente a infecção (FIGURA 6).

Da mesma forma, pode ser observada a diminuição do número de amastigotas intracelulares após 48 horas da infecção. A diminuição foi acentuada tanto na infecção com a cepa sensível ao óxido nítrico como na cepa resistente.

Santos et al. (2012) demonstraram que *L. chagasi* isolada de cães e humanos tem infectividade e sensibilidade ao óxido nítrico diferente e ao mesmo tempo são mais resistentes aos mecanismos leishmanicidas de macrófagos murinos e que poderia haver uma seleção natural do parasita desenvolvendo maior resistência ao infectar o cão, o que poderia explicar a maior severidade da doença.

Madeira et al. (1999) realizaram o cultivo de macrófagos derivados de exsudato peritoneal de cães para estudar a infectividade de *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Eles observaram que *L. chagasi* tem uma afinidade maior pelas células do cão e que após 6 dias da infecção, 98% dos macrófagos continuavam infectados. Após 48 horas da infecção de macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico de cão, Vouldoukis et al. (2006) e Sampaio et al. (2007) observaram a sobrevivência e multiplicação de *L. infantum* e *L. chagasi*, respectivamente. Esses resultados indicam que a raposa consegue controlar rapidamente a infecção com leishmania. As raposas raramente têm apresentado sinais clínicos da doença a diferença dos cães que após alguns meses de infectados, apresentam sintomatologia clínica. Como perspectiva é necessária a dosagem de citocinas do cultivo de macrófagos e a comparação da infecção com macrófagos de cães.

Lainson e Shaw (1987) propõem que a LV na América pudesse ser causada por ambos parasitas *L.chagasi* e *L.infantum*. Devido a grande semelhança observada entre os agentes causadores de LV no Velho e Novo Mundo, Killick-Kendrick et al. (1980) propõem a hipótese que *L. chagasi* teria uma origem afro-europeana recente e que o parasita poderia ter sido trazido por cães infectados que acompanhavam os conquistadores portugueses e espanhóis. Com base no perfil isoenzimático de cepas do parasito isoladas no Novo e Velho Mundo, Moreno et al. (1986), demonstram que o parasito é semelhante à *L. infantum*.

Estudos mais recentes recomendam a revisão da taxonomia de *L.chagasi*. Vários autores propõem que *L.chagasi* seja vista como sinônimo de *L.infantum* (DANTAS-TORRES, 2006; MAURICIO; STOTHART; MILES, 2000), ou que *L.chagasi* seja considerada como subespécie de *L.infantum* (SHAW, 2006). Atualmente métodos moleculares, tais como amplificação de DNA polimórfico ao acaso (RAPD), reação da polimerase em cadeia (PCR),

polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento, têm demonstrado distinção genética entre as espécies de *L.infantum* e *L.chagasi* (DANTAS-TORRES, 2006; SHAW, 2006). Foi demonstrado não existir diferenças moleculares marcantes entre *L. chagasi* e *L. infantum* (FINAMORE, 2010; KUHLS et al., 2007; OCHSENREITHER et al, 2006) o que permite supor que *L. infantum*, descrita por Nicolle em 1908 e *L. chagasi*, descrita por Cunha e Chagas em 1937, sejam a mesma espécie.

Os resultados aqui apresentados são uma aproximação parcial, realizados por eletroforese bidimensional seguido de identificação por MALDI-TOF/TOF, pois analisou-se uma pequena parte do proteoma.

Dessa forma, a comparação dos nossos resultados é feito com os dados das proteínas já caracterizadas de *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Na regulação gênica do isolado susceptível ao óxido nítrico (LVCSE-19), várias proteínas foram detectadas mais abundantemente em promastigotas na fase log precoce, e que estão relacionadas com a expressão e regulação do gene. Estas proteínas incluem a proteína de ligação à poli A (PABP), o fator de alongação 5 (eIF5a), fator de alongação Tu (EF-Tu), uma proteína de ligação de RNA e duas isoformas do fator de alongação 1 alfa (EF1a). Tais proteínas estão envolvidas especificamente com a regulação da tradução do mRNA e sua estabilidade.

Agindo na proteólise, uma cisteína peptidase tipo calpaína é a mais abundante no início da fase logarítmica do que na fase estacionária, enquanto uma oligopeptidase B é a mais abundante no quarto dia. Na transdução de sinais (sinalização intracelular) um inibidor da dissociação de rab-GDP e o fator de ribosilação de ADP são mais abundantes na fase logarítmica inicial.

Das proteínas relacionadas com o citoesqueleto e movimento, uma isoforma da beta tubulina e outra da alfa-tubulina são mais expressadas fase logarítmica intermediária e a da beta tubulina também na fase estacionária, em que existe também outra isoforma adicional de beta-tubulina sobre-expressada. Provavelmente tem a ver com uma maior mobilidade à medida que avançamos para a fase estacionária, e remodelamento celular que ocorre durante os processos de diferenciação.

No metabolismo de nucleotídeos, a cadeia A da hidrolase de nucleosídeo de purina é abundante na fase log intermediária, diminuindo na fase estacionária.

No metabolismo energético, várias proteínas envolvidas na glicólise exibem níveis diferenciais. A gGAPDH glicosomal é sobre-expressada no início e meio da fase log em relação à estacionária e uma triose fosfato isomerase (TPI) é sobre-expressada na fase log

média e estacionária com relação à fase logarítmica inicial. Uma isoforma da fosfoglicerato quinase é sobre-expressada em fase log precoce, enquanto que outra delas é sobre-expressa em fase estacionária. Finalmente, a enolase é sobre-expressada em fase estacionária. Os níveis não constantes de GADPH são muito raros, se tratando de uma enzima de expressão constitutiva.

A enzima-chave na gluconeogênese, uma fosfoenolpiruvato carboxiquinase glicosomal (gPEPCK) é sobre-expressada em fase estacionária. Quanto a glicólise e gliconeogênese, em geral, podemos dizer que há uma diminuição da atividade na fase estacionária das enzimas da primeira parte da glicólise, e um aumento na secundária. Podem ser necessários, em cada fase, açúcares distintos, não só para fins catabólicos, mas também para gerar outros açúcares, que possam servir para os processos anabólicos (ligação com a via das pentoses fosfato, por exemplo).

Algumas enzimas do ciclo de Krebs também apresentam expressão diferencial, como a isocitrato desidrogenase, aconitase e uma malato desidrogenase (MDH), que apresentam níveis elevados na fase logarítmica inicial. No entanto, existem duas isoformas da MDH, uma delas glicosomal, que estão sobre-expressadas em fase log intermediária.

Quanto à cadeia de transporte de elétrons respiratório, a Fe-superóxido dismutase é sobre-expressada em fase log precoce (dia 2), enquanto que a citocromo c oxidase isoforma V (coxV) é sobre-expressada na fase intermediária e estacionária.

Tripanotiona peroxidase e a triparredoxina peroxidase são sobre-expressadas na fase estacionária. Essas enzimas estão envolvidas no controle do estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS).

A fosfatase ácida secretada (SAP) é sobre-expressos nas fases intermediária e estacionárias 4 e 6 da curva. Nos promastigotas metacíclicos, a treonina-tRNA sintetase e o EF-Tu estão sobre-expressados, no início da fase logarítmica.

Relacionado com o enovelamento de proteínas, a chaperonina hsp60 é sobre-expressada em promastigotes metacíclicos, e com relação a citoesqueleto e movimento, uma proteína do haste paraflagelar (paraflagellar rod protein).

No metabolismo geral, a gPEPCK, piruvato quinase (enzima não vista antes na glicólise, a última enzima da via), duas isoformas do TPI, o coxV e timina 7-hidroxilase estão sobre-expressadas em promastigotas metacíclicos. A triparredoxina peroxidase também é sobre-expressa na fases intermediária e nos metacíclicos.

Podemos dizer que o perfil de expressão gênica de promastigotas de *L. chagasi* 19 lembra globalmente aos estudados previamente em *L. infantum* e de outras espécies em geral:

em fase logarítmica são sobre-expressados um número de genes associados com a regulação da expressão gênica, transdução de sinais, metabolismo, etc., visando o crescimento e multiplicação do parasita e o início de processos de diferenciação .

Na curva de crescimento do isolado LVCSE-30, detectou-se na fase logarítmica intermediária, um aumento da glicose-6-fosfato 1-desidrogenase, enzima que catalisa a primeira reação da via da pentose-fosfato. Esta via, encarregada da interconversão de açúcares de diferente número de átomos de carbono, tem importância em relação à tirosina aminotransferase, à malato desidrogenase e à resistência ao óxido nítrico, sendo que esta via participa no controle do estresse oxidativo. Diferentes mecanismos de controle oxidativo atuam de forma simultânea ou alternativa com mais intensidade em diferentes momentos da curva de crescimento.

Um dado interessante é a sobre-expressão de duas isoformas da enolase e de uma triose fosfato isomerase (TPI) na fase logarítmica inicial quando comparada com a fase logarítmica intermediária, ao contrário da glicose-6-fosfato-1-desidrogenase, cujo produto é o 6-fosfogluconato, intermediário na via das pentoses-fosfato. Foi relatado que em condições de estresse oxidativo, muitos organismos utilizam como alternativa à glicólise, a via da pentose-fosfato (GRANT, 2001; 2008). Nesse caso, os parasitas não se encontram na presença de óxido nítrico ou outras condições de estresse oxidativo, mas o parasita provavelmente tem este mecanismo ativado de forma basal, sendo mais ativo em determinada fase do crescimento. Seria esperado que fosse mais ativo no amastigota, mas ainda não foi realizado nenhum experimento desse tipo.

A diidrolipoamida desidrogenase, importante enzima que forma parte do complexo piruvato desidrogenase (complexo multienzimático que permite a geração de acetil-coenzima A, a partir de piruvato procedente da glicólise ou do catabolismo de certos aminoácidos) está sobre-expressada na fase estacionária. Porém, certas enzimas glicolíticas estão sobre-expressadas em tempo diferente e outras (isoformas de hexoquinasa, aldolasa, triose fosfato isomerase, e incluso outra isoforma distinta àquela aqui descrita de diidrolipoamida desidrogenasa) são de expressão constante ao longo de toda a curva.

Detectou-se em quantidade maior subunidades do complexo citocromo oxidase cox V e cox VI no dia 6 da curva de crescimento, assim como de uma ATP sintase. Em conjunto, esses dados sugerem que a sobre-expressão de diidrolipoamida desidrogenasa, cox VI y cox V não se deve ao aumento da atividade glicolítica, e sim provavelmente a outras origens alternativas do piruvato por razões desconhecidas. Porém, lembremos que a ATP sintase não tem nada a ver com a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa.

Foi observada uma sobre-expressão de uma GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) glicosomal. Normalmente GAPDH é, pelo menos em *Leishmania*, de expressão constitutiva, sendo raro que sua abundância mude em algum momento (ALCOLEA et al., 2011). Neste caso, há uma sobre-expressão na fase estacionária. Por ser uma enzima glicosomal, poderia ser uma isoenzima mitocondrial que apresenta um padrão de expressão diferente.

Foram detectadas variações na abundância de duas isoformas do fator de alongação da transcrição 1 alfa (EF1 alfa). As variações de abundância de ambas isoformas são antagônicas: enquanto uma delas se sobre-expressa na fase inicial, a outra é mais abundante na fase estacionária da curva de crescimento dos promastigotas de *L. chagasi*. Esses resultados sugerem que em cada fase do crescimento, a regulação da expressão gênica muda, dando lugar a perfis de expressão diferencial entre eles. Os mecanismos de regulação da expressão gênica são post-transcricionais e a maior abundância das isoformas de EF1 alfa descritas em uma ou outra fase do crescimento tem a ver provavelmente com estas variações (ALCOLEA et al., 2011).

Com relação à proteólise, uma serina peptidase de função biológica desconhecida no parasito está sobre-expressada na fase lagorítmica intermediária, enquanto que uma peptidase de tipo calpaína é mais abundante no início da curva, com relação a fase estacionária havendo se detectado variações entre o resto do tempo e as condições analisadas. Esta situação também foi observada por Vergnes et al. (2007) ao estudar *L. donovani* resistente a drogas. Eles concluíram que a sobre-expressão da calpaína era responsável por induzir susceptibilidade maior aos antimoniais e menor susceptibilidade à miltefosina. A mesma observação foi realizada por Trindade (2011) ao realizar análise proteômica de isolados de *L. chagasi* resistentes e susceptíveis a miltefosina.

Uma isoforma de beta tubulina é mais abundante na fase intermediária, sendo este um dos possíveis mecanismos de remodelação da morfologia do parasita ao longo do processo de diferenciação do promastigota. Uma isoforma da alfa tubulina se sobre-expressa em promastigotas metacíclicos com relação aos logarítmicos, e uma isoforma da beta tubulina apresentando perfil contrário ao promastigota em fase logarítmica. Resultado similar foi encontrado por Yao et al. (2010) ao utilizar a abordagem proteômica para identificar dezenas de proteínas da membrana celular de promastigotas em fase logarítmica e promastigotas metacíclicos de *Leishmania chagasi*, sendo a maioria delas, estágio específicas. Entre elas, vários tipos de alfa e beta tubulina, diferencialmente expressadas em promastigotas metacíclicos apenas.

Observação interessante é que três isoformas da tripanotiona peroxidasa se expressem de forma constante, invariável, a longo de toda a curva de crescimento. A principal função da tripanotiona é promover defesa contra o estresse oxidativo. Esse isolado poderia ter uma predisposição intrínseca de resistência ao óxido nítrico, pois foi cultivado em condições padronizadas sem nenhum tipo de pressão, agentes seletivos ou óxido nítrico. Esse isolado já tinha sido caracterizado anteriormente como sendo resistente ao óxido nítrico.

A abundância de frutose-1,6-difosfato aldolase (ALD), uma isoforma da triose fosfato isomerase (TPI) e da isoforma fosfoglicerato kinase B (PGK B) é menor em promastigotas metacíclicos separados do resto da população em fase estacionária mediante centrifugação em gradiente de Percoll do que em promastigotas em fase logarítmica. Temos que levar em conta que outra isoforma da TPI se expressa de forma constante ao longo de toda a curva de crescimento e também em metacíclicos de fase estacionária isolados por centrifugação em gradiente de Percoll.

Duas isoformas da malato desidrogenase citosólica (MDH) com padrão de expressão antagônico foram detectadas: uma pesada cuja abundância é menor em promastigotas metacíclicos isolados com gradiente de Percoll do que em promastigotas em fase logarítmica e outra com o perfil contrário, cuja abundância nos primeiros, é bem maior. Na ausência de carboidratos, *Leishmania* spp é capaz de utilizar aminoácidos como a principal fonte de carbono. As aminotransferases participam nos passos iniciais da quebra dos aminoácidos com a finalidade de obter NAD(P)H, que atua como poder redutor frente ao estresse oxidativo. A produção de NAD(P)H tem sido descrita como um dos principais sistemas de resistência em cepas resistentes ao óxido nítrico (VAN ASSCHE et al., 2011).

Isto foi demonstrado com uma tirosina aminotransferasa que se sobre-expressa em promastigotas procíclicos de cepas resistentes ao oxido nítrico e que está diretamente relacionada com uma malato desidrogenasa citosólica última responsável da produção de NAD(P)H (Dr. Vicente Larraga, comunicação pessoal). A tirosina aminotransferase produz uma reação de transaminação cujo produto é substrato da malato desidrogenase citosólica, gerando poder redutor em forma de NADH e/ou NADPH + H⁺ que é necessário para combater o estresse oxidativo na célula e em *Leishmania* atuando conjuntamente com a tripanotiona peroxidasa (HUNTER et al., 2003). Por enquanto, não sabemos o significado da sobre-expressão da outra isoforma da MDH citosólica a elevados níveis em promastigotas metacíclicos isolados pelo gradiente de Percoll.

Detectaram-se mudanças na abundância de certas proteínas que estão implicadas em processos de regulação da expressão gênica. Por um lado, duas isoformas do fator

transcricional 2 (EF2) são menos abundantes em promastigotas metacíclicos separados da população em fase estacionária através de centrifugação em gradiente de Percoll do que em promastigotas em fase logarítmica. A regulação da expressão gênica não se produz a nível da transcrição, mas é pós-transcricional (CLAYTON; SHAPIRA, 2007), existindo distintos mecanismos: estabilidade dos mRNA, taxa de transcrição, estabilidade e modificações pós-transcricionais das proteínas, etc., sendo alguns deles ainda pouco estudados. A sobre-expressão de EF2 está relacionada provavelmente com uma maior taxa de expressão gênica em geral (promastigotas em crescimento, etc.). Essa informação coincide com os dados da análise do transcriptoma observados previamente em *L. infantum* (ALCOLEA et al., 2010a), que é considerada praticamente a mesma espécie.

Há duas isoformas de uma cisteína peptidase de tipo calpaína que apresentam perfis de expressão antagônicos: uma delas se sobre-expressa em promastigotas metacíclicos e a outra em promastigotas logarítmicos. Ambas estão relacionadas com a diferenciação celular, a remodelação do citoesqueleto e a transdução de sinais (ONO; SORIMACHI; SUZUKI, 1998; SATO; KAWASHIMA, 2001). As rotas de transcrição de sinais não tem sido caracterizadas em tripanosomatídeos, a pesar de que os genes tem sido caracterizados a profundidade (PARSONS et al., 2005).

Por último, a chaperonina hsp60 está sobre-expressada em promastigotas metacíclicos em relação aos promastigotas em fase logarítmica. Como chaperonina, esta proteína tem a ver com a mudança de conformação de diversas proteínas, algumas das quais podem estar relacionadas com resposta ao estresse pelas mudanças de temperatura durante o processo de infecção. As principais proteínas do choque térmico são abundantes tanto na fase de promastigota no artrópode como na fase de amastigota no mamífero e algumas delas são requeridas e expressadas apenas no mamífero. O estresse calórico encontrado pelos parasitas durante a transmissão a hospedeiros mamíferos é o gatilho chave para a sua diferenciação e pode ser um fator no tropismo de *Leishmania* spp (CLOS; KROBITSCH, 1999).

Ao compararmos os perfis dos dois isolados, LVCSE-19 e LVCSE-30, sugerimos, portanto, que existe uma diferença importante na sobre-expressão de glicose-6-fosfato desidrogenase 1, diferencialmente expressa apenas em LVCSE-30; na expressão diferenciada da enolase e da triosefosfato isomerase (TPI), sobre-expressadas na fase logarítmica inicial e intermediária de LVCSE-30 e na fase estacionária de LVCSE-19; na expressão diferenciada da diidrolipoamida-desidrogenase e da ciclofilina, somente na LVCSE-30.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir:

- A. Existe uma associação entre as áreas de maior ocorrência de casos humanos e caninos e regiões de risco muito elevado para a saúde
- B. A ocupação do mesmo espaço geográfico dos casos caninos e humanos de LV em Aracaju – SE resalta a importância do cão como reservatório da LV
- C. Os macrófagos de raposa conseguem controlar mais rapidamente a infecção por *Leishmania* indiferente da sua resistência ou susceptibilidade ao óxido nítrico
- D. Em ambas as cepas analisadas houve uma maior expressão diferenciada de proteínas relacionadas com síntese proteica e dobramento proteico
- E. A expressão diferenciada de genes relacionados com infectividade foi mais observada em promastigotas metacíclicos.

8 PERSPECTIVAS

- A. Realizar novos estudos para identificar algumas das proteínas expressas diferencialmente, e, em conjugação com ensaios imunológicos, identificar proteínas essenciais ao parasita e para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de *Leishmania*.
- B. Realizar dosagem de citocinas nos sobrenadantes das infecções de macrófagos de cães e raposas.

9 FONTE DE FINANCIAMENTO

Este projeto de pesquisa foi financiado pelo Edital CNPq/Universal, 2009, Processo nº 477935/2009-5 e pelo PRONEX, EDITAL FAPITEC/SE /FUNTEC/CNPq N° 12/2009, Processo nº 019.203.02712/2009-8.

REFERÊNCIAS

- AKOPYANTS, N.S.; MATLIB, R.S.; BUKANOVA, E.N.; SMEDS, M.R.; BROWNSTEIN, B. H.; STORMO, G.D. et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 136, p. 71–86, 2004.
- ALBUQUERQUE, A. L.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clinica Veterinária**, v. 71, n. 1, p. 78-80, 2007.
- ALCOLEA, P.J.; ALONSO, A.; GÓMEZ, M.J.; MORENO-PAZ, M.; SANCHEZ-GOROSTIAGA, A.; RAMOS, I. et al. Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. **Genomics**, v. 93, p. 551-564, 2009.
- ALCOLEA, P.J.; ALONSO, A.; GÓMEZ, M.J.; MORENO, I.; DOMÍNGUEZ, M.; PARRO, V. et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. **Int J Parasitol.** v. 40, n 13, p. 1497-516, 2010a.
- ALCOLEA, P.J.; ALONSO, A.; GOMEZ, M.J.; SANCHEZ-GOROSTIAGA, A.; MORENO-PAZ, M.; GONZALEZ-PASTOR, J.E. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 11, 31, 2010b.
- ALCOLEA, P.J.; ALONSO, A.; LARRAGA, V. Proteome Profiling of *Leishmania infantum* Promastigotes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 58, n. 4, p. 352–358, 2011.
- ALMEIDA, R.; GILMARTIN, B. J.; MCCANN, S.H.; NORRISH, A.; IVENS, A.C.; LAWSON, D. et al. Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 136, p. 87–100, 2004.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol** v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad. S. Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.
- ALVES, W.A. Controle da leishmaniose Visceral baseado no reservatório canino. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**, p. 94–98, 2006.
- ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. **Mol Biochem Parasitol**, v. 115, p. 189-198, 2001.
- BABIKER, Z.O.E.; DAVIDSON, R.; MAZINDA, C.; KIPNGETCH, S.; RITMEIJER,

K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **Am J Trop Med Hyg**, v.76, p. 689–693, 2007.

BACELLAR, O.; BARRAL-NETO, M.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E.M. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. **Braz J Med Biol Res**, v. 24, n. 8, p. 791-5, 1991.

BARCELLOS, C.; RAMALHO, W.M.; GRACIE, R.; MAGALHÃES, M.A.F.M.; FONTES, M.P.; SKABA, D. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2008.

BARÓN, S.D.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; MORALES-YUSTE, M.; DÍAZ-SÁEZ, V.; IRIGARAY, C.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. **Parasitology**, v.138, n. 10, p. 1234-44, 2011.

BEVERLEY, S.M.; AKOPYANTS, N.S.; GOYARD, S.; MATLIB, R.S.; GORDON, J.L.; BROWNSTEIN, B.H. et al. Putting the *Leishmania* genome to work: functional genomics by transposon trapping and expression profiling. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** v. 357, n. 141, p. 747-53, 2002.

BHUNIA, G.S.; KESARI, S.; CHATTERJEE, N.; PAL, D.K.; KUMAR, V.; RANJAN, A.; DAS, P. Incidence of visceral leishmaniasis in the Vaishali district of Bihar, India: spatial patterns and role of inland water bodies. **Geospatial Health**, v. 5, n. 2, p. 205-215, 2011.

BISUGO, M.C.; ARAÚJO, M.F.; TANIGUCHI, H.H.; ACUNHA, E.; SANTOS, A.A.; JUNIOR, M.S. et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 185-193, 2007

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

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRÉ, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 345-351, 1997.

BORGES, B.K.A. **Fatores de risco para a Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais**, 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia)- Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRASIL. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar)**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p. (Normas técnicas).

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**.1.ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006. 122p (Manuais e normas técnicas)

_____. Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de

leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 133, 14 jul. 2008. p.37.

BRAZUNA, J.C.M.; SILVA, E.A.; BRAZUNA, J.M.; DOMINGOS, I.H.; CHAVES, N.; HONER, M.R.; VAN ONSELEN, V.J. et al. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.45, n. 5, p. 601-606, 2012.

BUENO, R.; MELLO, M.N.; MENEZES, C.A.S.; DUTRA, W.O.; SANTOS, R.L. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p. 521-524, 2005.

BURATTINI, M. N.; COUTINHO, F.A.B.; LOPEZ, L.F.; MASSAD, E. Modelling the Dynamics Of Leishmaniasis Considering Human, Animal Hosts And Vector Populations. **Journal of Biological Systems**, v. 6, n. 4, p. 337-356, 1998.

CABRAL, M.; GRADY, J.E.O.; GOMES, S.; SOUZA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173-180, 1998.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.M. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V.L.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETO, D.W.; LAGE, L.C.; SPINOLA, R.M.F. et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de Leishmaniose Visceral Americana–Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cad. S. Pública**, v.17, n.5, p.1263-1267, 2001.

CARMO, V.T. **Representação da Leishmaniose Visceral Canina por médicos veterinários do serviço público e privado de Belo Horizonte-MG**. 2002. 68f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.A.; REED, S.; BARRAL, A.; ROCHA, H.V. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill *Leishmania*. **Braz J Med Biol Res**, v. 21, p. 85–92, 1988.

CARVALHO, S.F.G.; LEMOS, E.M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 321-324, 2003.

CATENACCI, L.S.; GRIESE, J.; SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 169, p. 190-192, 2010.

CERBINO-NETO, J.C. **Fatores associados à incidência de Leishmaniose visceral em Teresina- PI na década de 90**. 2003. 79f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e

Parasitária) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CEZARIO, G.A.; OLIVEIRA, L.R.; PERESI, E.; NICOLETE, V.C.; POLETTINI, J.; LIMA, C.R.. et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 573-83, 2011.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 67-75, 2005.

CHAPPUIS, F.; MUELLER, Y.; NGUIMFACK, A.; RWAKIMARI, J.B.; COUFFIGNAL, S.; BOELAERT, M. et al. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formal gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5973-5977, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W. et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007.

CHEUNG, V.G.; MORLEY, M.; AGUILAR, F.; MASSIMI, A.; KUCHERLAPATI, R.; CHILDS, G. Making and reading microarrays. **Nat Genet**. v. 21, n. 1, p. 15-19, 1999.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93-101, 2007.

CLOS, J.; KROBITSCH, S. Heat shock as a regular feature of the life cycle of *Leishmania* parasites. **Amer Zool**, v. 39, p. 848-856, 1999.

CORTES, S.; AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES, C.; CAMPINO, L. Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 9, p. 1431-1432, 2007.

COSTA, M.M.; ANDRADE, H.M.; BARTHOLOMEU, D.C.; FREITAS, L.M.; PIRES, S.F.; CHAPEAUROUGE, A.D. et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **J Proteom Res**, v. 10, n. 5, p. 2172-84.

COURTENAY, O.; QUINNEL, R.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, p. 407-414, 2002.

COURTENAY, O.; GILLINGWATER, K.; GOMES, P.A.F.; GARCEZ, L.M.; DAVIES, C.R. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 168-176, 2007.

CROSS, E.R.; NEWCOMB, W.W.; TURCKER, C.J. Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest

Asia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, n.5, p. 530-536, 1996.

CURI, N.H.A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serological evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006.

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de Calazar, no Ceará. **O Hospital**, v. 48, p. 79-98, 1955.

DEPLEDGE, D. P.; EVANS, K. J.; IVENS, A. C.; AZIZ, N.; MAROOF, A.; KAYE, P.M. et al. Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. 476, 2009.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** ,v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

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

DIAS, R.A.; GARCIA, R.C.; SILVA, D. F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 565-70, 2004.

DIPINETO, L.; MANNA, L.; BAIANO, A.; GALA, M.; FIORETTI, A.; GRAVINO, A.E. et al. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 518-520, 2007.

FINAMORE, J.M.C. **Caracterização do polimorfismo intraespecífico do lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 e seu papel na interação com *Lutzomyia longipalpis* e macrófagos murinos.** 2010.108f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte-MG.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; GALATI, E.A.B. Novos encontros de flebotomíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência a *Lutzomyia longipalpis*. **Rev Saúde Pública** .v 10, p. 125-128, 1976.

FRANÇA-SILVA, J. C. **Distribuição espacial e temporal da Leishmaniose Visceral Canina em relação a densidade vetorial e ao controle de cães infectados em Porteirinha-MG (1998-2002).** 2003. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva)- Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the

endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 111, p. 161-173, 2003.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.; PEREIRA, J.M.; REIRA, L.W. RILEY, M.E. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis, **BMC Infect. Dis.** N. 2007.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-348, 2004.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; TALADRIZ, S.; MARQUET, A.; LARRAGA, V. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **Eur J Biochem**, v. 259, p. 909-916, 1999.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004

GRANT, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 533–541, 2001.

GRANT, C.M. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. **Journal of Biology**, v. 7, n.1, 2008.

GRIMALDI, J.R.G.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New world. **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, p. 687-725, 1988.

HOLZER, T.R.; MCMASTER, W.R.; FORNEY, J.D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, p. 198–218, 2006.

HUNTER, W.N.; ALPHEY, M.S.; BOND, C.S.; SCHÜTTELKOPF, A.W. Targeting metabolic pathways in microbial pathogens: oxidative stress and anti-folate drug resistance in trypanosomatids. **Biochem Soc Trans.** v.31, n 3, p. 607-10, 2003.

JÚNIOR, P.B. **Geografia e ecologia da Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo**. 2000. 70f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)-Escola Nacional de Saúde pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

KAWA, H.; SABROZA, P.C. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. **Cad. S. Pública**, v.18, n.3, p. 853-865, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; LEANEY, A. J. Possible origins of *Leishmania chagasi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** , v. 74, n. 5, p. 563-5, 1980.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.;

PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from the bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 105-111, 1997.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH, C.; PRESBER, W. et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microb. Infect.**, v. 9, p. 334-343, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER W. KILLICK-KENDRICK R. Ed. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v.1.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 94-105, 1992.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ROMAO, P.; CORTES, S.; ROLAO, N. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibodies response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, p. 273-284, 2001.

LIMA, V.M.F.; FATTORI, K.R.; MICHELIN, A.F.; NOGUEIRA, F.S.; SOUZA, L.O. Evidence of *Leishmania* spp antibodies and DNA in bush dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 91-94, 2009.

LUPPI, M.M.; MALTA, M.C.C.; SILVA, T.M.A.; SILVA, F.L.; MOTTA, R.O.C.; MIRANDA, I.; et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 155, p. 146-151, 2008.

MADEIRA, M.F.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOCHI, M.C.A. Experimental Infection of Canine Peritoneal Macrophages with Visceral and Dermotropic *Leishmania* Strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 645-648, 1999.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cellmediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 209-220, 1995.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R.W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n 1, p. 37-34, 1994.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B. Leishmanioses em áreas urbanas. **Rev Soc Bras**

Med Trop, v. 30, n. 1, p. 162-164, 1997.

MATRANGOLO, F.S.; LIARTE, D.B.; ANDRADE, L.C.; DE MELO, M.F.; ANDRADE, J.M.; FERREIRA, R.F. et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Mol Biochem Parasitol**. v. 190, n. 2, p. 63-75, 2013.

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

MENDES, W.S.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.A.M. Dinâmica da ocupação do espaço na cidade de São Luís e a leishmaniose visceral. **Cad. S. Pública**, v.16, n.3, p.871-873, 2000.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 56-72.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; REIS M.G; CARVALHO, L.; FERNANDES, O. et al. Frequency of infection of *Lutzomyia Phlebotominae* with *Leishmania brasiliensis* in a Brazilian endemic area as assed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.2, p.185-188, 2002.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C.R. Principles of gene microarray data analysis. **Adv Exp Med Biol.**, v. 593, p.19-30, 2007.

MONTEIRO, P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, n. 3, p. 67-72, 1994.

MONTEIRO, M. C.; MARQUES, F. C.; BLAZIUS, R. D.; SANTOS DA SILVA, O.; DE QUEIROZ CUNHA, F.; BENTO, D. B. et al. N-acetyl-L: -cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, v.102, n.4, Mar, p.801-803, 2008.

MORENO, G; RIOUX, J.A.; LANOTTE, G; PRATLONG, F; SERRES, E. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In: COLLOQUE INTERNATIONAL CNRS/INSERM, 1984. **Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques**. Montpellier: IMEEE, 1986. p. 105-117.

MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J.A.; MENDONÇA-LIMA, F.W. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 400-404, 2010.

NOLI, C.; AUXILIA, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Vet Dermatol**. v.16, n.4, p.213-232, 2005.

NUGENT, P.G.; KARSANI, S.A.; WAIT, R.; TEMPERO, J.; SMITH, D.F. Proteomic analysis of *Leishmania Mexicana* differentiation. **Mol Biochem Parasitol** v. 136, p. 51–62, 2004.

OCHSENREITHER, S.; KUHL, K.; SCHAAR, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 495-503, 2006.

OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SADIGUSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243-248, 1993.

OLIVEIRA, M.R.; MACIEL, J.N. Aspectos sócio-econômicos da Leishmaniose Visceral em João Pessoa- Paraíba – Brasil. **Rev. Bras. Ciências da Saúde**, v.7, n.1, p.63-70, 2003.

ONO, Y.; SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 245, p. 289-294, 1998.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; CAPRARIIS, D.; CAVALLO, P.; CIANCIULLI, A.; MITOLO, V. et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 10, 2008.

PARSONS, M.; WORTHEY, E. A.; WARD, P. N.; MOTTRAM, J. C. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 6, 127, 2005.

PAULAN, S.C.; SILVA, H.R.; LIMA, E.A.C.F.; FLORES, E.F.; TACHIBANA, V.M.; KANDA, C.Z. et al. Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Eng. Agríc.**, v.32, n.4, p.765-774, 2012

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**. V. 62, n. 1, p. 229-35, 1994.

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

ROCHETTE, A.; RAYMOND, F.; CORBEIL, J.; OUELETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 165, p. 32–47, 2009.

RODRIGUES, C.A.T.; BATISTA, L.F.S.; TEIXEIRA FILHO, R.S.; SANTOS, C.S.; PINHEIRO, C.G.; ALMEIDA, T.F. et al. IFN- γ expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation *in vitro*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 382-388, 2009.

ROMÃO, P.R.; TOVAR, J.; FONSECA, S.G.; MORAES, R.H.; CRUZ, A.K.; HOTHERSALL, J.S. et al. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. **Braz J Med Biol Res**, v.39, p. 355-363, 2006.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B. et

al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 197-203, 2005.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; OPPERDOES, F.; STERN, S.; OLAFSON, R. W.; ZILBERSTEIN, D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **FASEB J.**, v. 22, p. 590–602, 2008.

SAMPAIO, W.M.; MOURA, E.P.; ARRUDA, F.C.S.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MELO, F.A. et al. In vitro binding and survival assay of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p.11, 2007.

SÁNCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L. et al. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PMBC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 168-175, 2008.

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

SANTOS, S.; BARCELLOS, C. Abordagens espaciais na saúde pública In: Cruz MdSFO, editor. **Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

SANTOS, S.; SOUZA, W. Introdução à estatística espacial para a saúde pública. In: CRUZ, MdS.F.O. editor. **Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

SANTOS, S.; SOUZA-SANTOS, R. Sistemas de Informações Geográficas e Análise Espacial na Saúde Pública. In: CRUZ, MdS.F.O. editor. **Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

SANTOS, A. C.; SANTOS, J. P. Estudo geoespacial da prevalência da leishmaniose visceral americana no bairro Promorar, Teresina-Piauí, 2000/2004. **Hygeia**, v. 7, n. 13, p. 83 - 93, 2011.

SANTOS, P. L.; COSTA, R.V.; BRAZ, J.M.; SANTOS, L.F.V.C.; BATISTA, A.C.; VASCONCELOS, C.R.O. et al. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide** v. 27, n. 1, p. 67-71, 2012.

SASTRE, N.; FRANCINO, O.; RAMIREZ, O.; ENSEÑAT, C.; SÁNCHEZ, A.; ALTET, L. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolfs from Southwestern Europe. **Vet Parasitol**, v. 155, p. 198-203, 2008.

SATO, K.; KAWASHIMA, S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. **Biol Chem**, v. 382, p. 743-751, 2001.

- SAXENA, A.; WORTHEY, E.A.; YAN, S.; LELAND, A.; STUART, K.D.; MYLER, P.J. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 129, p. 103-114, 2003.
- SAXENA, A.; LAHAV, V.; HOLLAND, N.; AGGARWAL, G.; ANUPAMA, A.; HUANG, Y. et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 152, p. 53–65, 2007.
- SERVICE, E. M.; SERVICE, M.W. **Demography and Vector-borne diseases**. Boca Raton: CRC Press; 1989. p.416.
- SHAW, J.J. Leishmaniose Visceral no Brasil: o controle vetorial. **Rev Soc Bras Med Trop** , v. 32, n. 2, p. 98-99, 1999.
- SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p 577-579, 2006.
- SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Cad. S. Pública**, v. 21, p. 324-328, 2005.
- SILVA, E.S.; PIRMEZ C.; GONTIJO C.M.F.; FERNANDES O.; BRAZIL R.P. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Vet Rec** v. 147, p. 421-422, 2000.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p. 20-31, 2007.
- SILVA, A.R.; TAUIL, P.L.; CAVALCANTE, M.N.S.; MEDEIROS, M.N.; PIRES, B.N.; GONÇALVES, E.G.R. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 352-357, 2008.
- SILVA, A.V.M.; MAGALHÃES, M.A.F.M.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J.C.A. Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in an endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. **Geospatial Health**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2011.
- SIMPLICIO, A.C.R.; FURTADO, J.B.V.; MONTEIRO, O.S; GARRET, D. Leishmaniose Visceral no Brasil. Análise epidemiológica nos últimos 16 anos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 1, p. 298, 2002.
- SOBRINO, R.; FERROGLIO, E.; OLEAGA, A.; ROMANO, A.; MILLAN, J.; REVILLA, M. et al. Characterization of widespread anine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Vet Parasitol**, v. 155, p. 198-203, 2008.
- SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J. et al. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**, v. 90, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J.E. et al. *Leishmaniasis infantum* - specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v.96, p.265-276, 2001.

SOUZA, C.M. **As leishmanioses no Município de Belo Horizonte: Estudos entomológicos e biogeográficos visando a vigilância epidemiológica**. 2005. 158f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

SOUZA, N.P.; ALMEIDA, A.B.P.F.; FREITAS, T.P.T.; PAZ, R.C.R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em cães silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, n. 43, n. 3, p. 333-335, 2010.

SRIVIDYA, G.; DUNCAN, R.; SHARMA, P.; RAJU, B.V.S.; NAKHASI, H.L.; SALOTRA, P. Transcriptome analysis during the process of in vitro differentiation of *Leishmania donovani* using genomic microarrays. **Parasitology**, v. 134, p. 1527–1539, 2007.

SUNDAR, S.; MAURYA, R.; SINGH, R.K.; BHARTI, K.; CHAKRAVARTY, J.; PAREKH, A. et al. Rapid, Noninvasive Diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of immunochromatographic strip tests for detection of anti-k39 antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 251-253, 2006.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis—current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**. v. 123, p. 345-352. 2006.

TRINDADE, J.B.C. **Análise proteômica de isolados de *Leishmania (Leishmania) chagasi* sensíveis e resistentes a miltefosina**. 2011. 111f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; LUZ, R.A.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radic Biol Med.**, v. 51, n. 2, p. 337-51, 2011.

VERGNES, B.; GOURBAL, B.; GIRARD, I.; SUNDAR, S.; DRUMMELSMITH, J.; OUELLETTE, M.A. Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in *Leishmania donovani* Clinical Field Isolates by Modulating Drug induced Programmed Cell Death. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, p. 88-101, 2007.

VERCAUTEREN, F.G.G.; FLORES, G.; MA, W.; CHABOT, J.G.; GEENEN, L.; CLERENS, S. et al. An organelle proteomic method to study neurotransmission-related proteins, applied to a neurodevelopmental model of schizophrenia. **Proteomics**, v. 7, n. 19, p. 3569-3579, 2007

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D.; WOEHLÉ, F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Vet Parasitol**, v. 135, p. 137-146, 2006.

WALKER, J.; VASQUEZ, J.J.; GOMEZ, M.A.; DRUMMELSMITH, J.; BURCHMORE, R.; GIRARD, I. et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. **Mol Biochem Parasitol.** v. 147, n. 1, p. 64-73, 2006.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 7, 1090-1094, 1995.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. **Technical Report Series 949. World Health Organization** 2010; Geneva.

WHO. World Health Organization. **The 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/ WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases 2006.** Disponível: <http://www.who.int/tdr/leishmaniasis.htm>. Acesso em: 03 nov. 2012.

YAO, C.; LI, Y.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. **Proteomics Clin Appl.**, v. 4, n 1, p. 4–16, 2010.

ZAFRA, R.; JABER, J.R.; PÉREZ-ÉCIJA, R.A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 353-359, 2008.