UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Pesquisa de mutação do gene predito da Lectina Ligante de Manose em cães.

Comparação entre dois alvos para diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral Canina.

Cristiane de Santis Alves Rosa

Botucatu – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Pesquisa de mutação do gene predito da Lectina Ligante de Manose em cães.

Comparação entre dois alvos para diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral Canina.

Cristiane de Santis Alves Rosa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
Co-Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências –UNESP- campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu – SP
2010

"Se fosse ensinar a uma criança a beleza da música
não começaria com partituras, notas e pautas.
Ouviríamos juntos as melodias mais gostosas e lhe contaria
sobre os instrumentos que fazem a música.
Aí, encantada com a beleza da música, ela mesma me pediria
que lhe ensinasse o mistério daquelas bolinhas pretas escritas sobre cinco linhas.
Porque as bolinhas pretas e as cinco linhas são apenas ferramentas
para a produção da beleza musical. A experiência da beleza tem de vir antes".

Rubem Alves

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu duvidei de mim mesma. Que compreendeu todo o stress e os momentos de ausência. Por todo amor e carinho.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Paulo Ribolla e Prof. Dr. João Pessoa, pela orientação, paciência e confiança em mim depositada.

Aos funcionários dos Departamentos de Parasitologia e de Micro/Imunologia.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. João Candeias pelo apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Newton, por todo apoio e amizade.

À todos do laboratório PANGENE, pela ajuda e companheirismo, em especial: Carine, Karina, Ana Tereza e Aline.

À Giovana, pela amizade e todos os “cafezinhos”.

Ao Diego, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À todos do laboratório de Virologia: Lidiany, Andreza, Flávio, Ricardo, Taís, Sueli, Marlous e Marina.

À “Leticinha”, pela amizade de todos esses anos de convivência.

Aos amigos da XXXVII turma de Biologia noturno.

À Maritaka, por toda a amizade e companheirismo.

Aos grandes amigos Alf e Cenora.

Ao Bonsai, pelas dicas e pela amizade de longa data.

Aos meus pais por toda dedicação, confiança, apoio e incentivo. Sem sua ajuda, eu não estaria aqui...

Ao meu irmão, por toda a amizade.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Sumário

Lista de figuras **2**
Lista de tabelas e gráficos **3**
Resumo **4**
Abstract **5**
Parte I: Introdução e Revisão da Literatura **6**
1. Leishmania: 7
1.1. Leishmanioses: 7
1.2. Agente etiológico: 9
1.3. Reservatórios: 11
1.4. Vetores: 12
1.5. Diagnóstico das Leishmanioses: 17
2. Lectina ligante de manose (MBL): 19
2.1. Histórico: 19
2.2. Estrutura e função: 20
2.3. Genética: 24
2.4. Associação a doenças: 26
Parte II: Pesquisa de mutação do gene predito da Lectina Ligante de Manose em cães. **29**
3. Introdução: 30
4. Material e Métodos: 31
4.1. Material biológico: 31
4.2. Amplificação: 32
4.3. Purificação: 34
4.4. Sequênciamento: 34
4.5. Análises: 34
5. Resultados: 34
5.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR): 34
5.2. Sequênciamento: 36
6. Discussão: 39
Parte III: Comparação entre dois alvos para diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral Canina **41**
7. Introdução: 42
8. Material e Métodos: 43
8.1. Material biológico: 43
8.2. Amplificação: 44
9. Resultados: 45
9.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR): 45
10. Discussão: 48
11. Referências Bibliográficas 50
Anexo 1 60
Anexo 2 61
Anexo 3: 62

Lista de figuras

Figura 1: Huaco mochica exibindo mutilação do nariz e lábio superior, lesões sugestivas de leishmaniose. **7**
Figura 2: Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, Brasil, 2002. .....**9**
Figura 3: Foto exemplificando uma rede de minicírculos. **10**
Figura 4: promastigoto.....**11**
Figura 5: amastigoto **11**
Figura 6: fêmea *Lutzomyia longipalpis.* **13**
Figura 7: ciclo da Leishmaniose.....1**4**
Figura 8: Distribuição de municípios com presença de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo, maio 2010...**15**
Figura 9: Distribuição de municípios com transmissão da leishmaniose visceral americana canina, por início de ano de transmissão. Estado de São Paulo, 2006.....**16**
Figura 10: Número de casos, número de óbitos e letalidade de leishmaniose visceral. Estado de São Paulo, de 1999 a 2009. .....**16**
Figura 11: esquema da estrutura da MBL.....**22**
Figura 12: reconhecimento de carboidrato.....**22**
Figura 13: Sistema Complemento.....**23**
Figura 14: esquema do gene mbl2.....**25**
Figura 15: Foto de um gel de agarose 1,5%, contendo fragmentos correspondentes ao exon1. A primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb), as colunas 2, 3, 4 e 5 correspondem à amostras aleatórias de cães, e a 6, o branco. A seta aponta para o fragmento de 255 pb. **35**
Figura 16: Foto de um gel de agarose 1,5% contendo fragmentos correspondentes ao exon 2 e ao intron 1. A primeira e sexta colunas correspondem ao marcador de peso molecular de 100 pares de base, as colunas 2, 3 e 4 correspondem à amostras aleatórias de cães para o Exon 2, a 5 corresponde ao branco, as colunas, 7, 8 e 9 correspondem à amostras aleatórias de cães para o Intron 1, a 10 corresponde ao branco. **35**
Figura 17: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram. Em toda a extensão do exon 1 não foram observadas mutações.....**37**
Figura 18: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram, mostra o heterozigoto C/T na sequência do Intron 1, na posição 45.. .....**37**
Figura 19: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram, mostra o heterozigoto A/G na sequência do Intron 1, na posição 175.. .....**37**
Figura 20: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram. Em toda a extensão do exon 2 não foram observadas mutações.....**38**
Figura 21: Foto de um gel de agarose 1,5%, contendo o produto da amplificação do kDNA, a primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular de 1 Kb, as colunas 2, 3, 4 e 5 correspondem à amostras aleatórias de cão, a coluna 8 corresponde ao controle positivo e a 9 ao branco. A seta indica a posição de 800 pares de base. **45**
Figura 22: Foto de um gel de agarose 1,5%, contendo o produto da amplificação da região ITS 1, a primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular de 1 Kb, as colunas 2 e 3, correspondem à amostras aleatórias de cão, a 4 corresponde ao controle positivo e a 5 ao branco. **46**

Lista de tabelas e gráficos

Tabela 1: *primers* utilizados para amplificar e sequênciar o gene da MBL canina. **32**

Tabela 2: Heterozigoses encontradas em amostras de cães sequênciadas, sua procedência, raça, sexo e idade. **36**

Tabela 3: *primers* utilizados para amplificar alvos na *Leishmania*. **44**

Gráfico 1: Amostras positivas e negativas para a presença do protozoário com amplificação utilizando os *primers* correspondentes à região ITS1. .....**47**

Resumo

A lectina ligante de manose (MBL) é uma lectina sérica membro da família das colectinas, sendo uma importante constituinte da imunidade inata. Também é uma das mais de trinta moléculas do sistema complemento. O Sistema Complemento (SC) é um sofisticado sistema de defesa do hospedeiro que pode ser acionado tanto pelo sistema imune inato quanto pelo mecanismo de imunidade mediada por anticorpos. A via de ativação do SC das Lectinas é ativada por domínios de reconhecimento de carboidratos. O gene que codifica a MBL foi caracterizado em alguns mamíferos, e o mais estudado até agora é o humano. O gene da MBL em cães ainda não foi localizado, contudo, sua versão predita já está disponível, a qual é similar a lectina ligante de manose (A). Em humanos, a região codificadora da proteína é constituída por quatro exons e três introns. A grande maioria da MBL produzida no fígado se origina dos transcritos iniciados no exon 1. Alelos na região promotora do exon 1 contribuem para variações adicionais na concentração sérica da MBL. Em um estudo realizado com pacientes que apresentavam diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, cujo agente causador é o protozoário *Leishmania chagasi*, mostrou que esses pacientes apresentavam um nível maior de MBL sérica do que em indivíduos controle saudáveis. A Leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta principalmente as populações de baixa renda. . É uma doença de distribuição mundial, afetando 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Os agentes etiológicos da doença são protozoários que apresentam uma única mitocôndria, sendo que, o DNA mitocondrial aparece condensado e é chamado de cinetoplasto (k). Na área urbana, o cão é o principal reservatório. Os vetores são os flebotomíneos. De uma forma geral, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, e não existe um teste diagnóstico 100% específico e sensível. Novos métodos de diagnóstico, como a PCR, constituem uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral. No presente trabalho, foram avaliadas um total de 136 amostras caninas de diferentes localidades, no intuito de testar diferentes *primers* para a validação da PCR como teste diagnóstico e verificar a possibilidade de mutações no gene mbl(A). Todas as amostras testadas amplificaram com os primers do kDNA. Apenas 40 amostras amplificaram com os primers da região ITS-1. Das 96 amostras analisadas contendo o fragmento do intron1, oito apresentaram heterozigose. Nenhuma mutação significativa foi encontrada nas 96 amostras analisadas. Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão do funcionamento da MBL em cães e mais testes são necessários para a padronização de um diagnóstico molecular confiável.

Abstract

Mannose binding lectin (MBL) is a member of the colectins's family, being an important constituent of innate immunity. Also is one of more than thirty molecules of the complement system. The complement system (CS) is a sophisticated defense system of the host that can be triggered by both the innate immune system as the antibody-mediated immunity. The lectin pathway of complement activation is enabled by areas of recognition of carbohydrates. The gene that encodes the MBL was characterized in some mammals, and the most studied so far is the human. The MBL in dogs gene has not yet been located, however, it's predicted version is already available, which is similar to mannose binding lectin (A). In humans, the encoder protein region consists of four exons and three introns. The vast majority of MBL produced in the liver originates from transcripts started in exon 1. Allele in the promoter region of exon 1 contributes to additional variations in serum's levels of MBL. A study conducted with patients that had positive diagnosis for visceral leishmaniasis, whose causal agent is the protozoa *Leishmania Chagasi*, showed that these patients had a higher level of MBL in serum that in healthy control subjects. Leishmaniasis is a neglected disease that primarily affects low-income populations. The disease has a global distribution, affecting 88 countries, which 72 are developing countries. The etiological agents of the disease are protozoa with has a single mitochondria, and the mitochondrial DNA appears condensed and is called kinetoplast (k). In the urban area, the dog is the main reservoir. The vectors are insects called sandflies. General diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs is showing as a problem for public health services, and there is no specific diagnostic test that is 100% sensitive. New diagnostic methods, such as PCR, constitute a new perspective for the diagnosis of visceral leishmaniasis. In this work, there were evaluated a total of 136 canine samples from different locations in order to test different primers for validation of PCR as a diagnostic test and verify the possibility of mutations in the gene mbl (A). All samples tested amplified with the primers of kDNA. Only 40 samples amplified with the primers of ITS-1region. Of the 96 samples analyzed that contains fragment of intron1, eight presented heterozigose. No significant mutation was found in the 96 samples analyzed. Further studies are needed for a better understanding of the functioning of the MBL in dogs and more tests are necessary for the standardization of a trusted molecular diagnosis.

Parte I:

Introdução e Revisão da Literatura:

1. Leishmania:

1.1. Leishmanioses:

No Novo Mundo, as evidências mais antigas da existência da leishmaniose, são fornecidas por evidências arqueológicas provenientes do Peru e do Equador, que datam de 400 a 900 dC, ilustrando lesões sugestivas da doença (Figura 1) (Altamirano- Enciso, 2003; Castellano, 2005).

A primeira observação dos agentes etiológicos das leishmanioses ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham em 1885, na Índia, descreveu formas amastigotas em casos denominados “Calazar”. Posteriormente, em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico encontrado no oriente, sem, entretanto lhe dar nome. Mais tarde, Leishman (1903), observou corpúsculos ovais com 2-3µm de diâmetro em preparações de baço de um soldado inglês que havia morrido de febre Dum-Dum, contraída em Calcutá na Índia. Ao mesmo tempo, Donovan (1903), relatou esses mesmos parasitos em aspirados esplênicos de um menino hindu com 12 anos de idade e que estava acometido de uma febre irregular. Laveran & Mesnil, também em 1903 consideraram que o parasito associado ao calazar indiano um piroplasma, nomeando-o então de *Piroplasma donovani*. Ainda em 1903, Ross demonstrou que os organismos evidenciados na preparação de Donovan não eram esporozoários como este havia proposto e, sendo assim, estabeleceu um novo gênero (*Leishmania)* denominado *Leishmania donovani*, o agente etiológico do calazar (Genaro, 2005). Teorias moleculares recentes sobre as *Leishmanias* demonstram que o gênero tem cerca de 120 milhões de anos, surgindo quando os continentes ainda estavam unidos na pangéia (Altamirano- Enciso, 2003).

Figura 1: Huaco mochica exibindo mutilação do nariz e lábio superior, lesões sugestivas de leishmaniose. Fonte: Altamirano- Enciso, 2003.

As leishmanioses são consideradas zoonoses, no entanto, podem acometer o homem, fato que altera sua classificação epidemiológica para antropozoonose. Historicamente, a doença é considerada rural, restringida a bolsões de miséria, porém, desde os anos 80, está caminhando rapidamente para os grandes centros urbanos como Teresina/PI, Campo Grande/MS, Palmas/TO e Belo Horizonte/MG e está se aproximando de São Paulo/SP e Brasília/DF (Ferreira, 2010). De 1980 até 2008, mais de setenta mil casos de Leishmania Visceral foram registrados no Brasil, com 3.800 mortes (Ministério da Saúde, 2006; Werneck, 2010). Anualmente, de 5 a 10 mil brasileiros são atingidos pela doença e pelo menos 10% não sobrevivem, pois os serviços de saúde não estão preparados para atender essa moléstia (Ferreira, 2010).

É uma doença negligenciada que afeta principalmente as populações de baixa renda, devido à expansão urbana não planejada, destruição ambiental, moradia e situação sanitária precárias e problemas nutricionais, entre outros fatores determinantes (Werneck, 2010).

A epidemiologia é muito ampla: 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem e 30 espécies de mosquitos palha são vetores. É uma doença de distribuição mundial, afetando 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Noventa por cento dos casos de Leishmania Visceral ocorrem em áreas suburbanas e nas zonas rurais de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. A incidência anual de casos de Leishmania Visceral é de 500.000 (Desjeux, 2004).

As leishmanioses são doenças de importância clínica e epidemiológica. Existem diversos tipos de leishmanioses, entre as quais podemos destacar: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. (Desjeux, 2004). A leishmania visceral está se tornando uma das doenças mais importantes da atualidade, graças à sua incidência e alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas e, emergente em indivíduos portadores do HIV (vírus da imunodeficiência humana). Possui ampla distribuição geográfica, atingindo a Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas. O primeiro caso registrado no Brasil foi em 1913, em um paciente do Mato Grosso, posteriormente, em 1934, 41 casos positivos também foram identificados em lâminas provenientes da região norte e nordeste. Desde então, vem sendo registrados casos em todo o país, exceto na região sul. Na década de 90, a região nordeste era responsável por 90% das infecções no país, número que vem reduzindo desde então, devido à urbanização (figura 2) (Ministério da Saúde, 2006; Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006).

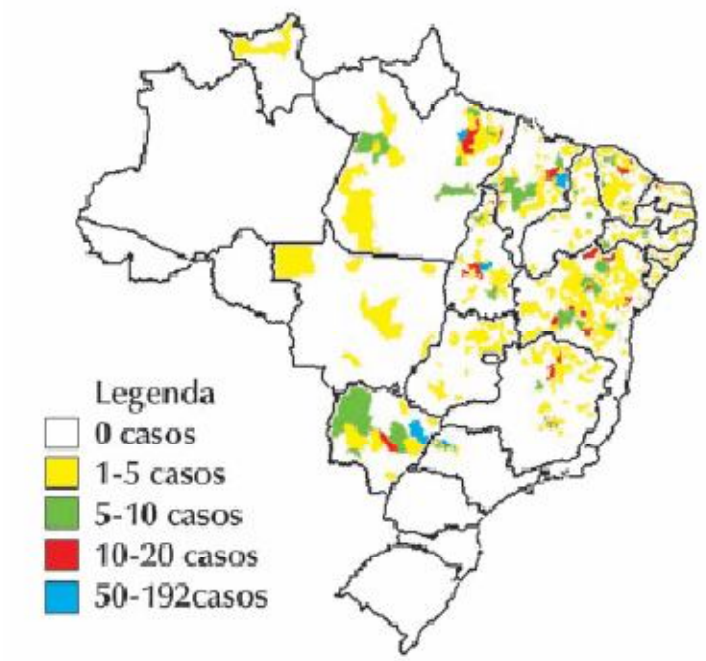


Figura 2: Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, Brasil, 2002.
Fonte: SINAN-CONVEV/OGDT/DEVEP/SVS/MS

1.2. *Agente etiológico:*

Os agentes etiológicos das leishmanioses são as *Leishmania spp,* pertencentes a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. São protozoários unicelulares, flagelados, parasitas intracelulares obrigatórios. Apresentam uma única mitocôndria, o DNA mitocondrial aparece condensado em uma região próxima aos corpúsculos basais do flagelo, sendo chamados de cinetoplastos (k), onde fica armazenado o kDNA (Castellano, 2005).

O kDNA é formado por milhares de moléculas de DNA circulares, fechadas covalentemente, formando uma “rede de trabalho” plana (figura 3). Cada rede de kDNA contém dois tipos de moléculas circulares de DNA. Os minicírculos que estão presentes em torno de 10^4 cópias, variando de 0,5 a 2,5Kb (kilobase), dependendo da espécie, sendo heterogêneos na sequência, porém o tamanho é sempre idêntico na rede. Sua única função genética conhecida é a formação de pequenos RNAs guias que controlam a especificidade da edição dos transcritos dos maxicírculos. Os maxicírculos estão presentes de 20 a 50 cópias, aparentemente, idênticas, variando de 20 a 40Kb, em diferentes espécies, e permanecem ao redor da camada da rede de minicírculos. Os maxicírculos codificam RNAs ribossômicos e proteínas mitocondriais envolvidas em funções como transporte de elétrons e na síntese de ATP (adenosina trifosfato) (Guilbride, 1998; Savill, 1999).

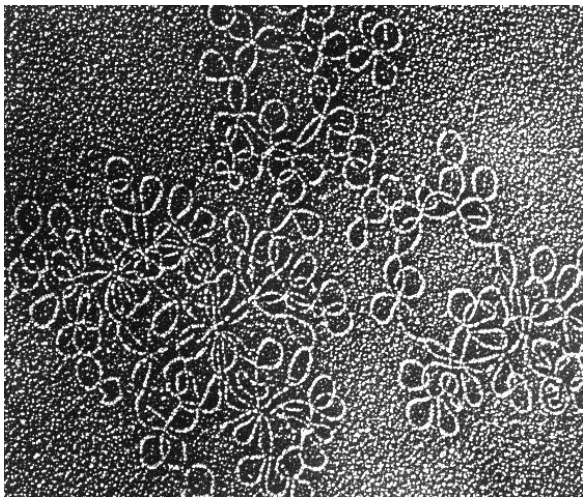


Figura 3: Foto exemplificando uma rede de minicírculos.

Fonte: http:// www.dna.kdna.ucla.edu

Em eucariotos, o DNAr (ribossômico) compreende uma família multigênica, organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões variáveis de espaçadores não-codificantes. Na maioria dos animais, existem de 100 a 500 cópias do gene codificante do DNAr no genoma nuclear. Cada unidade de transcrição é composta de uma região promotora líder (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do RNAr 18S, um espaçador não-codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de RNAr 5,8S, um outro espaçador não-codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de RNAr 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não-transcrito, IGS. As regiões ITSs possuem sequências que variam dentro e entre as populações. Sua utilização como marcador molecular é possível graças a essas variações (Mateus, 2006). Estima-se a presença de 20 a 200 cópias idênticas da região ITS-1 no genoma da *Leishmania* (Odiwuor, 2010).

Os agentes etiológicos da leishmania visceral, são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com forma flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do vetor (figura 4), e outra aflagelada ou amastigota, nos tecidos dos vertebrados (figura 5) (Ministério da Saúde, 2006).

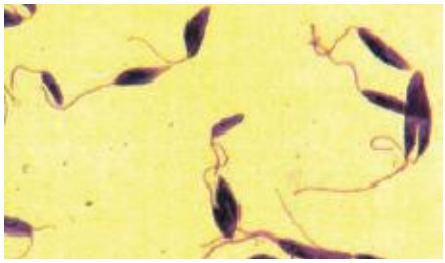


Figura 4: promastigoto
Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

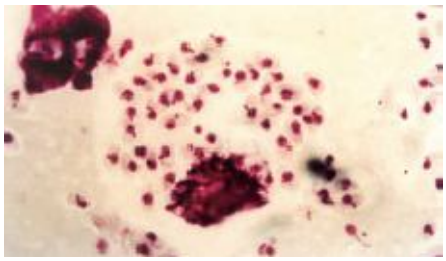


Figura 5: amastigoto
Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

1.3. *Reservatórios:*

Na área urbana e rural, o cão -*Canis familiaris*- vem sendo descrito como o principal reservatório da *L. chagasi*, tanto no Brasil, como nas Américas (OMS, 1990; Vieira & Coelho, 1998). No ambiente silvestre e rural, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Ministério da Saúde, 2006; Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006).

Em 1908 Nicolle & Comte demonstraram pela primeira vez o parasito em cães na Tunísia, sugerindo seu possível papel como reservatório da doença. Posteriormente, foi comprovada a transmissão natural em cães e assim registrado o primeiro foco de Leishmaniose Visceral Canina no mundo. No Brasil, as primeiras evidências de transmissão da doença foram em Abaeté/PA, pelo Instituto Oswaldo Cruz. Apenas em 1955 é que o cão foi considerado o reservatório da Leishmaniose Visceral, quando foi constatada a transmissão em cães residentes em zona urbana do município de Sobral/CE (Deane & Deane, 1955). Em 1957, Brener concluiu que o cão possuía papel fundamental na epidemiologia da LV no Brasil (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006).

O período de incubação do parasito em cães pode variar de 3 a 7 meses, ou até anos após a infecção. O período de transmissibilidade ocorre enquanto persistir o parasitismo na pele ou sangue dos animais infectados, e em cães a infectividade para os flebotomíneos persiste mesmo após o restabelecimento clínico desses animais (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006).

No Brasil, a forma assintomática da doença em canídeos é a mais frequênte, podendo variar de 40 a 60% em populações soropositivas (Camargo-Neves, 2004). Os cães assintomáticos são a maior fonte de transmissão do parasito para o homem em áreas endêmicas (Almeida, 2010).

O cão é um animal essencialmente doméstico, completamente adaptado à vida junto ao homem e, inclusive, se desloca com ele nas migrações. Até agora não há vacina de eficácia comprovada e nem cura para a leishmaniose canina, de modo que a única alternativa é a eliminação do animal infectado, tanto como medida de controle como para evitar seu sofrimento (Ferreira, 2010). Algumas tentativas de tratamento de cães utilizando drogas que são eficazes em humanos têm fracassado ou resultado apenas em uma melhora geral nos sintomas da doença, embora o parasitismo permaneça e o animal continue sendo fonte de infecção para o mosquito. Entretanto, medicamentos eficazes em seres humanos não devem ser utilizados em cães, pois podem induzir resistência dos parasitos (Ministério da Saúde, 2006, Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006).

Os cães são de extrema importância para o entendimento e controle das Leishmanioses, pois seu papel como reservatório natural do parasito pode ser a chave para a eliminação da doença na área urbana.

1.4. *Vetores:*

Os vetores são os flebotomíneos. Estes insetos são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (figura 6). No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a leishmaniose: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Ministério da Saúde, 2006).

Figura 6: fêmea *Lutzomyia longipalpis.*

A distribuição geográfica da *L. longipalpis* no Brasil se dá em todas as regiões, menos a sul. Estes insetos são pequenos, podendo medir de 1 a 3 mm de comprimento, possuem o corpo revestido por pêlos e são de coloração clara –castanho claro ou cor de palha- possuem comportamento característico, voando em pequenos saltos e pousando com as asas entreabertas. Na fase adulta, podem se encontrar em diversos tipos de ambiente, já na fase larvária, desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa luminosidade. Ambos os sexos necessitam de ingestão de carboidratos e a fêmea se alimenta de sangue para o desenvolvimento dos ovos (Ministério da Saúde, 2006).

O ciclo biológico da *L. longipalpis* se processa em ambiente terrestre, compreendendo quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva - constituída por quatro estádios -, pupa e adulto. Após a cópula, a fêmea deposita seus ovos em substrato úmido e com alto teor de matéria orgânica. Os ovos eclodem de 7 a 10 dias após a postura. As larvas alimentam-se vorazmente, desenvolvendo-se entre 20 e 30 dias, entretanto, se não houver condições favoráveis, podem entrar em diapausa. As pupas não se alimentam e possuem respiração aérea, este período pode durar de uma a duas semanas, em condições favoráveis. Os ovos se desenvolvem durante um período de 30 a 40 dias, dependendo da temperatura. A fêmea é hematófaga obrigatória, podendo realizar o repasto sanguíneo em diversos vertebrados. A longevidade da fêmea é de aproximadamente 20 dias (Ministério da Saúde, 2006).

A atividade dos flebotomídeos é crepuscular e noturna. A infecção da fêmea se dá quando sugam sangue de um animal infectado, ingerindo macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago

e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (Ministério da Saúde, 2006).

Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, sucedendo a liberação destas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo. Assim sendo, dar-se-á a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (figura 7) (Ministério da Saúde, 2006).

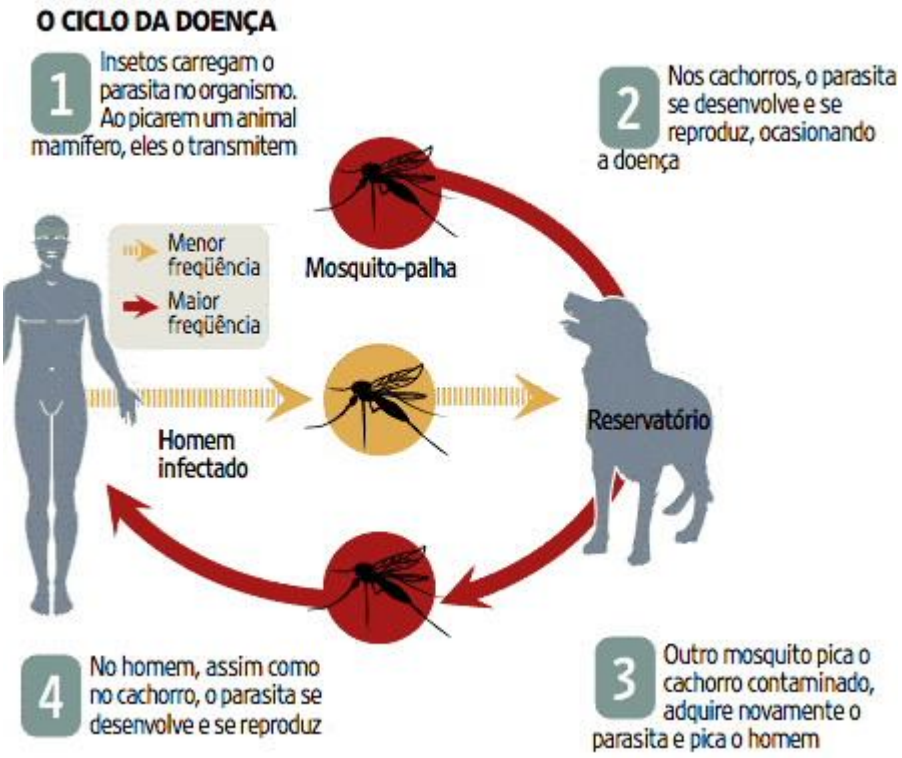


Figura 7: ciclo da Leishmaniose:

Fonte: Folha Online

No estado de São Paulo, em 1998, foram detectados pela primeira vez cães com suspeita clínica de Leishmaniose Visceral, no município de Araçatuba, fato que levou à identificação da *Leishmania chagasi* como agente causal, o que confirmou a transmissão autóctone de Leishmaniose Visceral Americana em cães na área urbana de Araçatuba. Em 1999, houve a

confirmação do primeiro caso autóctone da doença em humanos, também em Araçatuba. Até então, não haviam casos autóctones registrados no estado (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006).

A adaptação do vetor em zonas urbanas do estado de São Paulo está diretamente relacionada à expansão das Leishmanioses. Até maio de 2010, a espécie *L. longipalpis* foi detectada em 72 municípios do estado (figura 8) (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006; Boletim Epidemiológico Paulista, 2010).

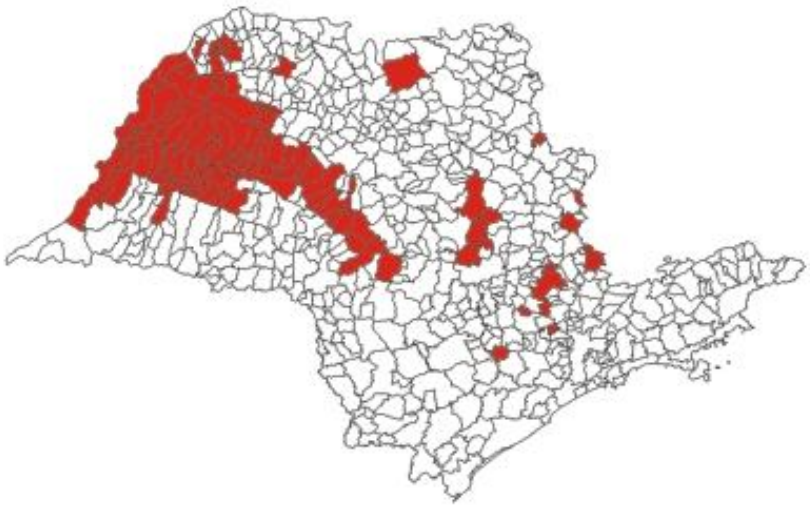


Figura 8: Distribuição de municípios com presença de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo, maio 2010.
Fonte: Sucen/SES-SP

A leishmaniose visceral canina desde a sua primeira detecção em 1999 até outubro de 2007 foi registrada em 57 municípios abrangendo todas as regiões em que o vetor foi detectado, exceto a Região Metropolitana de São Paulo, em que o mecanismo de transmissão ainda não foi elucidado. Verifica-se que a expansão se deu no sentido Oeste-Leste e, mais recentemente, no sentido Norte-Sul, na região Leste do estado de São Paulo, a partir do Estado de Minas Gerais (Figura 9) (Boletim Epidemiológico Paulista, 2007).

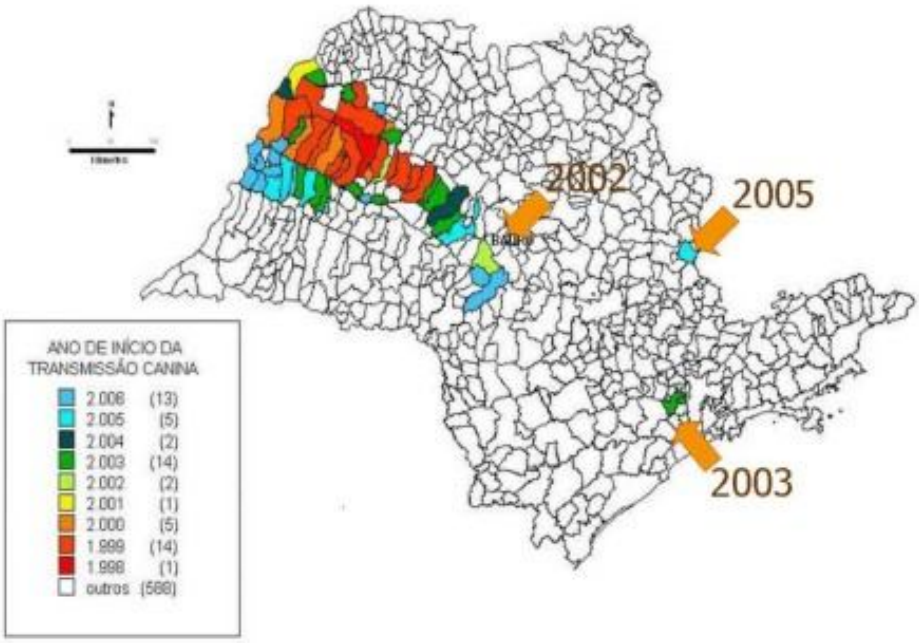
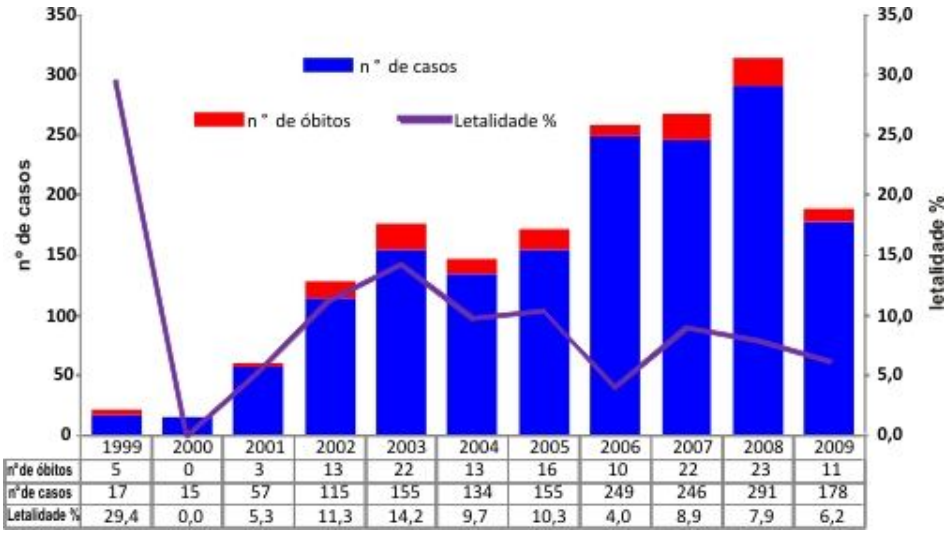


Figura 9: Distribuição de municípios com transmissão da leishmaniose visceral americana canina, por início de ano de transmissão. Estado de São Paulo, 2006.

Fonte: GEL/CCD/SUCEN

No período de 1999 até dezembro de 2009, foram notificados mais de 3.720 casos suspeitos de leishmaniose visceral, dos quais 1.750 confirmados. A figura 10 apresenta a série histórica do número de casos, número de óbitos e letalidade da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, no período.



	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
n° de óbitos	5	0	3	13	22	13	16	10	22	23	11
n° de casos	17	15	57	115	155	134	155	249	246	291	178
Letalidade %	29,4	0,0	5,3	11,3	14,2	9,7	10,3	4,0	8,9	7,9	6,2

Figura 10: Número de casos, número de óbitos e letalidade de leishmaniose visceral. Estado de São Paulo, de 1999 a 2009.

Fonte: SinanW e SinanNet. Dados atualizados em 15/03/2010.

1.5. Diagnóstico das Leishmanioses:

A doença apresenta semelhança com outras enfermidades infecto-contagiosas que acometem os cães, permitindo a possibilidade de diagnóstico clínico apenas quando o animal apresenta sinais clínicos comuns à doença, ou quando o animal se originar de regiões ou áreas de transmissão estabelecida. Entretanto, nas localidades cujo padrão socioeconômico é baixo, outros fatores podem estar associados, podendo dificultar o diagnóstico clínico, especialmente as dermatoses e a desnutrição, mascarando ou modificando o quadro clínico da leishmaniose visceral canina (LVC).

De uma forma geral, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. A problemática deve-se a variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas, a alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível.

No Brasil, o diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado no exame parasitológico ou sorológico. Para determinar o exame laboratorial a ser utilizado, é importante que se conheça a área provável de transmissão, o método utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica.

Dentre as técnicas sorológicas, podemos destacar os ensaios imunológicos:

Imunofluorescência indireta (Rifi), onde o resultado da imunofluorescência indireta é normalmente expresso em diluições. Consideram-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:40. Tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, podendo apresentar reações cruzadas principalmente com a leishmaniose tegumentar americana e a doença de Chagas.

Ensaio imunoenzimático (Elisa), consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro irão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos, caso estejam presentes, gerando um produto que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte do resultado do controle negativo.

Já o diagnóstico parasitológico, é o obtido pela observação de formas amastigotas do parasito em material biológico obtido, preferencialmente, da medula óssea, por ser um

procedimento mais seguro. A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende do grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, podendo diminuir para 80% em cães sintomáticos e mais ainda em cães assintomáticos. O material aspirado deverá ser examinado segundo a seguinte seqüência:

Exame direto: formas amastigotas do parasito podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, *Leishman*, Panóptico. O encontro de parasitos no material examinado depende do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se considerar uma lâmina como negativa).

Isolamento em meio de cultura (in vitro): formas amastigotas do parasito, inoculadas em meios de cultura especiais contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. O clássico meio de NNN é o mais comumente empregado. A utilização de meio líquido sobre o NNN, como o meio LIT ou de Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. As culturas devem ser mantidas entre 24ºC-26ºC e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até quatro semanas.

Diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas, a partir da década de 80, para a detecção e identificação precisa das *Leishmanias*, eliminando a necessidade de seu isolamento em cultura. Métodos de diagnóstico, como o a PCR (reação em cadeia da polimerase), constituem uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral, pois podem chegar a 94% de sensibilidade. Contudo, seus resultados dependem de diversas variáveis envolvidas, entre elas podemos destacar o tipo de amostra (aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel filtro), alvo do DNA utilizado para amplificação, método de extração do DNA e a procedência do animal (Ministério da Saúde, 2006). Os métodos moleculares estão sendo uma ferramenta de grande utilidade em diagnósticos, graças a sua rapidez, sensibilidade e especificidade, principalmente para detecções em cães assintomáticos (Gontijo, 2004; Queiroz, 2010).

O uso do kDNA, que é considerado o melhor alvo (Gontijo, 2004), para o diagnóstico vem sendo utilizado com sucesso por diversos autores em diferentes países, sendo utilizado também para a identificação de espécies, pela utilização da RFLP (análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição) (Anders, 2002; Ikonopoulos, 2003; Rodriguéz-González, 2007; Assis, 2009; Alonso, 2010). O uso da PCR em tempo real - utilizando como alvo o kDNA - para diagnóstico também está sendo avaliado, pois é uma alternativa prática e rápida a identificação de espécies por digestão enzimática, que é laboriosa, entretanto, ainda não foi obtido resultados satisfatórios para sua utilização como rotina (Abda, 2010).

Outra região – ITS-1 - vem sendo amplamente utilizada tanto para diagnóstico como para a identificação das espécies de *Leishmania*, também fazendo uso de técnicas de digestão enzimática do produto de PCR (Kuhls, 2005; Gelanew, 2010; Mahdy, 2010; Odiwuor, 2010; Yang, 2010).

Muitos estudos foram realizados com sucesso no Velho Mundo e com diversas espécies do parasito pela PCR, contudo pouco se sabe sobre o diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral em cães.

A comparação entre dois alvos distintos para a PCR, o kDNA e a região ITS-1, se faz necessária, a fim de identificar o melhor diagnóstico para a doença em cães, já que no Brasil, poucos estudos foram realizados.

2. Lectina ligante de manose (MBL):

2.1. *Histórico:*

A lectina ligante de manose (MBL) é uma lectina sérica membro da família das colectinas, sendo uma importante constituinte da imunidade inata. Também é uma das mais de trinta moléculas do sistema complemento (Turner, 2003).

Sua história recente se inicia em 1904, quando Wrigth & Douglas descreveram a primeira imunodeficiência, a qual o soro de pacientes com infecções recorrentes por *Staphylococcus* falhava na opsonização das bactérias via fagocitose por leucócitos polimorfonucleados normais.

Em 1968, Miller *et al.* também descreveram uma falha na opsonização de bactérias em uma menina de 2 anos de idade. A paciente sofria de infecção recorrente no trato respiratório superior e de quadros diarréicos persistentes, sendo que quase nenhuma melhora clínica foi observada como resposta ao tratamento com antibióticos. Os leucócitos polimorfonucleares da paciente revelaram uma capacidade diminuída em fagocitar partículas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococus aureus* inativadas por calor. Contudo, as mesmas partículas eram fagocitadas normalmente em soro heterólogo, indicando que o problema era humoral. O defeito era revertido quando plasma de outros doadores era utilizado em um mesmo ensaio, o que resultava em uma melhora clínica. Um defeito fagocítico semelhante foi descoberto no soro da mãe da paciente, como também em vários de seus parentes.

Em 1976, foi observado por Soothil & Harvey em crianças com infecções freqüentes e inexplicáveis a opsonização defeituosa de leveduras. Um defeito similar foi notado em algumas das mães destas crianças, porém, os pais possuíam funções normais, o que sugeria um defeito primário e de herança dominante. A falha na opsonização em pacientes normais indicou que o fator

deficiente pode ser limitante tanto em plasmas normais quanto em defeituosos. Já em 1977, continuando suas pesquisas na área, os autores sugeriram a existência de um caminho alternativo para a opsonização, já que as vias do sistema complemento não apresentavam alterações. E ainda, propuseram que esta rota alternativa poderia ocorrer no intuito de evitar alergias, já que durante a infância, a maior parte das alergias é resultado de uma deficiência transiente de imunoglobulina A (IgA), que por sua vez, é responsável pela ativação do sistema complemento. Também neste ano, outro grupo de pesquisadores descobriu que receptores de manose ou manose-*like* eram responsáveis pela "captura" da *E. coli* em células da mucosa humana (Ofek, 1977).

Kawasaki e colaboradores, isolaram pela primeira vez em 1978, a MBL a partir de soro de coelho e alguns anos depois, a MBL humana finalmente foi isolada (Kawasaki, 1983).

Em 1981, Turner *et al*. comprovaram que a molécula C3b estava envolvida na opsonização defeituosa, visto a rapidez na taxa de deposição desta em soros que opsonizavam leveduras normalmente e a lenta deposição de C3b nos de opsonização defeituosa.

Na segunda metade da década de 80, foi proposto que a lectina ligante de manose seria a responsável pela ativação do sistema complemento (Ikeda, 1987).

Nos primórdios dos anos 90, foi descoberta outra molécula, o receptor de C1q, que assim como a MBL, a conglutinina e as proteínas surfactantes de pulmão, também se ligava a proteínas solúveis com domínios de colágeno, participantes da fagocitose (Malhotra, 1990).

Alguns anos mais tarde, a MBL é vista como uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo. A possibilidade do reconhecimento do próprio e do não-próprio é dada graças à especificidade da ligação da MBL. (Fraser, 1998).

2.2. *Estrutura e função:*

O Sistema Complemento (SC) é composto por mais de 30 proteínas plasmáticas e de superfície celular. É um sofisticado sistema de defesa do hospedeiro que pode ser acionado tanto pelo sistema imune inato quanto pelo mecanismo de imunidade mediada por anticorpos. As proteínas do SC são sintetizadas nos hepatócitos e macrófagos, além de outros tecidos. Já as proteínas reguladoras ligadas à membrana celular são sintetizadas nas células sobre as quais são expressas (Moller-Kristensen, 2006). Uma vez que o SC é ativado, uma cascata de reações acontece, resultando na clivagem do terceiro componente do complemento (C3), a qual se denomina Via da Ativação. Existem três vias: a Clássica, que é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo; a Alternativa, ativada por micro-organismos e a das Lectinas, ativada por domínios de

reconhecimento de carboidratos. A via das lectinas envolve receptores de reconhecimento-padrão, como a lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas, que são uma família de proteínas estruturalmente semelhantes às colectinas, possuindo um domínio de colágeno ligado a um domínio fibrinogênio-*like*. A MBL aparece associada a uma família de proteases, conhecidas com MASPs (serino-protease associada à MBL). A associação entre a MASP-1 e a MASP-2 com as ficolinas (1, 2 e 3) e com a MBL são essenciais para a ativação da cascata do complemento (Iturry-Yamamoto, 2001; Weiss, 2007) que, após acionado, culmina em quatro importantes efeitos biológicos: opsonização de patógenos, ativação dos leucócitos, morte dirigida de patógenos e modulação da inflamação (Fujita, 2002; Turner, 2003). A remoção de células apoptóticas pela MBL e pelo C1q foi comprovada por Ogden e colaboradores em 2001 e, em estudo posterior, foi confirmada a ligação tanto da MBL quanto do C1q em diversas fases da apoptose e também a ligação da MBL com células necróticas (Nauta, 2003). A MBL pode se associar a pelo menos quatro MASPs, a MASP-1, MASP-2, MASP-3 e MASp19, uma forma truncada da MASP-2.

A MBL pertence à família das colectinas, que são proteínas que possuem um domínio colágeno-*like* e outro de reconhecimento de carboidrato (DRC). Três polipeptídios unidos formam uma subunidade idênticas de 32kDa, sendo que cada cadeia é caracterizada por uma lectina (ou DRC), uma região hidrofóbica (*neck)*, uma região de colágeno e uma região N-terminal rica em colágeno. A MBL encontrada em humanos é formada por 3 a 6 dessas subunidades, possuindo um peso molecular que pode variar de 300 a 650kDa (figura 11). Cada um dos três DRC de cada subunidade dista 45Å um do outro (Dommet, 2006). Através do domínio de reconhecimento de carboidrato –que se liga a um íon de cálcio, possibilitando a formação de pontes coordenadas com os açucares- a MBL determina a seleção de carboidratos por intermédio da presença horizontal do grupo hidroxil nas posições 3’ e 4’ do anel de piranose, na presença de cálcio (figura 12). Portanto, os principais candidatos a formações de ligações junto à MBL são a D-manose, a N-acetil-glucosamina, D-glucose e L-fucose (Sorensen, 2005; Dommet, 2006). Carboidratos como a galactose, que possuem o grupo hidroxil na vertical, e o ácido siálico – comumente encontrado em superfícies celulares de mamíferos - apresentam afinidade indetectável à MBL, tornando os organismos que contém ácido siálico em sua superfície, resistentes ao ataque da MBL. A MBL é capaz de reconhecer carboidratos específicos oriundos de diversos micro-organismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, protozoários, alguns vírus, células apoptóticas, DNA livre e outros parasitas. Ela também é capaz de evitar o reconhecimento do próprio, e é capaz de se ligar em diversos sítios simultaneamente, assegurando um funcionamento eficiente (Fujita, 2002; Turner, 2003; Klein, 2005; Takahashi, 2006).

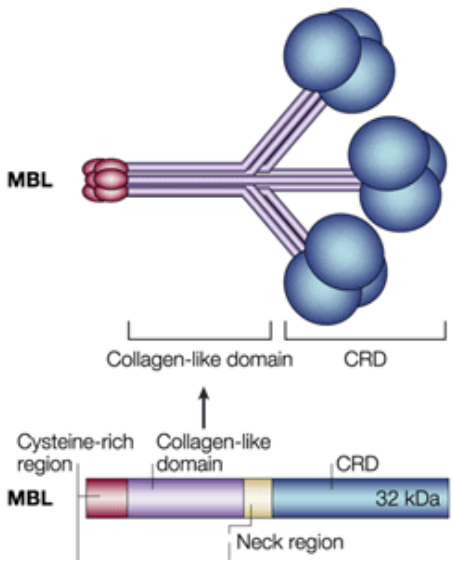


Figura 11: esquema da estrutura da MBL.

Figura adaptada de Fujita, 2002.

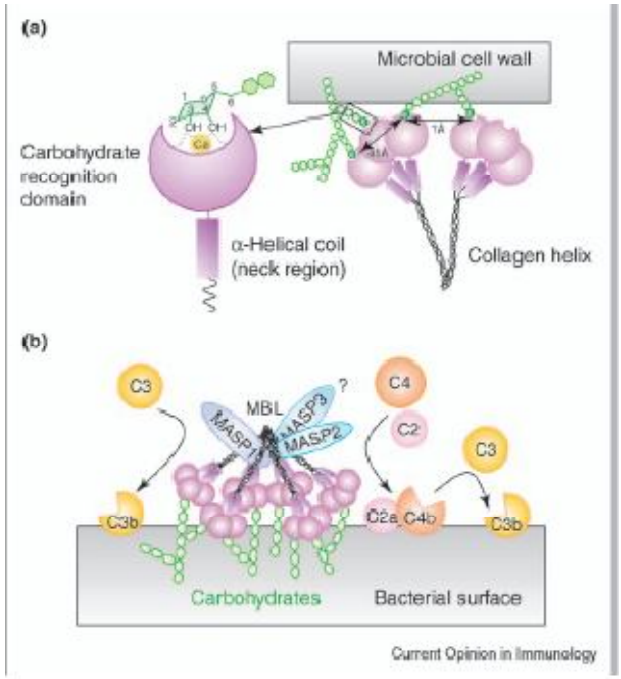


Figura 12: reconhecimento de carboidrato.

Fonte: Takahashi, 2006.

A MBL pode atuar como uma opsonina, se ligando a carboidratos de patógenos e, posteriormente, interagindo com os receptores da MBL em células fagocíticas. Entretanto, ela também pode desencadear a opsonização do complemento, o que resultaria na deposição de

C3b/iC3b nos alvos e simularia a fagocitose pela via dos receptores C3, CR1, CR3 e CR4 (Presanis, 2003). O reconhecimento de um corpo estranho ao organismo, tanto pela via clássica como pela das lectinas, leva à ativação da cascata de proteases que clivam os componentes dos complementos C2 e C4, levando à formação do complexo C4b2a que, por sua vez, cliva o C3 em C3a e C3b. O C3b é um componente central no SC graças às suas diversas interações de ligações. Ele se liga covalentemente às superfícies ativadoras do complemento –formando o subproduto iC3b- atuando com opsonina para fagocitose e o C3b também pode se ligar à C3 convertase, formando a C5 convertase. A C5 convertase inicia o complexo de ataque a membrana (MAC). O C3a atua mediando a resposta inflamatória (figura 13) (Presanis, 2003). Segundo estudos realizados por Schweinle e colaboradores, em 1993, a região colégeno-*like* da MBL é necessária para a ativação do sistema complemento.

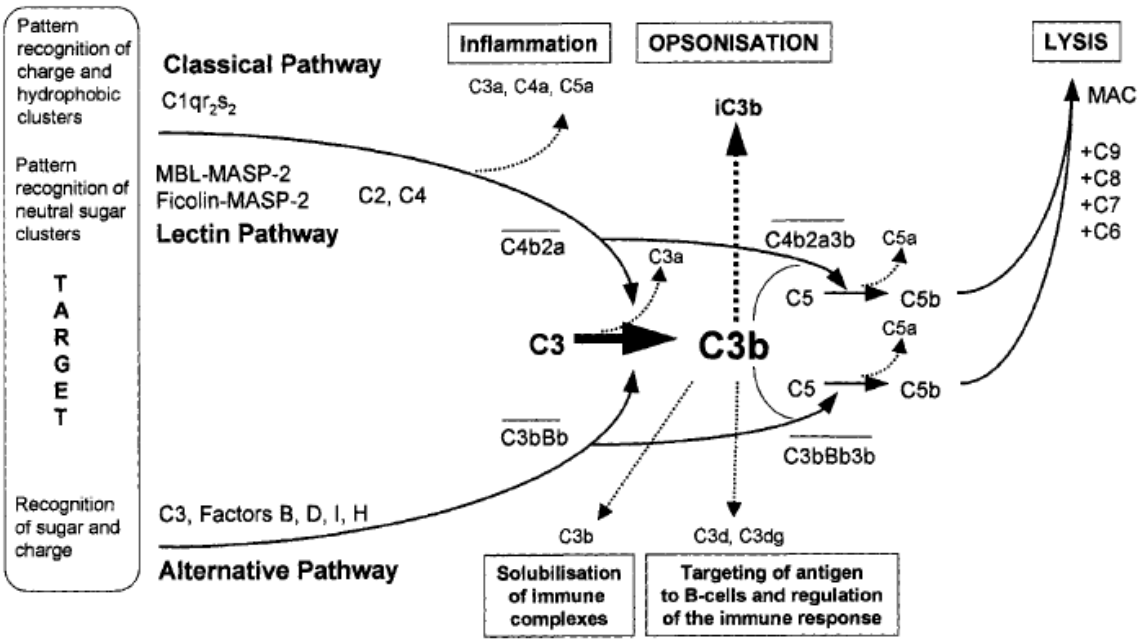


Figura 13: Sistema Complemento.

Fonte: Presanis, 2003.

A molécula de reconhecimento-padrão da via clássica é o C1q, a qual é similar à estrutura quaternária da MBL (Presanis, 2003).

O complexo MBL-MASP, assim como o C1s, é capaz de clivar o C2 e o C4, produzindo a C3 convertase (C4bC2a) (Matsushita, 1992), que por sua vez pode clivar centenas de moléculas C3 em C3a e C3b, o que irá culminar na interação do alvo na membrana celular, formando o

complexo terminal do complemento (TCC) (Garred, 2009), porém, apenas a MASP-2 demonstrou possuir esta atividade (Thiel, 1997; Presanis, 2003), enquanto que a função da MASP-1 e da MASP-3 permanece em discussão (Weiss, 2007).

2.3. Genética:

O gene que codifica a MBL foi caracterizado em galinha e em alguns mamíferos, como o chimpanzé, boi, camundongo, entre outros e o mais estudado até agora é o humano. O gene da MBL em cães ainda não foi localizado, contudo, sua versão predita já está disponível, a qual é similar a lectina ligante de manose (A), gerada a partir de dados que indicam uma similaridade em 7 EST (expressed sequences tags) e 32 proteínas, localizadas no cromossomo 4 do cão (número de acesso no GenBank: cromossomo - LOC 479260, proteína – XP 536402.2), sendo homologo ao rato, camundongo, boi e chimpanzé.

Em 1988, Ezekowitz e colaboradores isolaram pela primeira vez o cDNA e os clones genômicos da MBL humana. Foi dado o nome de mbl2 ao gene que codifica a MBL humana, pois também existe um pseudogene, chamado de mbl1. Ambos estão situados no mesmo cromossomo, próximos um do outro. Em camundongos também foi relatada a existência de duas formas do gene, a mbl-a e mbl-c, mas estes se encontram em cromossomos distintos. Os genes mbl1 e mbl2 foram encontrados no macaco Rhesus, enquanto que em chimpanzés e humanos, a MBL só é representada pelo gene mbl2 (Garred, 2008).

Em humanos, a região codificadora da proteína é constituída por quatro exons e três introns. O exon 1 codifica o sinal do peptídeo, o domínio rico em cisteína e sete cópias de Gly-Xaa-Yaa –formação da tripla hélice de estruturas de colágeno- essas cópias são repetidas mais 12 vezes no exon 2. O exon 3 codifica a região do pescoço (“neck”) e o exon 4 o domínio de ligação do carboidrato (CRD), como demonstrado na figura 14 (Dommet, 2006; Garred, 2008).

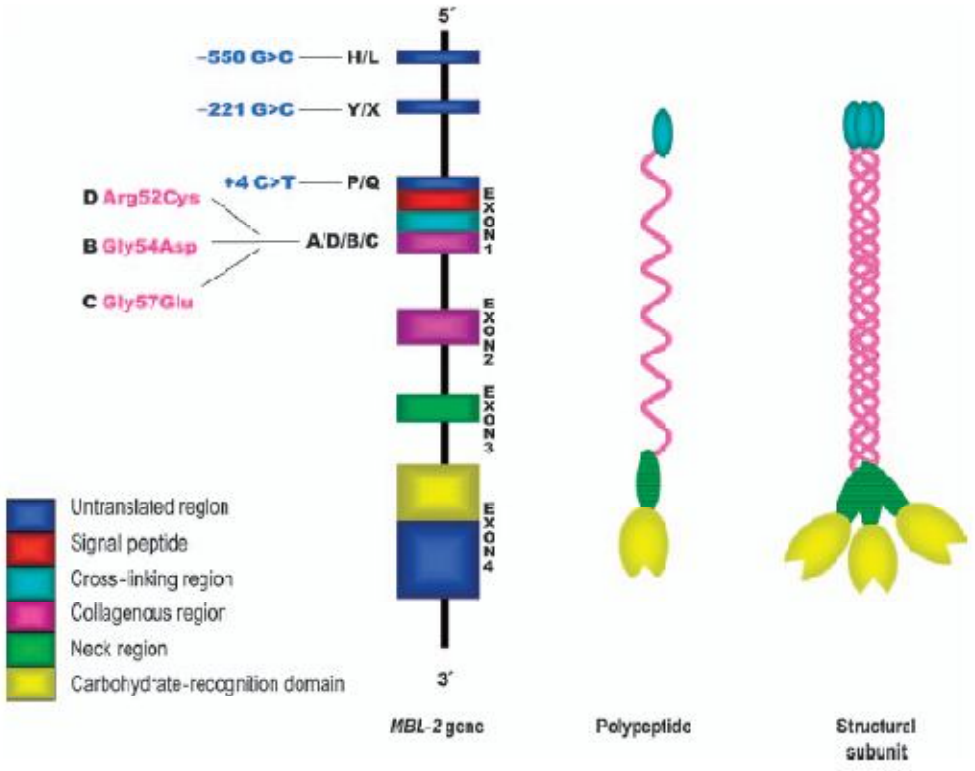


Figura 14: esquema do gene mbl2:

Fonte: Dommett, 2006.

Nas últimas décadas, pelo menos dez haplótipos do gene em humanos já foram descritos (Takahashi, 2006). Em 1991, a sequência nucleotídica dos quatro exons do gene humano mbl2 foi determinada em duas crianças britânicas que apresentavam infecções recorrentes e níveis baixos de MBL (Sumiya et al., 1991). Em ambos os indivíduos, uma mutação pontual foi detectada no codon 54, mudando a sequência de GGC para GAC e provocando a substituição do aminoácido ácido aspártico pelo aminoácido glicina na proteína traduzida. Estudos familiais confirmaram que o defeito era herdado de forma autossômica dominante. Em 1992, uma segunda mutação foi identificada no exon 1, desta vez no códon 57, o que provocava a substituição de glicina por ácido glutâmico (Lipscombe et al., 1992), e em 1994, uma terceira mutação no códon 52 do mesmo exon foi relatada, provocando a substituição de arginina por cisteína (Madsen et al., 1994). Essas mutações são comumente chamadas de variantes B, C e D respectivamente, sendo denominado A o alelo selvagem. As três mutações apresentam um efeito pronunciado nas concentrações séricas de MBL, medidas num ensaio de ELISA de captura. Em 2003, Garred e colaboradores (1) mostraram o resultado das medições nos soros de 1183 indivíduos, e os genótipos de MBL

correspondentes. Em homozigotos variantes e heterozigotos compostos não se detectou a proteína (limite de detecção 20µg/µl). Já nos heterozigotos para as mutações, o efeito mais profundo foi observado para o alelo B e para o C, enquanto que o alelo D não foi capaz de provocar diminuição semelhante (Garred, 2003).

A grande maioria da MBL produzida no fígado se origina dos transcritos iniciados no exon 1, porém de 10 a 15% do total é codificada a partir do exon 0 (Seyfarth et al., 2005). Além disso, alelos na região promotora do exon 1 contribuem para variações adicionais na concentração sérica da MBL (Madsen et al., 1995; Madsen et al., 1998).

Inicialmente, dois sítios polimórficos na região promotora foram descritos nas posições −550 (variantes H/L) e −221 (variantes X/Y), ambos são substituições nucleotídicas únicas de G para C. Com relação a suas posições no cromossomo, os seguintes haplótipos puderam ser identificados: HYA, LYA, e LXA em um cromossomo A normal, e HYD, LYB e LYC nos cromossomos carregando alelos estruturais variantes (Madsen et al., 1995). Os haplótipos HYA, LYA e LXA se correlacionam muito bem com níveis altos, intermediários e baixos de MBL, respectivamente. Contudo, o haplótipo LYA pôde ser subdividido em haplótipos adicionais quando um outro polimorfismo (P/Q) localizado na porção 5´ não traduzida do exon 1 (posição +4) foi descoberto (Madsen et al., 1994). Então o tipo LY, na verdade, consiste dos seguintes haplótipos: LYPA, LYPB, LYQA e LYQC.

Para facilitar a interpretação dos efeitos nas concentrações séricas relacionados a todos os haplótipos encontrados para a MBL, usualmente, os dados são apresentados de uma maneira mais simplificada: os alelos variantes B, C e D são agrupados e classificados como O, mostrando somente o alelo da posição −221 (X/Y) do promotor por ser o que mais significativamente altera os níveis de MBL (Garred et al., 1999; Graudal et al., 2000).

2.4. *Associação a doenças:*

Em 1975, Scott e colaboradores, descreveram um caso em que quatro gerações de uma família com defeito na opsonização e fagocitose de levedura, consistia uma herança dominante. Dois dos pacientes afetados eram saudáveis, um tinha osteomielite crônica e o quarto desenvolveu uma doença fatal na infância, caracterizada por dermatite esfoliativa, diarréia, infecções bacterianas múltiplas visto que todas as tentativas de cura falharam.

Graças ao papel da MBL na primeira linha de defesa do organismo contra diversos micro-organismos antes mesmo da produção de anticorpos, atribuiu-se a função de ante-anticorpo, isto é, anteceder os anticorpos no combate a micro-organismos invasores (Ezekowitz, 1991). Já a

deficiência de MBL foi associada ao aumento da susceptibilidade a várias doenças infecciosas, principalmente a patógenos extracelulares (Summerfield et al., 1997) e, particularmente, com micro-organismos que causam infecções agudas do trato respiratório durante a infância (Koch et al., 2001).

A associação da MBL, em humanos, a doenças vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. Já se sabe que, pelo menos quatro haplótipos do mbl2 causam a diminuição nas taxas da MBL circulante no soro (Takahashi, 2006). Uma diminuição gradual nas concentrações de MBL no soro está relacionada com o aumento da severidade da sepse em pacientes com a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Garred, 2003). Contudo, ainda não existe um consenso de quanto seriam as taxas normais da proteína no soro humano. Na literatura, são encontradas descobertas contraditórias, diferenças genéticas intrínsecas, falhas na padronização metodológica e interpretação de dados discrepante. Entretanto, as evidências disponíveis validam a correlação entre a concentração da MBL no soro e infecções, doenças auto-imunes, inflamações e doenças metabólicas e vasculares (Takahashi, 2006).

Graças aos avanços na compreensão do funcionamento da MBL, já está sendo proposto o uso terapêutico da molécula da MBL, como por exemplo, seu uso como agente contra o vírus Ebola, por intermédio de uma molécula quimérica L-FCN (ficolina) /MBL76 (Michelow, 2010).

Uma grande variedade de estudos realizados nas últimas décadas tem demonstrado a importância do sistema complemento na resposta imune da leishmaniose. Na década de 80, foi demonstrado o efeito lítico do soro humano fresco em promastigotas de *L. donovani*, efeito este não observado sobre a forma amastigota. Os autores também observaram que o aquecimento do soro humano a 56°C por 30 minutos retirava este efeito, ficando assim evidente que o sistema complemento era o responsável por este fenômeno (Pearson & Steigbigel, 1980). Nessa mesma década diferentes estudos determinaram a ativação das vias clássica e/ou alternativa do complemento por algumas espécies de *Leishmanias.* Mosser demonstrou a ativação da via clássica por formas promastigotas de *L. donovani*, assim como da alternativa por formas promastigotas de *L. major, L. mexicana mexicana, L. mexicana amazonensis, L. braziliensis guyanensis* (Mosser, Burke et al. 1986). Num outro estudo esses autores demonstraram que a ativação do complemento e deposição de fragmentos como C3b na superfície do parasito promove um aumento da sua fagocitose (Mosser & Edelson 1984).

Na década de 90, Mosser realizou um trabalho com o objetivo de verificar a importância do receptor CR3 na ligação de espécies de *Leishmania* a macrófagos humanos. O resultado obtido mostrou que as formas promastigotas de *Leishmania* necessitam da ativação do complemento ou mais especificamente, da deposição de C3bi na sua superfície, para que possam ser fagocitadas

pelos macrófagos via receptor CR3. Como a fagocitose é uma importante etapa na instalação de doenças causadas por microrganismos intracelulares como as *Leishmanias,* estes resultados forneceram evidências de como estes parasitos utilizam o sistema imune do hospedeiro mamífero para instalação da doença (Mosser, 1992).

Uma função imunomoduladora da MBL foi demonstrada na Leishmaniose Visceral. Santos *et al.* observaram a associação entre a concentração sérica de MBL em pacientes e a suscetibilidade a leishmaniose visceral causada *L. chagasi.* Esses autores observaram que a fagocitose das formas promastigotas opsonizadas com MBL induz a secreção de alta concentração de fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 por monócitos humanos, demonstrando assim que a MBL pode modular o curso clínico da doença e a função dos monócitos infectados (Santos, Costa et al. 2001). Em 2007, outro grupo conseguiu relacionar os fenótipos que aumentam as taxas de MBL no soro com a probabilidade de desenvolver leishmaniose visceral (Alonso, 2007).

Todos estes estudos demonstram que o sistema complemento e a MBL estão envolvidos diretamente no processo de instalação da leishmaniose e também evidenciam que as diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar comportamentos distintos frente a esse sistema.

A MBL e as *Leishmanias* estão intimamente relacionadas, portanto, é possível que o sistema imune dos cães respondam do mesmo modo ao ataque dos protozoários, relacionado com os níveis séricos da MBL no plasma, que em humanos é determinado por mutações no promotor e no exon 1 do gene mbl2.

Assim, o presente trabalho busca investigar a existência de interações entre a MBL canina e a Leishmaniose Visceral Canina.

Parte II:

Pesquisa de mutação do gene predito da Lectina Ligante de Manose em cães.

3. Introdução:

A lectina ligante de manose (MBL) é uma lectina sérica membro da família das colectinas, sendo uma importante constituinte da imunidade inata. Também é uma das mais de trinta moléculas do sistema complemento (Turner, 2003). Miller *et al.* descreveram uma falha na opsonização de bactérias em uma paciente que sofria de infecções recorrentes no trato respiratório e não apresentava melhora clínica quando tratada. Um defeito fagocítico semelhante foi descoberto no soro da mãe da paciente, como também em vários de seus parentes (Miller, 1968). A MBL é vista como uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo. A possibilidade do reconhecimento do próprio e do não-próprio é dada graças à especificidade da ligação da MBL. (Fraser, 1998).

Uma vez que o Sistema Complemento é ativado, uma cascata de reações acontece, resultando na clivagem do terceiro componente do complemento (C3), a qual se denomina Via da Ativação. Existem três vias: 1- a Clássica, que é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo; 2- a Alternativa, ativada por micro-organismos e 3- a das Lectinas, ativada por domínios de reconhecimento de carboidratos. A via das lectinas envolve receptores de reconhecimento-padrão, como a lectina ligante de manose (MBL) e as ficolinas, que são uma família de proteínas estruturalmente semelhantes às colectinas, possuindo um domínio de colágeno ligado a um domínio fibrinogênio-*like*. A MBL pode atuar como uma opsonina, se ligando a carboidratos de patógenos e, posteriormente, interagindo com os receptores da MBL em células fagocíticas. Entretanto, ela também pode desencadear a opsonização do complemento, o que resultaria na deposição de C3b/iC3b nos alvos e simulando a fagocitose (Presanis, 2003).

O gene que codifica a MBL foi caracterizado em galinha e em alguns mamíferos, como o chimpanzé, boi, camundongo, entre outros e o mais estudado até agora é o humano. O gene da MBL em cães ainda não foi localizado, contudo, sua versão predita já está disponível, a qual é similar a lectina ligante de manose (A), sendo homologa ao rato, camundongo, boi e chimpanzé.

A deficiência de MBL é associada ao aumento da susceptibilidade a várias doenças infecciosas, principalmente à patógenos extracelulares (Summerfield et al., 1997).

Em humanos, a associação da MBL à doenças vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. Já se sabe que, pelo menos quatro haplótipos do mbl2 causam a diminuição nas taxas da MBL circulante no soro (Takahashi, 2006). Uma grande variedade de estudos realizados nas últimas décadas tem demonstrado a importância do sistema complemento na resposta imune da leishmaniose. Diferentes estudos determinaram a ativação das vias clássica e/ou alternativa do complemento por algumas espécies de *Leishmanias.*

Uma função imunomoduladora da MBL foi demonstrada na Leishmaniose Visceral por Santos *et al.* que observaram a associação entre a concentração sérica de MBL em pacientes e a suscetibilidade a leishmaniose visceral causada *L. chagasi.* Outro grupo conseguiu relacionar os fenótipos que aumentam as taxas de MBL no soro com a probabilidade de desenvolver leishmaniose visceral (Alonso, 2007). Deste modo, demonstram que o sistema complemento e a MBL estão envolvidos diretamente no processo de instalação da leishmaniose e também evidenciam que as diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar comportamentos distintos frente a esse sistema.

A MBL e as *Leishmanias* estão intimamente relacionadas, portanto, é possível que o sistema imune dos cães respondam do mesmo modo ao ataque dos protozoários, relacionado com os níveis séricos da MBL no plasma, que em humanos é determinado por mutações no promotor e no exon 1 do gene mbl2. Assim, o presente trabalho busca investigar a existência de interações entre a MBL canina e a Leishmaniose Visceral Canina através de pesquisa de mutações no gene predito codificante da lectina ligante de manose em cães infectados e não infectados por *Leishmania chagasi*.

4. Material e Métodos:

4.1. Material biológico:

O material biológico proveniente de cães foi obtido do Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) do Departamento de Microbiologia e Imunologia, situado no Instituto de Biociências de Botucatu – SP. Todas as amostras consistiram de DNA extraído de sangue total colhido com EDTA com kit comercial. As mesmas foram encaminhadas ao Laboratório para diagnóstico de erliquiose canina no período de 2002 a 2005 e seu DNA foi devidamente armazenado. O uso do material biológico armazenado foi permitido pelos veterinários solicitantes, para a realização de pesquisas científicas, através de formulário.

Foram utilizadas 96 amostras de DNA do Laboratório de Diagnóstico Molecular onde 9 foram procedentes de Brasília/DF, 14 de Fortaleza/CE, 6 de Botucatu/SP, 3 de Barretos/SP, 4 de São José do Rio Preto/SP, 1 de Ourinhos/SP, 2 de Vitória/ES, 14 de Bauru/SP, 10 de São Paulo, 7 de Salvador/BA, 3 de Campinas/SP, 6 de Santos/SP, 1 de Paracatu/MG, 5 de Vila Velha/ES, 1 do Rio de Janeiro/RJ, 1 de Porto Alegre/RS, 3 de São Francisco de Paula/RS, 1 de Bofete/SP, 1 de Maceió/AL, 2 de Belo Horizonte/MG, 1 de Maringá/PR e 2 do Uruguai.

As idades dos cães variaram de 5 meses a 13 anos, e quanto ao gênero estão divididas em 61 machos e 35 fêmeas.

Das raças: sem raça definida -18, poodle -13, pastor alemão -10, fila brasileiro -5, labrador – 4, weimaramer -4, cocker spaniel – 4, lhasa apso -3, rottweiler -3, daschund -3, yorkshire -3, beagle -3, boxer -3, pit bull -2, schauzer -2, maltês -2, pointer -1, bull terrier -1, pinsher -1, bichon frise -1, dálmata-1, papillon -1, teckel -1, golden retriever -1, chow-chow -1, cane corso -1, basset haund -1, fox paulistinha -1.

4.2. Amplificação:

Os primers para a amplificação da região correspondente ao gene mbl (A) foram desenhados pelo programa Primer 3.

Para as reações de amplificação, foi utilizado o kit Gotaq® Colorless Master Mix da Promega, contendo: master mix 2X, *Taq* DNA polimerase, tampão (pH 8,5), 400µM dATP, 400µM dCTP, 400µM dGTP, 400µM dTTP e 3mM $MgCl_2$.

Tabela 1: *primers* utilizados para amplificar e sequênciar o gene da MBL canina.

Exon 1	Foward	5'_- ATGTTCTTGTCTTCGTCACTTCC -_3'
	Reverse	5'_- TTTGGAGAAGATGACCTATTGC -_3'
Intron 1	Foward	5´_-CGAGATGGACTCAAGGGAGA-_3´
	Reverse	5´_-TTTGTGGCCCTTTAGTCCTG-_3´
Exon 2	Foward	5´_-AAAATTGAATGAGCCGCAGT-_3´
	Reverse	5´_-GCTGGGGTGAGCTCCTTAC_-3´

Exon 1: O volume final de cada reação foi de 30µl dos quais foram constituídos: 15µl do mix, 0,75µl de cada *primer* a 10µM, 0,75µl do DNA e 12,75µl de água livre de nucleases.

Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador. As condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 95ºC, seguido por 30 ciclos: 1 minuto a 95ºC, para a desnaturação; 45 segundos a 48ºC para o anelamento dos *primers* e 30 segundos a 72ºC para a extensão da cadeia de DNA. Em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 5 minutos a 72ºC e mantido a 22ºC após o término dos ciclos, até sua retirada do termociclador. Foi gerado um fragmento de 255 pares de bases.

Intron 1: O volume final de cada reação foi de 25µl dos quais foram constituídos: 12,5µl do mix 0,75µl de cada *primer* a 10µM, 1,5µl do DNA e 9,5µl de água livre de nucleases.

Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador. As condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 95ºC, seguido por 30 ciclos: 1 minuto a 95ºC, para a desnaturação; 45 segundos a 58ºC para o anelamento dos *primers* e 30 segundos a 72ºC para a extensão da cadeia de DNA. Em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 5 minutos a 72ºC e mantido a 22ºC após o término dos ciclos, até sua retirada do termociclador. Foi gerado um fragmento de 455 pares de bases.

Exon 2: O volume final de cada reação foi de 25µl dos quais foram constituídos: 12,5µl do mix 0,75µl de cada *primer* a 10µM, 1,5µl do DNA e 9,5µl de água livre de nucleases.

Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador. As condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 95ºC, seguido por 30 ciclos: 1 minuto a 95ºC, para a desnaturação; 45 segundos a 58ºC para o anelamento dos *primers* e 30 segundos a 72ºC para a extensão da cadeia de DNA. Em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 5 minutos a 72ºC e mantido a 22ºC após o término dos ciclos, até sua retirada do termociclador. Foi gerado um fragmento de 149 pares de bases.

Os produtos amplificados foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989), 2µl de tampão de amostra foram adicionados à 8µl do produto amplificado pela reação de PCR e aplicado em gel de agarose 1,5% em solução de TAE 1X contendo intercalante Gel Red® a 1µl/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

4.3. Purificação:

As amostras contendo os fragmentos do intron 1 e do exon 2 foram purificadas com o kit comercial de purificação Amicon® Ultra 0,5ml 30K, da Millipore, seguindo instruções do fabricante.

4.4. Sequênciamento:

A purificação do produto de PCR, a reação de sequência e o sequênciamento do exon 1 foram realizadas na empresa MacroGen, localizada na Coréia.

A reação de sequência e o sequênciamento do intron 1 e do exon 2 foram realizadas pela empresa Macrogen, na Coréia.

4.5. Análises:

As análises foram realizadas pelo software Molecular Evolutionary Genetics Analysis - Mega 4.0.2.

5. Resultados:

5.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR):

O uso dos *primers* nas reações de PCR foi um sucesso, sendo necessário apenas um pequeno ajuste nas concentrações dos oligos e das amostras, pois os reagentes que estavam em excesso nas reações estavam muito evidentes nas fotos dos géis após corrida eletroforética, podendo interferir no sequênciamento, mesmo após purificação dos *amplicons*. Após o ajuste, todos os fragmentos foram amplificados do modo esperado (figuras 15 e 16)

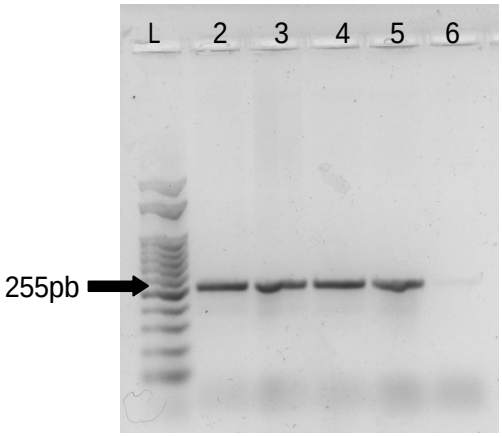


Figura 15: Foto de um gel de agarose 1,5%, contendo fragmentos correspondentes ao exon1. A primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb), as colunas 2, 3, 4 e 5 correspondem à amostras aleatórias de cães, e a 6, o branco. A seta aponta para o fragmento de 255 pb.

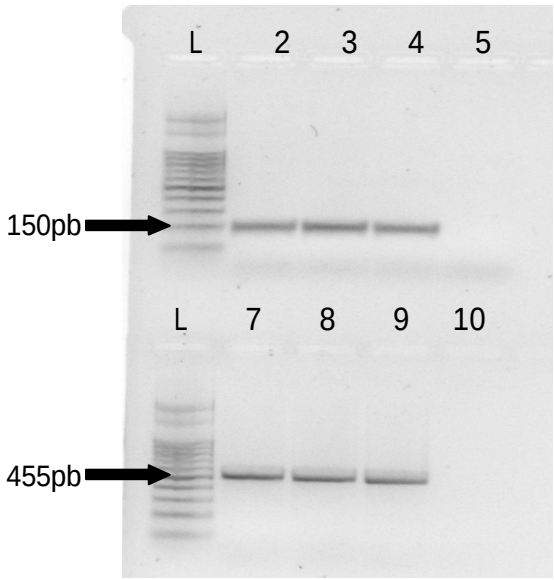


Figura 16: Foto de um gel de agarose 1,5% contendo fragmentos correspondentes ao exon 2 e ao intron 1. A primeira e sexta colunas correspondem ao marcador de peso molecular de 100 pares de base, as colunas 2, 3 e 4 correspondem à amostras aleatórias de cães para o Exon 2, a 5 corresponde ao branco, as colunas, 7, 8 e 9 correspondem à amostras aleatórias de cães para o Intron 1, a 10 corresponde ao branco.

5.2. Sequênciamento:

A sequência do cromossomo 4 do cão, assim como a localização dos oligos, dos exons, do intron e das mutações sequênciados está representada no anexo 1.

As sequências alinhadas das MBLs de diversos mamíferos estão representadas no anexo 2, demonstrando que a proteína é bastante conservada, principalmente na região rica em glicina, responsável pela região de colágeno, fundamental para a correta ligação do carboidrato. Foram comparadas as proteínas do cão, homem, boi, rato, chimpanzé, camundongo e cavalo. O alinhamento foi realizado pelo software MEGA 4.0.2.

Foram avaliadas 96 amostras de DNA de cães de diversas regiões do país. Não foram encontradas mutações nos exon 1 e 2 da MBL canina.

Das 96 amostras analisadas contendo o fragmento do intron1, oito apresentaram heterozigose: as amostras 15, 69, 76 e 85 apresentaram heterozigose na posição 45, onde existe uma citosina e uma guanina. As amostras 8, 18, 58 e 61, apresentaram heterozigose na posição 175, adenina e guanina, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Heterozigoses encontradas em amostras de cães sequênciadas, sua procedência, raça, sexo e idade.

AMOSTRA	HETEROZIGOTO	PROCEDÊNCIA	RAÇA	SEXO/IDADE
8	*A/G*	Bauru/SP	SRD	F/5ª
15	C/G	São Paulo/SP	daschund	F/5ª
18	*A/G*	Bauru/SP	basset haund	M/-
58	*A/G*	Bauru/SP	dogue alemão	M/7ª
61	*A/G*	Barretos/SP	rottweiler	F/3ª
69	C/G	Vila Velha/ES	fox paulistinha	F/5ª
76	C/G	Santos/SP	cocker spaniel	M/8ª
85	C/G	Fortaleza/CE	poodle	M/7ª

Bases nitrogenadas: A: adenina, G: guanina, C: citosina. Raças: SDR: sem raça definida.

A sequência do exon 1 não apresentou mutações. Todas as amostras sequênciadas foram submetidas ao GenBank para confirmação do resultado (figura 17).

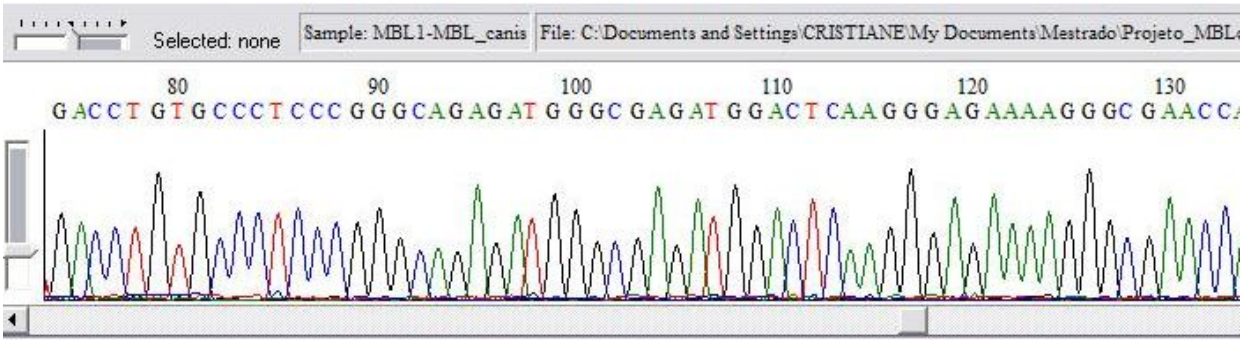


Figura 17: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram. Em toda a extensão do exon 1 não foram observadas mutações.

As sequências do intron 1 apresentaram mutações. Todas as amostras sequênciadas foram submetidas ao GenBank para confirmação do resultado (figuras 18 e 19).

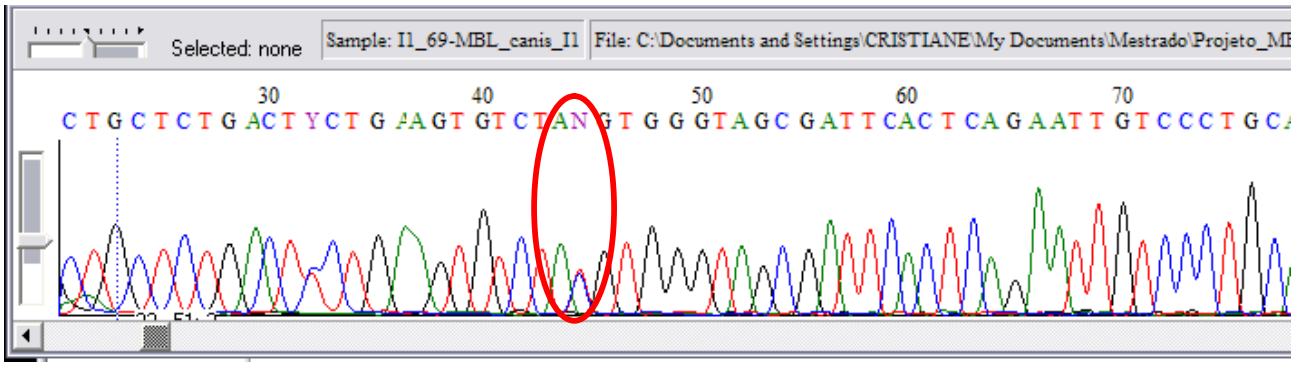


Figura 18: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram, mostra o heterozigoto C/T na sequência do Intron 1, na posição 45.

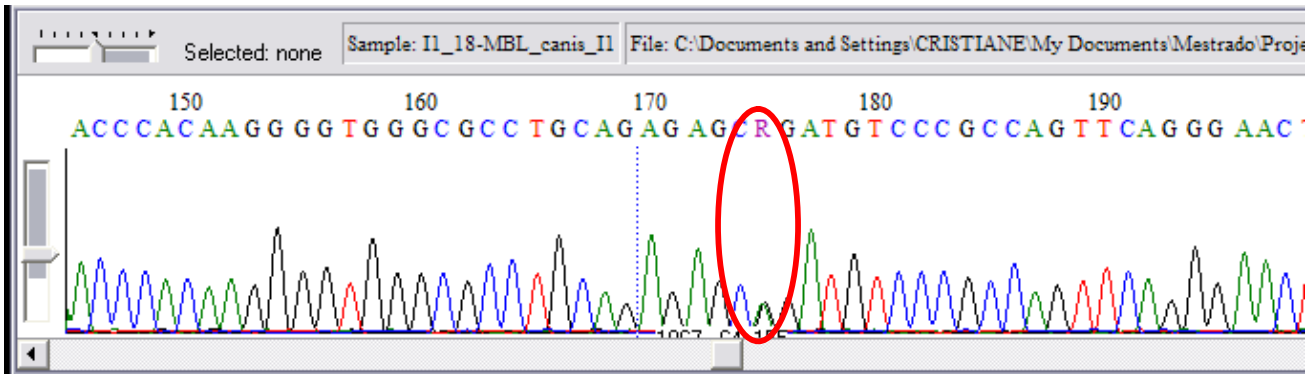


Figura 19: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram, mostra o heterozigoto A/G na sequência do Intron 1, na posição 175.

A sequência do exon 2 não apresentou mutações. Todas as amostras sequênciadas foram submetidas ao GenBank para confirmação do resultado (figura 20).

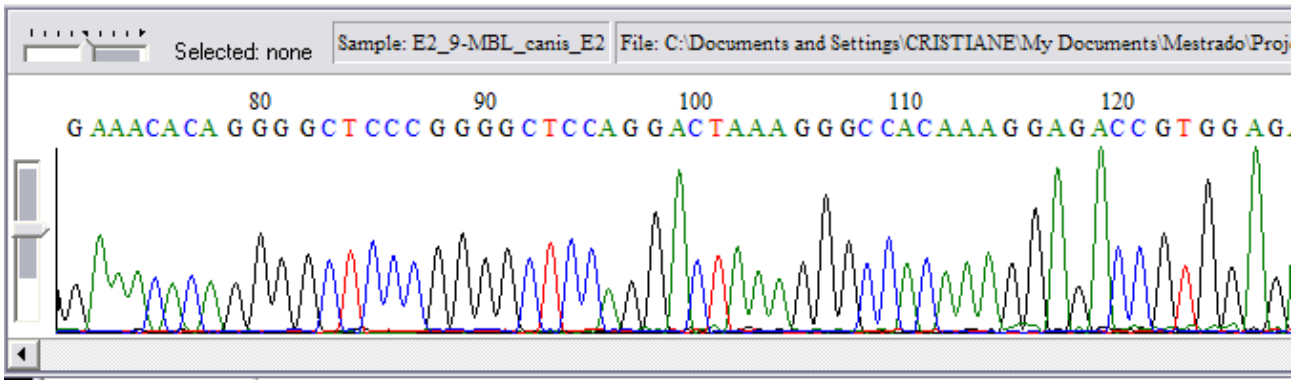


Figura 20: Parte do eletroferograma, visualizado pelo programa ABI Chromatogram. Em toda a extensão do exon 2 não foram observadas mutações.

6. Discussão:

O presente trabalho visou a identificação de diferentes fenótipos para a MBL em cães com intuito de correlacionar estes possíveis alelos com a susceptibilidade à leishmaniose visceral canina. Esta associação esta estabelecida em humanos (Alonso *et al*., 2007) e em cães poderia representar uma importante ferramenta no estudo deste reservatório de alto significado epidemiológico para a leishmaniose visceral. Porém, nenhuma mutação foi encontrada nas 96 amostras analisadas do gene canino. Em porcos, foram caracterizados os dois genes para MBL (mbl1 e mbl2), sendo que o primeiro codifica para a MBL-A e o segundo para MBL-C, homóloga à MBL humana (anexo 3). A caracterização destes dois genes em porcos mostrou que, diferente do que ocorre em humanos, não há variantes genotípicos do gene mbl2, mas há variação entre as raças de porcos na sequência codificante para o gene mbl1. Ao analisar a expressão destes dois genes, apenas o gene mbl2 é regulado, como ocorre em humanos (Lillie *et al*., 2006).

Não foi possível a realização do estudo do gene da mbl2 em cães, visto que este não foi encontrado nos bancos de dados de sequências expressas caninas. Duas possibilidades podem estar ocorrendo: 1. em cães o gene mbl2 perdeu sua função e não é mais expresso, tendo se tornado um pseudo-gene. 2. o gene mbl2 ainda não foi caracterizado em cães. Independentemente da explicação para o fato de não termos encontrado o gene mbl2 em cães, parece que neste animal a evolução destes dois genes foi diferente do encontrado em porcos (os dois expressos, sendo que mbl1 apresenta variantes genotípicos) e em humanos (mbl1 se tornou um pseudo-gene).

Uma possível causa para as frequências relativamente altas dos alelos variantes da proteína em humanos se baseia no fato de que alelos selvagens do gene mbl2, por conferirem altos níveis de proteína circulante, contribuem para a opsonização eficiente de patógenos intracelulares, o que potencialmente intensifica a disseminação hematogênica e a fagocitose desses patógenos, aumentando sua virulência. Por isso, indivíduos com alelos variantes para a MBL apresentam níveis séricos baixos da proteína, o que confere uma vantagem relativa a esses indivíduos no que diz respeito à susceptibilidade a doenças causadas por tais parasitas intracelulares (Garred, 1992).

A variação das taxas de MBL circulantes podem ser a chave para a predisposição à doenças causadas por parasitas intracelulares, como as leishmanioses. Em um trabalho realizado no Brasil, um grupo de 60 pacientes com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, demonstra que os genótipos que conferem altos níveis de MBL foram significativamente mais freqüentes do que no grupo controle. Essa diferença se mostra ainda mais significativa quando o

grupo de casos com indivíduos infectados, porém assintomáticos são comparados. Os níveis foram significativamente menores em indivíduos infectados assintomáticos do que em indivíduos com diagnóstico para leishmaniose visceral (Alonso et al, 2007). Esta mesma variação poderia representar um fator muito importante para cães, uma vez que estes são os reservatórios mais importantes de *Leishmania chagasi*. Variações na susceptibilidade destes animais ao parasita podem representar um ponto importante na epidemiologia desta doença.

Contudo, neste estudo, não foram quantificados os níveis séricos desta proteína nos diferentes cães que, em último caso, esta relacionada com a predisposição ao parasita. Em humanos está clara a correlação entre as mutações encontradas na região promotora e no exon 1 com os seus níveis séricos. Em cães faz-se necessário a avaliação sérica desta proteína para possível correlação com a leishmaniose. Entretanto, no presente trabalho isso não foi possível, por se tratar de estudo retrospectivo com amostras de DNA armazenadas pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular.

Parte III:

Comparação entre dois alvos para diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral Canina.

7. Introdução:

As leishmanioses são consideradas zoonoses, no entanto, podem acometer o homem, fato que altera sua classificação epidemiológica para antropozoonose. É uma doença de distribuição mundial, afetando 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Noventa por cento dos casos de Leishmania Visceral ocorrem em áreas suburbanas e nas zonas rurais de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. A incidência anual de casos de Leishmania Visceral é de 500.000 (Desjeux, 2004).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são as *Leishmania spp.* Apresentam uma única mitocôndria, o DNA mitocondrial aparece condensado em uma região próxima aos corpúsculos basais do flagelo, sendo chamados de cinetoplastos (k), onde fica armazenado o kDNA (Castellano, 2005). O kDNA é formado por milhares de moléculas de DNA circulares, formando uma “rede de trabalho” plana. Cada rede de kDNA contém dois tipos de moléculas circulares de DNA, os minicírculos e os maxicírculos (Guilbride, 1998; Savill, 1999).

Em eucariotos, o DNAr (ribossômico) compreende uma família multigênica, organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões variáveis de espaçadores não-codificantes, as regiões ITSs. Estima-se a presença de 20 a 200 cópias idênticas da região ITS-1 no genoma da *Leishmania* (Odiwuor, 2010).

Na área urbana e rural, o cão -*Canis familiaris*- vem sendo descrito como o principal reservatório da *L. chagasi*, tanto no Brasil, como nas Américas (OMS, 1990; Vieira & Coelho, 1998). Os cães são de extrema importância para o entendimento e controle das Leishmanioses, pois seu papel como reservatório natural do parasito pode ser a chave para a eliminação da doença na área urbana.

De uma forma geral, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. A problemática deve-se a variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas, a alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível. No Brasil, o diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado no exame parasitológico ou sorológico. Métodos de diagnóstico, como o a PCR (reação em cadeia da polimerase), constituem uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral, pois podem chegar a 94% de sensibilidade. Contudo, seus resultados dependem de diversas variáveis envolvidas, entre elas podemos destacar o tipo de amostra, alvo do DNA utilizado para amplificação, método de extração do DNA e a procedência do animal (Ministério da Saúde, 2006).

Os métodos moleculares estão sendo uma ferramenta de grande utilidade em diagnósticos, graças a sua rapidez, sensibilidade e especificidade, principalmente para detecções em cães assintomáticos (Gontijo, 2004; Queiroz, 2010).

O kDNA, que é considerado o melhor alvo (Gontijo, 2004), para o diagnóstico vem sendo utilizado com sucesso (Anders, 2002; Ikonopoulos, 2003; Rodriguéz-González, 2007; Assis, 2009; Alonso, 2010). O uso da PCR em tempo real - utilizando como alvo o kDNA - para diagnóstico também está sendo avaliado (Abda, 2010). A região ITS-1 vem sendo amplamente utilizada tanto para diagnóstico como para a identificação das espécies de *Leishmania* (Kuhls, 2005; Gelanew, 2010; Mahdy, 2010; Odiwuor, 2010; Yang, 2010).

Muitos estudos foram realizados com sucesso no Velho Mundo e com diversas espécies do parasito pela PCR, contudo pouco se sabe sobre o diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral em cães. A comparação entre dois alvos distintos para a PCR, o kDNA e a região ITS-1, se faz necessária, a fim de identificar o melhor alvo diagnóstico para a doença em cães, já que no Brasil, poucos estudos foram realizados e há a possibilidade de existirem outros protozoários que possam reagir cruzadamente com a *Leishmania*. Assim, o presente trabalho tem por objetivo comparar a PCR dirigida contra o kDNA com aquela dirigida contra a região cromossômica ITS com finalidade diagnóstica em estudo retrospectivo com amostras de DNA de cães de diferentes localidades no Brasil.

8. Material e Métodos:

8.1. Material biológico:

O material biológico proveniente de cães foi obtido do Laboratório PANGENE, do Departamento de Parasitologia, situado no Instituto de Biociências de Botucatu – SP, perfazendo um total de 236, das quais 40 são provenientes de Teresina/PI, raça e idade são desconhecidas. Estas amostras foram diagnosticadas como sendo positivas para *Leishmania chagasi*, por exame parasitológico realizado em Teresina, 100 amostras são provenientes de Belém/PA e as 96 amostras restantes são as mesmas já descritas no trabalho anterior.

8.2. Amplificação:

Para a amplificação do kDNA, foram utilizados os primers sugeridos por Anders *et al.*.

Para a amplificação da região ITS1 da Leishmania, foram utilizados os primers descritos por El Tai *et al.* (2000).

Para as reações de amplificação, foi utilizado o kit Gotaq® Colorless Master Mix da Promega, contendo: master mix 2X, *Taq* DNA polimerase, tampão (ph 8,5), 400µM dATP, 400µM dCTP, 400µM dGTP, 400µM dTTP e 3mM $MgCl_2$.

Tabela 3: *primers* utilizados para amplificar alvos na *Leishmania*.

kDNA	Uni21	5'_- GGGGTTGGTGTAAAATAGGCC -_3'
	Lmj4	5'_- CTAGTTTCCCGCCTCCGAG -_3'
ITS 1	LITSR	5´_- CTGGATCATTTTCCGATG -_3´
	L5-8S	5´_- TGATACCACTTATCGCACTT -_3´

kDNA: O volume final de cada reação foi de 25µl dos quais foram constituídos: 12,5µl do mix 1µl de cada *primer* a 10µM, 2µl do DNA e 8,5µl de água livre de nucleases.

Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador. As condições de amplificação utilizadas foram: 5 minutos a 94ºC, seguido por 36 ciclos: 30 segundos a 94ºC, para a desnaturação; 30 segundos a 54ºC para o anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72ºC para a extensão da cadeia de DNA. Em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 10 minutos a 72ºC e mantido a 22ºC após o término dos ciclos, até sua retirada do termociclador. Foi gerado um fragmento de aproximadamente 800 pares de bases.

ITS 1: O volume final de cada reação foi de 25µl dos quais foram constituídos: 12,5µl do mix 1µl de cada *primer* a 10µM, 2µl do DNA e 8,5µl de água livre de nucleases.

Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador. As condições de amplificação utilizadas foram: 3 minutos a 95ºC, seguido por 35 ciclos: 30 segundos a 95ºC, para a desnaturação; 30 segundos a 53ºC para o anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72ºC para a extensão da cadeia de DNA. Em seguida, o DNA amplificado foi submetido a um período de extensão de 5 minutos a 72ºC e mantido a 22ºC após o término dos ciclos, até sua retirada do termociclador. Foi gerado um fragmento de 300 pares de bases.

Os produtos amplificados foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989), 2µl de tampão de amostra foram adicionados à 8µl do produto amplificado pela reação de PCR e aplicado em gel de agarose 1,5% em solução de TAE 1X

contendo intercalante Gel Red® a 1µl/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

9. Resultados:

9.1. *Reação em cadeia da polimerase (PCR):*

As reações de PCR foram utilizadas nas mesmas condições descritas pelos autores, na tentativa de reproduzir os trabalhos dos quais foram descritos os *primers* utilizados no presente trabalho.

- Da região dos minicírculos:

Todas as amostras testadas amplificaram com os primers do kDNA, como exemplificado na figura 21. Como controle positivo, foi utilizado uma amostra sabidamente positiva para *Leishmania chagasi* de DNA humano e como controle negativo da reação, foi utilizada água livre de DNAses e RNAses.

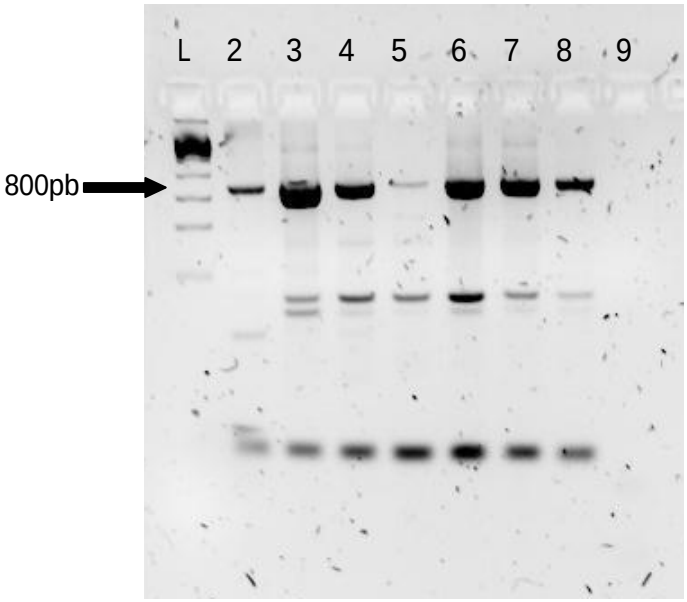


Figura 21: Foto de um gel de agarose 1,5%, contendo o produto da amplificação do kDNA, a primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular de 1 Kb, as colunas 2, 3, 4 e 5 correspondem à amostras aleatórias de cão, a coluna 8 corresponde ao controle positivo e a 9 ao branco. A seta indica a posição de 800 pares de base.

-Da região ITS-1:

Apenas as amostras provenientes do Piauí amplificaram com os primers da região ITS-1, enquanto que nenhuma das amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular e as provenientes de Belém amplificaram (Gráfico 1). Como controle positivo, foi utilizado uma amostra sabidamente positiva para *Leishmania chagasi* de DNA humano e como controle negativo da reação, foi utilizada água livre de DNAses e RNAses. A figura 22 é um exemplo das amostras consideradas positivas para o protozoário.

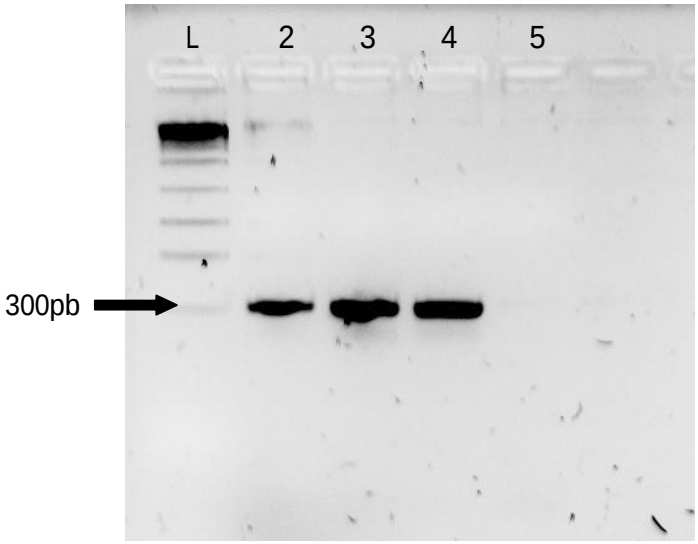
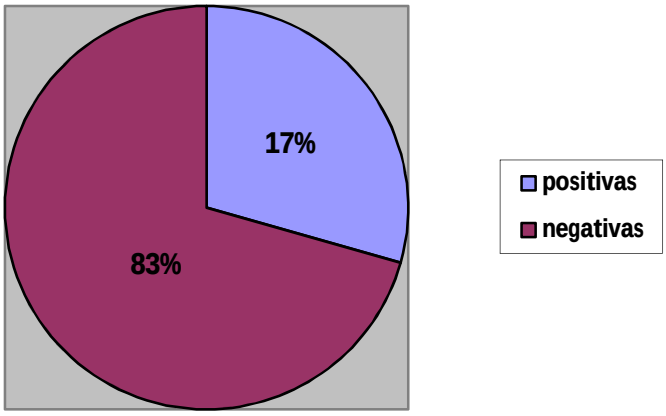


Figura 22: Foto de um gel de agarose 1,5%, contendo o produto da amplificação da região ITS 1, a primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular de 1 Kb, as colunas 2 e 3, correspondem à amostras aleatórias de cão, a 4 corresponde ao controle positivo e a 5 ao branco.

Gráfico 1: Amostras positivas e negativas para a presença do protozoário com amplificação utilizando os *primers* correspondentes à região ITS1:



10. Discussão:

Alguns parâmetros importantes utilizados para prever o risco e a maneira de controle da leishmaniose são a determinação da prevalência e da incidência da infecção em cães. Para se estimar de modo correto estes parâmetros, deve-se identificar os cães infectados de modo confiável. Os testes parasitológicos são específicos, mas falta sensibilidade. Os métodos sorológicos são sensíveis, porém, menos específicos. A PCR é uma técnica sensível e específica, entretanto alguns resultados podem ser conflitantes com outros, e ainda há discussão sobre o tecido a ser analisado. Em função destes fatores, o "padrão ouro" para o diagnóstico desta doença ainda não existe (Rodríguez-Cortés, 2010).

Estudos realizados com a finalidade de identificar um alvo para o correto diagnóstico das leishmanioses demonstram que a região ITS 1, região que difere em tamanho e sequência entre as espécies, demonstrou ser eficiente na detecção de todas as Leishmanias conhecidas. Para diferenciá-las, a realização de um ensaio com enzimas de restrição é necessário. Ainda é proposto a utilização de uma segunda PCR, agora tendo a região ssu rRNA (pequena subunidade do RNA ribossômico) como alvo, se o resultado for negativo, para confirmação, aumentando ainda mais a sensibilidade do teste. Diferentes tecidos (aspirado de medula óssea e linfonodos, sangue periférico, pele, flebótomos, entre outros) amplificaram de forma eficiente com as diferentes abordagens da PCR testadas (Schönian, 2003).

Na Grécia, outro estudo foi realizado a fim de avaliar a possibilidade de um correto diagnóstico para a leishmaniose baseado na PCR. A região ITS-1 foi avaliada de maneira positiva para detectar a presença do parasito e posterior, mediante análise de fragmentos obtidos a partir da digestão por enzimas de restrição, identificação da espécie (Spanakos, 2008).

Em estudo realizado em Ilha Solteira/SP, diferentes técnicas para diagnóstico da leishmaniose visceral canina foram avaliadas. Os minicírculos presentes no cinetoplasto foram utilizados para a amplificação a partir de amostras de pele. Os cães analisados por PCR apresentaram uma positividade de praticamente 100%, incluindo amostras de pele sadias. Os autores sugerem a associação de técnicas para o diagnóstico, utilizando os testes sorológicos e parasitários para confirmação da presença do parasito e fazer uso da PCR apenas para confirmação de casos ainda suspeitos depois de realizados os outros testes (Queiroz, 2010).

Diferentes espécies de *Leishmania* são prevalentes em Israel e países vizinhos, sendo necessária a criação de um método diagnóstico rápido e seguro. Motivo pelo qual um grupo de pesquisadores da região realizou um estudo visando a detecção do protozoário pela PCR, utilizando como alvo o kDNA e os mesmos primers utilizados no presente trabalho. O grupo

israelense conseguiu amplificar de maneira positiva, diferentes espécies de *Leishmania*, diferenciando-as pelo tamanho do fragmento gerado – entre 650 e 850 pares de base -, e observaram que nenhum outro Kinetoplastida que não fosse *Leishmania* amplificou. A utilização de métodos de extração de DNA diferentes gerou resultados igualmente efetivos, e a utilização de temperaturas de anelamento distintas também resultou no mesmo grau de sensibilidade. Porém, notaram que amostras coletadas em série, de uma mesma lesão, resultam em bandas com intensidade diferentes (Anders, 2002).

No presente trabalho, a utilização da região dos minicírculos do kDNA amplificou de forma inesperada – 100% das amostras analisadas -, enquanto que a região ITS 1, amplificou apenas nas amostras esperadas, as 40 amostras provenientes do Piauí, com positividade para o teste parasitológico. Desta forma, o uso do kDNA para diagnóstico não deve ser utilizado, enquanto que a região ITS 1 se mostra como alvo preferencial para o diagnóstico por PCR.

Contudo, estudos mais aprofundados devem ser feitos antes de se poder afirmar qual região deve ser utilizada para um correto diagnóstico da LVC.

11. Referências Bibliográficas:

ABDA, IB; MONBRISON, F; BOUSSLIMI, N; AOUN, K; BOURATBINE, A; PICOT, S, **Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia.** Trans R Soc Trop Med Hyg, doi: 10.1016, 2010.

ALMEIDA, ABPF; MENDONÇA, AJ; SOUSA, VRFS, **Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.** Ciência Rural, 40(7): 1610-1615, 2010.

ALTAMIRANO-ENCISO, AJ; MARZOCHI, MCA; MOREIRA, JS; SCHUBACH, AO; MARZOCHI, KBF, **Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas.** História, Ciência e Saúde-Manguinhos, 10(3): 853-882, 2003.

ALONSO, DP; COSTA, DL; MENDONÇA, IL; COSTA, CHN; RIBOLLA, PEM, **Short report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresina (Brazil).** Am J Med Hyg, 85(5): 819-821, 2010.

ALONSO, DP; FERREIRA, AFB; RIBOLLA, PEM; SANTOS, IKFM; CRUZ, MSPC; CARVALHO, FA; ABATEPAULO, ARR; COSTA, DL; WERNECK, GL; FARIAS, TJC; SOARES, MJS; COSTA, CHN, **Genotypes of mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications.** The Journal of Infectious diseases, 195: 1212-1217, 2007.

ANDERS, G; EISENBERGER, CL; JONAS, F; GREENBLATT, CL, **Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in middle east using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers.** Field epidemiology, 96(1): S1/87-S1/92, 2002.

ASSIS, TSM; CALIGIORNE, RB; ROMERO, GASR; RABELLO, A, **Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis.** Trans Royal Soc Trop Med Hyg, 103, 1269-1272, 2009.

BOROVISK (1898) apud _ RATH, S; TRIVELIN, LA; IMBRUNITO, TR; TOMAZELA, DM; JESUS, MN; MARZAL, PC, **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte.** Química Nova, 26(4): 550-555, 2003.

BRENER, Z, **Calazar canino em Minas Gerais.** Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG: 90 pp, 1957.

CAMARGO-NEVES, VLF; RODAS, LAC; PAULIQUÉVIS-JR, C, **Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina à 4% para o controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo.** Resultados Preliminares. Boletim Epidemiológico Paulista - BEPA 12: 7 - 14, 2004.

CASTELLANO, LRC, **Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão.** Academia Biomédica Digital, 25, 2005.

COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS, **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana no ESP.** Governo de Estado de São Paulo, Secretaria da Saúde, 2006.

CUNNINGHAM (1885) apud _ RATH, S; TRIVELIN, LA; IMBRUNITO, TR; TOMAZELA, DM; JESUS, MN; MARZAL, PC, **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte.** Química Nova, 26(4): 550-555, 2003.

DEANE, LM; DEANE, MP, **Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará.** O Hospital, 47: 75-87, 1955.

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

DOMMETT, RM; KLEIN, N; TURNER, MW, **Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.** Tissue Antigens, 63: 193-209, 2006.

DONOVAN, C, **On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in Índia.** BMJ, 2: 79, 1903.

EL TAI, NO; OSMAN, OF; EL FARI, M; PRESBER, W; SHÖNIAN, G, **Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing.** Trans Royal Soc Trop Med Hyg, 94: 1-5, 2000.

EZEKOWITZ, RAB; DAY, LE; HERMAN, GA, **A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins.** J. Exp. Med., 167: 1034-1046, 1988.

FERREIRA, P, **Epidemiologia das leishmanioses.** Agência Fiocruz de Notícias – Glossário de doenças, setembro de 2006.

FUJITA, T, **Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity.** Nature Reviews Immunology 2: 346-352, 2002.

FRASER, IP; KOZIEL, H; EZEKOWITZ, AB, **The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity.** Seminars in Immunology, 10: 363-372, 1998.

GARRED, P; MADSEN, HO; KURTZHALS, JAL; LAMM, LU; THIEL, S; HEY, AS; SVEJGAARD, A, **Diallelic polymorphism may explain variations of blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans.** Eur J Immunogenet, 19: 403–412, 1992.

GARRED, P; PRESSLER, T; MADSEN, HO; FREDERIKSEN, B; SVEJGAARD, A; HOIBY, N; SCHWARTZ, M; KOCH, C, **Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis**. J Clin Invest 104: 431–437, 1999.

GARRED, P; LARSEN, F; MADSEN, HO; KOCH, C, **Mannose-binding lectin deficiency-revisited.** Mol Immunol 40: 73–84, 2003 (1).

GARRED, P, STROM, JJ; QUIST, L; TAANING, E; MADSEN, HO, **Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome.** The Journal of Infectious diseases, 188: 1394-1403, 2003.

GARRED, P, **Mannose-binding lectin genetics: from A to Z.** Biochem. Soc. Trans, 36: 1461-1466, 2008.

GARRED, P; HONORÉ, C; MA, YJ; MUNTHE-FOG, L; HUMMELSHOJ, T, **MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3 – The genes behind the initiation of lectin pathway of complement.** Molecular Immunology, 46: 2737-2744, 2009.

GELANEW, T; AMOGNE, W; ABEBE, T; KUHLS, K; HAILU, A; SCHÖNIAN, G, **A clinical isolate of *Leishmania donovani* with ITS1 sequence polymorphism as a cause of para-kala-azar dermal leishmaniasis in Ethiopian human immune-deficience virus-positive patient on highly active antiretroviral therapy.** British Journal of Dermatology, 163: 870-874, 2010.

GENARO, O; MICHALICK, MSM, **Leishmaniose visceral americana.** In: Neves, DP, **Parasitologia Humana**. São Paulo, Editora Ateneu. 11ª ed. cap. 10: 67-83, 2005.

GONTIJO, CMF; MELO, MN, **Leishmananiose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** Ver Bras. Epidemiol, 3(7): 338-349, 2004.

GRAUDAL, NA; MADSEN, HO; TARP, U; SVEJGAARD, A; JURIK, AG; GRAUDAL, HK; GARRED, P, **The association of variant mannosebinding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum, 43: 515–521, 2000.

GUILBRIDE, DL; ENGLUND, PT, **The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid sepecies.** Journal of Cell Science, 111: 675-679, 1998.

IKEDA, K; SANNOH, T; KAWASAKI, N; KAWASAKI, T; YAMASHINA, I, **Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway.** The Journal of the Biological Chemistry, 262 (16): 7451-7454, 1987.

IKONOMOPOULOS, J; KOKOTAS, S; GAZOULI, M; ZAVRAS, A; STOITSIOU, M; GORGOULIS, VG, **Molecular diagnosis og leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples.** Veterinary Parasitology, 113: 99-113, 2003.

ITURRY-YAMAMOTO, GR; PORTINHO, CP, **Sistema Complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas.** Rev Ass Med Brasi, 47: 41-51, 2001.l

KAWASAKI, T; ETOH, R; YAMASHINA, I, **Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver.** Biochem Biophys Res Commun, 81: 1018–24, 1978.

KAWASAKI, N; KAWASAKI, T; YAMASHINA, I, **Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum.** J Biochem (Tokyo), 94:937-947, 1983.

KLEIN, NJ, **Mannose-binding lectin: do we need it?** Molecular Immunity, 42: 919-924, 2005.

KOCH, A; MELBYE, M; SORENSEN, P; HOMOE, P; MADSEN, HO; MOLBAK, K; HANSEN, CH; ANDERSEN, LH; HAHN, GW; GARRED, P, **Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood.** JAMA, 285: 1316-1321, 2001.

KUHLS, K; MAURICIO, IL; PRATLONG, F; PRESBER, W; SCHÖNIAN, G, **Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of *Leishmania donovani* complex.** Microbes and Infection 7: 1224-1234, 2005.

LASVERAN & MESNIL (1903) apud _ RATH, S; TRIVELIN, LA; IMBRUNITO, TR; TOMAZELA, DM; JESUS, MN; MARZAL, PC, **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte.** Química Nova, 26(4): 550-555, 2003.

LEISHMAN, WB, **On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in Índia.** BMJ, 2: 79, 1903.

LILLIE, BN; KEIRSTEAD, ND; SQUIRES, JE; HAYES, AM, **Single-nucleotide polymorphism in porcine mannan-binding lectin A.** Immunogenetics, 58: 983-993, 2006.

LIPSCOMBE, RJ; SUMIYA, M; HILL, AV; LAU, YL; LEVINSKY, R J; SUMMERFIELD, JA; TURNER, MW, **High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene.** Hum Mol Genet, 1: 709–715, 1992.

MADSEN, HO; GARRED, P; KURTZHALS, JAL; LAMM, LU; RYDER, LP; THIEL, S; SVEJGAARD, A, **A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein.** Immunogenetics, 40: 37–44, 1994.

MADSEN, HO; GARRED, P; THIEL, S; KURTZHALS, JAL; LAMM, LU; RYDER, LP; SVEJGAARD, A, **Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein.** J Immunol, 155: 3013–3020, 1995.

MADSEN, H. O., SATZ, M. L., HOGH, B., SVEJGAARD, A., GARRED, P, **Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America.** J Immunol 161: 3169–3175, 1998.

MAHDY, MAK; AL-MEKHLAFI, HM; AL-MEKHLAFI, AM; LIM, YAL; SHUAIB, NOMB; AZAZY, AA; MAHMUD, R, **Molecular characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous leishmaniasis in Yemen.** Plos One 5(9): e12879, 2010.

MALHOTRA, R; THIEL, S; REID, KBM; SIM, RB, **Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domais.** J. Exp. Med, 172: 955-959, 1990.

MATEUS, RP; CERON, CR; MACHADO, LPB; SENE, FM, **Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do DNA ribossômico nas espécies do *cluster buzzatii* de *drosophila* (diptera: drosophilidae).** Ambiência 2(1): 89-96, 2006.

MATSUSHITA, M; FUJITA, T, **Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease.** J. Exp. Med, 176: 1497-1502, 1992.

MICHELOW, IC; DONG, M; MUNGALL, BA; YANTOSCA, LM; LEAR, C; JI, X; KARPEL, M; ROOTES, CL; BRUDNER, M; HOUEN, G; EISEN, DP; KINANE, TB; TAKAHASHI, K; STAHL, GL; OLINGER, GG; SPEAR, GT, EZEKOWITZ, RAB; SCHMIDT, EM, **A novel L-ficolin/mannose-binding lectin chimeric molecule with enhanced activity against ebola virus.** JBC papers in press, manuscrito, 2010.

MILLER, ME; SEALS, J; KEYE, R; LEVITSKY, LC, **A familial, plasma associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection.** Lancet 2: 60-3, 1968.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de Vigilância e Controle da Leishmania Visceral.** 1, 2006.

MOLLER-KRISTENSEN, M; THIEL, S; SJÖHOLM, A; MATSUSHITA, M; JENSENIUS, JC, **Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway.** International Immunology, 19 (2): 141-149, 2006.

MOSSER, DM; BURKE, SK, **Leishmania species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes.** Exp Parasitol, 62(3): 394-404, 1986.

MOSSER, DM; EDELSON, PJ, **Activation of the alternative complement pathway by Leishmania promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages.** J Immunol, 132(3): 1501-5, 1984

MOSSER, DM; SPRINGER, TA, **Leishmania promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).** J Cell Biol, 116(2): 511-20, 1992.

NAUTA, AJ; RAASCHOU-JENSEN,N;ROOS, A; DAHA, MR; MADSEN, HO; BORRIAS-ESSERS, MC; RYDER, LP; KOCH, C; GARRED, P, **Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells.** Eur. J. Immunol, 33: 2853-2863, 2003.

ODIWUOR, SOC; SAAD, AA; DONCKER, SD; MAES, I; LAURENT, T; SAFI, SE; MBUCHI, M; BÜSCHER, P; DUJARDIN, J-C; AUWERA, GV, **Universal PCR assay for differential detection of all Old World *Leishmania* species.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010 (published online).

OFEK, I; MIRELMAN, D; SHARON, N, **Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors.** Nature, 265: 623-625, 1977.

OGDEN, CA; deCATHELINEAU, A; HOFFMANN, PR; BRATTON, D; GHEBREHIWET, B; FADOK, VA; HENSON, PM, **C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells.** J. Exp. Med, 194(6): 781-795, 2001.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUDE. **Lucha contra las Leishmaniasis.** (OMS – Serie de Informes Técnicos, 793), 1990.

PEARSON, RD; STEIGBIGEL, RT, **Mechanism of lethal effect of human serum upon Leishmania donovani.** J Immunol 125(5): 2195-201, 1980.

PRESANIS, JS; KOJIMA, M; SIM, RB, **Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL).** Biochemical Society Transactions, 31 (4): 748-752, 2003.

QUEIROZ, NMGP; ASSIS, J; OLIVEIRA, TMFS; MACHADO, RZ; NUNES, CM; STARKE-BUZETTI, WA, **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com RIFI e ELISA-teste.** Revista Brasileira de Parasitologia, 19(1): 34-40, 2010.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A; OJEDA, A; FRANCINO, O; LÓPEZ-FUERTES, L; TIMÓN, M; ALBEROLA, J, ***Leishmania* infection: Laboratory diagnosis in the absence of a "gold standard".** Am Journal Trop. Med Hyg, 82(20): 251-256, 2010.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I; MARÍN, C; LONGONI, SS; MATEO, H; ALUNDA, JM; MINAYA, G; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R; VARGAS, F; SÁNCHEZ-MORENO, M, **Identification of**

New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. FEMS Microbiol Lett, 267, 9-16, 2007.

ROSS (1903) apud _ RATH, S; TRIVELIN, LA; IMBRUNITO, TR; TOMAZELA, DM; JESUS, MN; MARZAL, PC, **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte.** Química Nova, 26(4): 550-555, 2003.

SAMBROOK, JP; FRITSCH, EF; MANIATIS, T, **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, IKFM; COSTA, CHN; KRIEGER, H; FEITOSA, MF; ZURAKOWSKI, D; FARDIN, B; GOMES, RBB; WEINER, DL; HARN, DA; EZEKOWITZ, RAB, EPSTEIN, JE, **Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis.** Infection and Immunity, 69(8): 5212-5215, 2001.

SAVILL, NJ; HIGGS, PG, **A theoretical study of random segregation of minicircles in trypanosomatids.** The Royal Society, 266 (B): 611-620, 1999.

SCHWEINLE, JE; NISHIYASU, M; DING, TQ; SASTRY, K; GILLIES, SD; EZEKOWITZ, RAB, **Truncated forms of mannose-binding protein multimerize and bind to mannose-rich *Salmonella Montevideo* but fail to activate complement *in vitro*.** The Journal of Biological Chemistry, 268(1): 364-370, 1993.

SCHÖNIAN, G; NASEREDDIN, A; DINSE, N; SCHWEYNOCH, C; SCHALLIG, HDFH; PRESBER, W; JAFFE, CL, **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 47: 349–358, 2003.

SCOTT, H; MOYNAHAN, EJ; RISDON, RA; HARVEY, BAM; SOOTHIL, JF, **Familial opsonization defect associated with fatal infantile dermatitis, infections and histiocytosis.** Archives of Disease in Childhood, 50: 311-317, 1977.

SEYFARTH, J; GARRED, P; MADSEN, HO, **The 'involution' of mannose binding lectin.** Hum Mol Genet, 14: 2859-2869, 2005.

SOOTHIL, JF; HARVEY, BAM, **Defective opsonization: A common immunity deficience.** Archives of Disease in Childhood, 51: 91, 1976.

SOOTHIL, JF; HARVEY, BAM, **A defect of the alternative pathway of complement.** Clin. Exp. Immunol., 27: 30, 1977.

SPANAKOS, G; PIPERAKI, ET; MENOUNOS, PG; TEGOS, N; FLEMETAKIS, A; VAKALIS, NC, **Detection and species identification of old world *Leishmania* in clinical samples using PCR-based method.** Trans of The Royal Soc of Trop Med Hyg, 102: 46-53, 2008.

SORENSEN, R; THIEL, S; JENSENIUS, JC, **Mannan-binding-lectin-associated serine protease, characteristics and disease associations.** Springer Semin Immun, 27: 299-319, 2005.

SUMIYA, M; SUPER, M; TABONA, P; LEVINSKY, RJ; ARAI, T; TURNER, MW; SUMMERFIELD, JA, **Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children.** Lancet, 337: 1569–1570, 1991.

SUMMERFIELD, JA; SUMIYA, M; LEVIN, M; TURNER, MW, **Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series.** BMJ, 314: 1229–32 1997.

TAKAHASHI, K; EDDIE IP, WK; MICHELOW, IC; EZEKOWITZ, RAB, **The mannose-binding lectin: a prototypic patter recognition molecule.** Current Opinion in Immunology, 18: 16-23, 2006.

THIEL, S; VORUP-JENSEN, T; STOVER, CM; SCHWAEBLE, W; LAURSEN, SB; POULSEN, K; WILLIS, AC; EGGLETON, P; HANSEN, S; HOLMSKOV, U; REID, KBM; JENSENIUS, JC, **A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement.** Nature, Letters to Nature, 386 (3), 1997.

TURNER, MW, **The role of mannose-binding lectin in health and disease.** Molecular Immunology, 40: 423-429, 2003.

TURNER, MW; MOWBRAY, JF; ROBERTON, DR, **A study of C3b deposition on yeast surfaces by sera of known opsonic potencial.** Clin. Exp. Immunol.,46: 412-419, 1981.

VIEIRA, JBF; COELHO, GE, **Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 31(2): 85-92, 1998.

WEISS, G; MADSEN, HO; GARRED, P, **A novel mannose-binding lectin-associated serine protease 1/3 gene variant.** Scandinavian Journal of Immunology, 65: 430-434, 2007.

WERNECK, GL, **Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil.** Cad. Saúde Pública, 26(4): 644-645, 2010.

WRIGTH & DOUGLAS (1904) apud _ SOOTHIL, JF; HARVEY, BAM, **Defective opsonization: A common immunity deficience.** Archives of Disease in Childhood, 51: 91, 1976.

YANG, BB; GUO, XG; HU, XS; ZHANG, JG; LIAO, L; CHEN, DL; CHEN, JP, **Species discrimination and phylogenetic inference of 17 chinese *Leishmania* isolates based on internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences.** Parasitol Res, 107: 1049-1065, 2010.

Sites consultados, disponíveis em:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Acesso em: outubro de 2010.

- http://portal.saude.gov.br/portal/asude/default.cfm

Acesso em: setembro de 2010.

- http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm

Acesso em: outubro de 2010.

- http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/viscer.html

Acesso em: novembro de 2010.

- Boletim Epidemiológico Paulista, 2007:

http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa48_lva.htm

Acesso em: novembro de 2010.

- Boletim Epidemiológico Paulista, 2010:

http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa77_lva.htm

Acesso em: novembro de 2010.

- Folha online:

http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u569868.shtml

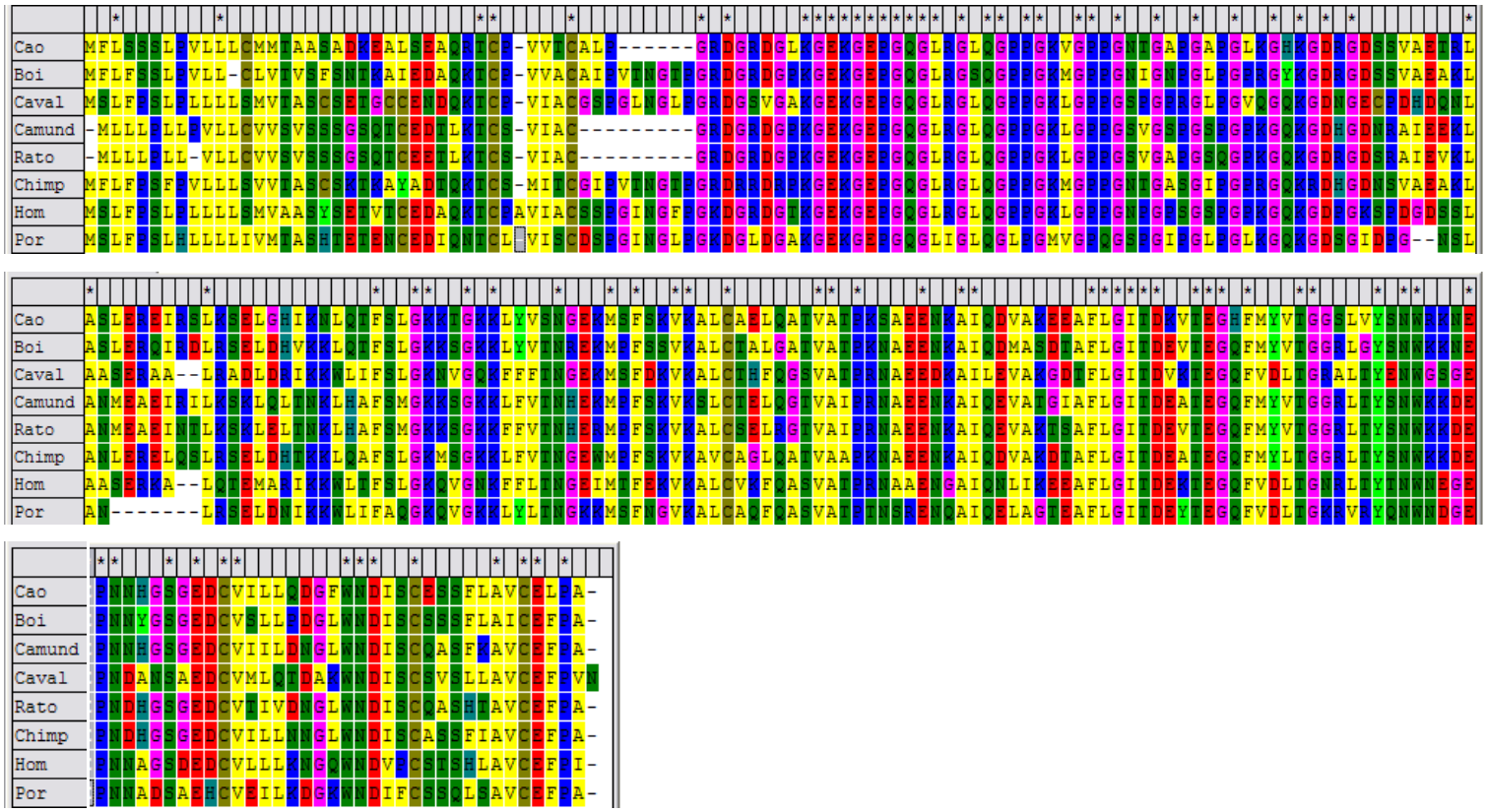
Acesso em: novembro de 2010.

Anexo 1: Sequência do cromossomo 4 _ *Canis lupus familiaris:*

Primers E1Primers E2Primers I1Exon 1Exon 2Mutações

TGTTCTTGTCTTCGTCACTTCCTGTCCTTCTTCTGTGTATGATGACAGCGGCCAGCGCAGATAAAGAAGCCTTGAGTGAG
GCCCAGAGGACATGCCCGGTGGTGACCTGTGCCCTCCCGGGCAGAGATGGGCGAGATGGACTCAAGGGAGAAAAGG
GCGAACCAGGTACGGGACAGGCTGCTCTGACTTCTGAAGTGTCTACGTGGGTAGCGATTCACTCAGAATTGTCCCTGCA
ATAGGTCATCTTCTCCAAAACAAAGATGCTTCCCTGGTCCTCAGGACCCCACATCTCCACACGGGAACCCACAAGGGGT
GGGCGCCTGCAGAGAGCGGATGTCCCGCCAGTTCAGGGAACTGGCCCTTGGAACAGGCTGTCCTCTGGAACACAGGAT
GACTTTTTGGGGGGAGGGGGGTGGGGGGGTCACCACTGGTTCACTGAAGGTTTTCAGGCTCAGTGTAAATTGAATGG
AACTTCTGGAAAAATTGAATGAGCCGCAGTCCCTGGATCACTTTTCCTTCCTCTTATAACAGGGCAAGGGCTCAGAGGC
TTGCAGGGCCCTCCAGGGAAAGTGGGACCTCCGGGAAACACAGGGGCTCCCGGGGCTCCAGGACTAAAGGGCCACAA
AGGAGACCGTGGAGACAGTTCAGGTAAGGAGCTCACCCCAGCGTAGCGTGGGCCCAGGGGACTCGCGGGCCGGAGC
CTGCTGCCAACCCAGGACACTCGTCCCCCTGAGCGTGTCGCCGGAGTGCAGACTTCCAAACCCTGCCATCCCCTCCCCAG
GCCTCTGTGGGAGACAGGCCCTGGCTTCATCCTCAGCGGACACGGTCTGCGTGGGTCTCCAGGATGGTGGGGAACAGA
GGTGTCCTCTCTCCGACGCCGGGTTTCTGTCTATTGTCAAAAGAAAAGCATGAAAATATTCGGTTTCCTAGGCCCCCTGA
GCCATGGGCAACCCCAGGACAACGTAGTTCAGAGTCAGATGAAGTACATTGACCTCTTGTTAATATCTGCCAGCTGGCC
CATCAAAATCATAAAAATATTAAAAAGTTGGTCTGGAATAAGAAATGAGAGAGAACGATTAAGAATGATGTTCGAGAA
GGAGAATAAACAGTTGGGCTTTTTCTTACAAAGGATTATATAATCTTGCAACATTTAAGCAGGATGTGAACAGAAGGAC
CCAGAGCCATAATGTATGAGTTATTTATCATCATTGTGATTATTATTAGTTCAGAACAAATAGTTTACGAGAGCCGCTAG
GTGTATCTCAGAAGCAGGAGTCCCGAGGTTTTCTTCCTTTTGCTGCTTCTCTGTTTCTTCTTTGTCCACAATAATCATACTC
TTCAGCAAGCTTTATCCCTCCCTTCTGGCAAAATACTGTCCTCTCCAATTGAGAGTCATCTTCTCATTAAACGCCCTTCTCC
CTCTCACTTTGCAGTTGCTGAGACCAGGCTGGCTAGCCTAGAGAGGGAGATAAGGAGCCTGAAATCAGAACTGGGCCA
CATCAAAAACTGTAAGTTTGTTTTCTGCCCTGAATGTGGCCTTGGCTCTCACCTTCCTCTTGCGGGCTTCAGGTTTCGGG
GAGGGTGGACACAAGCTAATGTTTAGGAACACTTACTGTACCCCCTGGCCTGGGTGAGGTCGGCATTCCCTCATTCCAT
CCTTTCACCGGCCCCACCTGTGGGGACGATACCCAGGTTATTTAGGTGAGAAGAAACAGGTCCAGGAAGTATAGATAA
TTCATTCGCTGTCACACATCTAGGAAGTAGCAGAGGAAGATTCCACCCGAAAGTCAGCCACTTGCAGCATCTTGGCTCTT
TCTGCAGCAACCCCTGCCTTGGATAGCTATCCATCCATGCCTGGTGCCCAAGCCTGGCAGGGCGGCCTGAGCATGCTTC
CCTGTGTCGCCCTTGCGCCAGGACCGTCTGTAACAGATGTTTGTGTCGAGGGTGGGATCACCCAGAAGGGTGTGAACT
TTCTGCCAGAGTCCCGCCCTCTGGCTGAGGAAGGAGGTCTTCCTTACTAGGATCTGACCTGCTGGTTGAGCATGGGGCT
CTTTTTCAAGAGGTCTGGGGACTCCCGGGGGAGGGCTTTCTCGCCTACTGTCCTGGGCTGAGTCCAAGCCCAGTCAACC
TCTCCCACCATTGCAATTTCAGTGCAAACCTTCTCCTTGGGCAAAAAGACTGGAAAGAAGCTCTACGTGAGCAACGGCG
AAAAGATGTCTTTTTCTAAAGTGAAGGCTCTGTGTGCCGAGCTCCAGGCCACTGTGGCCACCCCTAAGAGTGCTGAGGA
GAACAAAGCCATCCAAGATGTGGCCAAGGAAGAGGCCTTCCTGGGCATCACGGACAAGGTGACCGAAGGCCACTTCAT
GTATGTGACCGGAGGGAGCCTGGTCTACAGCAACTGGAGGAAGAATGAGCCAAACAACCACGGCTCGGGGGAGGACT
GTGTGATCCTCCTCCAGGATGGGTTCTGGAATGACATCTCCTGCGAGTCCTCCTTCCTGGCCGTCTGTGAACTCCCAGCC
TGATGAGGCAGCTTCCTCAGCCCCCTCCCGGCATTCCTGCTGTGCTCTCTGCTGCCCTGAAAGAGAATTCATGGTCCCCT
TTCC

Anexo 2: Comparação entre as MBLs de diferentes mamíferos:



Anexo 3: Tabela comparando os fenótipos da MBL em diferentes mamíferos:

	MBL 1 / A	MBL 2 / C
CÃO	X	
HOMEM		X
PORCO	X	X
CHIMPANZÉ	X	X
RATO	X	X
CAMUNDONGO	X	X
CAVALO		X
BOI	X	X

O X representa a presença da proteína.