

REGINA BUENO

**ESTUDO DO GENE NRAMP1 CANINO EM MACRÓFAGOS
INFECTADOS COM *LEISHMANIA LEISHMANIA CHAGASI***

Tese apresentada à UFMG, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor.
Curso de Doutorado em Ciência Animal.
Área de Concentração: Patologia Veterinária.
Orientador: Prof. Renato de Lima Santos

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2006

B928e Bueno, Regina, 1972-
Estudo do gene NRAMP1 canino em macrófagos infectados com
Leishmania leishmania chagasi / Regina Bueno. - 2006

105 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária

Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Teses.
3. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

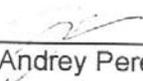
CDD – 636.708 96

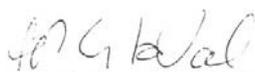
Tese defendida e aprovada em 21 de julho de 2006, pela comissão examinadora constituída por:


Prof.^o. Renato de Lima Santos
(Orientador)


Prof.^a. Isabela Maria Bernardes Goulart


Prof.^o. Alexandre Barbosa Reis


Prof.^o. Andrey Pereira Laje


Prof.^a. Adriane Pimenta da Costa-Val

A Deus, por guiar-me nesta vida e por ter me concedido o dom da perseverança.

Ao meu filho Davi, por sua existência e por ser a minha paz e razão.

*Feliz o homem que achou o saber e o homem que adquire a inteligência
Mais vale ganhá-la do que a prata e adquirí-la do que possuir o ouro
É mais preciosa do que as pérolas, e tudo que mais ama não a iguala.
É árvore de vida a quem a elegeu e aquele que a retém torna-se feliz.
(Provérbios, 2, 13-18)*

AGRADECIMENTOS

A Fundação Waltham, pelo total apoio financeiro, que nos possibilitou a execução do presente trabalho.

A PUCMINAS, em especial ao Programa de Capacitação de Docentes da referida instituição, pelo apoio financeiro a mim concedido.

A Escola de Veterinária da UFMG, em especial ao Programa de Pós-Graduação e ao setor de Patologia, pela acolhida durante estes quatro anos.

Ao meu orientador, Prof. Renato de Lima Santos, pela vontade permanente de ensinar e por ter confiado a mim a execução deste trabalho.

A minha co-orientadora e amiga, Prof^a Maria Norma Melo, por me guiar pelos caminhos ínvios do ICB e por diariamente dividir com todos sua sabedoria de vida.

Ao laboratório de biologia da *Leishmania* no ICB, em especial a técnica Soraia de Oliveira, por ensinar com muita boa vontade.

Ao laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária, em especial a técnica Mel pela ajuda na confecção das lâminas.

Ao laboratório de sorologia da leishmaniose, em especial a Prof^a Marilene Suzan Marques Michalick, pela realização das análises sorológicas.

À Prof^a. Walderez Dutra e a colega Cristiane Menezes, pela oportunidade de trabalho em seu laboratório e pela ajuda nas análises dos resultados.

Ao Laboratório de Genética e Bioquímica do ICB, em especial à colega Débora Naves, pelo apoio na execução das clonagens.

Ao Laboratório de Bacteriologia da Escola de Veterinária, em especial ao Prof. Andrey Lage, pelo apoio.

Ao canil da Polícia Militar de Minas Gerais, em especial ao Capitão Leonardo, que gentilmente nos cedeu seu mais precioso bem, seus cães.

Aos proprietários dos cães deste experimento, em especial Agustín, Mara, Maria Carolina e Major Janeiro pela boa vontade em cooperar e confiança na ciência.

Ao meu esposo Vanderlei, por ser meu porto seguro e por ter me norteado em mais esta etapa de nossas vidas.

Ao meu pai Olavo, por ter sido o maior incentivador para eu chegar até aqui em meus estudos e sempre entender a minha escolha.

À minha mãe e mestra, a quem devo cada linha desta tese. Por seu apoio fundamental.

Aos meus irmãos, Guilherme e Luciana, pelo amor fraternal que é tão importante e constante em minha vida.

Aos meus sobrinhos Luísa, Pedro e Miguel, o meu agradecimento a seus sorrisos, abraços e companheirismo.

Às minhas grandes amigas Alessandra, Andréa, Fernanda, Janaína, Luana, Roueda e Talita. Distantes ou não, estão sempre ao meu lado.

Aos colegas de pós-graduação da Veterinária Fabiana, Soraia, Tatiane, Alcina, Marcus, Silvia, Mariana e Ana Cláudia pela ajuda prática em vários momentos deste trabalho e, mais ainda, pelo apoio emocional.

Às colegas de pós-graduação do ICB Adriana, Cíntia, Janaína, Ângela pelos vários géis corridos juntos e momentos de descontração.

Às estagiárias da PUC e amigas Camila e Raquel pelo interesse neste trabalho e ajuda em sua execução.

Aos meus queridos Cafu, Teca, Melissa, Max e Faluja, que com seus latidos, miados e brincadeiras tornam meus dias mais alegres.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	17
1.2 PATOGÊNESE, PATOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	19
1.3 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	22
1.4 MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE <i>LEISHMANIA</i> E MACRÓFAGOS	24
1.5 RESISTÊNCIA NATURAL E O GENE <i>NRAMP1</i>	28
1.6 RESISTÊNCIA NATURAL À LEISHMANIOSE E O GENE <i>NRAMP1</i>	31
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL, FENOTÍPICA E QUANTITATIVA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO CANINO.	33
2.1 INTRODUÇÃO	33
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
2.4 CONCLUSÃO	36
CAPÍTULO 3: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO COMPLETOS DO CDNA DO GENE <i>NRAMP1</i> DE CÃES FENOTIPICAMENTE RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS A LEISHMANIOSE VISCERAL.	
3.1 INTRODUÇÃO	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.4 CONCLUSÃO	68
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
5 ANEXOS	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise de correlação entre a contagem de monócitos no sangue de 22 cães e o número de PBMC obtido pela separação por meio de gradiente de Ficoll ou o número de células aderentes ao teflon (macrófagos), após dez dias de cultura.	36
Tabela 2	Sistema de escore utilizado na análise semi-quantitativa do número de amastigotas intracelulares de macrófagos infectados por <i>Leishmania chagasi</i> .	43
Tabela 3	Iniciadores específicos utilizados na clonagem do gene <i>Nramp1</i> canino dos animais selecionados como resistentes ou susceptíveis a infecção <i>in vitro</i> por <i>L. chagasi</i> .	45
Tabela 4	Resultado do escore estabelecido a partir da contagem do número de amastigotas de <i>L. chagasi</i> em macrófagos, após 24 e 72 horas de infecção, de 29 cães analisados para resistência ou susceptibilidade a leishmaniose visceral.	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Raça, Idade e Sexo dos cães estudados no Capítulo 3.	88
Anexo 2	Exemplar de cromatograma das seqüências utilizadas para a montagem dos consensos de cada cão. Seqüência de nucleotídeos do segmento S1 do cão número 24. Neste cromatograma é possível verificar que o princípio da seqüência (nucleotídeos de 1 a 70) foi de baixa qualidade, por conter inclusão imprecisa de nucleotídeos e, por isso, foi excluído para a montagem do consenso do cDNA do gene <i>Nramp1</i> deste cão.	89
Anexo 3	Consenso obtidos a partir do alinhamento dos consensos do cDNA do <i>Nramp1</i> dos cães 6, 18, 22 e 24 e comparados com o <i>Nramp1</i> canino de número de acesso no GenBank (AF091049), mostrando na seqüência as diferenças de nucleotídeos encontradas.	91
Anexo 4	Análise de comparação entre as seqüências da proteína previamente depositada no GenBank (numero de acesso AF091049; Altet et al., 2002) e a seqüência obtida neste estudo, em relação a características de hidrofobicidade, hidrofiliçidade, domínios transmembrana, conformação e estrutura secundária.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Macrófagos derivados de monócitos após 24 horas de infecção com <i>L. chagasi</i> , com número variável de formas amastigotas intracelulares. Em detalhe: macrófagos moderadamente infectados. Giemsa modificado. Barra = 50 µm.	37
Figura 2	(A/B) Dot plot representativo de tamanho (eixo x) e granulosidade (eixo y) de PBMC, imediatamente após separação em gradiente de Ficoll (A) ou células aderentes ao teflon, após 10 dias de cultura (B); os intervalos selecionados (R) correspondem aos monócitos em A ou macrófagos derivados de monócitos em B. (C/D) Histogramas representativos da expressão de CD14 de PBMC, imediatamente após separação em gradiente de Ficoll (C) ou de células aderentes ao Teflon, após 10 dias de cultura (D).	39
Figura 3	Mapa dos segmentos do cDNA do <i>Nramp1</i> clonado. Notar as regiões de sobreposição dos segmentos. Segmentos: S5' (1 a 246pb); S1 (12 a 671pb); S2 (600 a 1261pb); S3 (1243 a 1995pb); S3' (1721 a 2022pb).	46
Figura 4	(A/B/C/D) Macrófagos derivados de monócito do sangue periférico canino, aos dez dias de cultivo, após 24 horas de infecção com <i>L. chagasi</i> , mostrando quantidades distintas de formas amastigotas do parasita intracitoplasmáticas. Giemsa modificado. Barra = 20 µm.	49
Figura 5	(A/B) Macrófagos derivados de monócitos isolados do cão 22, com dez dias de cultura, após 24 (A) e 72 (B) horas de infecção com <i>L. chagasi</i> . Em detalhe: macrófagos contendo formas amastigotas do parasita em degeneração. Giemsa modificado. Barra = 50 µm.	53
Figura 6	(A/B) Macrófagos derivados de monócitos isolados do cão 6, com dez dias de cultivo, após 24 (A) e 72 (B) horas de infecção com <i>L. chagasi</i> . Em detalhe: macrófagos com incontáveis formas amastigotas do parasita intracitoplasmáticas. Giemsa modificado. Barra = 50 µm.	55
Figura 7	Número de macrófagos infectados com a forma amastigota de <i>L. chagasi</i> , nos períodos de 24 e 72 horas, para os cães seis (A) e 18 (B), selecionados fenotipicamente susceptíveis, pelo sistema de escore.	57
Figura 8	Número de macrófagos infectados com a forma amastigota de <i>L. chagasi</i> , nos períodos de 24 e 72 horas, para os cães 22 (A) e 24 (B), selecionados fenotipicamente resistentes pelo sistema de escore	59
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando, nas canaletas de 2 a 5 o produto de amplificação com iniciadores para <i>beta-actina</i> canina, para os cães 22, 6 18 e 24, respectivamente. Na canaleta 1, padrão de tamanho molecular (1kb ladder, Invitrogen) e na canaleta 6 o controle negativo.	61

Figura 10	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando na canaleta 1 o padrão de tamanho molecular (1kb ladder, Invitrogen) e nas canaletas 2 a 5 os produtos de amplificação do segmento 1 do gene <i>Nramp1</i> canino, dos cães 22, 6, 18 e 24, respectivamente, utilizando iniciadores específicos delineados para a reação, que originaram um produto de 659 pb. Na canaleta 6, o controle negativo da reação.	61
Figura 11	(A/B) Eletroforese em gel de agarose mostrando o PCR de colônias de bactérias transformadas com os plasmídios pGemT easy/Segmento 2 (gene <i>Nramp1</i> canino).	65
Figura 12	Segmentos do cDNA do gene <i>Nramp1</i> canino que apresentaram diferença de nucleotídeos entre a seqüência originada no presente trabalho (linha superior) e a seqüência previamente depositada no GenBank (AF091049) (linha inferior).	65
Figura 13	(A) Seqüência de aminoácidos da proteína Nramp1 originada a partir da seqüência consenso do cDNA do gene <i>Nramp1</i> canino, obtido no presente trabalho. (B) Segmento da proteína Nramp1 em qual ocorreu mudança de aminoácido valina (V) para alanina (A) na posição 413, entre a seqüência depositada no GenBank (a) e a seqüência originada no presente trabalho (b).	67

RESUMO

O controle da leishmaniose visceral canina é um desafio para a saúde pública, sendo importante a busca de alternativas para o mesmo. O gene *Nramp1* (natural resistance associated macrophage protein 1) é expresso em macrófagos e está envolvido em resistência natural a patógenos intracelulares. Para o estudo do papel do *Nramp1* canino na leishmaniose visceral, visando à utilização de possíveis polimorfismos deste gene, como marcadores moleculares de resistência natural, foi coletado sangue periférico de vinte e nove cães, para o isolamento de monócitos e conseqüente diferenciação em macrófagos, que foram inoculados com promastigotas de *Leishmania chagasi*, após dez dias de cultivo, quando cerca de 75% das células apresentaram atividade fagocitária e 84% marcação positiva para a molécula de superfície CD14, verificado por citometria de fluxo, o que caracteriza funcional e fenotipicamente a cultura de macrófagos derivados de monócitos. Os dois cães fenotipicamente mais resistentes e os dois mais susceptíveis, cujos macrófagos apresentaram a maior ou a menor proliferação intracelular de *Leishmania*, respectivamente, após 24 e 72 horas de infecção foram selecionados para a clonagem e sequenciamento completos do cDNA do *Nramp1*. As seqüências consenso obtidas de cada cão foram alinhadas e resultaram em uma seqüência final de 2022pb (depositada no GenBank sob numero de acesso DQ784645), idêntica para os cães resistentes e susceptíveis. Portanto, a metodologia utilizada neste estudo não resultou na identificação de polimorfismos na região codificadora do cDNA do *Nramp1* canino, potencialmente associados a resistencia contra leishmaniose visceral.

ABSTRACT

Controlling canine visceral leishmaniasis (CVL) is a public health challenge and the development of new tools for controlling the disease is very important. The *Nramp1* (natural resistance associated macrophage protein 1) gene is expressed by macrophages and it is associated with natural resistance to intracellular pathogens. The goal was to study the role of *Nramp1* in resistance against CVL by looking for gene polymorphisms that could be employed for the development of a test to detect natural resistance. Peripheral blood was collected from 29 dogs for isolation of mononuclear cells and their differentiation on macrophages in culture, which were inoculated with *L. chagasi* promastigotes, after ten days in culture, when 75% of the cells had phagocytic activity and 84% were positive for CD14 monocyte/macrophage marker as assessed by flow cytometry. The two most phenotypically resistant dogs, which were the ones with lower levels of *Leishmania* survival intracellularly in macrophages, after 24 and 72 hour of infection, and the two most susceptible dogs, were selected for cloning of the full length *Nramp1* cDNA. The consensus sequence from the resistant and susceptible dogs were aligned, resulting in a 2022bp sequence (GenBank access number DQ784645) that was identical for the four studied dogs. Therefore no polymorphisms of the canine *Nramp1* associated with resistance against leishmaniasis were identified in this study.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose de caráter endêmico em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, onde seu agente causador é o protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* e o vetor, o inseto *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Desjeux, 2001; Guerin et al., 2002). Na região metropolitana de Belo Horizonte, o número de casos de leishmaniose visceral humana e canina tem aumentado a cada ano, (Silva et al., 2001; FUNASA, 2002), sendo que existe correlação na distribuição espacial dos casos da doença nestas espécies (Oliveira et al., 2001; Silva et al., 2005), o que se justifica pelo fato de o cão doméstico ser o principal reservatório para as infecções humanas por *Leishmania chagasi* (Ashford et al., 1998; FUNASA, 2002). As medidas preconizadas pelos órgãos competentes para o controle da doença são baseadas no tratamento precoce de casos de infecções humanas, no uso de inseticidas para eliminação dos vetores e na eliminação de cães soropositivos. Contudo, somente a eliminação de cães soropositivos não é suficiente para a erradicação da doença (Ashford et al., 1998; Dietze et al., 1997), o que, por si só, justifica novos trabalhos que indiquem alternativas no controle da doença na população canina.

A manifestação clínica da leishmaniose visceral nos cães varia individualmente, pois, enquanto alguns animais apresentam sintomatologia evidente, outros são infectados e permanecem com a doença sub-clínica, por longos períodos ou mesmo não chegam a desenvolvê-la (Pozio et al., 1981; Slappendel e Ferrer, 1998; Nelson e Couto, 2001), sugerindo o envolvimento de fatores genéticos do hospedeiro no resultado da infecção, já que alguns

cães parecem apresentar resistência natural à *Leishmania* (Sanchez-Robert et al., 2005).

O conceito de resistência natural foi desenvolvido a partir da observação de que indivíduos de uma mesma população, em contato com determinado patógeno, reagem diferentemente, permitindo, ou não, o desenvolvimento da doença, o que, aparentemente, seria uma característica hereditária (Templeton et al., 1988; Adams e Templeton, 1998). A característica de susceptibilidade ou resistência à infecção pode ser determinada, com base em diferentes parâmetros, que incluem análises *in vitro*, nas quais observam-se variações nas taxas de infecção e de sobrevivência intracelulares dos patógenos nos macrófagos, dependendo da característica do indivíduo (Price et al., 1990; Barthel et al., 2001).

Embora, certamente, a condição geral de saúde e a condição fisiológica do hospedeiro exerçam influência na progressão da doença (Caron et al., 2004), sabe-se que a resistência contra alguns patógenos intracelulares, incluindo a *Leishmania* é determinada geneticamente, em várias espécies como na murina, bovina e humana (Skamene et al., 1998; Buu et al., 2000; Buschman e Skamene, 2001). O gene *Nramp1* ("natural resistance associated macrophage protein 1") está envolvido com a resistência do camundongo à infecção por *Leishmania* (Canonne-Hergaux et al., 1999). Já foram reconhecidos vários polimorfismos do gene *Nramp1* humano, sendo que o possível papel destes polimorfismos, com relação à resistência contra patógenos intracelulares tem sido estudado intensivamente (Buu et al., 2000). O gene *Nramp1* codifica uma

proteína transmembrana que se localiza na membrana do fagolisossoma, transporta íons divalentes (Canonne-Hergaux et al., 1999) e interfere na sobrevivência de alguns patógenos intracelulares (Gruenheid et al., 1995; Jabado et al., 2000; Forbes e Gros, 2001), como já foi observado em macrófagos de camundongos inoculados com *Leishmania donovani*, *Mycobacterium bovis* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (Vidal et al., 1995).

Na espécie canina existem evidências de que o gene *Nramp1* está relacionado à condição de resistência ou susceptibilidade a leishmaniose visceral (Altet et al., 2002; Sanchez-Robert et al., 2005), reforçando a importância de se conhecer qual é a efetiva participação deste gene na proteção contra a infecção por *Leishmania*.

Hipótese

A hipótese é de que alelo(s) específico(s) do cDNA do gene *Nramp1* canino confira(m) resistência à leishmaniose visceral nessa espécie.

Objetivos

Caracterização fenotípica e funcional de macrófagos oriundos do sangue periférico canino, para sua utilização na seleção *in vitro* de cães resistentes ou susceptíveis a *L. chagasi*.

Clonagem e sequenciamento completos do cDNA do *Nramp1* canino de animais com fenótipo resistente ou susceptível.

Determinação da correlação entre polimorfismos do *Nramp1* e susceptibilidade ou resistência contra *Leishmania chagasi*.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

1.1. Leishmaniose Visceral Canina

Em 1903, Leishman e Donovan, isoladamente, descreveram o protozoário conhecido, atualmente, como *Leishmania donovani*; que foi, inicialmente, identificado em tecido esplênico de pacientes humanos com leishmaniose visceral na Índia (revisado por Herwaldt, 1999). A leishmaniose visceral canina foi descrita, pela primeira vez em 1908, por Nicolle e Conte, na Tunísia (revisado por Ashford et al., 1998). Os protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, espécie *Leishmania chagasi* (= *infantum*) (Kuhls et al., 2005) são capazes de causar leishmaniose visceral em animais e no homem (Chang, 1990).

A *Leishmania* é classificada como um parasita heteroxeno e, sendo assim, completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vertebrado (canídeos, roedores ou humanos) e o outro invertebrado, os dípteros hematófagos da família Psychodidae, subfamília Phlebotomidae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, com várias espécies vetoras, no Velho Mundo e Novo Mundo. No Novo Mundo a principal espécie vetora é *Lutzomyia lutzomyia longipalpis* (Chang, 1990; Vassilios, 1993).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam basicamente três formas: a promastigota e a paramastigota extracelulares, flageladas e móveis, que vivem no interior do trato digestivo do flebotomíneo e a forma amastigota, imóvel e que vive no hospedeiro

vertebrado. A forma infectante para o hospedeiro definitivo é a promastigota metacíclica, que se define no final do ciclo intravetorial e são formas menores, móveis, possuindo um flagelo mais longo. A forma amastigota é intracelular, imóvel, de corpo arredondado, medindo de 2 a 4 µm de diâmetro, e se desenvolve poucas horas depois de sofrer fagocitose pelas células-alvo do hospedeiro vertebrado. A manutenção do ciclo biológico da *Leishmania* depende tanto da capacidade das promastigotas em colonizar o aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado, como das amastigotas de estabelecer um parasitismo intracelular, no macrófago do hospedeiro vertebrado (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987; Chang, 1990).

O inseto vetor durante repasto no hospedeiro mamífero infectado ingere sangue que contém macrófagos oriundos, sobretudo, da pele. Os macrófagos parasitados são rapidamente destruídos e liberam as formas amastigotas. Durante as primeiras 24 horas, as amastigotas se multiplicam por fissão binária longitudinal e se diferenciam em promastigotas no aparelho digestivo do flebotomíneo. Finalmente, se diferenciam, pelo menos em parte, em promastigotas metacíclicas, que são infectantes e se localizam na parte anterior do tubo digestivo do vetor. Estas formas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, durante os repastos subseqüentes do flebotomíneo. As promastigotas metacíclicas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro vertebrado, localizando-se dentro do vacúolo parasitóforo. Num período de 24 a 48 horas, as promastigotas se transformam em amastigotas e se

multiplicam, podendo haver ruptura dos macrófagos e, novamente, a fagocitose dos parasitas por outras células, causando sua distribuição pelo organismo (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987).

A leishmaniose visceral é considerada uma zoonose, que atinge várias regiões em todo o mundo, como países do Mediterrâneo, América Latina e Ásia. Como regra geral, a doença é mais comum em áreas rurais ou peri-urbanas, embora, atualmente, ocorra emergência de focos em grandes centros urbanos (Marzochi et al., 1994; Desjeux, 2001; Guerin et al., 2002). O cão doméstico é o principal reservatório do parasita, em áreas peri-urbanas e urbanas (Marzochi et al., 1994; Guerin et al., 2002) e parece ser o responsável pela natureza endêmica ou epidêmica da doença, já que o homem é uma fonte ineficiente de infecção para o inseto vetor (Lainson e Shaw, 1987; Ashford et al., 1998; Silva et al., 2001).

A doença é endêmica em 62 países, com 300 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção e 500.000 novos casos humanos por ano, com cerca de 40.000 mortes (Desjeux, 2001; Guerin et al., 2002; OMS, 2005). De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil ocorrem, aproximadamente, 1000 casos de leishmaniose visceral humana, por ano (FUNASA, 2002) e a maioria dos casos é registrada no nordeste brasileiro (Arias, et al., 1996; Ashford et al., 1998; Costa et al., 1999; Miles et al., 1999; Caldas et al., 2002; FUNASA, 2002), mas em alguns estados do sudeste, incluindo Minas Gerais, o número de casos da doença tanto em humanos, como em cães tem aumentado significativamente (Miles et al., 1999; Silva et al., 2001; Oliveira et al., 2001; FUNASA, 2002; Silva et al., 2005). Observou-se ainda que, em regiões nas quais não existia a

leishmaniose visceral, como na região metropolitana de Belo Horizonte, os primeiros casos registrados da doença, na década de noventa, foram em cães e precederam os casos da doença em humanos (FUNASA, 2002).

Segundo Silva et al. (2001) o número de casos humanos e caninos de leishmaniose visceral tem aumentado na região metropolitana de Belo Horizonte, sugerindo um aumento na taxa de transmissão da doença. Os autores afirmaram ainda, que, na referida área, a proporção de animais positivos para *L. chagasi* com infecção não aparente é de cerca de 68%, sendo esta semelhante à encontrada em outras regiões do país. O intenso parasitismo cutâneo que muitos cães apresentam, a presença desses animais no ambiente doméstico e peridoméstico e, muitas vezes, o fato de acompanharem o movimento migratório do homem são evidências de sua importância no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral (Guerin et al., 2002; Gontijo e Melo, 2004; Grima, 2005; Moreno et al., 2005).

O cão doméstico é, portanto, um reservatório importante da *Leishmania chagasi* e, aparentemente, é o responsável pela natureza endêmica ou epidêmica da doença (Lainson e Shaw, 1987; Ashford et al., 1998; FUNASA, 2002), particularmente em áreas urbanas, onde há correlação entre a distribuição espacial de cães soropositivos e casos humanos de leishmaniose visceral (Oliveira et al., 2001; Camargo-Neves et al., 2001). Embora, a eliminação de cães soropositivos seja uma das medidas preconizadas pelos órgãos públicos competentes, tal medida não é suficiente para a erradicação da doença (Dietze et al., 1997; Ashford et al., 1998).

1.2. Patogênese, Patologia e Aspectos Clínicos e Diagnósticos da Leishmaniose Visceral Canina

O sítio de inoculação da *Leishmania chagasi* na pele, por meio da picada do vetor é o primeiro local de infecção. Em seguida, ocorre a difusão do parasita, para todo o organismo, nos indivíduos susceptíveis. O período de incubação da doença pode variar de um mês a anos. As etapas essenciais para o desenvolvimento da doença são a infecção, seguida de sobrevivência e multiplicação do parasita nas células do sistema monocítico fagocitário. O parasita exerce ação lesiva direta sobre estas células, causando, inicialmente, alteração funcional e, posteriormente, a destruição das mesmas (Genaro et al., 1993; Cunningham, 2002). As formas amastigotas da *Leishmania* já foram observadas nos macrófagos dos animais infectados em, praticamente, todo o organismo e em outras células fagocitárias como monócitos, neutrófilos, eosinófilos, e também células endoteliais (Oliveira et al., 1993; revisado por Marsella e Gopegui, 1998), fibroblastos (Hervas-Rodriguez et al., 1996; Bogdan et al., 2000) e hepatócitos (Duarte et al., 1989; Tafuri et al., 2001). O parasita é distribuído por via hematogênica e linfática, principalmente no interior de células do hospedeiro, podendo, eventualmente, ser transportado livre (não associado às células do hospedeiro). O parasita é encontrado em maior abundância no baço, linfonodos, medula óssea, fígado, rins e pele (Genaro, 1993; Cunningham, 2002; revisado por Grima, 2005).

Além das lesões causadas pela ação direta do parasita, algumas alterações observadas na leishmaniose visceral são imunomediadas, uma vez que a infecção em animais susceptíveis resulta em intensa produção de

anticorpos. Ocorre a proliferação de linfócitos B e o aumento do número de histiócitos e macrófagos, resultando em linfadenomegalia generalizada e hepato-esplenomegalia. Embora ocorra a expressiva produção de anticorpos, a resposta humoral não é protetora contra a *Leishmania* e tem efeitos deletérios no organismo. Anticorpos específicos opsonizam o parasita, facilitando sua entrada nos macrófagos e permitindo sua sobrevivência. Por outro lado, os anticorpos formam imunocomplexos circulantes, que se depositam nas paredes de vasos sanguíneos podendo causar vasculite, poliartrite e glomerulonefrite (Slappendel, 1988; Cunningham, 2002; revisado por Grima, 2005).

O quadro histopatológico clássico na leishmaniose visceral canina é de reação inflamatória crônica intensa do tipo granulomatosa, com hipertrofia e hiperplasia do sistema mononuclear fagocitário, sendo que este quadro é observado, principalmente, nos linfonodos, fígado, baço, rins e pele (Keenan et al., 1984b; Slappendel, 1988; Tafuri et al., 1996; Lima et al., 2004).

Ainda que com menor frequência, os cães acometidos pela leishmaniose visceral podem desenvolver lesões oculares, como uveíte, blefarite e ceratoconjuntivite (Peña et al., 2000; Brito et al., 2004), ou ainda, panoftalmite (Carvalho-Neta et al., 2006¹), osteoarticulares, como osteomielite osteolítica (Agut et al., 2003; Souza et al., 2005), genito-urinárias, como epididimite, balanopostite e com menor frequência, orquite (Diniz et al., 2005), pulmonares,

¹ Carvalho-Neta: Panoftalmite em cão com Leishmaniose Visceral: relato de caso (alcinavcn@yahoo.com).

como pneumonite intersticial (Duarte et al., 1986; Gonçalves et al., 2003) e gastro-intestinais, como reações inflamatórias exsudativas, com infiltrado de células mononucleares (Silva, 2001). As alterações renais mais comuns são glomerulonefrites, seguidas de alterações intersticiais e tubulares (Marcussen et al., 1989; Tafuri et al., 1989; Nieto et al., 1992; Costa et al., 2003).

Os sintomas clínicos da leishmaniose visceral canina variam, enormemente, e a evolução da doença é lenta, o que é uma consequência de sua patogênese e da resposta imunológica que o paciente desenvolve. Os sintomas podem ocorrer simultânea ou isoladamente (Nelson e Couto, 2001). Dermatites, emagrecimento, linfadenomegalia periférica ou generalizada, hepatoesplenomegalia, anemia, emaciação e insuficiência renal são os sinais mais comuns, sendo que epistaxe, claudicação, diarreia, conjuntivite, uveíte e pneumonia ocorrem em menor número de casos (Keenan et al., 1984a; Marzochi et al., 1985; Ciaramella et al., 1997; Slappendel e Ferrer, 1998; Feitosa et al., 2000; Almeida et al., 2005).

Em um estudo realizado no Brasil, os aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina foram avaliados, em duzentos e quinze cães naturalmente infectados sendo que, destes, 81% apresentaram linfadenomegalia, 68%, alterações cutâneas, 58%, hiporexia, 51%, onicogrifose, 47%, emaciação e 30%, anemia e alterações oculares, como uveíte; além de achados menos frequentes como diarreia (20%), hipertermia (21%), alterações neurológicas (4%) e epistaxe (3%) (Feitosa et al., 2000).

Na Itália, em um estudo clínico de cento e cinquenta cães positivos para *L. infantum*, os sintomas mais comuns e as percentagens de animais que os apresentavam foram, respectivamente, linfadenomegalia generalizada (56%) ou periférica (32%), palidez de mucosas (87%), esplenomegalia (53%), dermatite exfoliativa (56%), úlceras (40%) e alopecia periorbital (18%) ou difusa (14%) (Ciaramella et al., 1997). Os aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina também foram estudados em oitenta e seis cães positivos, provenientes do nordeste brasileiro. Os sinais clínicos mais comuns foram emagrecimento e úlceras cutâneas, observados em 80% dos animais. Cerca de 73% dos cães apresentaram onicogrifose e conjuntivite, 60%, alopecia e, menos de 20% manifestaram linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia (Almeida et al., 2005).

As alterações de pele mais comuns na leishmaniose visceral canina são alopecia e dermatite exfoliativa, não pruriginosa, intensa, devido a hiperkeratose da epiderme, que, geralmente, tem início na região periocular e orelhas, com evolução para todo o corpo. Sintomas menos comuns são dermatite ulcerativa crônica, principalmente na cabeça e membros posteriores e dermatite pustular ou nodular, com acometimento ou não de junções muco-cutâneas e onicogrifose (Slappendel, 1988; Ferrer, 1999; Ciaramella et al., 1997; Feitosa et al., 2000; Almeida et al., 2005). As alterações histopatológicas mais observadas na pele consistem em reação inflamatória difusa histioplasmocitária (Scott et al., 1996; Fondevila et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2004). Segundo Scott et al. (1996) em cerca de 50% das biópsias cutâneas, de cães acometidos pela *L.*

chagasi, encontram-se parasitas no interior dos macrófagos na derme.

Um estudo imuno-histoquímico da pele de cães com diferentes manifestações cutâneas de leishmaniose, demonstrou que cães com dermatite alopecica tinham número considerado normal de células de Langerhans. Já nas lesões nodulares, o número destas células estava diminuído e havia infiltrado de histiócitos, com a presença constante das formas amastigotas do parasita nestas células (Fondevila et al., 1997). Além disso, foi observada dermatite papular em cães positivos para *Leishmania*, sendo que estes animais apresentavam também resposta imune celular, verificada por meio do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) ao antígeno de *Leishmania* e baixos títulos de anticorpos. Portanto, sugeriu-se a possibilidade deste sinal clínico servir como indicador de indivíduos resistentes (Ordeix et al., 2005).

As alterações laboratoriais mais comuns na leishmaniose visceral canina são hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, com diminuição da taxa albumina/globulina, aumento de uréia, creatinina e de enzimas hepáticas, proteinúria e anemia moderada não regenerativa, associada a leucopenia (Keenan et al., 1984a; Ciaramella et al., 1997; Feitosa et al., 2000; Ikeda et al., 2003; Almeida et al., 2005; Reis et al., 2006a).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina é baseado em dados epidemiológicos, clínicos, bioquímicos e os obtidos de provas diagnósticas específicas, principalmente por métodos de detecção do parasita e técnicas de imunodiagnóstico, destinadas a avaliar

a resposta imune celular e humoral (Ferrer, 1999; Cañavate et al., 2005).

O exame parasitológico consiste em observação direta da forma amastigota do parasita, em amostras teciduais (geralmente aspirados de medula óssea ou linfonodos) ou em cultivo do parasita. O exame parasitológico tem alta especificidade, porém baixa sensibilidade, podendo ocorrer resultados falso-negativos, além de ser considerado invasivo (Tavares et al., 2003; Cañavate et al., 2005; Reis et al., 2006a). Técnicas de imuno-histoquímica têm sido empregadas com intuito de aumentar a sensibilidade dos exames de amostras teciduais, que possibilitam a identificação da forma amastigota do parasita, principalmente, no interior de macrófagos, em vários órgãos (Ferrer et al., 1988; Ferrer et al., 1995; Tafuri et al., 2004).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada para detecção do DNA genômico ou do cinetoplasto de *Leishmania* no sangue, pele, medula óssea, linfonodos, conjuntiva e sêmen do cão. Devido a sua alta especificidade, a PCR pode contribuir de maneira significativa, para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, mostrando sensibilidade de 89 a 100% (Ashford et al., 1995; Mathis e Deplazes, 1995; Fisa et al., 2001; Quinnell et al., 2001, Strauss-Ayali et al., 2004; Diniz et al., 2005). Foi detectada *Leishmania* no sangue periférico canino, por meio de diferentes métodos de PCR, direcionados tanto para o DNA genômico, quanto para o DNA do cinetoplasto do parasita, sendo que este último demonstrou maior repetibilidade e sensibilidade (Lachaud et al., 2002a; Lachaud et al., 2002b). Em um estudo comparativo das técnicas de imunofluorescência indireta, detecção de formas amastigotas da

Leishmania em tecidos linfóides e PCR, para diagnóstico da leishmaniose canina observou-se que de dezesseis animais negativos nos dois primeiros testes, dez foram positivos na PCR (Andrade et al., 2006).

Os testes sorológicos são mais amplamente utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral e avaliam a resposta imune humoral do animal, sendo que a doença leva à produção de altos níveis de Imunoglobulina G (IgG) anti-leishmania (Deplazes et al., 1995). No entanto, pode haver reação cruzada entre diferentes espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Babesia spp.* Estes testes também apresentam baixa sensibilidade (revisado por Marsella e Gopegui, 1998; Tavares et al., 2003; Nability et al., 2006). As técnicas sorológicas mais difundidas são de imunofluorescência indireta (IFAT), que tem alta especificidade e sensibilidade (Mancianti e Meciani, 1988) e o ensaio imuno-enzimático (ELISA ou dot-ELISA) (Pappas et al., 1983). Mancianti et al. (1996) relataram que a sensibilidade do dot-ELISA está em torno de 91,6% e do IFAT 98,7%.

1.3. Imunologia da Leishmaniose Visceral Canina

A imunidade celular protetora contra a *Leishmania* é mediada pelos linfócitos-T auxiliares (CD4+) que, quando expostos aos antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), liberam produtos solúveis e citocinas, que atraem monócitos e ativam os macrófagos locais, aumentando a habilidade citolítica destas células (Cunningham, 2002). A produção de interleucina 12 (IL-12) pelas células dendríticas e macrófagos permite que os linfócitos T se

diferenciem na sub-população Th1, que produz interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2). Estas citocinas estimulam os macrófagos a produzirem intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e aumentar a expressão da sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), resultando na produção de óxido nítrico (NO). Tanto os ROIs quanto o NO são substâncias tóxicas para o parasita. Por outro lado, se houver a produção de interleucina-4 (IL-4) pelos linfócitos T, ocorre o desenvolvimento da sub-população Th2, que confere susceptibilidade a *Leishmania*, por inibir a produção de IFN- γ e IL-12, diminuir a expressão de receptores para IL-12 nos linfócitos e inibir a produção de NO pelos macrófagos. As interleucinas 10 (IL-10), 6 (IL-6), 13 (IL-13) e 5 (IL-5) também são produzidas na resposta Th-2 e estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos (Cox, 1993; Alexander et al., 1999; Kharazmi et al., 1999; Brown e Reiner, 1999; revisado por Pinelli, et al., 1999a; Pinelli et al., 2000).

A primeira demonstração direta da relevância da dicotomia de linfócitos T (Th1/Th2) para o desenvolvimento de doenças *in vivo* foi observada em estudos do modelo de *Leishmania major*, em camundongos, onde foi possível verificar que determinadas linhagens de camundongos, como o BALB/c, falharam em controlar a infecção e desenvolveram lesões progressivas e doença sistêmica. A predisposição genética para susceptibilidade ou resistência a infecção por *L. major* em camundongos se correlaciona com a dominância de uma resposta Th2, direcionada por IL-4, que causa doença, ou uma resposta Th1 direcionada por IL-12 e IFN- γ , que promove a cura e a eliminação do parasita. No entanto, a simplicidade deste modelo foi colocada à prova em

infecções por outros parasitas, bem como outros hospedeiros, revelando maior complexidade na regulação de citocinas e no mecanismo de resistência adquirida (revisado por Sacks e Noben-Trauth, 2002).

A semelhança do que ocorre em camundongos, onde a resposta dominante da sub-população de linfócitos Th1 confere resistência à *Leishmania*, a resposta imune celular está envolvida na regulação da infecção por *Leishmania infantum* em cães (Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994). Aparentemente, a produção de IFN- γ e a destruição das células hospedeiras parasitadas pelos linfócitos T específicos contra *Leishmania* têm participação fundamental na resistência à leishmaniose visceral canina (Pinelli et al., 1995; revisado por Pinelli et al., 1999a).

Cães que desenvolvem a forma crônica da leishmaniose visceral possuem menor número de linfócitos T e estas células apresentam menor capacidade de proliferação, em resposta ao antígeno de *Leishmania* em análises *in vitro* e *in vivo*, quando comparados aos linfócitos de cães não infectados (Brandonisio et al., 1988; Pinelli et al., 1994; DeLuna et al., 1999). Nos cães susceptíveis, a diminuição de resposta imune mediada por células está relacionada à diminuição do número de linfócitos T CD4+, quando também se observa uma alta produção de anticorpos (Martinez-Moreno et al., 1993; Martinez-Moreno et al., 1995; Bordoiseau et al., 1997; Cabral et al., 1998; Moreno et al., 1999; Guarga et al., 2000; Leandro et al., 2001; Quinnell et al., 2003a). Análises *in vitro* de linfócitos T citotóxicos CD8+ de cães positivos para leishmaniose visceral assintomáticos demonstraram a possibilidade de participação destas

células, na resistência à esta doença nesta espécie, devido a maior produção de IFN- γ e lise de macrófagos infectados, quando comparado a animais sintomáticos (Pinelli et al., 1995). Andrade et al. (1999) estudaram a resposta imune celular e humoral de cães naturalmente infectados com *L. infantum* e observaram que a resposta linfoproliferativa ao antígeno da *Leishmania* e a produção IFN- γ , em culturas de células mononucleares do sangue periférico ocorreram somente em animais assintomáticos, não ocorrendo em cães sintomáticos.

Pinelli et al. (1999b) estudaram a expressão de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-4), em células periféricas mononucleares de sangue periférico de cães infectados por *L. chagasi* e verificaram que cães tratados e assintomáticos produziram todas as citocinas igualmente, enquanto cães sintomáticos produziram IL-4 e IL-10. Além disso, os macrófagos infectados parecem não funcionar adequadamente como APCs, pois apresentam moléculas co-estimulatórias inefetivas, que não promovem a ligação estável entre receptor de linfócitos T (TCR) nos linfócitos e o complexo maior de histocompatibilidade II (MHC-II), nos macrófagos, não havendo a produção de IFN- γ pelos linfócitos e consequente ativação dos macrófagos (Pinelli et al., 1999c; Meier et al., 2003).

Leandro et al. (2001) avaliaram a resposta imune de cães sintomáticos infectados com *L. chagasi*, que apresentaram uma resposta humoral acentuada, sendo que a concentração sérica de imunoglobulina G, subclasse 1 (IgG1) foi similar ao do grupo controle (não infectado) e de imunoglobulina G, subclasse 2 (IgG2) foi bastante elevado. A resposta imune celular foi avaliada pelo teste de proliferação de linfócitos,

sendo que todos os animais tiveram resposta celular contra o antígeno da *Leishmania* em, ao menos, um momento durante o período experimental.

Segundo Deplazes et al. (1995) as concentrações de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2 podem identificar susceptibilidade à leishmaniose visceral em cães, sendo que os animais susceptíveis apresentam maior concentração de IgG total e IgG2, por mais tempo. Para verificar esta possibilidade, Solano-Gallego et al. (2001) avaliaram cães sintomáticos e assintomáticos e observaram que as concentrações de imunoglobulinas são muito variáveis em animais assintomáticos e maiores nos sintomáticos. Além disso, foi observada correlação alta e positiva entre IgG total e IgG2, tanto nos animais sintomáticos, como nos assintomáticos.

Quinell et al. (2003a) estudaram a resposta de subclasses de IgG em cães, naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* e observaram que concentrações de todas as subclasses de IgG (IgG1 a IgG4) estavam no período de soroconversão, atingindo platô após alguns meses. A concentração das subclasses de IgG foi mais elevada em cães sintomáticos, quando comparados aos assintomáticos e também foi mais elevada nos animais nos quais houve detecção do parasita, por meio de PCR, com exceção da IgG2. Reis et al. (2006b) verificaram forte correlação entre a produção de IgG1 e cães positivos assintomáticos para *L. chagasi* e melhor associação entre os animais sintomáticos e IgG2, IgE e IgA.

A resposta imune na leishmaniose visceral também foi estudada em cães experimentalmente infectados com *L.*

infantum, que apresentaram baixa produção de citocinas nos primeiros oito meses pós-infecção, associada à ausência de sinais clínicos e evidências de dispersão do parasita pelo organismo, sugerindo a ocorrência de desenvolvimento sub-clínico da doença. Não houve relação entre a resposta imune humoral e a severidade da doença com a expressão de IL-10 (Santos-Gomes et al., 2002).

A observação de fenótipos exclusivamente Th1 ou Th2 é rara na população canina. No entanto, foi demonstrada dicotomia da resposta imune em celular ou humoral ao parasita, nos cães infectados (Martinez-Moreno et al., 1995; Pinelli et al., 2000). Portanto, o resultado da infecção é amplamente determinado pelo tipo de resposta dos cães, sendo que os linfócitos T têm papel fundamental na imunidade à leishmaniose, por influenciar a produção de citocinas e interagir com os macrófagos infectados (Martinez-Moreno et al., 1995; Rhalem et al., 1999; Chamizo et al., 2005; Fernandez-Bellon et al., 2005; Rosypal et al., 2005).

1.4. Mecanismos de Interação entre *Leishmania* e Macrófagos

A forma promastigota da *Leishmania*, inoculada no hospedeiro vertebrado pelo flebotomíneo adere à superfície dos macrófagos, pois possui moléculas em sua superfície, que são reconhecidas e se ligam a receptores de superfície de sua célula hospedeira, o que desencadeia o processo de fagocitose. Apesar de grande quantidade de promastigotas ser degradada no interior do macrófago, após fagocitose, aquelas que sobrevivem se convertem em amastigotas. A forma amastigotas

intracelular não impede a fusão do fagossoma com o lisossoma, pois consegue viver e se multiplicar dentro dos fagolisossomas secundários. (Sadick, 1992; Russell, 1995).

As células hospedeiras da *Leishmania* no hospedeiro mamífero são os macrófagos ou histiócitos, as células epitelióides e as células de *Kupfer* dos sinusóides hepáticos, que são derivadas de monócitos (Alexander et al., 1999). A fagocitose de microrganismos por macrófagos requer ligações preliminares da partícula à superfície fagocitária, por meio de reconhecimento específico ligante-receptor (Aderem e Underhill, 1999). As moléculas de superfície dos macrófagos as quais interagem com microrganismos, a fim de promoverem sua internalização, são receptores para o terceiro componente do sistema complemento; receptores para a fração constante (Fc) de imunoglobulinas, principalmente para IgG, IgE e IgA; receptores do tipo lecitina, que interagem com seqüências de carboidratos, glicoproteínas ou proteoglicanos, presentes na superfície dos parasitas e moléculas-receptoras, pertencentes à família das integrinas, que reconhecem estruturas determinadas por seqüências específicas de aminoácidos (em particular, a seqüência Arg-Gly-Asp, encontradas em fibronectina e em outras moléculas de adesão) (Auger e Ross, 1992; Mosser e Rosenthal, 1993; Brittingham e Mosser, 1997).

As principais moléculas de superfície da *Leishmania* que são reconhecidas pelo sistema complemento ou anticorpos e, então, se ligam à superfície dos macrófagos, são a protease de superfície promastigota (PSP), também conhecida por gp63, que é uma metaloprotease, presente em grandes quantidades em todas as espécies de

Leishmania (Frommel et al., 1990) e um glicoconjugado formado por repetições de oligossacarídeos fosforilados, denominado lipofosfoglicano (LPG) (Mc Conville et al., 1990), sendo que estas moléculas são ancoradas à membrana da *Leishmania* por uma seqüência de glicosilfosfatidilinositol. A gp63 e o LPG são os principais fatores de virulência reconhecidos da *Leishmania* (Sacks et al., 1985; Bordier, 1987).

A ligação da *Leishmania* aos macrófagos pode também ocorrer por meio de interações diretas entre estruturas da superfície dos parasitas e receptores dos macrófagos, como foi comprovado pela ligação da protease de superfície gp63 e do LPG a receptores de manose/fucose, receptores para produtos finais de glicosilação avançada (AGE) e receptores semelhantes à integrina (Wilson e Pearson, 1988).

A proteína gp63 da superfície da *Leishmania* adere ao macrófago, ligando-se aos seus receptores para fibronectina, mais especificamente, β 1-integrina, adesão esta que ocorre na presença de complemento, indicando que possa ocorrer cooperação entre os receptores para complemento e para fibronectina dos macrófagos. A internalização da *Leishmania* pelos macrófagos ocorreu de forma mais rápida em parasitas gp63 positivos, do que em parasitas com baixa expressão desta proteína. Observou-se ainda, que, após o tratamento das células com anticorpos anti- β 1-integrina, a internalização dos parasitas foi mais lenta (Brittingham et al., 1999).

A gp63 e o LPG do parasita ativam o sistema complemento do hospedeiro e as proteínas do complemento se ligam a receptores de superfície das células hospedeiras, ou o próprio parasita se

utiliza destes receptores para ser internalizado (Brittingham et al., 1995; Desjardins e Descoteaux, 1997). O Mac-1 (CD11b/CD18/CR3), é o receptor para C3b e o CR1 (CD35) é o receptor para C3b e C4b. Estes dois receptores atuam em cooperação, para mediar a adesão de partículas ao macrófago (Rosenthal et al., 1996; Brittingham e Mosser, 1997; Ehlers, 2000).

A participação destes receptores celulares na interação da *Leishmania chagasi* com macrófago peritoneal canino foi estudada, por meio de citometria de fluxo, quando se utilizou marcador de superfície para CR3 (CD18/CD11b) e verificou-se expressão mais baixa destas moléculas nos macrófagos, após infecção com a forma promastigota do parasita, o que pode indicar ligações destes com os receptores ou ainda, internalização dos mesmos (Gonçalves et al., 2005).

A forma amastigota da *Leishmania* apresenta diminuição expressiva das moléculas (gp63 e LPG) em sua superfície (McConville et al., 1993; Moody et al., 1993). Além disso, a membrana plasmática das amastigotas é coberta com glicolipídios do hospedeiro. Estas modificações que ocorrem nas formas amastigotas da *Leishmania* parecem ser estratégias importantes para evasão do sistema imune (Bogdan e Rollinghoff, 1999).

A deleção do gene da metaloprotease de superfície da *Leishmania*, gp63, resultando em parasitas mutantes deficientes nesta proteína, causa maior sensibilidade dos mesmos à ação lítica do complemento e atraso no desenvolvimento de lesões no sítio de inoculação do parasita, demonstrando a importância desta molécula na patogênese da doença (Joshi et al., 2002).

Outras duas moléculas da superfície da *Leishmania* também realizam ligação com receptores de superfície dos macrófagos, mais especificamente CR3, que são o Antígeno 2 da superfície do parasita (PSA-2) e o proteofosfoglicano de membrana (PPG), sendo que ambas apresentam um domínio rico em leucina (LRR) (Kedzierski et al., 2004). Foi demonstrado que o PPG se liga aos macrófagos e sofre internalização e também que esta molécula inibe a produção de citocinas, como o TNF- α , mas, por outro lado, apresenta sinergismo com o IFN- γ , estimulando a produção de NO (Piani et al., 1999).

Após ser reconhecida e aderir à superfície dos macrófagos a *Leishmania* é internalizada. Este processo de internalização de microrganismos pela fagocitose é, freqüentemente, associado com ativação metabólica dos macrófagos, que desencadeia a respiração oxidativa, gerando reativos tóxicos do oxigênio (ROIs) e radicais livres que, geralmente, são letais aos invasores. Parasitas intracelulares como *Leishmania*, que utilizam esta via, devem estar, permanentemente, criando estratégias para o escape e neutralização desses metabólitos oxidativos tóxicos (Proudfoot et al., 1996; Bogdan e Rollinghoff, 1999).

A respiração oxidativa causa aumento pela demanda celular de oxigênio, que é reduzido a superóxido (O_2^-) por elétrons, em uma reação catalisada pela enzima NADPH-oxidase de membrana (Janeway e Medzhitov, 2002). A produção dos ROIs é, geralmente, desencadeada pela fagocitose e os microrganismos são, então, expostos a esses agentes, enquanto são internalizados. Os ROIs são moléculas altamente tóxicas e constituem parte essencial dos mecanismos de defesa

usados pelos macrófagos, para destruir microrganismos invasores (Auger e Ross, 1992).

A interação da *Leishmania* com macrófagos, por meio de receptores do complemento, parece constituir um importante mecanismo protetor para o parasita. Ao contrário dos receptores da Fc das Ig, a ligação de receptores do complemento, sabidamente, não inicia a respiração oxidativa dos macrófagos, assim, a opsonização pelo sistema complemento confere vantagens à sobrevivência do parasita (Mosser e Edelson, 1985; Mosser e Edelson, 1987). Além disso, a forma amastigota da *Leishmania* exibe uma atividade significativa de catalase e superóxido dismutase, que são enzimas que detoxificam os ROIs (Channon e Blackwell, 1985).

A ativação da respiração oxidativa envolve a translocação da proteína cinase-C (PKC) do citosol para a membrana das células e é acompanhada por fosforilação de proteínas celulares específicas pela PKC, como componentes da NADPH-oxidase (Asaoka et al., 1992). A *Leishmania* modula a atividade da PKC, inibindo sua translocação para a membrana celular ou interferindo com a transdução de sinal via PKC. O LPG parece ser a principal molécula do parasita mediadora da modulação da PKC, modificando a resposta dos macrófagos infectados (Descoteaux et al., 1992; Olivier et al., 1992; Reiner, 1994).

A produção de óxido nítrico (NO) é um mecanismo celular utilizado pela célula do hospedeiro para a eliminação de patógenos intracelulares como a *Leishmania*, sendo essencial para a sobrevivência do hospedeiro (Green et al., 1994). O NO é gerado a partir da

conversão de L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Green et al., 1990). Esta molécula é produzida pelos macrófagos após contato com o LPG da forma promastigota do parasita (Kavoosi et al., 2006).

Pinelli et al. (2000) observaram que os macrófagos caninos também produzem NO, quando estimulados por citocinas como IFN- γ , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-2 e que o NO tem atividade anti-leishmania. Ainda, levantam a possibilidade de que os ROIs seriam importantes, por serem tóxicos para as formas promastigotas da *Leishmania*, principalmente, extracelulares e que o NO teria atividade tóxica, mais significativa, sobre as formas amastigotas intracelulares.

A interação da *Leishmania* com o macrófago resulta em alteração da expressão gênica da célula hospedeira, já que em macrófagos infectados ocorre supressão de cerca de 40% dos genes expressos, quando comparado com não infectados. Entretanto, alguns poucos genes relacionados com a resposta inflamatória, mais especificamente com o recrutamento de novos macrófagos, têm seu nível de expressão aumentado (Buates e Matlashewski, 2001). Macrófagos infectados pela *Leishmania chagasi* sofrem inibição de vários genes pró-inflamatórios, enquanto alguns genes cujos produtos tem função anti-inflamatória são transcritos em maior intensidade, sugerindo que a infecção por *L. chagasi* promove a ativação dos macrófagos que culmina em um estado anti-inflamatório (Rodriguez et al., 2004).

Para evadir do sistema de defesa do hospedeiro a *Leishmania* também é capaz de modular a capacidade de migração de células dendríticas para

órgãos linfóides, pois interfere na produção de quimiocinas e na expressão de receptores destas células para as quimiocinas e, por isso, altera a comunicação entre a resposta imune inata e a adaptativa (Steigerwald e Moll, 2005).

Os receptores semelhantes a Toll (TLR), que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e que ativam vários mecanismos de sinalização celular (Brightbill et al., 1999) são utilizados pelos macrófagos, na defesa contra a *Leishmania*, pois foi observado que a ativação do TLR4, pelo parasita leva à produção de sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), enquanto o bloqueio destes receptores no macrófagos permite a multiplicação do parasita intracelular (Kropf et al., 2004a/b). O TLR3 também é importante para o mecanismo de fagocitose do parasita, pelo macrófago e na atividade anti-*Leishmania* da célula ativada pelo IFN- γ (Flandin et al., 2006). Foi observado que camundongos deficientes na proteína adaptadora do TLR, a MyD88, apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *Leishmania* e também que a molécula do parasita capaz de estimular o TLR2 é o LPG. (deVeer et al., 2003).

A *Leishmania* também interfere em vias de sinalização celular de macrófagos, modificando a atividade da família de proteínas tirosina cinases C (PKC). A resposta intracelular ao IFN- γ envolve tirosinas cinases, como a *Janus* cinase e, em seqüência, o sinal de transdução ou ativador da transcrição (Stat-1), que vai desencadear a transcrição de genes estimuláveis pelo IFN- γ . Esta seqüência de eventos é inibida em células infectadas pela *Leishmania*, o que vai impedir a ativação destas células e, conseqüentemente, sua atividade anti-

Leishmania (Nandan e Reiner, 1995; Nandan et al., 1999). Outra via de sinalização celular em macrófagos, que pode ser modulada pela *Leishmania*, é a que envolve a proteína adaptadora MyD-88, que interage com TLRs e o fator de transcrição nuclear NF κ -B, causando a modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 (Hawn et al., 2002).

1.5. Resistência Natural e o gene *Nramp1*

Sob condições naturais, a resposta do hospedeiro à infecção é multifatorial e envolve interações complexas entre os genomas do hospedeiro e do patógeno e o ambiente. Desde há muito tempo, observa-se que as doenças não ocorrem em todos os indivíduos em uma população exposta ao patógeno (Caron et al., 2004). A ausência de doença em indivíduos submetidos às mesmas condições de desafio, que resulta em doença em parte da população, foi responsável pelo desenvolvimento do conceito de resistência natural, que, segundo Templeton et al. (1988) e Adams e Templeton (1998) é “a capacidade inerente de um animal de resistir a uma doença, sem ter sido previamente exposto ao agente ou imunizado”. Aparentemente, a resistência natural é uma característica hereditária. A caracterização dos genes e das proteínas responsáveis pela resistência natural pode resultar na identificação dos mecanismos de defesa do hospedeiro a serem utilizados como alvos, para intervenção terapêutica (revisado por Govoni e Gros, 1998). Apesar do estado geral de saúde e condição fisiológica do hospedeiro influenciarem na progressão de uma doença, a predisposição genética participa de modo decisivo,

determinando como a doença irá progredir no indivíduo. Estudos em camundongos e no homem demonstraram que locos genéticos múltiplos influenciam no desenvolvimento de uma infecção, afetando tanto a resposta imune inata como a adquirida contra o parasita (Alexander et al., 1999).

Experimentos em camundongos mostraram que a resistência do hospedeiro a parasitas intracelulares é determinada geneticamente (Bradley et al., 1979; Cox, 1993; Soo et al., 1998; Bellamy, 1999; Buu et al., 2000). Vários grupos de pesquisadores, trabalhando isoladamente, revelaram a existência de um gene localizado no cromossoma 1 de camundongos denominado *Bcg/Ity/Lsh*. Mais tarde ficou evidente que estes três loci correspondiam na realidade a um único gene, que foi denominado gene da proteína macrofágica 1 associada a resistência natural ou *Nramp1* (sigla da denominação em inglês “Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1”). Recentemente o gene foi renomeado como *Slc11a1* de “solute carrier family 11 member 1”. Um alelo deste gene está associado à resistência do camundongo a determinados agentes infecciosos como *Mycobacterium* (Gros, 1981), *Salmonella* (Lissner et al., 1983) e *Leishmania* (Bradley et al., 1979). A participação do gene *Nramp1* na resistência a patógenos foi comprovada em análises funcionais *in vitro* de linhagens celulares de macrófagos transfectados (Barton et al., 1995) e por análise *in vivo* de camundongos “knock-out” (Vidal et al., 1995) e transgênicos (Govoni et al., 1996).

Ortólogos do gene *Nramp1* foram identificados em várias espécies de animais domésticos como em bovinos

(Feng et al., 1996; Coussens, 2004), aves (Hu et al., 1996), suínos (Tuggle et al., 1997), ovinos (Bussmann, 1998), caninos (Altet et al., 2002), e eqüinos (Matiasovic et al., 2002), além da espécie humana (Cellier et al., 1994).

O gene *Nramp1* codifica uma proteína integral de membrana de 60kDa, com 12 domínios transmembrânicos, que se localiza em fagolisossomas de macrófagos. A proteína possui vários sítios de fosforilação e alças extracelulares glicosiladas. Existem evidências de que sua função seja de canal iônico, transportando íons divalentes através da membrana. A *Nramp1* define uma família de proteínas, extremamente conservada durante a evolução, distribuídas em grupos evolutivos que variam da bactéria ao homem, sugerindo participação fundamental em todos os organismos vivos (Vidal et al., 1993; Cellier et al., 1994; Skamene et al., 1998). Outra proteína da família *Nramp* também foi caracterizada, a *Nramp2* (DMT1 ou *Slc11a2*). Esta proteína está localizada na membrana plasmática de vários tipos celulares e tem função semelhante a *Nramp1*, como transportadora de íons divalentes, principalmente ferro, mas que não está envolvida em resistência natural (Gruenheid et al., 1995). Foram identificadas mutações do gene desta proteína em ratos, responsáveis pela produção de *Nramp2* deficiente em absorção de ferro, pelas células do epitélio intestinal, causando o desenvolvimento de anemia microcítica (Fleming et al., 1997; Knopf et al., 2000).

Em camundongos, uma mutação recessiva pontual no gene *Nramp1*, causando a substituição de glicina por ácido aspártico na posição 169 do quarto domínio transmembrânico, resulta em susceptibilidade a alguns

patógenos intracelulares, como *Leishmania donovani*, *Mycobacterium bovis* e *Salmonella entérica* sorotipo Typhimurium (Vidal et al., 1995). No entanto, observou-se que, mesmo em camundongos com alelo resistente (*Nramp*⁹¹⁶⁹), determinados patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis* (revisado por North e Medina, 1998) e *Brucella melitensis* (Guilloteau et al., 2003) têm capacidade de replicação intracelular em macrófagos e de estabelecer infecção.

Estudos imuno-citoquímicos, com anticorpos específicos mostraram que a *Nramp1* se localiza nas membranas de endossomas tardios e lisossomas e, ocorrendo fagocitose, a proteína se desloca para membranas fagossomais (Gruenheid et al., 1997; Searle et al., 1998; Blackwell e Searle, 1999). Existem evidências de que, nos camundongos, com alelo susceptível de *Nramp1*, ocorre multiplicação exacerbada de microrganismos nos macrófagos, devido a alterações conformacionais da proteína, que impede seu direcionamento para endossomas tardios/lisossomas, ficando a mesma retida no retículo endoplasmático (White et al., 2004).

Não está totalmente elucidado como a função desta proteína, como transportadora de íons divalentes, pode influenciar a susceptibilidade a patógenos, mas parece que pode haver efeitos diretos na sobrevivência destes, nos compartimentos endossomal/lisossomal, além de influência sobre a resposta imune inata e adaptativa, por meio dos efeitos pleiotrópicos do gene *Nramp1* sobre o sistema imune (Brown et al., 1995; Blackwell e Searle, 1999; revisado por Blackwell et al., 2001).

São descritos dois possíveis mecanismos de ação da *Nramp1* nos

macrófagos: o primeiro sugere que a proteína deva transportar íons ferro para dentro do fagolisossoma, aumentando o conteúdo de ferro, para sustentar a reação catalítica Haber-Weiss/Fenton, gerando radicais hidroxilas, altamente tóxicos, com atividade bactericida (Gutteridge et al., 1981; Kuhn et al., 1999; Zwilling et al., 1999). O segundo mecanismo de ação seria o da *Nramp1* transportar íons para fora do fagolisossoma, transporte este dependente de pH. A diminuição do conteúdo iônico dentro dos fagolisossomas, principalmente ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), controlaria a proliferação de microrganismos intracelulares em fagócitos. Os patógenos utilizam estes íons como cofatores para a replicação de DNA, produção de importantes enzimas para seu metabolismo e para neutralização de componentes tóxicos do fagolisossoma e também para expressão de diferentes fatores de virulência (Gruenheid et al., 1995; Canonne-Hergaux et al., 1999; Jabado et al., 2000; Forbes e Gros, 2001; Wyllie et al., 2002; Forbes e Gros, 2003).

A *Nramp1* atua sobre o sistema imunológico, por meio de seus efeitos pleiotrópicos, o que parece dever-se à atividade transportadora de cátions divalentes da proteína, pois a concentração destes íons influencia muitas funções celulares, como a regulação da transcrição por proteínas ligantes do DNA e como as funções de centenas de enzimas, incluindo metaloproteases, superóxido dismutase (SOD) e iNOS e também eventos celulares como fusão endossomal (revisado por Blackwell et al., 2003). Nos camundongos com alelo resistente ocorre maior produção de ROIs e NO, resposta aumentada ao IFN- γ e maior capacidade de apresentação de antígenos, devido ao aumento das

moléculas do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC-II) (Lang et al., 1997; Blackwell e Searle, 1999; Blackwell et al., 2001; Fritsche et al., 2003).

Vários estudos foram conduzidos em diferentes espécies animais, com intuito de verificar polimorfismos do gene *Nramp1*, que possam estar associados com resistência ou susceptibilidade a doenças infecciosas, causadas por patógenos intracelulares, como salmonelose aviária (Hu et al., 1997; revisado por Wigley, 2004) e brucelose (Adams e Templeton, 1998; Paixão, 2006) e tuberculose (Barthel et al., 2000) bovinas.

Na espécie humana, estudos populacionais foram conduzidos para verificação da participação do gene *Nramp1* em doenças infecciosas e auto-imunes. Existem evidências de que polimorfismos presentes na seqüência reguladora da região promotora do *Nramp1* estejam envolvidos no desenvolvimento de doenças auto-imunes como artrite reumatóide (Shaw et al., 1996; Yen et al., 2006), diabetes (Takahashi et al., 2004) e sarcóide (Dubaniewicz et al., 2005). A doença de Crohn também foi associada a polimorfismos localizados próximos ao *Nramp1*, mas não especificamente na região promotora (Hofmeister et al., 1997). Os polimorfismos do *Nramp1* que podem estar associados à susceptibilidade de indivíduos a doenças infecciosas e/ou a sobrevivência do patógeno nos pacientes, estão localizados na região promotora ou na região não traduzida (UTR) da extremidade 3' como foi observado em hanseníase (Ferreira et al., 2004), tuberculose (Abe et al., 2003; Zhang et al., 2005; Li et al., 2006) e na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Donninger et al., 2004).

1.6. Resistência Natural à Leishmaniose e o gene *Nramp1*

Bradley e Kirkley (1977), estudando o desenvolvimento de *Leishmania donovani* em diferentes linhagens de camundongos, observaram que a taxa de multiplicação dos parasitas ocorria de modo distinto entre as linhagens, mas não entre indivíduos de uma mesma linhagem; denominando resistentes os animais que tiveram a carga parasitária aumentada em até oito vezes e que apresentaram lesões histopatológicas restritas ao fígado, e susceptíveis aqueles com aumento de carga parasitária em mais de oito vezes, no primeiro mês e que apresentavam parasitas espalhados em fagócitos mononucleares, em todo organismo, por um período de dois anos. Segundo os autores, este sistema poderia ser utilizado como modelo para estudos em resistência genética a infecções intracelulares, sendo que o padrão de resposta encontrado pôde ser comparado à hanseníase e leishmaniose cutânea.

Em um segundo trabalho, Bradley (1977) definiu que a partir da taxa de multiplicação aguda de *Leishmania donovani* é possível classificar camundongos em dois grupos: susceptíveis e resistentes. Relatou, também, que os híbridos descendentes de um mesmo grupo relembram seus progenitores em susceptibilidade ou resistência, enquanto que os híbridos entre grupos apresentam perfil moderadamente resistente. Cruzamentos entre indivíduos F1 do grupo resistente e susceptível, e cruzamentos entre indivíduos F1 do mesmo grupo originaram animais com perfis de susceptibilidade indicativos de que o controle da leishmaniose visceral é determinado por um único gene. A seguir, Bradley et al. (1979) realizaram

o mapeamento do loco genético que controla susceptibilidade à leishmaniose visceral em camundongos, denominando-o *Lsh* (mais tarde identificado como *Nramp1*) e relataram sua localização no cromossomo um, sendo que esta é distante do loco do MHCII.

Análises genéticas de linhagens de camundongos permitiram o escaneamento do genoma murino na busca dos genes que controlam a resistência ou a susceptibilidade a infecções por *Leishmania*. Devido ao fato de estas seqüências gênicas murinas apresentarem conservada sintonia com regiões do genoma humano, imediatamente, tornaram-se possíveis candidatas a genes relacionados à susceptibilidade a doenças humanas, como ocorreu com o gene *Lsh* ou *Nramp1*, relacionado com controle de vários patógenos intramacrofágicos, incluindo *Leishmania*, *Salmonella* e *Mycobacteria* (revisado por Blackwell et al., 2001).

Estudos populacionais humanos foram conduzidos no nordeste brasileiro, com intuito de determinar a possível participação do *Nramp1* em susceptibilidade a doenças e não foi verificada ligação, na população

estudada, entre o gene e leishmaniose visceral ou tuberculose (Blackwell et al., 1997). Entretanto, estudos populacionais realizados na espécie humana no Sudão, onde ocorrem distintas incidências e fenótipos clínicos da leishmaniose visceral, foram relatados polimorfismos no *Nramp1* associados à doença. As variações genéticas já determinadas, que afetam a susceptibilidade à leishmaniose visceral nesta população, estão localizadas na região promotora, no exon3 e no intron4 e haplótipos formados entre estes (Bucheton et al., 2003; Mohamed et al., 2004).

Na espécie canina, foi realizado o mapeamento e o sequenciamento do *Nramp1*, a partir do DNA genômico de um animal e pesquisadas mutações neste gene, que pudessem estar associadas à susceptibilidade à leishmaniose visceral. O gene canino foi mapeado no cromossomo CFA37 e ocupa 9kb, incluindo 700 pares de base da região promotora, 15 exons e um microsatélite polimórfico no intron1. O gene codifica uma proteína de 547 aminoácidos que possui 87% de identidade com proteínas *Nramp1*, de diferentes espécies de mamíferos (Altet et al., 2002; Sanchez-Robert et al., 2005).

CAPÍTULO 2²

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL, FENOTÍPICA E QUANTITATIVA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO CANINO.

2.1. INTRODUÇÃO

Os macrófagos participam sobremaneira da defesa contra infecções, particularmente aquelas causadas por patógenos intracelulares. Além disso, estão envolvidos na remoção de células e debrís celulares e são importantes ferramentas na resposta imune inata e adaptativa. Tais células exibem diversidade funcional, morfológica e metabólica, conforme o seu ambiente tecidual e, também, conforme de seu estágio de diferenciação e ativação (Janeway et al., 2001). A resposta imune contra *Leishmania* é altamente dependente de macrófagos e, apesar de estes serem as células hospedeiras, alvo da infecção, são capazes de apresentação antigênica e de causar a morte intracelular da *Leishmania* (Pinelli et al., 1999c).

Os macrófagos maduros, oriundos dos tecidos animais, não são prontamente disponíveis para cultura celular e análises funcionais. Assim, o uso, para estudos, de macrófagos derivados de monócitos circulantes é uma alternativa muito atraente (Saldarriaga et al., 2003), particularmente, porque isso requer uma abordagem menos invasiva para obtenção das células, quando comparado a macrófagos derivados do peritônio ou da medula óssea. Esse

fato torna-se importante, quando o delineamento experimental envolve animais de companhia para estudo.

O isolamento, cultura e caracterização de macrófagos alveolares (Shaw e Anderson, 1984), macrófagos derivados de medula óssea (Tipold et al., 1998) e de linhagens celulares caninas derivadas de histiocitose maligna (Pinelli et al., 2000) foram descritos. No entanto, como salientado, os procedimentos para obtenção das células não são simples e, portanto, menos convenientes que a obtenção de células sanguíneas, apesar de a quantidade de monócitos isolados do sangue poder ser, freqüentemente, relativamente baixa (Ho e Babiuk, 1979).

Diferentemente de macrófagos derivados de monócitos de outras espécies animais como suínos, caprinos (Wardley et al., 1980), ovinos (Olivier et al., 2001) e bovinos (Saldarriaga et al., 2003), os macrófagos derivados de monócitos caninos não foram examinados em detalhes, a despeito de sua utilização prévia em experimentação (Kurzman et al., 1993; Panaro et al., 1998; Sisto et al., 2001).

Os objetivos deste estudo foram a caracterização de macrófagos derivados de monócitos caninos e a padronização do procedimento para isolamento, cultura e infecção das células com *Leishmania*, por meio de análises quantitativa e qualitativa de macrófagos derivados do sangue periférico canino.

² Artigo Publicado: BUENO, R.; MELLO, M.N.; MENEZES, C.A. et al. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.521-524, 2005.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletado sangue periférico da veia jugular em tubos heparinizados, de 22 cães adultos, hígidos, de ambos os sexos. O sangue foi processado para análise sanguínea e para isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Foram centrifugados 60 ml de sangue a 1600g por dez minutos, em temperatura ambiente; separado o plasma, as células foram ressuspendidas em solução salina tamponada (PBS) na proporção de 1:1, que foi colocada sobre uma solução de Ficoll (Ficoll-paque Plus, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra), na proporção de 2:1 e então centrifugada a 1200g, por 40 minutos a 18°C. Após centrifugação, o PBMC foi separado, lavado duas vezes em PBS e ressuspendido em 8,0 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (200mM), piruvato (10mM), aminoácidos não essenciais (10 mM), solução de bicarbonato de sódio (7,5%p/v), penicilina (50UI/ml) e estreptomomicina (50µl/100ml).

A suspensão de células foi transferida para frascos de teflon (NalgeNunc, Rochester, EUA) e mantida em estufa (Forma Scientific, Waltham, EUA) a 37°C com 5% de CO₂. Após vinte e quatro horas, o meio de cultura foi trocado, para a remoção de células não aderentes e a cultura foi mantida nessas condições por dez dias, trocando o meio a cada três dias. O período necessário para a diferenciação de monócitos em macrófagos é de dez dias (Wardley et al., 1980), portanto, após esse período, as células formavam uma monocamada confluyente, resultante de expansão celular, a qual pôde ser observada em microscopia de contraste de fase. Os frascos de teflon contendo os

macrófagos foram então colocados sobre o gelo por 30 minutos, seguido de agitação para promover a liberação das células do fundo dos frascos, que eram transferidas para tubos de centrifuga graduados e centrifugadas a 2000g, por 10 minutos e ressuspendidas em RPMI-1640. A viabilidade celular foi observada por meio de coloração com azul de tripan a 1% e a concentração de células ressuspendidas foi ajustada para 300.000 células por ml. As células eram semeadas em lâminas contendo uma câmara (chamber-slides) (Lab-Tek, NalgeNunc, Rochester, EUA).

A atividade fagocitária destas células foi analisada por meio de sua inoculação com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MCAN/BR/2002/BH400), isoladas de baço de um cão naturalmente infectado proveniente da área urbana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e cultivado em meio α -MEM, pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina (50 UI/ml) a 24°C. A multiplicidade de infecção (MOI) foi de 10 promastigotas por macrófagos, em duplicatas. Após 24 ou 72 horas de infecção, as células foram coradas com Giemsa modificado (Kit "Diff-Quick", Laborclin, Pinhais, Brasil) e a taxa de infecção foi estabelecida contando-se 200 células de cada câmara, sendo duas câmaras por cão. Na mesma data de coleta de sangue dos cães para isolamento do PBMC, foram colhidos também 5,0 ml de sangue periférico total para contagem de células sanguíneas.

Com o objetivo de caracterização dos macrófagos derivados de monócitos circulantes, foi verificada a expressão de CD14 em PBMC oriundos de nove cães adultos, de ambos sexos. A expressão de CD14 foi avaliada no PBMC imediatamente após a separação

pelo gradiente de Ficoll, como descrito acima, ou após 10 dias, em cultura em frascos de teflon. As células foram lavadas duas vezes em PBS e 2×10^5 células eram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD14 (anti-M-M9: VMRD, Pullman, EUA) em placas de 96 poços com fundo em U, por 15 minutos a temperatura ambiente e então lavados com PBS com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,01% de azida de sódio, seguido de centrifugação por 10 minutos a 128g. As amostras eram incubadas com IgG de cabra secundário anti-camundongo, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sta Cruz Biotechnology, Sta Cruz, EUA). As células foram então fixadas com 2% de formaldeído e lidas em um FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, EUA). Foi realizada aquisição de um mínimo de 20.000 células para cada amostra. Após definir (gating) a região correspondente aos monócitos/macrófagos de acordo com os padrões de tamanho e granulosidade, a percentagem de células CD14 positivas foi determinada neste intervalo, como realizado previamente em Souza et al. (2004).

Os parâmetros foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e médias com diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon Signed Ranks. O teste de correlação de *Pearson* foi aplicado entre os valores de monócitos sanguíneos e PBMC ou de células aderentes ao teflon após dez dias de cultura (macrófagos). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS 11.0 (Siqueira, 2002).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem de macrófagos contendo a forma amastigota de *Leishmania chagasi* (Fig. 1), após 24 ou

72 horas de inoculação foi de $75,93 \pm 9,81\%$ e $76,70 \pm 14,65\%$, respectivamente (n= 22 cães, 200 células contadas por cão, em duplicatas). Não houve diferença estatística entre estes dois períodos pós-infecção ($P > 0,05$). Estas percentagens de infecção foram similares ao descrito para macrófagos derivados de monócitos (Panaro et al., 1998), peritoneal e alveolar (Shaw e Anderson, 1984), ou macrófagos derivados de medula óssea (Tipold et al., 1998), indicando uma atividade fagocitária compatível com a de macrófagos obtidos por métodos mais invasivos.

Como demonstrado (Tab. 1), o número de monócitos no sangue periférico canino é altamente variável (Dienzle, 2002). No entanto, seria razoável prever que o rendimento de macrófagos em cultura fosse diretamente proporcional, ao número de monócitos no sangue, usado para isolamento de PBMC. Interessantemente, foi encontrada uma correlação negativa, não significativa e baixa entre o número de macrófagos derivados de monócitos, após 10 dias de cultura e o número de monócitos na amostra sanguínea, que originou a cultura (Tab. 1). Este resultado indica que o número de monócitos em uma determinada amostra sanguínea não é capaz de prever o rendimento de macrófagos na cultura. Em contraste, a quantidade de leucócitos sanguíneos obtidos após a separação pelo gradiente de Ficoll correlacionou-se positivamente, mas não significativamente, com o número de macrófagos recuperados após 10 dias de cultura (Tab. 1). Contudo, somente 1,5 a 5% do número original de PBMC transferidos para os frascos de teflon, mantiveram-se aderentes após 10 dias de cultura, indicando baixo rendimento celular.

Tabela 1: Análise de correlação entre a contagem de monócitos no sangue de 22 cães e o número de PBMC obtido pela separação por meio de gradiente de Ficoll ou o número de células aderentes ao teflon (macrófagos), após dez dias de cultura.

Nº monócitos/ml de sangue total	Células aderentes ao teflon	Correlação
$3,44 \times 10^8 \pm 2,50 \times 10^8$	$4,05 \times 10^5 \pm 1,33 \times 10^5$	$r = -0,35$ (P = 0,114)
PBMC **	Células aderentes ao teflon	Correlação
$3,67 \times 10^7 \pm 2,29 \times 10^7$	$4,05 \times 10^5 \pm 1,33 \times 10^5$	$r = 0,36$ (P= 0,334)

1*Número total de células aderentes ao Teflon removidas após 10 dias de cultura.

2**Número total de PBMC obtido a partir de 60 ml de sangue total, imediatamente após separação, em gradiente de Ficoll.

Para se assegurar que a população de células aderentes, após 10 dias de cultura, apresentava, de forma importante, o fenótipo macrófágico, a expressão de CD14, marcador de monócito/macrófago (Janeway et al., 2001), foi determinada por meio de citometria de fluxo. As percentagens de células CD14 positivas foram $39,11 \pm 16,19\%$ e $84,17 \pm 7,40\%$ na população de PBMC, imediatamente após a separação, pelo gradiente de Ficoll e nas células aderentes ao teflon, após 10 dias de cultura, respectivamente (Fig. 2). Estas percentagens foram significativamente diferentes (P=0,008). Estes resultados indicam, claramente, que a cultura em frascos de teflon resulta em uma forte seleção de células CD14 positivas, o que é supostamente alcançado pela remoção de PBMC não aderentes, como linfócitos, que são CD14 negativos. Saldarriaga et al. (2003) relataram resultados similares, em monocamadas de macrófagos derivados de monócitos periféricos, após onze dias de cultura, obtendo 94% de células em cultura CD14 positivas.

Na comparação de tamanho (eixo x) e granulosidade (eixo y) (Fig. 2) do dot plot representativo de PBMC (A) e macrófagos em cultura (B), torna-se evidente que houve aumento no tamanho e granulosidade destas células, após cultura. Fato este, que deve estar relacionado a diferenças morfológicas (Dienzle, 2002), entre as células mononucleares do PBMC, como monócitos e linfócitos e macrófagos presentes na cultura, após dez dias de condições adequadas para o cultivo celular.

2.4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico são fenotípica e funcionalmente utilizáveis em experimentação biológica, o que torna esse método de utilização preferencial, quando o bem-estar animal for um aspecto relevante para o delineamento experimental.

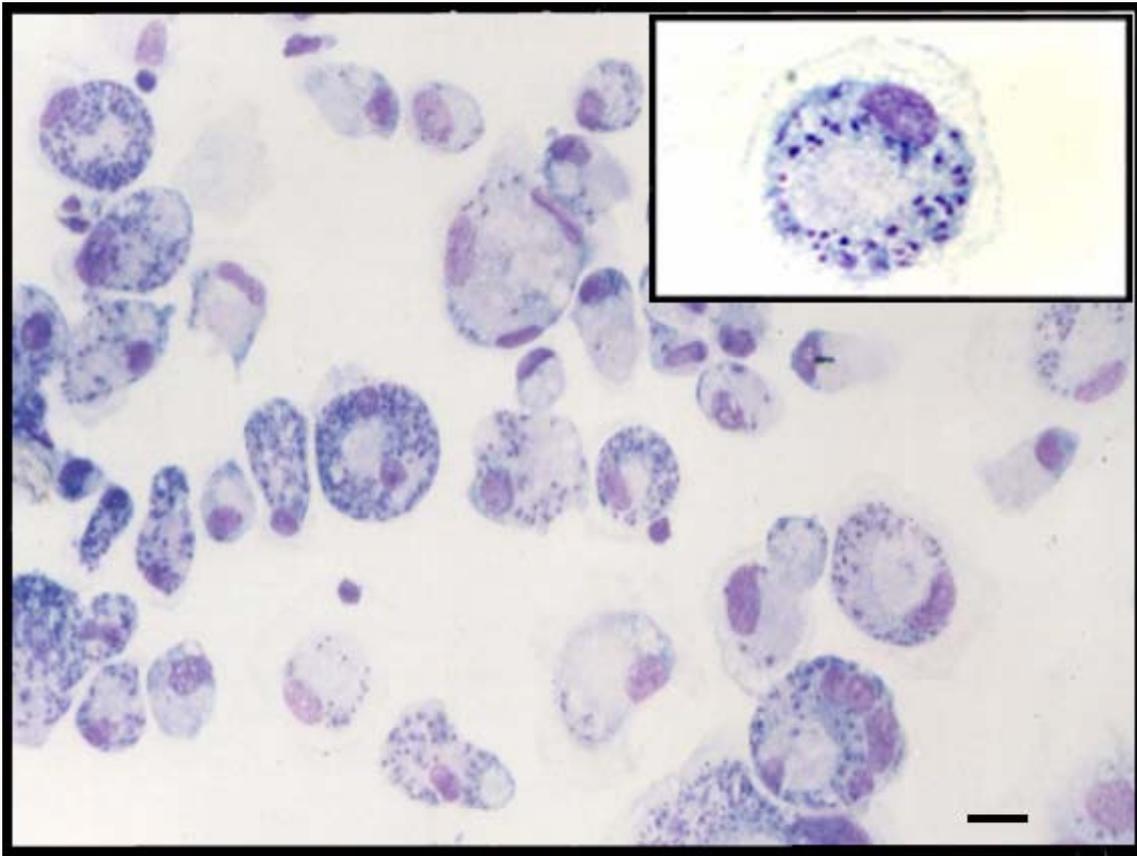


Figura 1: Macrófagos derivados de monócitos, após 24 horas de infecção com *L. chagasi*, com número variável de formas amastigotas intracelulares. Em detalhe: macrófago moderadamente infectado. Giemsa modificado. Barra = 50 μm .

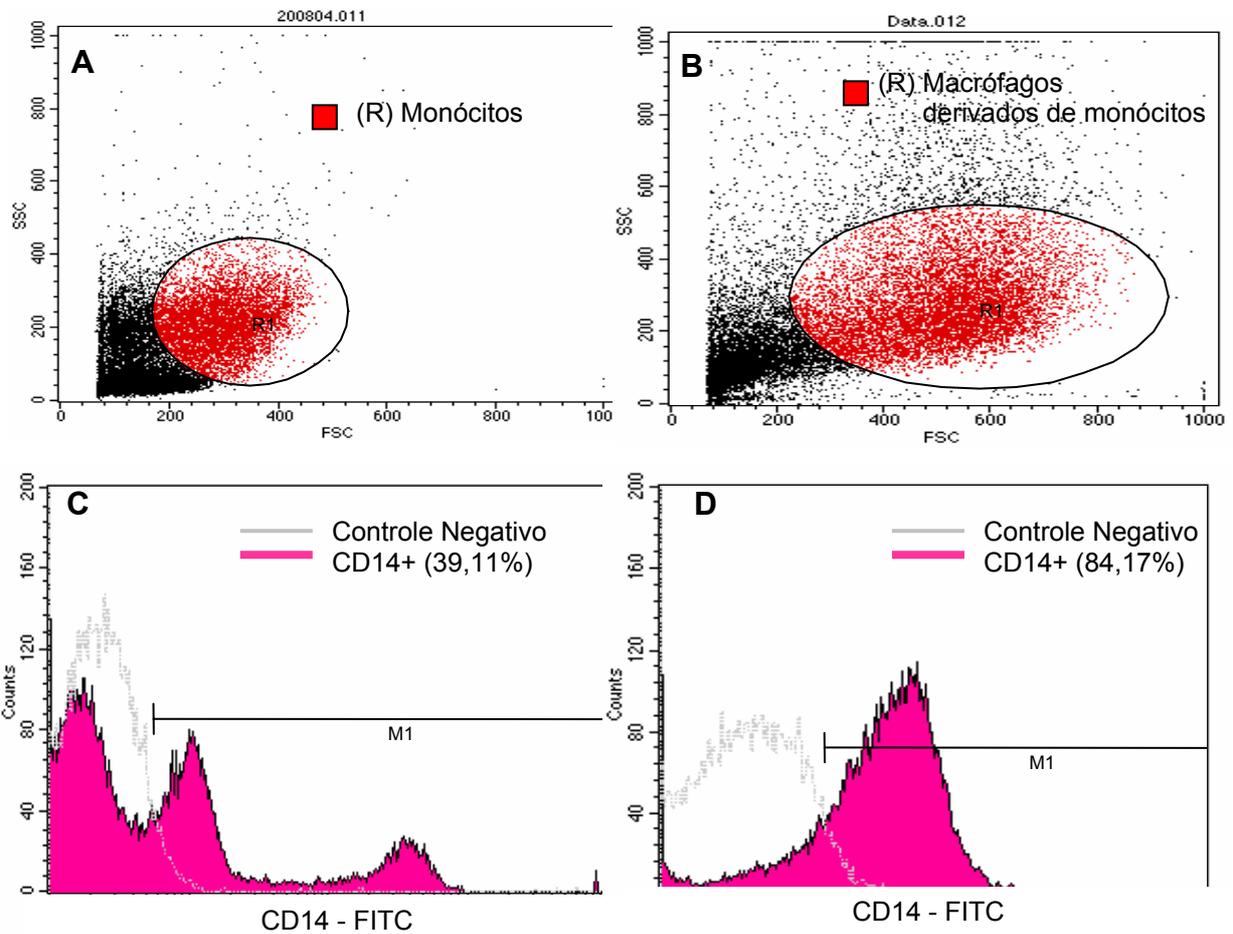


Figura 2: (A/B) Dot plot representativo de tamanho (eixo x) e granulosidade (eixo y) de PBMC, imediatamente após separação em gradiente de Ficoll (A) ou células aderentes ao teflon, após 10 dias de cultura (B); os intervalos selecionados (R) correspondem aos monócitos em A ou macrófagos derivados de monócitos em B. (C/D) Histogramas representativos da expressão de CD14 de PBMC, imediatamente após separação em gradiente de Ficoll (C) ou de células aderentes ao Teflon, após 10 dias de cultura (D). A linha cinza pontilhada indica a distribuição dos controles negativos e M/M1 indicam a população de células CD14 positivo. Os valores mostrados nos histogramas representam a média e desvio padrão das amostras analisadas.

CAPÍTULO 3

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO CDNA DO GENE *NRAMP1* DE CÃES FENOTIPICAMENTE RESISTENTES OU USCEPTÍVEIS A LEISHMANIOSE VISCERAL.

3.1. INTRODUÇÃO

A utilização de seleção genética de animais domésticos, resistentes naturais a determinados patógenos tem sido preconizada, principalmente, para animais de produção, como rebanhos bovinos, onde as perdas financeiras com doenças são muito significativas. A identificação de genes que possam estar envolvidos na resistência natural bem como o estudo da ação destes genes nas células onde são expressos, ou no fenótipo dos indivíduos, amplia o conhecimento sobre os mecanismos de resistência a doenças e as possibilidades de suas aplicações práticas (Adams e Templeton, 1998). Na espécie canina, a seleção genética de animais, visando à resistência natural a infecções, não é rotineiramente realizada. No entanto, considerando que os cães são reservatórios importantes para zoonoses, como a leishmaniose visceral (Ashford et al., 1998; FUNASA, 2002), a prática de seleção de animais resistentes pode ter um impacto positivo no controle desta doença, nas populações canina e humana (Quinnell et al., 2003b). O gene *Nramp1*, que determina resistência natural a patógenos intracelulares em camundongos, inclusive resistência a *Leishmania* (Vidal et al., 1995) pode ter a mesma função na espécie canina (Altet et al., 2002) e, por isso, seu estudo pode resultar na identificação de marcadores de resistência à leishmaniose no cão.

O gene *Nramp1* ou *Slc11a1*, expresso em macrófagos foi primeiramente identificado em camundongos e está associado à resistência natural a patógenos intracelulares como *Leishmania* (Bradley et al., 1979), *Salmonella* (Lissner et al., 1983) e *Mycobacterium* (Gros, 1981). Um polimorfismo identificado no gene *Nramp1* em camundongos torna os macrófagos resistentes à multiplicação da *Leishmania* e, conseqüentemente, impede a visceralização do parasita nos indivíduos, no início da infecção (Bradley, 1977; Bradley et al. 1979). Quando o produto deste gene foi identificado como a proteína macrofágica associada à resistência natural, verificou-se que esta foi a responsável pelo crescimento lento do parasita, nos macrófagos de camundongos, que apresentavam o alelo resistente (Vidal et al., 1995). A *Nramp1* é uma proteína transportadora de íons divalentes (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) localizada na membrana dos fagolisossomas de macrófagos (Gruenheid et al., 1997). Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas ela controla o conteúdo iônico da organela, o que interfere na multiplicação e sobrevivência dos parasitas intracelulares (Canonne-Hergaux et al., 1999; Forbes e Gros, 2001). Esta proteína possui efeitos pleiotrópicos sobre o sistema imunológico, pois, regulando o conteúdo iônico dos macrófagos interfere em diversas funções celulares, como

atividade enzimática e transcrição gênica (Blackwell et al., 2003).

A influência do *Nramp1* sobre a resistência ou susceptibilidade a diferentes patógenos intracelulares foi verificada, inicialmente, em estudos *in vitro* (Lissner et al., 1983; Stach et al., 1984; Olivier e Tanner, 1987) e *in vivo* (Gros et al., 1983; Crocker et al., 1984), nos quais se pretendeu estabelecer como este gene afeta a capacidade do macrófago de inibir a replicação intracelular de patógenos. Foi verificado em ensaios *in vitro*, após a infecção de macrófagos por patógenos intracelulares obrigatórios, que estas células apresentam taxas de infecção e de sobrevivência intracelular distintas, conforme terem sido isoladas de indivíduos resistentes (originam taxas menores) ou susceptíveis (originam taxas maiores), sugerindo, portanto, ser este um critério plausível para seleção destes indivíduos, nos quais se pretende estudar a influência de genes de resistência (Price et al., 1990; Campbell e Adams, 1992; Qureshi et al., 1996; Barthel et al., 2001).

Durante a execução do presente estudo, foi realizado, por outro grupo, o mapeamento e o sequenciamento do gene *Nramp1* na espécie canina, a partir do DNA genômico de um animal e foram pesquisadas mutações neste gene, que pudessem estar associadas à susceptibilidade à leishmaniose visceral. Para estas pesquisas, foi seqüenciado o cDNA do *Nramp1* de quatro cães da raça Beagle, que foram infectados, experimentalmente, com *L. infantum*, para determinação do fenótipo (resistência ou susceptibilidade). Verificaram-se nestes cães variações de seqüências de nucleotídeos no cDNA, entretanto, estas não se repetiram dentro dos indivíduos com um mesmo fenótipo. Foram verificadas variações

nas seqüências da região promotora do gene e em uma região microsatélite do intron1, as quais podem estar relacionadas com susceptibilidade a leishmaniose visceral canina (Altet et al., 2002).

A possibilidade destas variações de seqüência estarem associadas à resistência ou susceptibilidade à *Leishmania* na espécie canina foi verificada em estudos populacionais. A localização de uma região microsatélite (TAAA)_n no intron1 do gene *Nramp1* canino levantou a possibilidade de a mesma poder ser utilizada como um marcador genético de resistência ou susceptibilidade à leishmaniose visceral. Esta possibilidade foi testada em uma população de 117 cães, sendo 84 animais positivos para *L. infantum* e sintomáticos e 33 negativos com resposta imune celular positiva (avaliada por teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*). Foram detectados cinco alelos na região microsatélite (133, 137, 141, 145 e 149) e, destes, o alelo 145 foi significativamente mais freqüente nos indivíduos susceptíveis que nos resistentes, sugerindo uma associação entre este polimorfismo do gene *Nramp1* e susceptibilidade à leishmaniose (Altet et al., 2002).

Um segundo estudo populacional incluiu 97 cães de diferentes raças, sendo 40 animais fenotipicamente susceptíveis e 57 resistentes. Foram analisadas, no gene *Nramp1* destes animais, as regiões microsatélite do intron1 e promotora para verificação de polimorfismos. A região microsatélite do intron1 possui cinco diferentes alelos, sendo os alelos 141 e 145 os mais comuns; na região promotora foram verificados três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), em sítios de ligação genômica para fatores de

transcrição eucariotas e ainda, uma seqüência rica em G, na qual o número de G variou de 7 a 9. Os SNPs da região promotora foram significativamente mais freqüentes nos cães susceptíveis, o que pode estar relacionado com alterações no nível de expressão gênica do *Nramp1* (Sanchez-Robert et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi a clonagem e sequenciamento completos do cDNA do *Nramp1* canino e a detecção de polimorfismos na seqüência codificadora do gene que pudessem estar associados à resistência ou susceptibilidade à leishmaniose visceral canina e que, por isso, pudessem ser utilizados como marcadores genéticos de resistência através de testes moleculares.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletado sangue periférico da veia jugular em tubos heparinizados, de 29 cães adultos, hípidos, de ambos os sexos e de diferentes raças (Anexo 1). Os animais eram soronegativos para *Leishmania*, determinado pelos testes de imunofluorescência indireta (RIFI) (Camargo, 1966), ensaio imunoenzimático (ELISA) (Voller et al., 1979) e fixação de complemento (RFC) (Pellegrino e Brener, 1958). O sangue foi processado para isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e as células isoladas foram cultivadas, para promover sua diferenciação em macrófagos, conforme descrito por Bueno et al. (2005). Após dez dias, foi determinada a viabilidade celular, por meio de coloração com azul de tripan e a concentração das células ressuspensas foi ajustada para 300.000 células por ml. Os macrófagos foram semeados em lâminas contendo câmaras para cultivo

celular (chamber-slides) e foram infectados com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MCAN/BR/2002/BH400), isoladas de baço de um cão naturalmente infectado proveniente da área urbana de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil) e cultivado em meio α -MEM, pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina (50 UI/ml) a 24°C. A multiplicidade de infecção foi de 10 promastigotas por macrófago e os experimentos foram conduzidos em duplicatas. Nos períodos de 24 ou 72 horas de infecção, as células foram coradas com Giemsa modificado (Diff-Quick Laborclin, Pinhais, Brasil). Foi estabelecida a taxa média de infecção dos macrófagos (percentagem de macrófagos infectados por *Leishmania*, em duzentas células) para todos os cães do experimento. Foi determinado, individualmente, o número de amastigotas intracelulares por macrófago, contando-se 200 células em cada câmara, sendo duas câmaras por cão. O número de amastigotas intracelulares foi semi-quantitativamente estimado, por meio de um escore de 0 a 6, que corresponde ao número médio de amastigotas por macrófago, conforme descrito na Tab. 2.

Tabela 2: Sistema de escore utilizado na análise semi-quantitativa do número de amastigotas intracelulares de macrófagos infectados por *Leishmania chagasi*.

Número de amastigotas por macrófagos	Escore
1-4	1
5-8	2
9-12	3
13-16	4
17-20	5
> 20	6

A partir desta contagem, o escore de um cão, em cada período (24 ou 72 horas) foi estabelecido por meio da média ponderada, considerando a percentagem de macrófagos classificados dentro de cada categoria (escore 1 a 6). Portanto, um escore foi calculado para cada cão, em cada período e a diferença entre estes determinou se o animal era fenotipicamente resistente ou susceptível, permitindo ou limitando o crescimento de *Leishmania chagasi*, nos macrófagos em cultura (Sampaio, 2002).

Após a seleção dos cães, fenotipicamente resistentes ou susceptíveis, foram coletados 60 ml de sangue destes animais selecionados, para isolamento de RNA. O material foi processado conforme descrito por Bueno et al. (2005), para isolamento e cultura das células mononucleares de sangue periférico. Após dez dias, os macrófagos foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10ng/ml, durante quatro horas e, imediatamente após, seguiu-se o isolamento de RNA, conforme descrito previamente (Sambrook et al., 1989), que consistiu em lisar as células com 2ml de TRIZOL (total RNA isolation reagent) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) acrescentado, diretamente, nos frascos de teflon com cultura celular. A seguir, a separação de fase foi realizada a 4°C, por 15 minutos, com 400 µl de clorofórmio. A fase aquosa, contendo o RNA, foi precipitada do sobrenadante a 4°C, com 1ml isopropanol, por 10 minutos, a 20.000g. O RNA foi lavado com 2 ml de etanol 75% e diluído em 20 µl de água livre de RNAase.

As amostras de RNA foram dosadas em espectrofotometria e foram, qualitativamente, avaliadas por

meio de uma reação de RT-PCR (transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase) para a detecção da presença de RNA para a proteína constitutiva beta-actina. Utilizou-se o kit comercial Superscript One-Step RT-PCR com platinum Taq (Invitrogen) com iniciadores específicos para *beta-actina* canina (5'-ATCCACGAGACCACCTTCAACTCC-3' e 5'-CCACACAGAATACTTGCGTTCCG) (Invitrogen). A PCR foi realizada com 1µg de RNA em 50 µl de mistura, contendo tampão da reação (0,4mM de cada dNTP, 2,4mM MgSO₄), 10µM de cada iniciado, 50 unidades de transcriptase reversa e 5 unidades de Taq DNA polimerase. Os parâmetros da RT-PCR foram: produção do cDNA durante 30 minutos a 50°C, seguido de um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C e 40 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos a 57°C), e extensão (1 minuto e 20 segundos a 72°C) e um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C. O produto da PCR foi mantido a temperatura de 4°C e resolvido por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

Para a clonagem do gene *Nramp1* foi produzida a primeira fita de cDNA a partir do RNA total, por transcrição reversa, como previamente descrito (Kimmel e Berger, 1987). A transcrição foi realizada com o kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) com 1µg de RNA total em 12µl de mistura contendo 10µM de dNTPs e 0,5µg/µl de oligo dT (5'-CGGTATTTTCAGTCGGTGTTCAAACCTT...18Ts-3') (AlphaDNA, Montreal, Canada) e manter a 65°C por 5 minutos, seguido de resfriamento rápido em gelo. A segunda mistura de 9µl continha tampão da transcriptase reversa

(250mM Tris pH8,3; 375mM KCl; 15 mM MgCl₂) e 0,1M de DTT, sendo acrescentada à primeira mistura e incubada a 42°C, por 2 minutos. Acrescentaram-se, ainda, 50 unidades de transcriptase reversa, que foi incubada a 42°C, por 50 minutos e aquecida a 70°C, por 15 minutos, para inativação da reação. O cDNA *Nramp1* canino foi amplificado para a clonagem, em três segmentos maiores e nas terminações 5' e 3'. Os iniciadores específicos para a amplificação e o tamanho dos segmentos do cDNA do *Nramp1* originados estão mostrados na Tab. 3. Na Fig. 3 estão representados os segmentos clonados em relação ao cDNA.

A PCR foi realizada com 1µg de cDNA em 25 µl de mistura, contendo tampão

de reação 1B (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) (Tris-HCl 10 mM pH 8,4, KCl 50 mM, 0,1% Triton X-100, MgCl₂ 1,5mM), 2,5mM de cada dNTPs, 10µM de cada iniciador e 5 unidades de Taq DNA polimerase (Phoneutria). Os parâmetros da PCR foram: um passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 95°C), anelamento (30 segundos a 57°C), extensão (1 minuto a 72°C) e um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C. O produto da PCR foi mantido a temperatura de 4°C e resolvido por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, a 100 volts, por 50 minutos. Em todas as reações de amplificação foi feito controle negativo.

Tabela 3: Iniciadores específicos utilizados na clonagem do gene *Nramp1* canino dos animais selecionados como resistentes ou susceptíveis a infecção *in vitro* por *L. chagasi*.

Iniciadores	Seqüência de Nucleotídeos	Fragmento amplificado (tamanho)
Segmento 1	5'-CAAGGACCCCAAAGTGTA-3' (direto) 5'-CCTGGAGAAGCGCTACCTG-3' (reverso)	659 pb
Segmento 2	5'-GGGCTACGAGTACGTGGTG-3' (direto) 5'-CAGGTCGTTGAGACCTGACA-3' (reverso)	661 pb
Segmento 3	5'-TCAGGGACCTGAAAGACCTG-3' (direto) 5'-TGAGCACTCAACAGCATTCA-3' (reverso)	752 pb
Terminação 5'	5'-ATGACAGGTGACAAGGACCC-3' (direto) 5'-GCCAGCCTGAAGATCTGACT-3' (reverso)	246 pb
Terminação 3'	5'-GACCGAGTGGGAGTTTTGAA-3' (direto) 5'-AGACAAGAGAAGTGAAGTAGCATTTA-3' (reverso)	301 pb

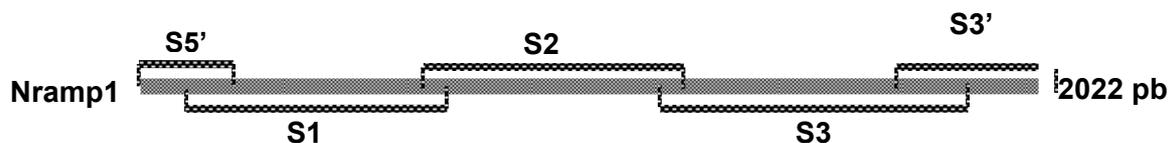


Figura 3: Mapa dos segmentos do cDNA do *Nramp1* clonado. Notar as regiões de sobreposição dos segmentos. Segmentos: S5' (1 a 246pb); S1 (12 a 671pb); S2 (600 a 1261pb); S3 (1243 a 1995pb); S3' (1721 a 2022pb).

Os produtos amplificados do cDNA do *Nramp1* canino foram ligados ao vetor pGem-T Easy (Promega, Madison, EUA). Esta ligação foi realizada com uma razão molar fragmento/vetor de 3:1, utilizando 3 unidades de T4 DNA ligase em tampão de ligação (Tris-HCl 60mM pH 7.8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20mM, ATP 2 mM, 10% (p/v) polietilenoglicol 8000), em um volume final de 10µl, por 12 horas a 4°C. Os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformar bactérias hospedeiras *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes. Estas bactérias (50µl) foram incubadas com 3µl de cada produto de ligação por 5 minutos, em gelo. Como controle positivo da transformação, foi feita incubação com 10 ng do vetor pUC18 intacto. Como controle negativo da reação, as células DH5α foram incubadas sem plasmídio. Após a incubação, as bactérias foram submetidas a uma descarga elétrica de 3400 volts por 2,5 milisegundos em eletroporador Micro Pulser (BioRad, San Jose, EUA). Após o choque elétrico, foram adicionados 600µl de meio de cultura 2XYT (extrato de levedura 1%, peptona 1,6%, NaCl 0,5% pH 7,0) às bactérias, que foram incubadas por 1 hora a 37°C, sob agitação. As bactérias foram plaqueadas em meio 2XYT ágar, contendo ampicilina e incubadas por 18 horas a 37°C.

Para confirmar a presença do cDNA do *Nramp1* clonado, nos vetores pGem-T easy nos clones de bactérias recombinantes, crescidas em placas com meio de cultura 2XYT e ampicilina foi feita uma PCR de colônia. Para a mistura de um volume de 10µl foram utilizados 0,2µM de cada iniciador, 200µM de cada dNTP, 0,5U de Taq DNA polimerase e tampão de reação 1B (Phonotria). Os clones escolhidos foram isolados na placa com palito esterilizado e inoculados em tubos de eppendorf contendo a mistura de PCR. Os parâmetros para a PCR foram os mesmos utilizados para a amplificação inicial. A amplificação foi confirmada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Dez clones de cada construção contendo o inserto de interesse foram crescidos por 18 horas a 37°C em 3,0 ml de meio 2XYT líquido, suplementado com ampicilina, sob agitação, para extração dos plasmídios. Esta extração foi realizada utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme orientação do fabricante.

Os plasmídios foram seqüenciados no aparelho de sequenciamento automático de DNA MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido), segundo método de terminação de cadeia de dideoxinucleotídeo, descrito por

Sanger et al. (1977). Na reação de sequenciamento foram utilizados 200 a 350 ng de DNA, 10 pmol de iniciador e 4 μ l do kit DYEnamic ET dye terminator Mega BACE (Amersham Biosciences). Os iniciadores utilizados foram universais M13 direto e reverso. A confirmação de que as seqüências obtidas foram do gene *Nramp1* foi realizada testando-as contra a seqüência parcial depositada no GenBank (AF091049), no Sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), de acesso livre no NCBI (National Center for Biotechnology Information), no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov. A checagem da qualidade das seqüências obtidas e a montagem e o alinhamento dos consensos para a observação de polimorfismos entre os animais resistentes ou susceptíveis foram realizadas no programa ChromasPro1.33 (Technelysium), utilizado para leitura e alinhamento dos cromatogramas (Anexo 2). Para a análise comparativa das seqüências de aminoácidos das traduções dos cDNAs do *Nramp1* obtida nesse estudo e previamente depositada no GenBank, foi utilizado o programa MacVector 7.2.3 (Accelrys).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de infecção obtida para a população dos 29 cães estudados foi de 76%, no período de 24 horas e 76,5%, no período de 72 horas, resultado este semelhante ao descrito na literatura para testes de infecção *in vitro* com *Leishmania* e macrófagos caninos (Madeira et al., 1999) ou macrófagos de camundongos (Rodriguez et al., 2004), que foram cultivados em condições semelhantes. Além disso, este resultado mostra que não houve re-infecção das células entre os períodos de 24 e 72 horas, pois o número de macrófagos infectados para os dois períodos foi constante, indicando que o aumento ou

a diminuição do número de formas amastigotas no interior dos macrófagos foi devido à multiplicação ou a morte do parasita, respectivamente.

Os períodos de infecção utilizados no presente trabalho, ou seja, 24 e 72 horas, foram escolhidos após um ensaio experimental prévio, no qual se utilizaram vários períodos de infecção (6, 12, 24, 48 e 72 horas) e observou-se que em períodos inferiores a 24 horas, ainda não havia multiplicação suficiente do parasita para avaliar a resposta do macrófago à infecção. No período entre 24 e 48 horas já foi possível observar multiplicação do parasita, em alguns casos, no entanto, após 72 horas esta diferença foi mais evidente.

Após dez dias de cultivo celular, a maioria das células apresentou características morfológicas típicas de macrófagos como: tamanho aumentado, expansões citoplasmáticas, núcleo vesiculoso e claro, nucléolo evidente e presença de células binucleadas (Fig. 4). Estes achados foram semelhantes aos relatados na literatura para macrófagos caninos isolados de medula óssea (Tipold et al., 1998), peritônio (Madeira et al., 1999; Gonçalves et al., 2005), linhagem celular 030-D (Pinelli et al., 2000) e sangue periférico (Sisto et al., 2001). Além disso, foi determinado por meio de citometria de fluxo, que em cultivos celulares realizados nas mesmas condições descritas (Bueno et al., 2005), mais de 80% das células, após 10 dias de cultivo, apresentaram marcação positiva para a molécula de superfície celular CD14, que é marcador de monócito/macrófago (Janeway et al. 2001), demonstrando que o método de isolamento e cultivo resultou em forte seleção de células com características fenotípicas de macrófagos.

Durante a avaliação da taxa de infecção dos macrófagos observou-se que as células apresentavam quantidades distintas da forma amastigota da *L. chagasi* intracitoplasmática, indicando maior ou menor sobrevivência do parasita (Fig. 4), sendo que em algumas células o número de amastigotas intracitoplasmáticas era contado com exatidão e em outras não, devido ao número elevado de parasitas. A partir desta observação, foi desenvolvido um sistema de escore, que permitiu a estimativa semi-quantitativa do número de amastigotas nos macrófagos, que foi importante para estabelecer a taxa de sobrevivência dos parasitas nas células dos cães e, com isso, selecionar os indivíduos resistentes e susceptíveis.

Os cães resistentes e susceptíveis à infecção *in vitro* pela *L. chagasi* foram selecionados, então, a partir dos resultados estabelecidos por meio do sistema de escore e que estão demonstrados na Tab. 4. Os cães 6 e 18 foram selecionados como fenotipicamente susceptíveis, pois ambos tiveram aumento de mais que 1,5 em seu escore, o que corresponde a mais que 1,96 vezes o desvio padrão, indicando que pertencem ao grupo dos animais 2,5% mais susceptíveis da população estudada. Os cães 22 e 24 foram selecionados como

fenotipicamente resistentes pois, a partir do sistema de escore, tiveram uma diferença negativa e alta entre os períodos de 72 e 24 horas. O cão 22 teve uma diferença maior que 1,96 vezes o desvio padrão. Estes quatro cães foram selecionados para o estudo de identificação de polimorfismos nas seqüências do cDNA do *Nramp1*.

Foi possível observar, microscopicamente, que houve diferença entre as culturas celulares dos cães resistentes e susceptíveis, no que diz respeito ao número de amastigotas de *L. chagasi* intracitoplasmáticas. Os macrófagos dos cães 22 e 24, selecionados com fenótipo resistente, apresentaram número menor de formas amastigotas (Fig. 5), quando comparados com aqueles dos cães susceptíveis (6 e 18) (Fig. 6), indicando que as células dos animais resistentes foram capazes de inibir a multiplicação do parasita.

Na cultura de macrófagos de ambos os cães selecionados como fenotipicamente susceptíveis observou-se aumento do número de macrófagos classificados no escore de 3 a 6, entre as 24 e 72 horas, após a infecção por *L. chagasi*, indicando aumento do número, ou seja, proliferação de amastigotas intracelulares (Fig.7).

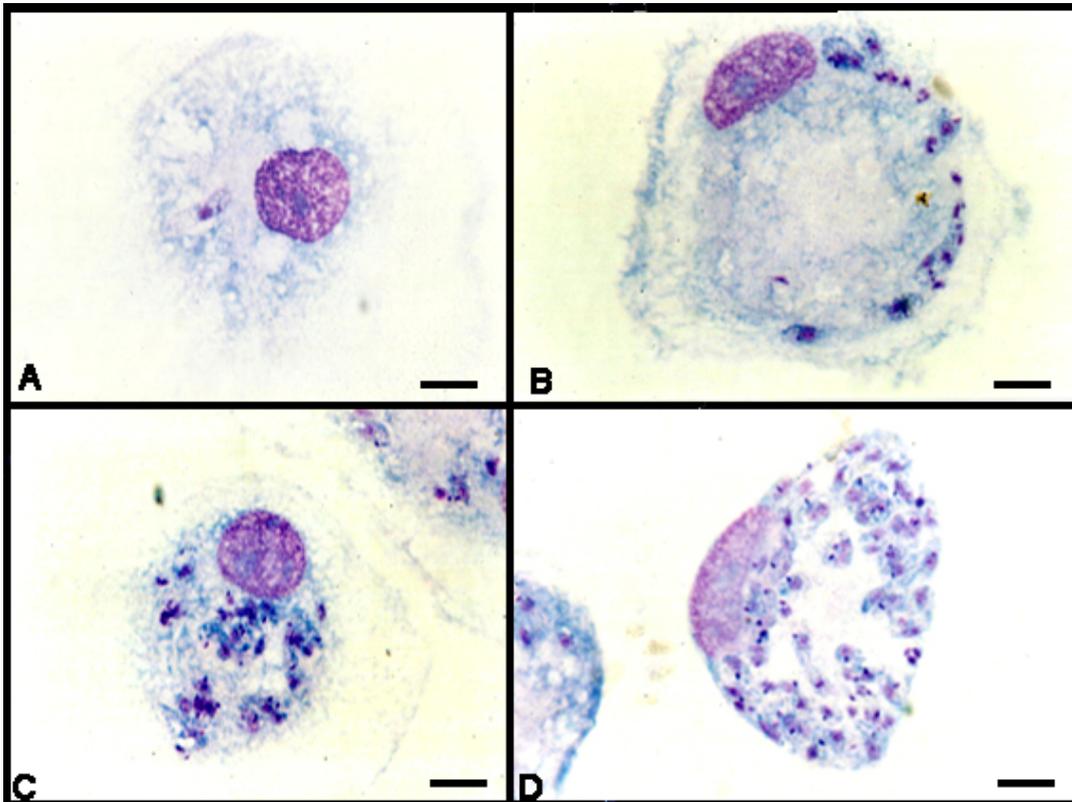


Figura 4: (A/B/C/D) Macrófagos derivados de monócito do sangue periférico canino, aos dez dias de cultivo, após 24 horas de infecção com *L. chagasi*, mostrando quantidades distintas de formas amastigotas do parasita intracitoplasmáticas. Giemsa modificado. Barra = 20 μm .

Tabela 4: Resultado do escore estabelecido a partir da contagem do número de amastigotas de *L. chagasi* em macrófagos, após 24 e 72 horas de infecção, de 29 cães analisados para resistência ou susceptibilidade a leishmaniose visceral.

Cão	Escore – 24h	Escore –72h	Diferença de Escore de 72 e 24h
1	2.880	2.805	-0.075
2	1.605	1.845	0.24
3	1.835	1.810	-0.025
4	1.395	1.170	-0.225
5	1.815	1.990	0.175
6 *	1.765	3.300	1.535
7	1.410	1.715	0.305
8	1.600	2.165	0.565
9	1.280	0.910	-0.37
10	1.580	1.260	-0.32
11	1.605	1.275	-0.33
12	1.380	1.680	0.3
13	1.305	0.960	-0.345
14	2.080	2.300	0.22
15	1,365	1,724	0,359
16	1.285	0.980	-0.305
17	1.21	0.945	-0.265
18 *	1.695	3.22	1.525
19	2.39	2.0	-0.39
20	2.455	2.93	0.475
21	1.745	2.405	0.66
22 **	2.035	0.935	-1.1
23	1.34	0.86	-0.48
24 **	3.825	3.02	-0.805
25	2.145	2.07	-0.075
26	2.265	3.25	0.985
27	1.37	1.37	0.0
28	2.575	2.55	-0.025
29	2.105	3.075	0.97
Média	1.83931	1.948931	0.109621
Desvio Padrão	0.584014	0.808413	0.480203
			1.96 SD *** = 0.941196

* Cães fenotipicamente susceptíveis; ** Cães fenotipicamente resistentes. *** Cães susceptíveis e resistentes apresentaram, preferencialmente mais que 1,96 vezes o desvio padrão (SD), o que indica que eles pertencem ou à classe 2,5% mais resistente ou à classe 2,5% mais susceptível, considerando a população estudada (Sampaio, 2002).

O número de macrófagos classificados no escore 1 aumentou entre 24 e 72 horas, após inoculação, no caso do cão 22, enquanto o número de macrófagos classificados em todos os demais escores diminuiu no mesmo período, indicando diminuição no número de formas amastigotas intracelulares, o que sugere que os macrófagos deste cão, classificado como resistente, foram capazes de inibir a multiplicação

intracelular do parasita. Na cultura celular do animal 24, houve aumento do número de macrófagos classificados nos escores 1, 3 e 6, entre 24 e 72 horas, após inoculação. No entanto, no mesmo período, houve diminuição do número de macrófagos classificados com escores 4 e 5 e o número de macrófagos classificados com escore 2 se manteve estável (Fig. 8). Este quadro originou a segunda maior diferença

negativa entre os escores dos períodos de 72 e 24 horas (Tab. 4), resultando na seleção deste cão como fenotipicamente resistente.

O critério de seleção de cães resistentes ou susceptíveis a *L. chagasi* utilizado neste trabalho foi baseado na cultura e inoculação de culturas primárias de macrófagos *in vitro*. Este mesmo critério foi utilizado, anteriormente, para a espécie bovina, a partir de macrófagos diferenciados de monócitos isolados de sangue periférico ou glândula mamária e infectados *in vitro* com patógenos intracelulares (*Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica* sorotipos Dublin e Typhimurium), sendo que os animais dos quais foram obtidos os macrófagos, foram posteriormente desafiados *in vivo* com *B. abortus*. Foi observado que os bovinos, cujos macrófagos foram capazes de controlar a multiplicação intracelular dos patógenos, também tiveram características de resistência frente ao desafio *in vivo* por *B. abortus*, portanto, segundo os autores, o critério de seleção, por meio de análises *in vitro* pode ser utilizado como marcação fenotípica de resistência ou susceptibilidade (Price et al., 1990; Qureshi et al., 1996).

No presente trabalho, os cães selecionados resistentes assim o foram, porque seus macrófagos apresentaram maior eficiência em controlar a replicação intracelular do parasita, ou seja, tiveram atividade anti-leishmanial aumentada, se comparados com os animais selecionados susceptíveis e, acredita-se que esta diferença possa estar relacionada com maior ou menor produção de NO dos macrófagos, nos cães resistentes e susceptíveis,

respectivamente, se considerados estudos que demonstraram a importância do NO para a inativação intracelular da *Leishmania* (Panaro et al., 1998; Pinelli et al., 2000; Sisto et al., 2001). Considerando que o gene *Nramp1* atua sobre o sistema imunológico, por meio de seus efeitos pleiotrópicos, modificando, inclusive, níveis de atividade enzimática como da iNOS, tal como foi observado em camundongos, que possuem o alelo resistente deste gene e tem maior produção de reativos tóxicos do oxigênio, inclusive NO (Blackwell et al., 2001; Fritsche et al., 2003), podemos formular a hipótese de que houve a participação do *Nramp1* na atividade anti-leishmanial dos macrófagos, que resultou no controle da multiplicação do parasita nos animais resistentes.

Para a clonagem e o sequenciamento do gene *Nramp1* foi isolado RNA total, a partir dos macrófagos dos cães selecionados. A qualidade deste RNA foi avaliada por meio de RT-PCR, com iniciadores específicos para o gene da *beta-actina* canina, que amplificaram um fragmento de 200 pares de base (pb) a partir do RNA isolado dos cães, demonstrando a integridade das amostras (Fig. 9). A concentração total de RNA isolado, a partir da cultura de macrófagos variou entre as culturas celulares dos animais entre 25 a 40 µg.

Todos os segmentos do *Nramp1* canino (segmentos 1, 2, 3 e terminações 3' e 5') foram amplificados para a realização da clonagem, conforme descrito na Tab. 3 e Fig. 3, sendo que uma reação de PCR representativa está demonstrada na Fig. 10.

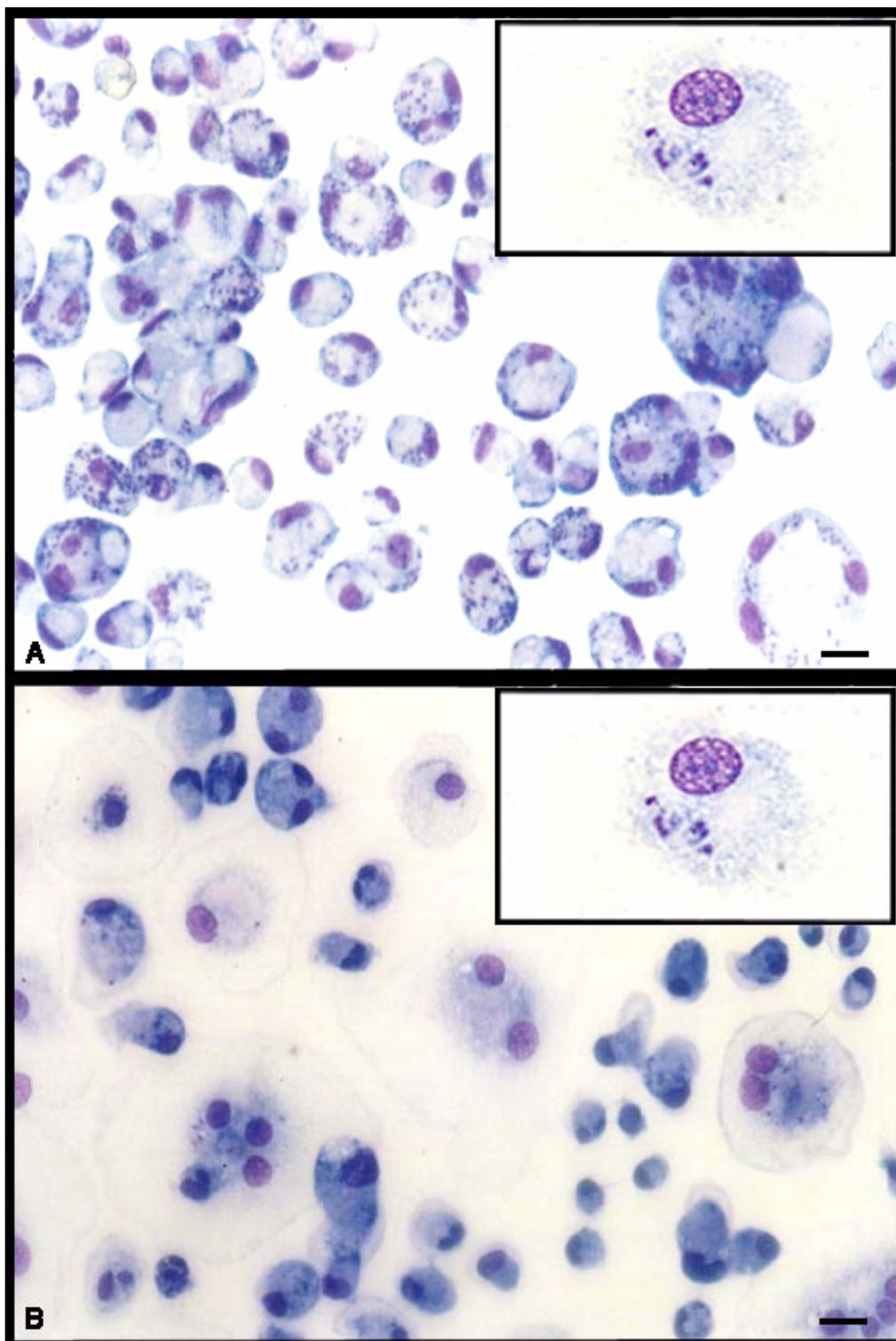


Figura 5:(A/B) Macrófagos derivados de monócitos isolados do cão 22, com dez dias de cultura, após 24 (A) e 72 (B) horas de infecção com *L. chagasi*. Em detalhe: macrófagos contendo formas amastigotas do parasita em degeneração. Giemsa modificado. Barra = 50 μ m.

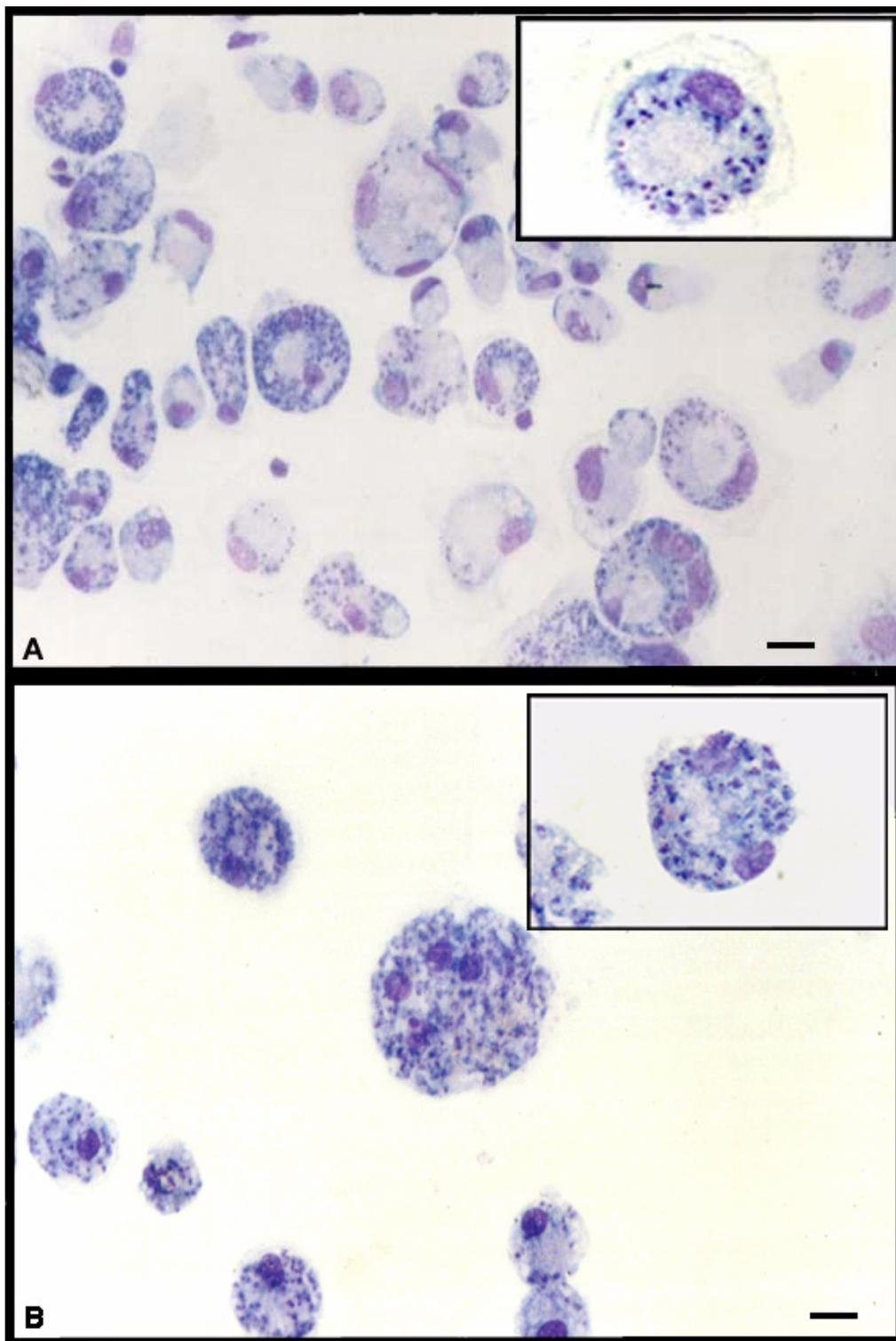


Figura 6: (A/B) Macrófagos derivados de monócitos isolados do cão 6, com dez dias de cultivo, após 24 (A) e 72 (B) horas de infecção com *L. chagasi*. Em detalhe: macrófagos com incontáveis formas amastigotas do parasita intracitoplasmáticas. Giemsa modificado. Barra = 50 μ m.

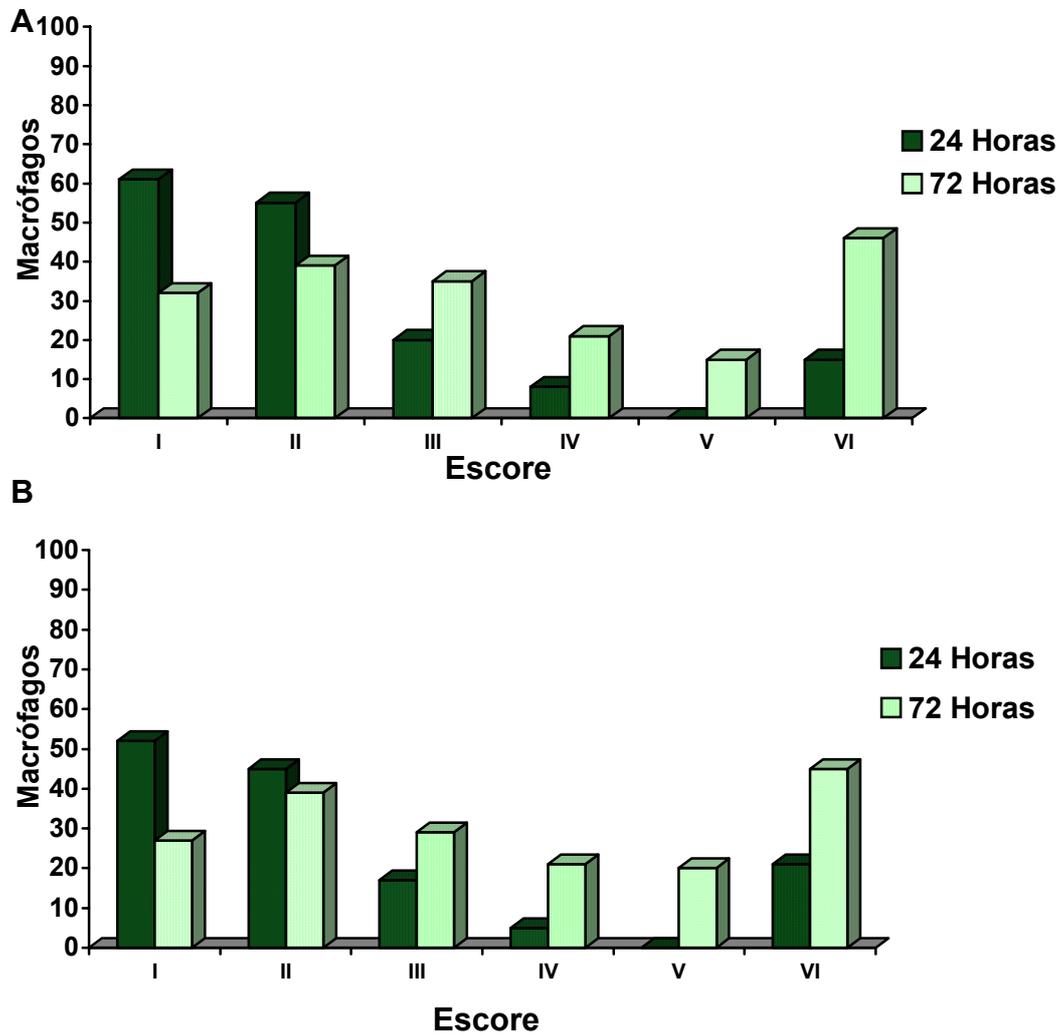


Figura 7: Número de macrófagos infectados com a forma amastigota de *L. chagasi*, nos períodos de 24 e 72 horas, para os cães seis (A) e 18 (B), selecionados fenotipicamente susceptíveis, pelo sistema de escore. Escore: I = 1 a 4 amastigotas; II = 5 a 8; III = 9 a 12; IV = 13 a 16; V = 17-20; VI \geq 20.

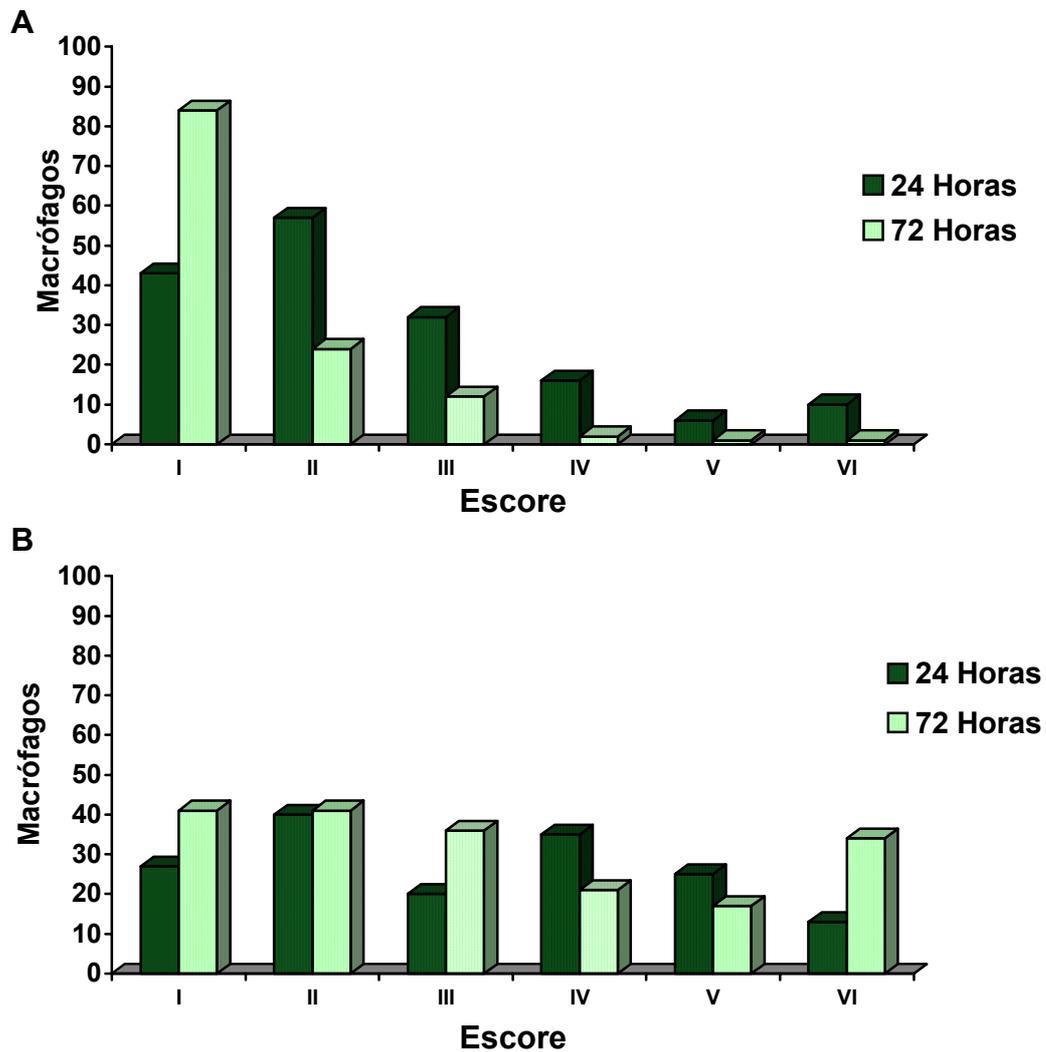


Figura 8: Número de macrófagos infectados com a forma amastigota de *L. chagasi*, nos períodos de 24 e 72 horas, para os cães 22 (A) e 24 (B), selecionados fenotipicamente resistentes pelo sistema de escore. Escore I = 1 a 4 amastigotas; II = 5 a 8; III = 9 a 12; IV = 13 a 16; V = 17-20; VI \geq 20.

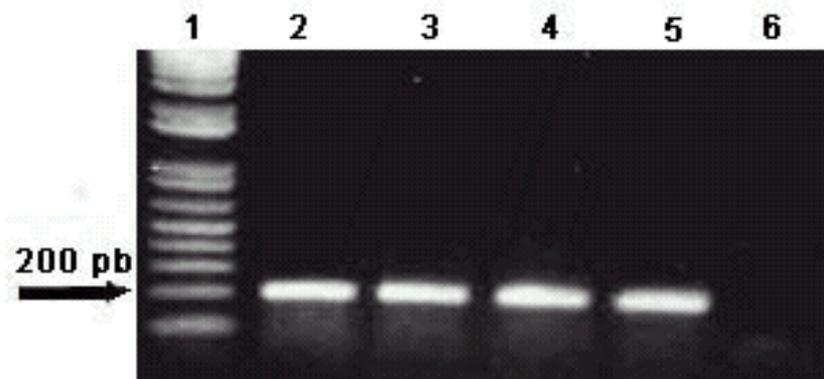


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando, nas canaletas de 2 a 5 o produto de amplificação com iniciadores para *beta-actina* canina, para os cães 22, 6 18 e 24, respectivamente. Na canaleta 1, padrão de tamanho molecular (1kb ladder, Invitrogen) e na canaleta 6 o controle negativo, sem DNA.

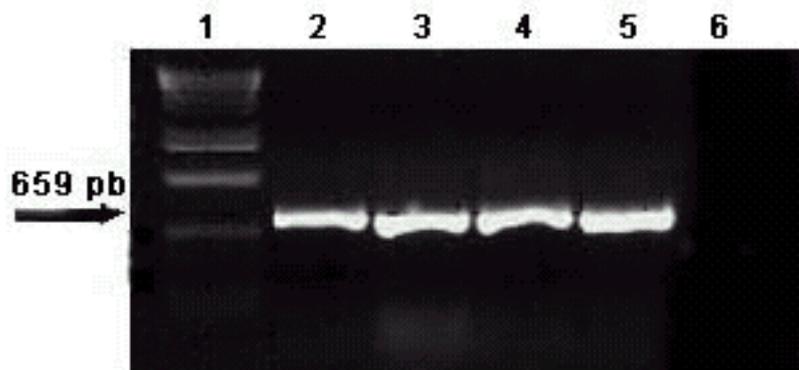


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando na canaleta 1 o padrão de tamanho molecular (1kb ladder, Invitrogen) e nas canaletas 2 a 5 os produtos de amplificação do segmento 1 do gene *Nramp1* canino, dos cães 22, 6, 18 e 24, respectivamente, utilizando iniciadores específicos delineados para a reação, que originaram um produto de 659 pb. Na canaleta 6, o controle negativo da reação, sem DNA

Os produtos amplificados do gene *Nramp1* canino foram ligados ao vetor e os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformação de bactérias hospedeiras *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. As bactérias cresceram em meio 2XYT, por 18 horas e o DNA plasmidial foi isolado, após terem sido verificados os clones positivos, por meio de PCR de colônia (Fig. 11). Foram seqüenciados de cinco a dez clones de cada segmento de cada animal. As seqüências obtidas foram analisadas no programa BLAST, para checagem de identificação com o *Nramp1* canino (GenBank AF091049) e foram então utilizadas para a obtenção do consenso. Os consensos de cada segmento, obtidos a partir do sequenciamento de vários clones, foram alinhados para a obtenção do consenso do cDNA do gene *Nramp1* de cada cão, após terem sido retirados de cada seqüência os segmentos de baixa qualidade, por conter inclusão imprecisa de nucleotídeos, conforme evidenciado pelo cromatograma (Anexo 3) ou àqueles correspondentes ao vetor. Foram utilizadas, no mínimo, quatro destas seqüências, de cada segmento do *Nramp1*, de cada cão para a obtenção dos consensos. A seqüência do cDNA do *Nramp1* canino obtida no presente estudo foi depositada no GenBank, sob o número de acesso DQ784645.

Um consenso final foi obtido a partir do consenso de cada cão e obteve-se uma seqüência de 2022 pb para o cDNA do gene *Nramp1* dos cães selecionados como resistentes ou susceptíveis. Na análise de variação de seqüência deste consenso foi possível determinar ausência de polimorfismos entre os cães (Anexo 4), uma vez que os quatro cães apresentaram seqüências absolutamente idênticas. A partir do alinhamento da seqüência do cDNA do

gene *Nramp1* canino originada no presente trabalho e a seqüência previamente depositada no GenBank (AF091049) (Altet et al., 2002) verificou-se 99% de identidade entre elas, sendo 2018 pb iguais de uma seqüência completa de 2022 pb. Os nucleotídeos que diferem entre as duas seqüências estão nas posições 1238, 1608, 1652 e 1892 e as alterações de bases foram de T para C, C para T, T para C e G para A, respectivamente, entre a seqüência no GenBank (AF091049) (Altet et al., 2002) e a deste trabalho (Fig. 12; Anexo 3). A comparação entre o cDNA do gene *Nramp1* canino seqüenciado neste trabalho com o das espécies humana e murina indicou 89% de identidade entre elas, resultado este semelhante ao relatado por Altet et al. (2002).

A ORF (open reading frame) do cDNA do gene *Nramp1* canino (que corresponde a região codificadora do gene) do presente trabalho está localizada entre os nucleotídeos 1 a 1641, originando uma proteína de 547 aminoácidos (Fig. 13). Esta seqüência de aminoácidos tem identidade de 99% com a seqüência da proteína *Nramp1* canina disponível (Altet et al., 2002), diferindo em apenas um aminoácido na posição 413, onde a seqüência previamente depositada no GenBank indica uma valina (V), enquanto a seqüência obtida no presente estudo indica uma alanina (A) (Fig. 13). Estes aminoácidos são ambos apolares e, por isso, tal diferença não resultaria em alterações significativas na proteína, o que foi confirmado, por meio de uma minuciosa análise de comparação entre as seqüências da proteína previamente depositada no GenBank (número de acesso AF091049; Altet et al., 2002) e a seqüência obtida neste estudo, em relação a características de hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, domínios transmembrana, conformação e estrutura secundária (Anexo 4).

O gene *Nramp1* canino foi seqüenciado anteriormente por Altet et al. (2002), a partir do DNA genômico de um cão da raça *Rottweiler*. Este grupo também verificou a existência de possíveis polimorfismos que pudessem estar associados à leishmaniose visceral e encontraram variações no cDNA do *Nramp1* canino, em quatro cães da raça *Beagle*, sendo que dois animais foram classificados fenotipicamente como resistentes e dois susceptíveis, após terem sido infectados, experimentalmente, com *L. infantum*. As variações de seqüência encontradas que resultaram em substituição de aminoácidos na proteína foram quatro SNPs que causaram três substituições de aminoácidos em domínios transmembrânicos, sendo duas em um dos cães susceptíveis e a outra em um cão resistente, que também teve perda de um sítio de N-glicosilação da proteína. No entanto, estas variações de seqüência não foram consistentes com o fenótipo de resistência e susceptibilidade, pois não se repetiram nos cães com o mesmo fenótipo.

No presente trabalho, a análise de variação de seqüência demonstrou não existir polimorfismos no cDNA do gene *Nramp1* entre os cães selecionados como resistentes e susceptíveis. Para a afirmação deste resultado, foram utilizados cinco a dez clones de cada segmento de cada cão, enquanto em Altet et al. (2002) as seqüências obtidas, que tiveram variações de nucleotídeos foram geradas a partir de dois clones, o que pode ter sido a causa da diferença de resultados nos dois trabalhos.

Das variações de seqüência do *Nramp1* canino já estudadas, quanto a sua associação à resistência ou susceptibilidade à leishmaniose visceral, as que tiveram esta associação confirmada estão localizadas no intron1 e região promotora do gene (Altet et al., 2002; Sacherz-Robert et al., 2005), isto é, fora da região codificadora. No presente trabalho, o estudo de polimorfismo se baseou na região codificadora (cDNA) e identificou ausência de polimorfismo no gene *Nramp1* canino entre os quatro animais selecionados.

O *Nramp1* é um gene essencial e, por isso, mutações em sua região codificadora não são comuns (Blackwell e Searle, 1999). Existem evidências de que, mesmo em camundongos, a mutação pontual que causa uma substituição de aminoácido da proteína e que anula sua função, determinando susceptibilidade nos indivíduos (Vidal et al., 1993) só exista em linhagens puras e não é bem tolerada na população, pois não foi encontrada em camundongos provenientes de áreas endêmicas para leishmaniose visceral (Blackwell, 1983; Blackwell, 1998). O que, segundo os autores, demonstra que a participação deste gene possa ser tão fundamental na ativação precoce de macrófagos, que polimorfismos que anulam a função da proteína, não são bem tolerados na população, o que é concordante com o resultado encontrado no presente trabalho.

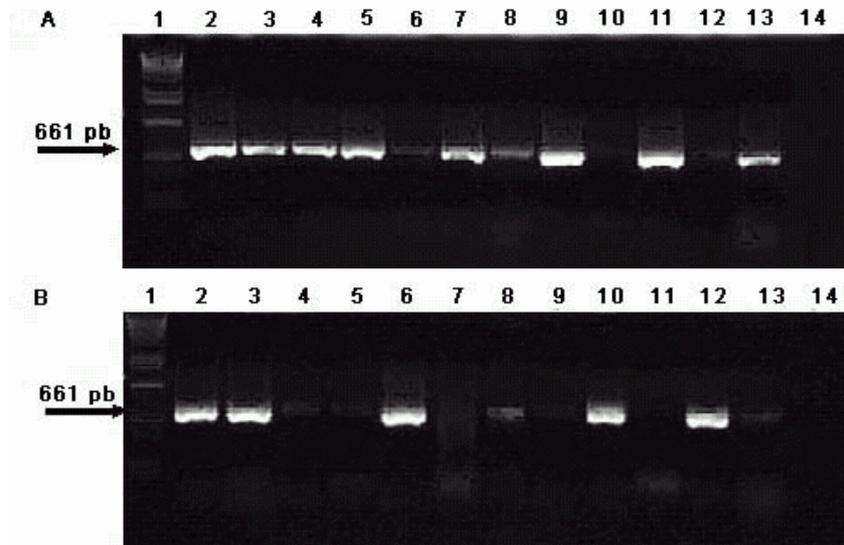


Figura 11: (A/B) Eletroforese em gel de agarose mostrando o PCR de colônias de bactérias transformadas com os plasmídios pGemT easy/Segmento 2 (gene *Nramp1* canino).

A - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando na canaleta 1 o padrão de tamanho molecular (1kb ladder, Invitrogen), nas canaletas 2 a 13 o resultado positivo ou negativo dos clones, conforme a presença ou não de banda, oriundos dos produtos de amplificação de 661 pb do cão 24 e na canaleta 14 o controle negativo da reação, sem DNA.

B - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, mostrando na canaleta 1 o padrão de tamanho molecular (1kb ladder, Invitrogen), nas canaletas 2 a 13 o resultado positivo ou negativo dos clones, conforme a presença ou não de banda, oriundos do produto de amplificação de 661 pb do cão 18 e na canaleta 14 o controle negativo da reação, sem DNA.

1210-TGCGCCATCCTGCCACCGTGCTCGTGG	C	AGTCTTCAGGGACCTGAAAGAC-1260
1210-TGCGCCATCCTGCCACCGTGCTCGTGG	T	AGTCTTCAGGGACCTGAAAGAC-1260

1570-CTGGCCCACAGCTCCCATCAACACTTCTGTATGGGCT	T	CCTGATGTGGAG-1620
1570-CTGGCCCACAGCTCCCATCAACACTTCTGTATGGGCT	C	CCTGATGTGGAG-1620

1630-AAGATCTCTGGGTGAACTCCCA	C	GCAGTGCCCGCTAGGGGGTGAATGAG-1680
1630-AAGATCTCTGGGTGAACTCCCA	T	GCAGTGCCCGCTAGGGGGTGAATGAG-1680

1865-CATTTTAAACACAGTGCCTGACATTTTG	A	GACTTAAAAATAATAGTAATTCCAAAA-1920
1865-CATTTTAAACACAGTGCCTGACATTTTG	G	GACTTAAAAATAATAGTAATTCCAAAA-1920

Figura 12: Segmentos do cDNA do gene *Nramp1* canino que apresentaram diferença de nucleotídeos entre a seqüência originada no presente trabalho (linha superior) e a seqüência previamente depositada no GenBank (AF091049) (linha inferior).

(A)

MTGDKDPQSVSRPNYGSISHPPSSEPQQEPLRTTYLSEKIPIPDTEPGTFSLRKLWAF
TGPGFLMSIAFLDPGNIESDLQAGAVAGFKLLWLLWATVLGLLCQRLAARLGVVTGK
DLGEICHLYYPKVPRTLLWLTIELAIVGSDMQEVIGTAIAFSLLSAGRIPLWGGVLITIVD
TFFFLFDNYGLRKLEAFFGILITIMALTFGYEYVVARPAQVALLQGLLLPSCPGCGRPE
LLQAVGIVGAIIMPHNIYLHSALVKSREIDRSRRPDIREANMYFLIEASIALSVSFFINLFV
VAVFGQAFYQQTNEAAFNVCANSSLHDYAKIFPRNLTVEVDIYQGGVMLGCVFGPA
ALYIWAVGLLAAGQSSTMTGTYAGQFVMEGFLRLRWSRFARVLLTRSCAILPTVLVAV
FRDLKDL SGLNDLLNVLQSLLLPFAVLPILTFTSMPALMQEFANGRLSKAITSFIMALVC
AINLYFVVIYLPSPHPAYFILVALLAIVYLGLTTYLVWTCFIAHGVTL LAHSSHQHFLYGL
PDVEEK GKISG

(B)

(a) 401	RWSRFARVLLTRSCAILPTVLV	V	VFRDLKD	420
(b) 401	RWSRFARVLLTRSCAILPTVLV	A	VFRDLKD	420

Figura 13: (A) Seqüência de aminoácidos da proteína Nramp1 originada a partir da seqüência consenso do cDNA do gene *Nramp1* canino, obtido no presente trabalho. (B) Segmento da proteína Nramp1 em qual ocorreu mudança de aminoácido valina (V) para alanina (A) na posição 413, entre a seqüência depositada previamente no GenBank (a) e a seqüência originada no presente trabalho (b).

Por outro lado, a participação do gene *Nramp1* na resistência a patógenos intracelulares é bastante difundida e parece ser determinada por polimorfismos na região promotora do gene, que influenciariam os seus níveis de expressão (Blackwel e Searle, 1999). Em humanos, foi observado que uma seqüência de repetição polimórfica da região promotora do gene direciona os níveis de expressão gênica nos indivíduos, o que foi correlacionado com susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas e auto-imunes (Searle e Blackwell, 1999; Zaahl et al., 2004). Esta condição já foi confirmada em estudos populacionais que associaram polimorfismos da região promotora do *Nramp1* em humanos e susceptibilidade a doenças como tuberculose (Shaw et al., 1997; Bellamy et al., 1998) e leishmaniose (Bucheton

et al., 2003; Mohamed et al., 2004). Também na população canina polimorfismos na região promotora foram associados resistência a leishmaniose visceral e estão localizados em sítios genômicos de ligação para fatores de transcrição, o que sugere influência na expressão gênica (Altet et al., 2002; Sanchez-Robert et al., 2005.). Acredita-se que esta condição poderá ser utilizada para direcionar futuros estudos de localização de marcadores moleculares de resistência à leishmaniose visceral canina, considerando que no presente estudo foi confirmado ausência de polimorfismo na região codificadora do gene.

Devido à grande complexidade na interação entre patógeno e hospedeiro, o controle da infecção natural e da

doença resultante raramente será determinado por um único gene (Adams e Templeton, 1998). O gene *Nramp1* participa na resistência ou susceptibilidade a patógenos intracelulares nos indivíduos, contudo, outros genes envolvidos nas vias de ativação dos macrófagos, que possam influenciar diretamente a defesa inata, ou mesmo a adquirida, por mecanismos indiretos podem contribuir para a resistência natural a doenças, caracterizando, portanto, uma influência poligênica sobre esta condição (Blackwell, 1996; Tuite e Gros, 2006).

A realização de análises de escaneamento do genoma murino, de indivíduos com fenótipos distintos para leishmaniose, com intuito de identificação de regiões candidatas a genes responsáveis pelo controle da doença, ou seja, pela resistência natural dos indivíduos foi fundamental para a caracterização da influência poligênica sobre a resistência natural. Nestas análises foram identificadas cinco regiões, entre elas, o *Nramp1* e genes ligados ao MHCII. Devido apresentar conservada sintonia com o genoma humano, estas mesmas regiões vem sendo estudadas no homem, para verificar a influência que exercem sobre a condição de resistência natural (Blackwell et al., 1998). Na espécie canina, além das informações disponíveis sobre o papel do *Nramp1* na resistência à leishmaniose visceral, disponibilizadas pelo presente trabalho, por Altet et al. (2002) e por Sanchez-Robert et al. (2005), também Quinnell et al. (2003b) encontraram associação entre alelos ligados ao gene *MHCII* e resistência à leishmaniose visceral, caracterizando controle, ao mínimo, oligogênico sobre a manifestação da doença nos cães. Assim, a influência genética sobre a resistência natural à leishmaniose visceral, na espécie

canina, parece ser determinada por mais que um gene e o estudo destes é importante para o entendimento dos mecanismos imunológicos que são desencadeados na infecção e para a prática de seleção genética dos animais, o que seria uma ferramenta auxiliar no controle desta zoonose.

3.4. CONCLUSÃO

Não foram encontrados polimorfismos no cDNA do gene *Nramp1* canino, quando comparadas as seqüências de cães fenotipicamente resistentes ou susceptíveis a infecção *in vitro* dos macrófagos por *Leishmania chagasi*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; IINUMA, Y.; ANDO, M. et al. NRAMP1 polymorphisms, susceptibility and clinical features of tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, v.46, n.4, p.215-20, 2003.
- ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.17, p.200-19, 1998.
- ADEREM A.; UNDERHILL D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, v.17, p.593-623, 1999.
- AGUT, A.; CORZO, N.; MURCIANO, J.; et al. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v.153, p.648-52, 2003.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.*, v.112, p.2993-3002, 1999.

- ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUZA-ATTA, M.L.B. et al., Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v.127, p.227-32, 2005.
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Mapping and sequencing of canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect. Immun.*, v.70, p.2763-71, 2002.
- ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.C.P.; MAYRINK, W. et al. Evaluation of the immune response and production of interferon in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Med. Vet.*, v.150, n.10, p.809-14, 1999.
- ANDRADE H.M.; REIS, A.B.; DOS SANTOS, S.L. et al. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.*, 2006 (no prelo)
- ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.2, n.2, p.145-46, 1996.
- ASAOKA, Y.; YOSHIDA, K.; OKA, M. et al. The family of protein kinase C in transmembrane signalling for cellular regulation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.7, p.12, 1992
- ASHFORD, D. A.; BOZZ, M., FREIRE, M. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.53, p. 251-55, 1995.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.59, n.1, p.53-57, 1998.
- AUGER, M.J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C. E., MCGEE, J. O.D. (Eds.) *The macrophage*. Oxford: Oxford University Press, 1992, p.3-74.
- BARTHEL, R.; PIEDRAHITA, J.A.; McMURRAY, D.N. et al. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, p.1140-44, 2000.
- BARTHEL, R.; FENG, J.; PIEDRAHITA, J.A. et al. Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun.*, v.69, n.5, p.3110-9, 2001.
- BARTON, C.H.; WHITEHEAD, S.H.; BLACKWELL, J.M. Nramp transfection transfers lty/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Mol. Med.* v.1, p.267-79, 1995.
- BELLAMY, R. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbe Infect.*, v.1, p.23-27, 1999.
- BELLAMY, R.; RUWENDE, C.; CORRAH, T. et al. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N. Engl. J. Med.*, v.338, n.10, p.640-4, 1998.
- BLACKWELL, J.M. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of

- multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern *Brazi*. *Int. J. Parasitol.*, v.28, n.1, p.21-8, 1998.
- BLACKWELL, J.M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C.A.W. et al. Slc11A1 (formely Nramp1) and disease resistance. *Cell. Microb.*, v.3, n.12, p.773-784, 2001.
- BLACKWELL, J.M.; SEARLE, S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (=Ity/Lsh/Bcg). *Immunol. Lett.*, v.65, n.1-2, 73-80, 1999.
- BLACKWELL, J.M. Regulation of *Leishmania* populations within the host. V. Resistance to *L. donovani* in wild mice. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.86, n.1, p.17-22, 1983.
- BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*, v.112, p.S67-74, 1996.
- BLACKWELL J. M.; BLACK, G.F.; PEACOCK, C.S. et al. Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem family study. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, v.352, p.1331-45, 1997.
- BLACKWELL, J.M.; SEARLE, S.; MOHAMED, H. et al. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Rev. Immunol. Lett.*, v.85, n.2, p.197-203, 2003.
- BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.*, v.191, n.12, p.2121-30, 2000.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today*, v.15, p.22-28, 1999.
- BORDIER, C. The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitol. Today*, v.3, p.151-56, 1987.
- BOURDEISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 56, p.345-51, 1997.
- BRADLEY, D.J. Regulation of *Leishmania* populations within the host.II. Genetic contrl of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, v.30, n.1, p.130-40, 1977.
- BRADLEY, D.J.; KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, v.30, n.1, p.119-29, 1977.
- BRADLEY, D.J.; TAYLOR, B.A.; BLACKWELL, J. et al. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, v..37, p.7-14, 1979.
- BRANDONISIO, O.; ALTAMURA, M.; CARELLI, G. et al. Lymphocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. *J. Immunopharmacol.*, v.9, p.37-40, 1988.
- BRIGHTBILL, H.D.; LIBRATY, D.H.; KRUTZIK, S.R. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, v.285, p.732-6, 1999.
- BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; ORTIZ, J.P.D. et al. Uveíte associada à infecção

- por *Leishmania chagasi* em cão na cidade de Olinda, Pernambuco, Brasil. *Ciênc. Rural*, v.34, n.3, p.925-29, 2004.
- BRITTINGHAM, A.; CHEN, G.; MCGWIRE, B.S. et al. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect. Immun.*, v.67, n.9, p.4477-84, 1999.
- BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C.J.; MCMASTER, W.R. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.*, v.155, n.6, p.3102-11, 1995.
- BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, v.115, p.S9-S23, 1997.
- BROWN, D.H.; SHERIDAN, J.; LA FUSE, W. et al. Cytokine-mediated activation of macrophages from mycobacterium bovis BCG-resistant and -susceptible mice: differential effects of corticosterone on antimycobacterial activity and expression of the Bcg gene. *Infect. Immun.*, v.63, p.2983-88, 1995.
- BROWN, D.; REINER, S. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. *Infect. Immun.*, v.67, p.266-70, 1999.
- BUATES, S; MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J. Immunol.*, v.166, n.5, p.3416-22, 2001.
- BUCHETON, B.; ABEL, L.; KHEIR, M.M. et al. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population : candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun.*, v.4, n.2, p.104-9, 2003.
- BUENO, R.; MELLO, M.N.; MENEZES, C.A. et al. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.521-524, 2005.
- BUSCHMAN, E.; SKAMENE, E. From Bcg/Lsh/Ity to Nramp1: three decades of search and research. *Drug Metab. Dispos.*, v.4, p.471-73, 2001.
- BUSSMANN, V.; LANTIER, I.; PITEL, F. et al. cDNA cloning, structural organization, and expression of the sheep NRAMP1 gene. *Mamm. Genome*, v.9, n.12, p.1027-31, 1998.
- BUU, N.; SÁNCHEZ, F.; SCHURR, E. The Bcg Host-Resistance Gene. *Clin. Infect. Dis.*, v.31, p.S81-5, 2000.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.*, v.14, p.531-539, 1992.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S. et al. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, v.76, p.173-80, 1998.
- CALDAS, A.J.M.; COSTA, J.M.L.; SILVA, A.A.M. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.96, p.21-28, 2002.
- CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Tripanosomiasis. Technical modification

- employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.8. n.5, p.227-234, 1966.
- CAMARGO-NEVES, V.L.; KATZ, G.; RODAS, L.A. et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad. Saude Publica*, v.17, n.5, p.1263-67, 2001.
- CAMPBELL, G.A.; ADAMS, L.G. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.34, n.3-4, p.291-305, 1992.
- CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; FLORES, M. Leishmaniosis canina: Diagnóstico. *Inf. Vet.*, v.9, p.28-32, 2005
- CANONNE-HERGAUX, F.; GRUENHEID, S.; GOVONI, G. et al. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, v.111, n.4, p.283-289, 1999.
- CARON, J.; MALO, D.; SCHUTTA et al. Genetic susceptibility to infectious diseases linked to *NRAMP1* gene in farm animals. In: CELLIER, M.; GROS, P.(Eds.) *The Nramp family*, 2004, p.16-28.
- CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S. et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J. Exp. Med.*, v.180, n.5, p.1741-52, 1994.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.103, p.67-75, 2005.
- CHANG, K. P. *Modern Biology: Cell Biology of Leishmania*. 2.ed. New York: Farman and Company, 1990. p.79-89.
- CHANNON, J.Y.; BLACKWELL, J.M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigote and amastigotes to hydrogen peroxide. II. Possible mechanisms involved in protective H₂O₂ scavenging. *Parasitology*, v.91, p.207-17, 1985.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, v.141, n.21, p.539-543, 1997.
- COSTA, F.A.; GOTO, H.; SALDANHA, L.C. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v.40, n.6, p.677-84, 2003.
- COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; PEREIRA, F.C.A. et al. Is the household dog a risk factor for american visceral leishmaniasis in Brazil? *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.93, p.464, 1999.
- COUSSENS, P.M.; COUSSENS, M.J.; TOOKER, B.C. et al. Structure of the bovine natural resistance associated macrophage protein (NRAMP 1) gene and identification of a novel polymorphism. *DNA Seq.*, v.15, p.15-25, 2004.
- COX, F.E.G. Immunology. In:_____. *Modern Parasitology A textbook of Parasitology*. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1993, p.193-218.

- CROCKER, P.R.; BLACKWELL, J.M.; BRADLEY, D.J. Transfer of innate resistance and susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mouse radiation bone marrow chimaeras. *Immunology*, v.52, n.3, p.417-22, 1984.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. *Exp. Molec. Pathol.*, v.72, p.132-141, 2002.
- DE LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T. et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.70, p.95-103, 1999.
- DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P. et al. Specific IgG1 e IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.*, v.17, p.451-58, 1995.
- DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.*, v.185, n.12, p.2061-8, 1997.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.95, p.239-43, 2001.
- DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G.; TURCO, S.J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Immunol.*, v.149, n.9, p.3008-15, 1992.
- DE VEER, M.J.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.M. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*. possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.*, v.10, p.2822-31, 2003.
- DIENZLE, D. Monocytes and Macrophages. In: SCHALM, O.W. *Veterinary Hematology*, 2. ed., Oxford Press: London, 2002, 318-325p.
- DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* v.25, n.5, p.1240-2., 1997.
- DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. In the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.*, v.42, p.650-58, 2005.
- DONNINGER, H.; CASHMORE, T.J.; SCRIBA, T. et al. Functional analyses of novel SLC11A1 (Nramp1 promoter variants in susceptibility to HIV-1. *J. Med. Genet.*, v.41, p.49-52, 2004.
- DUARTE, M.I.; LAURENTI, M.D.; NUNES, V.L.B. et al., Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, n.6, p.431-436, 1986.
- DUARTE, M.I.; MARIANO, O.N.; CORBETT, C.E. Liver parenchymal cell parasitism in human visceral leishmaniasis. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*; v.415, n.1, p.1-6, 1989.
- DUBANIEWICZ, A.; JAMIESON, S.E.; DUBANIEWICZ-WYBIERALSKA, M. et al. Association between SLC11A1 (formerly NRAMP1) and the risk of sarcoidosis in Poland. *Eur. J. Hum. Genet.*, v.13, n.7, p.829-34, 2005.
- EHLERS MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.*, v.2, n.3, p.289-94, 2000.

- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil) Clin. Vet., v.5, p.36-44, 2000.
- FENG, J.; LI, Y.; HASHAD, M.; et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Res.*, v.6, p.956-64, 1996.
- FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO- GALEGO, L.; RODRIGUEZ, A. et al. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.107, p.163-169, 2005.
- FERREIRA, F.R.; GOULART, L.R.; SILVA, H.D. et al. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* v.2, n.4, p.457-67, 2004.
- FERRER, L.M; RABANAL, R.; DOMINGO, M. et al. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res. Vet. Sci.*, v.44, n.2, p.194-196, 1988.
- FERRER, L.M; AISA, M.J.; ROURA, X. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v.136, p.514-516, 1995.
- FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. *Proc. Int. Can. Leish. Forum, Barcelona, Spain*, v.1, p.6-11, 1999.
- FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGO, M. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.*, v. 99, p.105-111, 2001.
- FLANDIN, J.F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur. J. Immunol.*, v.36, n.2, p.411-20, 2006.
- FLEMING, M.D.; TRENOR, C.C.3RD; SU, M.A. et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.*,v.6, n.4, p.383-6, 1997.
- FONDEVILLA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.56, p.319-327, 1997.
- FORBES, J.R.; GROS, P. Iron, manganese, and cobalt transport by *Nramp1* (Slc11a1) and *Nramp2* (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood*, v.102, n.5, p.1884-92, 2003.
- FORBES, J.R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Rev. Trends Microbiol.*, v.9, n.8, p.397-403, 2001.
- FRITSCHKE, G.; DLASKA, M.; BARTON, H. et al. *Nramp1* functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression. *J. Immunol.*, v.171, p.1994-98, 2003.
- FROMMEL, T.O.; BUTTON, L.L.; FUJIKURA, Y. et al. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.38, n.1, p.25-32, 1990.

FUNDAÇÃO NACIONAL da SAÚDE/CENTRO NACIONAL de EPIDEMIOLOGIA. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol. Epidemiol.*, v.6, p.1-11, 2002.

GENARO, O. *Leishmaniose Visceral Canina Experimental*. 1993. 146p. Tese. Doutorado em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GONÇALVES, R.; VIEIRA, E.R.; MELO, M.N. et al. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect. Dis.*, v.5, n.1, p.39, 2005.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N. et al. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morfometric study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.45, n.3, p.153-158, 2003.

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

GOVONI, G.; GROS, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.*, v.47, p.277-84, 1998.

GOVONI, G.; VIDAL, S.; GAUTIER, S. et al. The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp1G169* allele. *Infect. Immunol.*, v.64, p.2923-29, 1996.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T. et al. *Leishmania*

major amastigotes initiate the l-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, v.145, p.4290-97, 1990.

GREEN, P.J.; FEIZI, T.; STOLL, M. S. et al. Recognition of the major cell surface glyconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.66, p.319-28, 1994.

GRIMA, M.J. Leishmaniosis canina: Panorámica general de la enfermedad. *Inf. Veter.*, v.6, p.14-18, 2005.

GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.*, v.127, n.6, p.2417-21, 1981.

GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J. Immunol.*, v.131, n.4, p.1966-72, 1983.
GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M. et al. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.*, v.185, n.4, p.717-30, 1997.

GRUENHEID, S.; CELLIER, M.; VIDAL, S. et al. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genome*, v.25, p.514-25, 1995.

GUARGA J. L.; MORENO, J.M.; LUCIENTES, J. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.*, v.69, p.249-53, 2000.

- GUERIN, P.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.494-501, 2002.
- GUILLOTEAU, L.A.; DORNAND, J.; GROSS, A.; et al. Nramp1 is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.71, n.2, p.621-28, 2003.
- GUTTERIDGE, J.M.; ROWLEI, D.A.; HALLIWELL, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Detection of free iron in biological systems by using bleomycin-dependent degradation of DNA. *Biochem. J.*, v.199, n.1, p.263-65, 1981.
- HAWN, T. R.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M. et al. *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD-88-dependent pathway. *Microbes Infect.*, v. 4, n.8, p.763-71, 2002.
- HERVAS-RODRIGUEZ, J.; MOZOS, E.; MENDEZ, A. et al. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. *Vet Pathol.* v.33, n.4, p.469-73, 1996.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, p.1191-98, 1999.
- HO, C.K.; BABIUK, L.A. Long-term culture of canine peripheral blood monocytes in vitro. *Can. J. Comp. Med.*, v.43, p.223-228, 1979.
- HOFMEISTER, A.; NEIBERGS, H.L.; POKORNY, R.M. et al. The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. *Surgery*, v.122, n.2, p.173-79, 1997.
- HU, J.; BUMSTEAD, N.; SKAMENE, E. et al. Structural organization, sequence, and expression of the chicken NRAMP1 gene encoding the natural resistance-associated macrophage protein 1 *DNA Cell. Biol.*, v.15, n.2, p.113-23, 1996.
- IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M. et al. Perfil Hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo. *Clin. Vet.*, n.47, p.42-8, 2003.
- JABADO, B.N.; JANKOWSKI, A.; DOUGAPARSAD, S. et al. Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.*, v.192, p.1237-47, 2000.
- JANEWAY, C.A. JR; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, v.20, p.197-216, 2002.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. *Innate Immunity*. In: *Immunobiology - The Immune System in Health and Disease*, 5. ed. Garland: New York, 2001, 35-92p.
- JOSHI, P.B.; KELLY, B.L.; KAMHAWI, S. et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.20, n.1, p.33-40, 2002.
- KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S.K.; KARIMINIA, A. et al. Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. *Korean J. Parasitol.*, v.44, n.1, p.35-41, 2006.

- KEDZIERSKI, L.; MONTGOMERY, J.; BULLEN, D. et al. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J. Immunol.*, v.172, n.8, p.4902-6, 2004.
- KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.*, v.21, n.1, p.74-79, 1984a.
- KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, v.21, n.1, p.80-86, 1984b.
- KHARAZMI, A. KEMP, K., ISMAIL, A. et al. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol. Lett.* v.65, p.105-107, 1999.
- KIMMEL, A.R.; BERGER, S.L. Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. *Methods Enzymol.*, v.152, p.307-316, 1987.
- KNOPFEL, M.; SCHULTHEISS, G.; FUNK, F. et al. Characterization of an integral protein of the brush border membrane mediating the transport of divalent metal ions. *Biophys J.*, v.79, n.2, p.874-84, 2000.
- KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; MODOLELL, M. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.1920-8, 2004a.
- KROPF, P.; FREUDENBERG, N.; KALIS, C. et al. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J. Leukoc. Biol.*, v.76, n.1, p.48-57, 2004b.
- KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F. et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* v.7, n.11-12, p.1224-34, 2005.
- KUHN, D.E.; BAKER, B.D.; LAFUSE, W.P. et al. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *J. Leukoc. Biol.*, v.66, p.113-19, 1999.
- KURZMAN, I.D.; FUSHUN, S.; MACEWEN, E.G. In vitro and in vivo mononuclear cell production of tumor necrosis factor induced by muramyl peptides and lipopolysaccharides. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.38, p.45-56, 1993.
- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n.1, p.210-215, 2002b.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P. et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitol.*, v.125, p.197-207, 2002a.
- LAOINSON, R.; SHAW, J.J. *The leishmaniasis in biology and medicine: Evolution, classification and geographical distribution*. London: Academic Press Inc., 1987. p.1-120.
- LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHORPE, D. et al. Nramp1 transfection transfers

- Ity/Ish/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: Influence on antigen processing and presentation. *Infect. Immun.*, v.65, n.2, p.380-86, 1997.
- LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.79, p.273-284, 2001.
- LI, H.T.; ZHANG, T.T.; ZHOU, Y.Q. et al. Slc11A1 (formely Nramp1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.10, n.1, p.3-12, 2006.
- LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N. et al. canine visceral leishmaniosis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.*, v. 92, n.1, p.43-53, 2004.
- LISSNER, C.R.; SWANSON, R.N.; O'BRIEN, A.D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the Ity gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J. Immunol.*, v.131, n.6, p.3006-13, 1983.
- MADEIRA, M.; BARBOSA-SANTOS, E.; MARZOCHI, M. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatropic *Leishmania* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, n.5, p.645-8, 1999.
- MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniosis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counter-immunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.1409-11, 1988.
- MANCIANTI, F.; PEDONESI, F.; POLI, A. evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.*, v.65, p.1-9, 1996.
- MARCUSSEN, N.; VETNER, M.; KRISTENSEN, H.M. Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniosis in a dog. A case report. *APMIS.*, v.97, n.12, p.1137-40, 1989.
- MARSELLA, R., GOPEGUI, R.R. Leishmaniosis: a re-emerging zoonosis. *Int. J. Dermatol.*, v.37, p.801-14, 1998.
- MARTINEZ-MORENO, A.; MARTINEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A. et al. Immunological and histological study of T-and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v.51, p.49-59, 1993.
- MARTINEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTINEZ-MORENO, C. et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.48, p.209-20, 1995.
- MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DESOUZA, W.J. et al. Canine visceral leishmaniosis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.80, n.3, p.349-357, 1985.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniosis in Rio de Janeiro. *Parasitol. Today*, v.10, p.37-40, 1994.
- MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples

- from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.5, p.1145-9, 1995.
- MATIASOVIC, J.; KUBICKOVA, S.; MUSILOVA, P. et al. Characterization of the NRAMP1 (SLC11A1) gene in the horse (*Equus caballus.*). *Eur. J. Immunogenet.*, v.29, n.5, p.423-29, 2002.
- MCCONVILLE, M.J.; THOMAS-OATES, J.E.; FERGUSON, M.A. et al. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, v.265, n.32, p.19611-23, 1990.
- MCCONVILLE, M.J. TURCO, S.J., FERGUSON, M.A.J., et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.*, v.11, p.3593-3690, 1993.
- MEIER, C.L.; SVENSSON, M.; KAYE, P.M. *Leishmania*-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. *J. Immunol.*, v.171, n.12, p.6706-13, 2003.
- MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; CAMPOS, J.H.F. et al. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. *Proc. Int. Can. Leish. Forum, Barcelona, Spain*, v.1, p.46-53, 1999.
- MOHAMED, H.S.; MUNTASER, E.I.; MILLER, E.N. et al. SLC11A1 (formely Nramp1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in the Sudan. *Europ. J. Hum. Genet.*, v.12, p.66-74, 2004.
- MOODY, S.F.; HANDMAN, E.; MCCONVILLE, M.J. et al. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem.*, v.268, n.25, p.18457-66, 1993.
- MOLLYNEUX, D.H.; KILLICK-KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in biology and medicine: Morphology, ultrastructure and life cycles*. London: Academic Press Inc., 1987. p. 122-168.
- MORENO, E.C.; MELO, M.N.; GENARO, O. et al., Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais state. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.6, p.456-463, 2005.
- MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.71, p.181-195, 1999.
- MOSSER, D.; EDELSON, P. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.*, v.35, p.2785-2789, 1985.
- MOSSER, D.M.; EDELSON, P.J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, v.327, n.6120, p.329-31, 1987.
- MOSSER, D.M.; ROSENTHAL, L.A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell. Biol.*, v.4, p.315-322, 1993.
- NABITY, M.B.; BARNHART, K.; LOGAN, K.S. et al. An atypical case of *Trypanosoma cruzi* infection in a young English Mastiff. *Vet. Parasitol.*, 2006 (no prelo).
- NANDAN, D.; REINER, N.E. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of

signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect. Immun.*, v.63, n.11, p.4495-500, 1995.

NANDAN, D.; LO, R.; REINER, N.E. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.*, v.67, n.8, p.4055-63, 1999.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Doenças protozoárias polissistêmicas. In:____. *Medicina interna de pequenos animais*. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-coogan, 2001, p.1031-1040.

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

NORTH, R. J.; MEDINA, E. How important is Nramp1 in tuberculosis? Review. *Trends Microbiol.*, v.6, n.11, p.234-40, 1998.

OLIVEIRA, C.D; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Distribuição espacial da leishmaniose visceral humana e canina em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1994-1997. *Cad. Saúde Pública*, v.17, n.5, p.1231-39, 2001.

OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SAGIDURSKI, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, p.243-48, 1993.

OLIVIER, M.; TANNER, C.E. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by

Leishmania donovani. *Infect. Immun.*, v.55, n.2, p.467-71, 1987.

OLIVIER, M.; BROWNSEY, R.W.; REINER, N.E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.89, n.16, p.7481-5, 1992.

OLIVIER, M.; BERTHON, P.; CHASTANG, J. et al. Establishment and characterization of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.82, p. 139-51, 2001.

ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDEVILA, D; et al. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. *Vet. Dermatol.*, v.16,p.187-191, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO), *Leishmaniasis*, TDR 2005. Seventeenth Program Report, 2005. Disponível em: < <http://www.who.int/in/>> Acesso em: 28 abr. 2006.

PAIXÃO, T.A. *Resistência natural à brucelose bovina associada ao gene Nramp1*. 2006. 91p. Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PANARO, M.A.; FASANELA, A.; LISI, S. et al. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, v.20,p.147-58, 1998.

PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.; HOCKMEYER, W.T. Dot-enzyme-linked

- immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods*, v.64, p.205-214, 1983.
- PELLEGRINO, J.; BRENER, Z. Reação da Fixação do Complemento com sangue dessecado no diagnóstico da calazar canino. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* Publ. Avulsas, v.10, p.39-44, 1958.
- PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G.; Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet. Ophthalmol.*, v.3, n.1, p.35-39, 2000.
- PIANI, A.; ILG, T.; ELEFANTY, A.G. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect.*; v.1, n.8, p.589-99, 1999.
- PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur. J. Immunol.*, v. 25, n.6, p.1594-1600, 1995.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, v.62, p.229-35, 1994.
- PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect. Immun.*, v.67, n.1, p.237-43, 1999c.
- PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune response in canine leishmaniasis. *Proc. Int. Can. Leish. Forum, Barcelona, Spain*, v.1, p.60-64, 1999a.
- PINELLI, E.; KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 69, p.121-26, 1999b.
- PINELLI, E., GEBHARD, D., MOMMAAS, et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.*, v.92, p.181-89, 2000.
- POZIO, E.; GRANDONI, L.; BETTINI, S. et al. Leishmaniasis in Tuscany, (Italy): VI Canine Leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.*, v.38, p.383-393, 1981.
- PRICE, R.E.; TEMPLETON, J.W.; SMITH, R. 3RD. et al. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, v.58, n.4, p.879-86, 1990.
- PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A.V.; FENG, G.J. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.93, n.20, p.10984-9, 1996.
- QUINNELL, R.J.; KENNEDY, L.J.; BARNES, A. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II

- polymorphism. *Immunogenetics*, v.55, n.1, p.23-8, 2003b.
- QUINNELL, R.J.; COURTNEY, O.; DAVIDSON, S. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of brazilian dogs. *Parasitol.*, v.122, p.253-61, 2001.
- QUINNELL, R.J.; COURTNEY, O.; GARCEZ, L.M. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.91, p.161-68, 2003a.
- QURESHI, T.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.50, n.1-2, p.55-65, 1996.
- REINER, N.E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol. Today*, v.15, p.374-81, 1994.
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v.81, n.1, p.68-75, 2006a.
- REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania)chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006b (no prelo)
- RHALEM, A.; SAHIBI, H., GUESSOUS-IDRISSI, N. et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v.81, p.696-99, 1999.
- RODRIGUEZ, N.E.; CHANG, H.K.; WILSON, M.E. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect. Immun.* v.72, n.4, p.2111-22, 2004.
- ROSENTHAL, L.A.; SUTTERWALA, F.S.; KEHRLI, M.E. et al. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect. Immun.*, v.64, n.6, p.2206-15, 1996.
- ROSYPAL, A.; GOGAL JR., R.M.; ZAJAC, A.M. et al. Flow cytometric analysis of cellular immune responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v. 131, p.45-51, 2005.
- RUSSELL, D. G. *Mycobacterium* and *Leishmania*: stowaways in the endosomal network. *Trends Cell. Biol.*, v.5, p.125-28, 1995.
- SACKS, D.L.; HIENY, S.; SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.*, v.135, p.564-69, 1985.
- SACKS, D.L.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.*, v.2, p.845-58, 2002.

- SADICK, M. D. Macrophages in parasitic infection. In: Lewis, C. E., McGee, J. O'D. (Eds.). *The macrophage*. Oxford: Oxford University Press, 1992, p.267-84.
- SALDARRIAGA, O.A.; VELÁSQUEZ, J.I.; OSSA, J.E. et al.. Standardization of bovine macrophage monolayers and isolation and culture of trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, p.269-71, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukariotic cells. In: _____. *Molecular cloning. A laboratory manual* (2.ed.). New York: Cold Spring Harbor laboratory Press. 1989. p.7.3-7.87.
- SAMPAIO, I. B. M. Tipificação de Respostas Individuais. In:_____. *Estatística Aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: FEP MVZ editora. 2002, p. 48-53.
- SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; SANCHEZ, A. et al. Polymorphism of Slc11A1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J. Hered.*, v.96, n.7, p.755-58, 2005.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SANTOS-GOMES, G.; ROSA, R.; LEANDRO, C. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.88, p.21-30, 2002.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Doenças de pele causadas por vírus, riquetsias e protozoários. In: SCOTT, D.W. (Ed.) *Dermatologia de pequenos animais*. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, p. 435-447.
- SEARLE, S.; BRIGHT, N.A.; ROACH, T.I. et al. Localization of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *J. Cell. Sci.*, v.111, p.2855-66, 1998.
- SEARLE, S.; BLACKWELL, J.M. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J. Med. Genet.*, v.36, n.4, p.295-9, 1999.
- SHAW, S.E., ANDERSON, N.V. Isolation and functional analysis of normal canine blood monocytes and resident alveolar macrophages. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.87-90, 1984.
- SHAW, M.A.; CLAYTON, D., ATKINSON, S.E., et al. Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *J. Med. Genet.* v.33, n.8, p.672-77, 1996.
- SHAW, M.A.; COLLINS, A.; PEACOCK, C.S. et al. Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA. *Tuberc. Lung Dis.*, v.78, n.1, p.35-45, 1997.
- SILVA, E. D.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S. et al. Visceral Leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p.285-291, 2001.
- SILVA, F.L. Estudo histopatológico e imuno-histoquímico do trato gastrointestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania*

(*Leishmania*) *chagasi* de duas regiões geográficas distintas. 2001, 41p. Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A. et al., Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública*. v.21, n.1, p.324-328, 2005.

SIQUEIRA, A.L. *Métodos Não-Paramétricos na Análise Estatística*. In: SOARES, J.F., SIQUEIRA, A.L. *Introdução a Estatística Médica*. Coopmed: Belo Horizonte, 2002, 127-165p.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v.24, p.247-54, 2001.

SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Infection genomics: *Nramp1* as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu. Rev. Med.*, v.49, p.275-87, 1998.

SLAPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet. Q.*, v.10, n.1, p. 74-80, 1988.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed.) *Infectious Diseases of dog and cat*. 2.ed. Philadelphia: Saunders Company, 1998, p.450-58.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of

Leishmania infantum-infected dogs. *J. Comp. Pathol.*, v.130, p.7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X. et al. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, v.96, p.265-76, 2001.

SOO, S., RAMOS, G. B., ANJAM KHAN, C. M. et al. Genetic Control of Immune response to recombinant antigens carried by an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: *Nramp1* influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge. *Infect. Immun.* v.66, p.1910-17, 1998.

SOUZA, P.E.; ROCHA, M.O.; ROCHA-VIEIRA, E. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect. Immun.*, v.72, p.5283-91, 2004.

SOUZA, A.I.; JULIANO, R.S.; GOMES, T.S. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Vet. Parasitol.*, v.129, p.51-54, 2005.

STACH, J.L.; DELGADO, G.; TCHIBOZO, V. et al. Natural resistance to mycobacteria: antimicrobial activity and reactive oxygen intermediate releasing functions of murine macrophages. *Ann. Immunol.*, v.135D, n.1, p.25-37, 1984.

STEIGERWALD, M.; MOLL, H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory

- capacity. *Infect. Immun.*, v.73, n.4, p.2564-7, 2005.
- STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BURSHTAIN, O. et al. Polymerase chain reaction using noninvasive obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.*, v.189, p.1729-1733, 2004.
- TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; OLIVEIRA, M.R. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, v.292, p.17-23, 2004.
- TAFURI, W.L. et al. Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.31, n.3, p. 139-145, 1989.
- TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, n.2, p. 81-89, 1996.
- TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.96, p.203-212, 2001.
- TAKAHASHI, K.; SATOH, J.; KOJIMA, Y. et al. Promoter polymorphism of SLC11a1 (formaly NRAMP1) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in japanese. *Tissue Antigens*, v.63, p.231-36, 2004.
- TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, v.3, n.5, p.657-667, 2003.
- TEMPLETON, J.W.; SMITH, R. 3RD, ADAMS, L.G. Natural disease resistance in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.192, n.9, p.1306-15, 1988.
- TIPOLD, A.; ZURBRIGGEN, A.; MOORE, P. et al. Generation and functional characterization of canine bone marrow-derived macrophages. *Res. Vet. Sci.*, v.64, p.125-132, 1998.
- TUGGLE, C.K.; SCHMITZ, C.B.; GINGERICH-FEIL, D. Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.277, 1997.
- TUITE, A.; GROS, P. The impact of genomics on the analysis of host resistance to infectious disease. *Microbes Infect.* v.26, 2006. (no prelo)
- VASSILIOS, J.K. Old world canine leishmaniasis. *Compend. Cont. Ed. Pract. Vet.*, v.15, p.941-49, 1993.
- VIDAL, S.M.; MALO, D.; VOGAN, K. et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, v.73, n.3, p.469-85, 1993.
- VIDAL, S.M.; TREMBLAY, M.L.; GOVONI, G. et al. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J. Exp. Med.*, v.182, n.3, p.655-66, 1995.
- VOLLER, A., BIDWELL, D.E. BARTLETT, A., *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide*

with abstracts of microplate applications, Guernsey: Dynatech Europe, 124p, 1979.

WARDLEY, R.C.; LAWMAN, M.J.; HAMILTON, F. The establishment of continuous macrophage cell lines from peripheral blood monocytes. *Immunology*, v.39, p.67-73, 1980.

WYLLIE, S.; SEU, P.; GOSS, J A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. *Microbes Infect.*, v.4, p.351-59, 2002.

WIGLEY, P. Genetics Resistance to salmonella infection in domestic animals. *Res. Vet. Sci.*, v.76, p.165-169, 2004.

WILSON, M.E.; PEARSON, R.D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.*, v.56, p.363-369, 1988.

WHITE, J.K.; STEWART, A.; POPOFF, J.F. Incomplete glycosylation and

defective intracellular targeting of mutant solute carrier family 11 member 1 (Slc11a1). *Biochem. J.*, v.382, p.811-819, 2004.

YEN, J.H.; LIN, C.H.; TSAI W.C. et al. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, v.102, n.1, p.91-97, 2006.

ZAAHL, M.G.; ROBSON, K.J.; WARNICH, L. et al. Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)_n repeat: opposite effect in the presence of -237C-->T. *Blood Cells Mol. Dis.* v.33, n.1, p.45-50, 2004.

ZHANG, W.; SHAO, L.; WENG, X. et al. Variants of the natural resistance-associated macrophage protein gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.40, p.1232-36, 2005.

ZWILLING, B.S.; KUHN, D.E.; WIKOFF, W. et al. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect. Immun.*, v.67, p.1386-92, 1999.

5. ANEXOS

Anexo 1: Raça, Idade e Sexo dos cães estudados no Capítulo 3.

Nº	Raça	Idade (Anos)	Sexo
1	Pastor Alemão	3	Fêmea
2	Pastor Alemão	2	Macho
3	Sem Raça Definida	4	Fêmea
4	Pastor Alemão	3	Fêmea
5	Sem Raça Definida	2	Fêmea
6	Rottweiler	3	Macho
7	Pastor Alemão	2	Fêmea
8	Sem Raça Definida	4	Fêmea
9	Dogue Alemão	4	Macho
10	Dogue Alemão	5	Fêmea
11	Sem Raça Definida	1	Fêmea
12	Dogue Alemão	6	Macho
13	Dogue Alemão	3	Macho
14	Dogue Alemão	4	Fêmea
15	Dogue Alemão	4	Fêmea
16	Golden Retriever	3	Fêmea
17	Bull Terrier	2	Fêmea
18	Pastor Alemão	4	Macho
19	Sem Raça Definida	1	Fêmea
20	Pointer Inglês	5	Fêmea
21	Sem Raça Definida	3	Fêmea
22	Sem Raça Definida	9	Macho
23	Rottweiler	5	Fêmea
24	Golden Retriever	4	Fêmea
25	Sem Raça Definida	5	Macho
26	Sem Raça Definida	2	Macho
27	Cocker Spaniel	6	Fêmea
28	Rottweiler	7	Fêmea
29	Labrador	5	Fêmea