

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Lidiane Gomes da Silva

**Avaliação da relação entre polimorfismos dos genes
beta-defensina e *mbi2* e a predisposição à infecção pela
Leishmania infantum chagasi em cães de Serra Talhada,
Pernambuco**

Recife

2013

Lidiane Gomes da Silva

**Avaliação da relação entre polimorfismos dos genes
beta-defensina e mbl2 e a predisposição à infecção pela
Leishmania infantum chagasi em cães de Serra Talhada,
Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino

**Recife
2013**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Lidiane Gomes da

Avaliação da relação entre polimorfismos dos genes beta-defensina e mbl2 e a predisposição à infecção pela Leishmania infantum chagasi em cães de Serra Talhada, Pernambuco/ Lidiane Gomes da Silva– Recife: O Autor, 2013.

61 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

Leishmaniose Visceral 2. Polimorfismo (Genética) 3. Lectinas I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador) II. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 164

Lidiane Gomes da Silva

Avaliação da relação entre polimorfismos dos genes beta-defensina e mbl2 e a predisposição à infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em cães de Serra Talhada, Pernambuco

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Vladimir da Mota Silveira Filho
Universidade de Pernambuco

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2013

Aos meus pais e irmãos, que são fonte do meu esforço, e aos meus sobrinhos, razão das minhas alegrias.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela oportunidade, paciência, confiança e principalmente pelos grandes ensinamentos.

À Dra. Tereza Cristina Leal Balbino, Dra. Milena de Paiva Cavalcanti e ao Dr. Sinval Brandão, pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Genética da UFPE, pela viabilização de parte importante deste trabalho.

Aos estagiários da UAST-UFRPE, colaboradores do Centro de Controle de Zoonoses e da Secretaria de Saúde do município de Serra Talhada, pelo apoio durante todo o período de coleta.

Aos companheiros do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva: Patrícia e Nádia (amigas muito especiais, que estiveram comigo em todos os momentos!); César e Carlos, devo-lhes um agradecimento muito especial, por toda ajuda e paciência mais que importante para a conclusão deste trabalho; Fernanda pelo apoio diário e paciência na realização dos experimentos; Marcus Batista, Moisés, Marcus Cardoso, Kláudia, Elaine, Tiago, Pierre, Sérgio e Plínio, pelo apoio diário, amizade e convívio saudável. Amo muito vocês!

Aos amigos que sempre me apoiaram.

Aos colegas da turma de mestrado e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética.

À FACEPE, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e irmãos, por tanto amor, paciência, confiança e por serem tão presentes em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Liliane (minha mãe, irmã e filha), por todo apoio, confiança, incentivo e por ser a base da minha força e energia em continuar na caminhada.

Aos meus sobrinhos Luan, Júlia e Lívia, onde me renovo encontrando os mais sinceros e amáveis sorrisos.

A Deus, por tudo!

"Quando um 'biólogo' só enxerga o macro ou o micro e passa a achar tudo bonito, ele é só um deslumbrado. Mas quando ele compreende as relações entre o macro e o micro, quando consegue abstrair, quando entende, por exemplo, que um trabalho sobre o comportamento de um inseto vetor é tão importante quanto o desenvolvimento de uma vacina, ele ainda é um deslumbrado, mas um cientista deslumbrado."

(José Antônio de Souza Pereira Júnior)

Resumo

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença infecciosa grave altamente letal se não tratada. A taxa de infecção de cães pela *Leishmania infantum* é considerada como um parâmetro importante no monitoramento epidemiológico da LVA, visto que esta doença é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis maiores epidemias de origem parasitária do mundo. O presente estudo objetivou determinar a taxa de infecção de cães pela *L. infantum* no município de Serra Talhada - PE e avaliar a relação entre polimorfismos nos genes beta-defensina e lectina ligadora de manose (MBL) destes animais e a infecção pela *L. infantum*. Foram utilizadas amostras de sangue de cães errantes de Serra Talhada, que foram submetidas a extração de DNA e conseqüentemente PCR em tempo real. Utilizando os *primers* Linf 1B a qPCR detectou a presença de seis cães infectados de 86 avaliados (~7% de cães infectados). Nas sequências avaliadas para o marcador de defensina foram observados nove sítios polimórficos, dos quais, nenhum apresentou associação significativa com a infecção por *L. infantum*, porém o haplótipo formado pela união desses SNPs apresentou uma forte associação com a *L. infantum* ($p = 0,029$ e $OR = 37.36$ (1.55 – 903.16)). Para MBL2 apenas um *indel* foi encontrado e não apresentou associação significativa com *L. infantum*, obtendo um valor de $p < 0,21$, possivelmente por apresentar um baixo número de indivíduos infectados e polimorfismos nas sequências obtidas.

Palavras-chave: Defensina; Lectina Ligadora de Manose; *Leishmania infantum chagasi*; Leishmaniose visceral americana; Polimorfismos.

Abstract

The American Visceral Leishmaniasis (AVL) is a serious infectious disease, highly lethal if untreated. The rate of infection of dogs by *Leishmania infantum chagasi* is considered an extremely important parameter in epidemiological monitoring of AVL, since the disease is considered by the World Health Organization (WHO) as one of six major epidemics of parasitic origin of the world. The present study aimed to determine the rate of infection of dogs by *L. infantum* in Serra Talhada - PE and evaluate the possible relationship between polymorphisms in beta-defensin and mannose binding lectin (MBL) of these animals and predisposition to infection by *L. infantum*. We used samples of blood of stray dogs Serra Talhada, they were subjected to DNA extraction and consequently real-time PCR. Using *primers* Linf 1B the qPCR detected the presence of six dogs infected among the 86 evaluated (~7% of infected dogs). In the sequences evaluated for marker defensin, nine polymorphic sites were observed, of which, none showed significant association with infection by *L. infantum*, but the haplotype formed by the union of these SNPs showed a strong association with *L. infantum* ($p = 0.029$ and $OR = 37.36 (1.55 - 903.16)$). To MBL2 only one *indel* was found and no showed significant association with *L. infantum*, obtaining a p value <0.21 , probably due to a low number of infected individuals and polymorphisms in the sequences obtained.

Key words: Defensin; Mannose binding lectin; *Leishmania infantum chagasi*; American visceral leishmaniasis; polymorphisms.

Lista de Ilustrações

- Figura 01** – Distribuição geográfica cumulativa dos casos de leishmaniose visceral notificados em Pernambuco, Brasil, no período de 1990 a 2001. 04
- Figura 02** – Ciclo de vida da *Leishmania infantum chagasi* 06
- Figura 03** – Corante SYBR Green I intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real. 12
- Figura 04** – Curva de amplificação. As linhas coloridas representam quantidades decrescentes de DNA alvo (100 pg a 0,1 fg) quanto maior a quantidade de DNA (primeira linha verde), menor o valor de *Ct* (menos ciclos de amplificação são necessários para atingir o limite de detecção). Legenda- NTC: controle negativo (sem amplificação). 13
- Figura 05** – Apresentação da curva de amplificação evidenciando em lilás as amostras dos cães infectados por *L. infantum* (L34, L38 e L41), em vermelho a curva de controle positivo (DNA de *L. infantum*) e em amarelo o controle negativo (NTC). 25
- Figura 06** – Curva de dissociação apresentando as amostras dos cães positivos (L34, L38 e L41) infectados por *L. infantum* através do sistema Linf1B, evidenciando a formação dos picos correspondentes a *T_m* de ~81°C. Legenda: *T_m*= temperatura de *Melting*. 25
- Figura 07** – Apresentação da curva de amplificação evidenciando em lilás as amostras dos cães infectados por *L. infantum* (L73, L75 e L76), em vermelho a curva de controle positivo (DNA de *L. infantum*) e em amarelo o controle negativo (NTC). 25

- Figura 08** – Curva de dissociação apresentando as amostras dos cães positivos (L73, L75 e L76) infectados por *L. infantum* através do sistema Linf1B, evidenciando a formação dos picos correspondentes a Tm de ~81°C. Legenda: Tm= temperatura de *Melting*. 26
- Figura 09** – Apresentação da curva de amplificação evidenciando em vermelho a curva de controle positivo com 2ng, 100pg e 1pg (DNA de *L. infantum*) e em amarelo controle negativo (NTC). Neste caso, não houve nenhum cão infectado. 26
- Figura 10** – Curva de dissociação apresentando os controles positivos e negativos (nenhum amostra de cão positiva), através do sistema Linf1B, evidenciando a formação dos picos correspondentes a Tm de 81°C. Legenda: Tm= temperatura de *Melting*. 26
- Figura 11** – Gel de agarose mostrando a padronização dos *primers* definidos para defensina e MBL2. a) fragmento de defensina, b) fragmento de MBL2. Todos os géis seguem a seguinte ordem: Poço 1- marcador de peso molecular de 100 pb, poço 2- controle negativo, poços de 3 a 10- amostras de DNA canino. 27
- Figura 12** – Cromatogramas ilustrativos utilizados para avaliar a confiança das bases em relação a sequencia de referência. Foi utilizado a amostra de DNA do cão nº 10 para defensina e MBL2. A imagem mostra a qualidade da reação. 28
- Figura 13** – A imagem mostra que o resultado do Blast revelou similaridade de 99% e 100% (defensina e MBL2, respectivamente) em relação as sequencias utilizadas como referência. 28

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Localização dos cães infectados por <i>L. infantum</i> , indicando a porcentagem de cães infectados em cada bairro.	24
Tabela 02 – Informações sobre a definição dos <i>primers</i> de defensina e MBL2 baseado em sequencias de <i>Canis familiaris</i> , evidenciando os padrões utilizados para definição e padronização dos mesmos.	27
Tabela 03 – Mudança de nucleotídeo nos polimorfismos dos cães infectados por <i>L. infantum</i>	29
Tabela 04 – Avaliação das proporções genotípicas e sua associação com <i>L. infantum</i> . Os SNPs em destaque (4 e 9) apresentaram relação com a doença.	30

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
ΔG	Delta G
μg	Micrograma
μl	Microlitro
ACD	Ácido citrato dextrose
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	Peptídeos Antimicrobianos
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CCZ	Centro de Controle de Zoonozes
cm	Centímetro
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
fg	Fentograma
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kcal/mol	Quilocaloria
Km	Quilômetro
Km²	Quilômetro quadrado
LABBE	Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum chagasi</i>
LVA	Leishmaniose visceral Americana

LVC	Leishmaniose visceral canina
MBL	Lectina ligante de manose
MI	Mililitro
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
ng	Nanograma
NTC	Controle negative
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
pg	Picogramas
qPCR	PCR em tempo real
RIFI	Imunofluorescência Indireta
seg	Segundos
ssp.	Várias species
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultra violeta

Sumário

Resumo	Vii
Abstract	viii
Lista de ilustrações	lx
Lista de Tabelas	Xii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xiii
1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	03
2.1 Leishmaniose Visceral Americana	03
2.2 <i>Leishmania infantum chagasi</i>	05
2.3 Epidemiologia	06
2.4 Importância da Leishmaniose Visceral Americana em animais	07
2.5 Tratamento	09
2.6 Prevenção e Controle	09
2.7 Diagnósticos	10
2.7.1 Reação de PCR	11
2.8 Defensinas – Peptídeos Antimicrobianos	14
2.9. MBL (lectina ligadora de manose)	16
3. Objetivos	18
4. Material e Métodos	19

5. Resultados	24
6. Discussão	32
7. Conclusões	36
8. Referências Bibliográficas	37
9. Anexos	49
10. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	56

1. Introdução

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma doença parasitária de caráter endêmico, causada pelo protozoário tripanossomatídeo *Leishmania infantum chagasi*. Este parasita é transmitido pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Psychodidae, gênero *Lutzomyia*, sendo *Lu. longipalpis* o seu principal vetor no Brasil.

A LVA se encontra disseminada em toda a região neotropical, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos humanos notificados. Devido ao seu caráter endêmico, esta doença vem se tornando um importante problema de saúde pública. A ocorrência da LVA em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. O cão vem sendo apontado como reservatório da endemia e como hospedeiro doméstico, tornando-se o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos.

O diagnóstico da LVA em cães é baseado principalmente na realização de testes sorológicos, exames de esfregaços corados por Giemsa, culturas *in vitro* e no uso de técnicas histológicas. Tem-se demonstrado que a técnica da PCR também pode ser utilizada na detecção de DNA da *L. infantum* em amostras clínicas de cães, exibindo níveis de sensibilidade geralmente superiores àqueles fornecidos pelos métodos tradicionais. Deste modo, espera-se que a PCR passe a representar o padrão de referência na rotina de detecção de infecções pela *L. infantum*.

A PCR também tem sido utilizada para detectar componentes relacionados com o processo de resposta imunológica em seres humanos e animais que,

devido a sua ação contra parasitas causadores de doenças, podem estar relacionados com o nível de infecção por diversos patógenos, inclusive pela *L. infantum*.

Dentre esses componentes destacam-se as defensinas, que são peptídeos antimicrobianos que apresentam atividades importantes para o sistema inato de resistência nos vertebrados. Outro componente importante do sistema de imunidade inato é a lectina ligadora de manose (MBL), uma proteína sérica sintetizada no fígado que tem uma importante função na imunidade inata do hospedeiro, pela sua ligação de alta afinidade a resíduos de manose ou a outros carboidratos componentes de vírus, bactérias e leveduras. Estudos indicam que níveis elevados de MBL2 podem estar relacionados ao risco de desenvolvimento da LVA e complicações clínicas em infecções com *L. infantum*.

Sendo assim, a análise dos genes que codificam a defensina e MBL2 podem fornecer subsídios para relacionarmos seus polimorfismos com a infecção pela *L. infantum* em cães. Este estudo se baseou no uso de ferramentas de biologia molecular para avaliar diferentes aspectos da epidemiologia da leishmaniose visceral em Serra Talhada, município do sertão de Pernambuco, onde são registrados dezenas de casos de leishmaniose visceral canina a cada ano.

2. Revisão da Literatura

2.1. Leishmaniose Visceral Americana

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença infecciosa sistêmica grave, altamente letal se não tratada e que apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos bastante característicos em cada região geográfica onde ocorre. Apresenta como agente etiológico a *Leishmania infantum chagasi* (Cunha e Chagas 1937), protozoário da família Trypanosomatidae transmitido pelas fêmeas infectadas do díptero flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Grimaldi *et al.*, 1989).

A LVA é uma doença endêmica em áreas tropicais e subtropicais, onde constitui um importante problema de saúde pública. Nessas regiões é considerada basicamente uma zoonose, onde os humanos são hospedeiros incidentes no ciclo de vida dessas espécies parasitas. A infecção de humanos pela *L. infantum* depende tanto da imunidade do hospedeiro quanto da virulência do parasita (Grimaldi *et al.*, 1989).

O primeiro caso de infecção assintomática de LVA subclínica foi relatado em 1906, por William Leishman. Nas Américas, estende-se desde o México até a Argentina, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos notificados (Monteiro *et al.*, 2005; Brasil, 2006). O primeiro caso descrito no Brasil foi em 1913, através da necropsia de um paciente procedente de Boa Esperança, Mato Grosso. No período de 2001 a 2010 foram registrados 33.315 casos de LVA no país. Nesse mesmo período, ocorreram pelo menos 2.287 óbitos por LVA, implicando uma letalidade de 6,9% (Brasil, 2010).

A região Nordeste é a que apresenta o maior percentual de notificações de leishmaniose visceral humana (77% dos casos), estimando-se ainda que de 20 a 30% dos cães estejam permanentemente infectados (Gomes Neto, 2006). Assim como em outros Estados do Nordeste, a LVA é endêmica em Pernambuco, sendo amplamente distribuída e havendo registros de casos em todas as regiões geoclimáticas (Dantas-Torres, 2006). No período de 2000 a 2006, foram notificados cerca de 1.210 casos humanos em 76 (41%) municípios, sendo o Agreste e o Sertão as regiões com os maiores índices (Miranda, 2008).

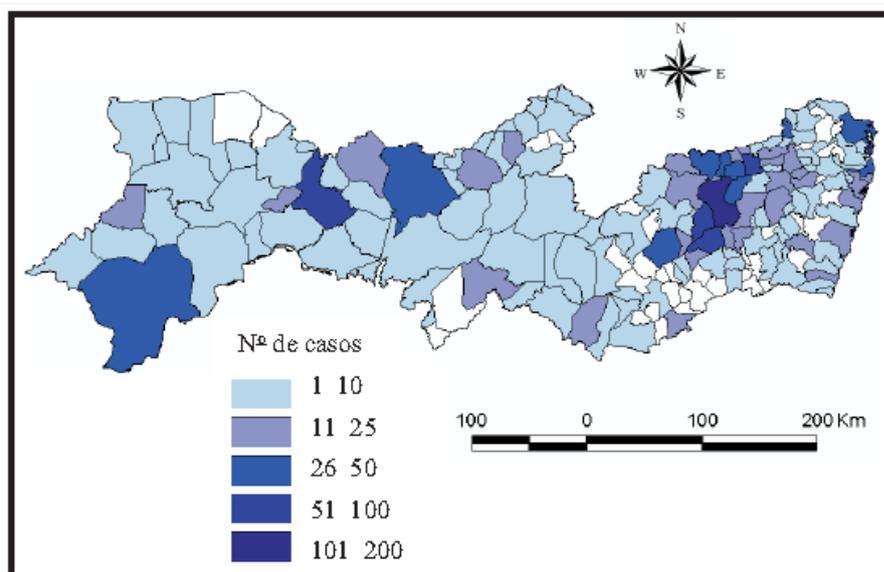


Figura 01 – Distribuição geográfica cumulativa dos casos de leishmaniose visceral notificados em Pernambuco, Brasil, no período de 1990 a 2001. (Fonte: Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006).

Estima-se que 20% dos indivíduos infectados por *Leishmania infantum chagasi* desenvolverão a forma clássica da doença. O período de incubação geralmente varia entre dois e seis meses. O primeiro sintoma de visceralização é febre baixa recorrente, frequentemente com dois ou três picos diários que persiste com remissões durante todo o curso da infecção. Esplenomegalia é o achado mais importante e destacado no calazar. O tamanho do baço varia, sendo caracteristicamente encontrado entre 5 e 15 cm da reborda costal direita e, em

geral, quanto mais prolongada for a doença, maior o baço. Áreas de congestão e de infarto esplênico podem ocorrer, inclusive com ruptura do órgão (Gontijo e Melo 2004; Nascimento *et al.*, 2005; Borges, 2006).

2.2. *Leishmania infantum chagasi*

A *Leishmania infantum chagasi* (Trypanosomatidae) é o protozoário parasita causador da Leishmaniose Visceral Americana. Existem aproximadamente 30 espécies de *Leishmania* e ao menos 20 destas são patógenos para humanos (Ashford *et al.*, 2000; Desjeux, 2004). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, que se diferenciam, entre outros aspectos, pelo lugar onde se multiplicam no trato digestivo dos insetos vetores (Lainson and Shaw, 1987).

O ciclo de vida da *Leishmania* se completa em duas etapas. O flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere a forma amastigota da *Leishmania* que, no seu trato digestivo, desenvolve-se para a forma promastigota. Os promastigotas se multiplicam e migram para as probóscides até o momento de um novo repasto sanguíneo. Ao realizar o repasto, o vetor infectado regurgita os promastigotas da *Leishmania* para o hospedeiro. As formas promastigotas infectam os macrófagos, transformando-se em amastigotas reiniciando o ciclo do parasita. (Silveira *et al.*, 2004).

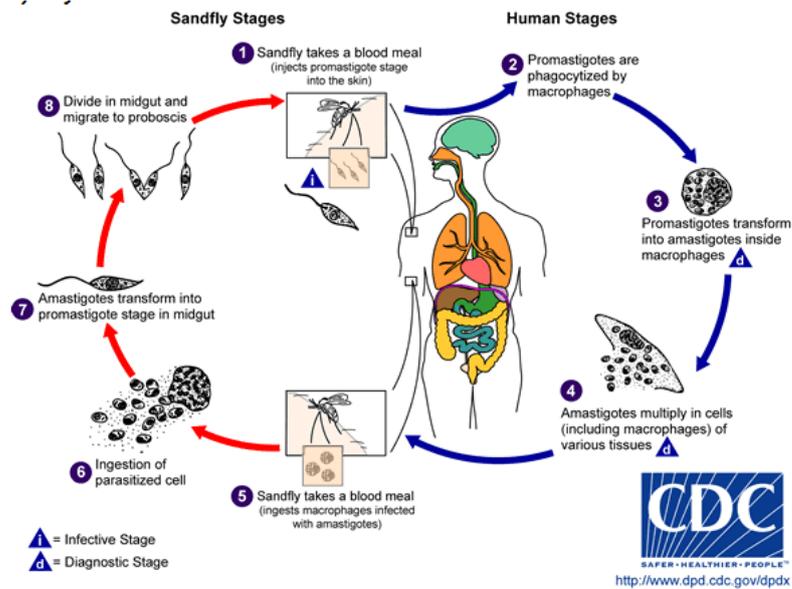


Figura 02 – Ciclo de vida da *Leishmania infantum chagasi* (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention)

2.3. Epidemiologia

Nas duas últimas décadas a Leishmaniose Visceral Americana ressurgiu no mundo de forma preocupante. No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS (Brasil, 2005).

A LVA predomina nas periferias das grandes cidades, onde se observa um grande conglomerado de homens e cães, uma constante verticalização das cidades e a alteração do estado imunológico das pessoas por dependência química, doenças transmissíveis, desnutrição e estresse (Naveda *et al.*, 2006). A esse fato, associam-se também as alterações ambientais ocasionadas por ações antrópicas (e.g. práticas agrárias, exploração do solo, desmatamento acentuado), habitação em áreas sem condições adequadas de moradia e saneamento, migrações constantes, interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães

infectados para áreas sem transmissão (Monteiro *et al.*, 2005; Fontes, 2007; Maia-Elkhoury, 2008).

A LVA é considerada pela Organização Mundial de Saúde (2009) um importante problema de saúde pública, sendo registrados cerca de 500 mil casos a cada ano. Segundo o Ministério da Saúde (2010), foram registrados casos autóctones no Brasil em 20 unidades federadas de quatro regiões, sendo a maioria no Nordeste. No entanto, a doença vem se expandindo de forma gradativa nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste.

Segundo Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006), a maioria dos casos de LVA identificados no Agreste de Pernambuco foi observada nos municípios no entorno de Caruaru, mesmo o Sertão sendo considerado historicamente endêmico.

De maneira geral, o país enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LVA com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria nos ambientes silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos. A proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional e a grande suscetibilidade da população à infecção contribuíram para a rápida expansão da LVA no ambiente urbano (Gontijo e Melo, 2004).

2.4. Importância da Leishmaniose Visceral Americana em animais

Em locais onde a LVA é endêmica, o cão é considerado hospedeiro doméstico e principal reservatório de *L. infantum* (França-Silva *et al.*, 2003). Os hospedeiros silvestres mais bem conhecidos são as raposas e marsupiais que,

por possuírem hábitos sinantrópicos, poderiam promover a ligação entre os ciclos silvestres e domésticos (Costa, 2012).

Os cães domésticos constituem o mais importante reservatório de *L. infantum* e representam, conseqüentemente, o principal elemento no ciclo de transmissão doméstica da LVA (Alvar *et al.*, 2004). A identificação da infecção de cães sintomáticos e assintomáticos em áreas endêmicas é de grande importância para a saúde pública, visto que já se demonstrou que os cães são os principais reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão da *Leishmania* para humanos (Alvar *et al.*, 1994; Soares *et al.*, 2011).

A eliminação de cães domésticos em áreas endêmicas pode reduzir o número de casos humanos, confirmando que cães infectados apresentam maior risco de infecção em humanos (Guan *et al.*, 2000). Isso se explica pelo fato de que casos humanos geralmente são precedidos por casos caninos que, por apresentarem uma grande quantidade de parasitas na pele, favorecem a infecção do vetor (Santa Rosa e Oliveira, 1997).

O aumento da incidência da LVA no Nordeste pode estar relacionado à aproximação entre cães infectados e homens nos ambientes intra e peridomiciliar (Cunha *et al.*, 1995; Desjeux, 2001), representando um importante fator de risco para a doença.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é rotineiramente diagnosticada pelo uso do teste de imunofluorescência indireta (RIFI); porém, esta técnica pode diagnosticar falsos negativos e falsos positivos em cães assintomáticos (Almeida *et al.*, 2005). Considerando as limitações dos métodos convencionais, testes diagnósticos alternativos são necessários para identificar a LVC. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada como uma metodologia rápida e

sensível para detecção dos parasitas (Leontides *et al.*, 2002; Schonian *et al.*, 2003; Cortes *et al.*, 2004).

2.5. Tratamento

No Brasil, para humanos os antimoniais pentavalentes são as drogas de escolha utilizadas no tratamento da LVA, em virtude de sua eficiência terapêutica (Santos *et al.*, 2002). Esses antimoniais foram usados pela primeira vez em 1913 por Gaspar Vianna no tratamento da leishmaniose tegumentar (Brasil, 2006). A anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas (Carvalho, 2000). Outras drogas são empregadas no tratamento da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, miltefosine e a paromomicina (Rath *et al.*, 2003).

Existem também os tratamentos suportes com o uso de antibióticos, devido ao fato de que pacientes com LVA são caracteristicamente neutropênicos e, portanto, têm resposta inflamatória diminuída e estão em risco aumentado de apresentar infecção estabelecida ou oculta (Andrade *et al.*, 1990; Brasil, 2005). A prescrição de antibióticos deverá seguir as recomendações da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) local ou as normas preconizadas na literatura quando disponíveis (Brasil, 2005).

2.6. Prevenção e Controle

Um princípio básico para a prevenção da Leishmaniose visceral canina é evitar o contato entre o vetor e o hospedeiro. Assim, medidas contra o vetor

devem ser adotadas no ambiente e centradas principalmente no cão (Ribeiro, 2007), por ser o principal reservatório.

De acordo com Ribeiro (2007), as medidas recomendadas para cães livres da infecção ou em tratamento, são: uso do colar impregnado com deltametrina 4%, cuidados de limpeza do ambiente (como retirada de matéria orgânica excessiva), aplicação de inseticidas ambientais centrados nos canis, uso de plantas repelentes de insetos (citronela) e a não realização de passeios crepusculares ou noturnos (horários de maior atividade dos flebotomíneos).

Apesar do amplo conhecimento sobre o ciclo de transmissão da LVA, as estratégias de controle têm sido pouco efetivas (Costa e Vieira, 2001). No Brasil esse controle tem se baseado em três estratégias básicas: diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos; realização de inquéritos sorológicos e consequente eutanásia dos cães positivos; e vigilância entomológica (Brasil, 2006). As estratégias adotadas estão relacionadas com a classificação das áreas com e sem transmissão vetorial (Brasil, 2004).

De acordo com Shaw (2007), as metodologias de controle poderão apresentar maior eficácia a partir de estudos relacionados com a diversidade genética das espécies de *L. Infantum* e dos hospedeiros envolvidos no seu ciclo de vida. Sendo assim, será possível avaliar quais os melhores métodos de controles a serem empregados.

2.7. Diagnósticos

O diagnóstico da LVA em cães pode ser feito a partir de características clínicas como febre ondulante, fadiga, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Manna *et al.*, 2006; Chappuis *et al.*, 2007), porém é necessário

uma confirmação por exames laboratoriais (Bonates, 2003). Esses testes são baseados principalmente na realização de testes sorológicos (e.g. ELISA e RIFI), exames de esfregaços corados por Giemsa, culturas *in vitro* e no uso de técnicas histológicas (Grimaldi e Tesh, 1993). A maioria destes métodos exhibe níveis reduzidos de sensibilidade e especificidade, além de dependerem da disponibilidade de mão-de-obra qualificada e de equipamentos especializados.

Tem-se demonstrado que a PCR também pode ser utilizada na detecção de DNA da *L. infantum* em amostras clínicas de cães (Franceschi *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Moshfe *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2010), exibindo níveis de sensibilidade geralmente superiores àqueles fornecidos pelos métodos tradicionais.

2.7.1. Diagnóstico Molecular

A PCR tem se mostrado uma ferramenta útil no diagnóstico da LVA, permitindo a identificação do DNA do parasita em diversos materiais, como amostras clínicas, isolados de cultura, bem como em flebotomíneos (Michalsky *et al.*, 2011). Esta técnica tem se mostrado vantajosa em relação aos métodos convencionais, apresentando alta sensibilidade e especificidade, além de detectar a presença do protozoário e produzir o resultado em poucas horas (Ikonopoulou *et al.*, 2003).

Ensaio com PCR têm sido muito utilizados para o diagnóstico da LVA em cães. Vários tecidos caninos, incluindo sangue, biópsia de pele, medula óssea e baço, são utilizados para a detecção do parasita e tem se mostrado altamente sensível nestes casos, sendo considerada muito importante principalmente quando utilizada para diagnóstico de cães assintomáticos (Leite, *et al.*, 2010).

A PCR vem mostrando significativos avanços em sua tecnologia, como no caso da PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR). Esta técnica se baseia no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento dos produtos amplificados em tempo real. Um dos corantes utilizados é o SYBR Green (Applied Biosystems), que se liga as fitas duplas de DNA geradas durante os ciclos de amplificação emitindo um forte sinal luminoso (Nygren *et al.*, 1998) (Figura 03). O sinal luminoso é analisado por um detector e por um amplificador de sinal, que traçam um gráfico após cada ciclo da PCR que reflete a quantidade do produto amplificado (Kubista *et al.*, 2006). O ciclo em que o sinal de amplificação atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limite de detecção (*Threshold*), ou Ct, é o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra supera a referência passiva do aparelho (Instituto Fleury, 2004). (Figura 04).

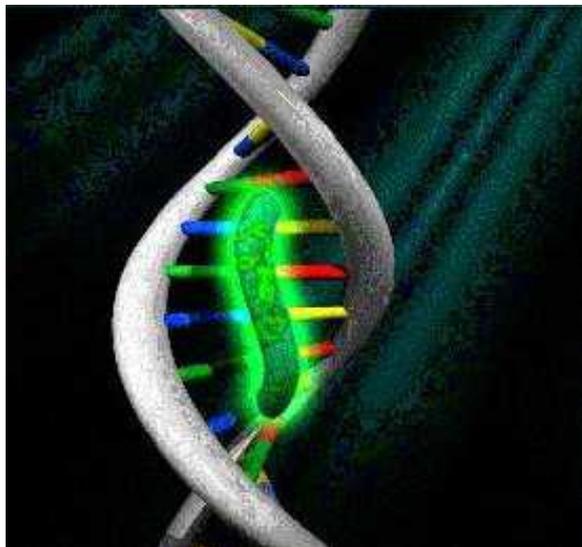


Figura 03 – Corante SYBR Green I intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real. (Fonte: Applied Biosystems®)



Figura 04- Curva de amplificação. As linhas coloridas representam quantidades decrescentes de DNA alvo (100 pg a 0,1 fg) quanto maior a quantidade de DNA (primeira linha verde), menor o valor de Ct (menos ciclos de amplificação são necessários para atingir o limite de detecção). Legenda- NTC: controle negativo (sem amplificação) (Fonte: Paiva Cavalcanti, 2008).

Os principais benefícios desta metodologia são: rapidez no resultado e redução no risco de amostras contaminadas que podem causar falsos positivos, principalmente quando se trata de casos de cães assintomáticos (Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009).

A PCR também tem sido utilizada para detectar componentes relacionados com o processo de resposta imunológica em seres humanos e animais que, devido a sua ação contra parasitas causadores de doenças, podem estar relacionados com o nível de infecção por diversos patógenos, inclusive pela *L. infantum*. Dentre esses componentes destacam-se as defensinas, que são peptídeos antimicrobianos que apresentam atividades importantes para o sistema inato de resistência nos vertebrados (Bagnicka *et al.*, 2008), e a lectina ligadora de manose (MBL), que é uma proteína sérica sintetizada no fígado e que tem uma importante função na imunidade inata do hospedeiro, pela sua ligação de alta afinidade a resíduos de manose ou a outros carboidratos componentes de vírus, bactérias e leveduras (Kuipers *et al.*, 2003; Turner, 2003).

2.8. Defensina - Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) fazem parte do sistema imune inato de organismos vertebrados, atuando contra bactérias, fungos e vírus envelopados (Kagan *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1999; Anbu *et al.*, 2003; Pawlik *et al.*, 2009) na interface pele-ambiente (Leonard *et al.*, 2012). A maioria dos peptídeos antimicrobianos apresentam modos de ação semelhantes, com base na interação com a membrana celular dos microrganismos. A interação torna a membrana do microrganismo permeável por perfuração e formação de canais, ou ruptura total da membrana do microrganismo (Helmerhorst *et al.*, 1999; Shai, 1999; Brogden, 2005).

AMPs raramente são usados em tratamentos de doenças parasitárias e ainda há uma escassez de informações sobre a sua atividade *in vivo* contra parasitas (Vizioli and Salzet, 2002). Tem-se observado uma importante expressão alterada de AMPs em estados de doenças, tais como dermatite atópica (AD) em cães e humanos e psoríase em seres humanos (Leonard *et al.*, 2012). Em relação à AD canina, o estudo de Santoro *et al.* (2013) mostrou um aumento significativo nos níveis de expressão de mRNA do gene cBD103 em pele de cães naturalmente afetados quando comparados com cães saudáveis do grupo controle.

Para a leishmaniose, há uma breve menção do AMP dermaseptina no tratamento da leishmaniose causada por *Leishmania major* em ratos (Nicolas and Mor, 1995). Segundo Alberola *et al.* (2004), o uso de AMPs no tratamento da LVA em cães tem mostrado que o resultado do tratamento da doença está correlacionado com a quantidade de sintomas e a normalização da proteína total no soro.

Na Índia, foi realizado um estudo de caso-controle que demonstrou associações entre leishmaniose e SNPs de genes (DLL1 e FAM120B) localizados no cromossomo 6q27 de seres humanos. Os resultados desse estudo sugerem que o gene DLL1 pode influenciar a susceptibilidade dos pacientes à doença (Mehrotra *et al.*, 2012). Esses dados indicam que muitos AMPs devem estar envolvidos na imunidade inata cutânea, atuando na defesa contra microrganismos externos (Santoro *et al.* 2013).

O mais importante dos peptídeos antimicrobianos é uma família de peptídeos catiônicos que incluem as defensinas, classificadas em alfa, beta e teta-defensinas, sendo a classe das beta-defensinas a maior delas. As alfa e beta defensinas influenciam na expressão de moléculas de adesão, produção de adrenocorticóides, secreção de cloreto de íons, reparação de feridas e síntese de DNA (Bagnicka *et al.*, 2008).

A atividade biológica das defensinas depende fortemente da sua concentração. Como exemplo, as concentrações baixas (< 10 µg/ml) de alfa-defensinas estimulam a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas e produção de citocinas em monócitos humanos. O efeito da beta-defensina-2 (BD-2) na quimiotaxia e cicatrização de feridas depende da sua concentração, com um efeito máximo de 500 µg/ml (Ganz, 2004). Em concentrações de 1 a 10 µg/ml exibem atividade antimicrobiana em bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos. Em 25 µg/ml, estimulam a síntese de DNA. Em concentrações muito elevadas, causam a lise de micróbios e de algumas células tumorais (Biragyn *et al.*, 2002; Lehrer e Ganz, 2002; Kamysz *et al.*, 2003; Ganz, 2004; Wiechuła *et al.*, 2006).

O gene de defensina tem sido usado em correlações com doenças. Polimorfismos de defensina em humanos, por exemplo, estão fortemente associados ao risco de infecção por HIV-1 (Braidia *et al.* 2004; Milanese *et al.*, 2006).

Novos agentes leishmanicidas são necessários e avanços importantes têm sido alcançados nesse sentido, principalmente com a utilização de AMPs que aparentemente tem apresentado efeitos positivos no tratamento da LVA. Contudo, o tratamento eficaz da LVA não depende apenas da ação leishmanicida, mas também das interações entre o parasita e o sistema imunitário (Solano-Gallego *et al.*, 2000; Altet *et al.*, 2002; Sacks and Sher, 2002).

2.9. MBL (lectina ligadora de manose)

Outro componente importante do sistema de imunidade inato é a lectina ligadora de manose (MBL), que é uma proteína sérica sintetizada no fígado e que tem como função atuar na imunidade inata do hospedeiro, porque possui alta afinidade a resíduos de manose ou a outros carboidratos componentes de vírus, bactérias e leveduras (Kuipers *et al.*, 2003; Turner, 2003).

O gene MBL2 em humanos está localizado no cromossomo 10, consistindo em quatro éxons interrompidos por três íntrons de 600, 1350 e 800pb (Taylor *et al.*, 1989). A região promotora do gene MBL2 contém elementos que sugerem a importante participação desta proteína na fase aguda de infecções (Alonso, 2007). A função da MBL2 está diretamente associada a sua concentração sérica, que é determinada pela interação entre mutações na região promotora e no éxon 1 (Jülicher *et al.*, 2000).

MBL é uma molécula candidata na modificação da progressão de doenças, porque é possível diminuir o efeito das infecções causadas por patógenos intracelulares (Garred *et al.*, 1994; Green *et al.*, 1994). Ela se liga a carboidratos presentes em muitos patógenos, incluindo *Leishmania Infantum chagasi* (Green *et al.*, 1994), conferindo proteção antes do estabelecimento de adaptação a respostas imunes (Ezekowitz, 1991). Recentes trabalhos têm apontado para uma provável função da MBL na modulação de processos inflamatórios (Jack *et al.*, 2001). A deficiência da MBL foi inicialmente reconhecida em crianças com defeito na função de opsonização, estando aparentemente associada a infecções recorrentes e deficiência de crescimento (Super *et al.*, 1989).

Em relação a LVA, estudos indicam que altos níveis de MBL2 podem estar relacionados ao risco de desenvolvimento da LVA e complicações clínicas em infecções com *L. Infantum* (Alonso *et al.*, 2007). Isabel *et al.* (2001) observaram que a MBL2 *in vitro* afeta a função de células infectadas por este parasita e que *in vivo*, os níveis de MBL2 estão diretamente correlacionados com a probabilidade de desenvolvimento de infecções por *L. infantum*.

Sendo assim, os polimorfismos encontrados nos genes defensina e MBL2 podem fornecer subsídios para observar a possível associação desses polimorfismos com a infecção pela *L. infantum* em cães. O presente estudo utilizou métodos moleculares para determinação da LVA em cães no município de Serra Talhada, sertão de Pernambuco, onde são registrados vários casos de LVA canina a cada ano, motivando a realização deste estudo naquele município.

3. Objetivos

3.1 Geral

- Avaliar a possível relação entre polimorfismos nos genes da beta-defensina e MBL2 e a infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em cães procedentes de uma área de transmissão de leishmaniose visceral no sertão de Pernambuco.

3.2 Específicos

- Determinar a taxa de infecção por *L. infantum* em cães errantes de uma área de transmissão ativa do Sertão do Pajeú de Pernambuco, através do uso da técnica de PCR em tempo real.
- Avaliar a relação entre polimorfismos dos genes beta-defensina e MBL2 no DNA de cães e sua predisposição à infecção pela *L. infantum*.

4. Material e Métodos

4.1. Descrição da área de estudo

Serra Talhada, Pernambuco (07°59'31"S/ 38°17'54"W): município localizado no sertão de Pernambuco, microrregião do Pajeú, distante cerca de 400 km do Recife, capital do Estado. Tem uma área de 2.979,97 km² e a sua sede encontra-se numa altitude de 429 metros, apresentando relevo levemente ondulado. A vegetação predominante é a caatinga hiperxerófila e o clima predominante é o semiárido com chuvas de verão. A população estimada para o ano de 2012 era de 80.489 habitantes, sendo que cerca de 30% residem na zona rural do município (IBGE, 2012).

4.2. Captura de cães

Foram capturados 86 cães errantes que apresentavam sinais clínicos de qualquer enfermidade foram capturados por funcionários do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Também foram capturados cães através de denúncia dos proprietários ou da população, inclusive nos distritos situados na zona rural do município. As capturas foram georreferenciadas e serviram de suporte para identificação de focos da leishmaniose no município. Todos os cães capturados foram encaminhados ao CCZ do município.

4.3. Coleta de sangue e extração de DNA

A realização da coleta de sangue dos cães capturados foi realizada com o apoio da equipe do CCZ de Serra Talhada, através de punção venosa para a retirada, quando possível, de 5 ml de sangue total. O sangue total foi armazenado em anticoagulante ACD (ácido cítrico 0,0038M; citrato de sódio tribásico 0,075M; dextrose 0,133M) e estocado a 4°C. Todo o material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da UFPE, onde foram realizados os testes moleculares.

A extração de DNA do sangue total foi realizada utilizando a técnica de *Mini Salting Out*, descrita por Miller *et al.* (1988), que consiste das seguintes etapas: separação dos leucócitos; digestão e eliminação das proteínas; precipitação e lavagem do DNA. O DNA obtido de cada amostra foi quantificado para determinação da concentração e do grau de pureza.

4.4. Técnica de qPCR para detecção da *Leishmania*

Para a detecção de *Leishmania infantum chagasi* foram utilizados os iniciadores Linf.1-23F 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3' e Linf.1-154R 5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3', com produto esperado de 132pb e Tm = 81°C, descritos por Paiva-Cavalcanti *et al.* (2009). Esses iniciadores têm como alvo a região conservada do DNA cinetoplastidial do complexo *Le. donovani*. Para quantificação absoluta foi utilizada uma curva de controle positivo numa escala com sete amostras variando entre 1ng a 1fg de DNA de *L. Infantum* (1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg), utilizado para avaliar o limite de detecção do sistema. Também foi utilizado um controle negativo (NTC) sem DNA e as amostras do

DNA canino, todos em duplicata para observar a homogeneidade entre as mesmas e garantir a confiabilidade da reação.

As reações foram realizadas no equipamento ABI PRISM 7500 systems (Applied Biosystems), contendo um volume final de 50 μ l, sendo 2 μ L de DNA, 21 μ L de água livre de nuclease (Tipo 1), 1 μ L cada primer (Linf.1-23F e Linf.1-154R) a 3pmol e 25 μ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). O perfil de amplificação consistiu dos seguintes passos: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de (95°C / 15seg, 60°C / 50 seg e 72°C / 30 seg). Para análise dos resultados foi utilizado o ABI PRISM software (versão 1.1). Os experimentos foram analisados de acordo com a curva de amplificação e dissociação. Em relação à curva de amplificação, todas as amostras positivas foram avaliadas mediante a comparação da amplificação das mesmas com os ciclos em que houve a amplificação da curva de controle positivo; além disso, as amostras também foram avaliadas em comparação com o controle negativo (NTC).

4.5. Definição e PCR convencional dos *primers* de defensina e MBL2

Os *primers* para defensina e MBL2 foram definidos utilizando o programa Primer3Plus (Untergasser *et al*, 2007), a partir das sequências genômicas de *Canis lupus familiaris* depositadas no Genbank (NC_006598, para defensina; e NC_006586 para MBL2). O programa OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) foi utilizado para verificar a qualidade dos *primers* selecionados com base na observação dos seguintes critérios: definição da temperatura de *melting*; formação de dímero de *primers* e de *hairpins*. Para avaliar temperatura de *melting*, a diferença entre a

temperatura dos dois *primers* (direto e reverso) não deve ser superior a 5°C. Para evitar a formação de *hairpins* é recomendável que ΔG seja no mínimo -3 Kcal/mol; e para evitar a formação de dímeros de *primers* o ΔG deverá ser de no mínimo -5 Kcal/mol.

Para padronização dos *primers*, foi utilizado o *kit* Gotaq Master Mix em um volume final de 25 μ l contendo: 1,5 μ L de cada primer com concentração de 3ng/ μ L; 7,5 μ L de água livre de nuclease; 12,5 μ L de Green Master Mix (Promega); e 2 μ L de DNA com concentração de 70ng/ μ L. O perfil de amplificação foi definido a partir da temperatura de *melting* de cada *primer*, onde foram realizados gradientes dos dois pares de *primers* para encontrar a temperatura de anelamento perfeita e a quantidade de ciclos foi definida pelo tamanho do fragmento específico para cada *primer*.

O perfil de amplificação para defensina seguiu os seguintes passos: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de (94°C / 30seg, 55°C / 30seg e 72°C / 30seg) e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os mesmos passos adotados para MBL2, com exceção da temperatura de anelamento que foi ajustada para 64°C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV.

4.6. Análise dos polimorfismos

Foram geradas sequências consenso com base nos valores de Phred 40, através do programa Staden (Staden *et al.*, 2000) e validadas através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram analisadas 47 sequências para o gene de defensina e 17 sequências para o gene de MBL2. As sequências foram alinhadas

utilizando o programa MEGA v. 5.3 (Tamura *et al.*, 2011), que também foi utilizado para visualizar e quantificar os polimorfismos.

As associações dos SNPs com a doença (tipo caso-controle) foram realizadas com o auxílio do software SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web), admitindo-se um nível de significância de 5% (Solé *et al.*, 2006).

5. Resultados

5.1. Diagnóstico de LVA por qPCR em amostras de DNA canino

Dos 86 cães capturados, seis (~7%) apresentaram diagnóstico positivo para leishmaniose visceral canina (LVC). A maior parte dos cães infectados por *L. infantum* foram capturados em bairros localizados em áreas periféricas do município (Mutirão, Borborema, COHAB e CAGEP). Uma das amostras positivas (L38) foi coletada sem identificação, impossibilitando a definição do seu bairro de origem (Tabela 01).

Tabela 01 – Localização dos cães infectados por *L. infantum*, indicando a porcentagem de cães infectados em cada bairro.

Localidade (Bairro)	Cães capturados	Cães infectados	% de cães infectados	Amostras
Mutirão	09	01	11,0%	L34
Indeterminado	20	01	5,0%	L38
Borborema	08	01	12,5%	L41
COHAB	10	01	10,0%	L73
Centro	05	01	20,0%	L75
CAGEP	06	01	16,0%	L76

Todos os cães com diagnóstico positivo para LVA apresentaram cargas parasitárias altas, com exceção de uma das amostras (L76), que apresentou carga parasitária inferior à quantidade de DNA presente na região conservada do minicírculo do cinetoplasto da *Leishmania* (~200fg). Os experimentos de qPCR

apresentaram eficiência acima de 90% em todas as reações, evidenciando a boa qualidade das reações ao se utilizar sangue periférico de cães (Figuras 05, 06, 07, 08, 09 e 10).

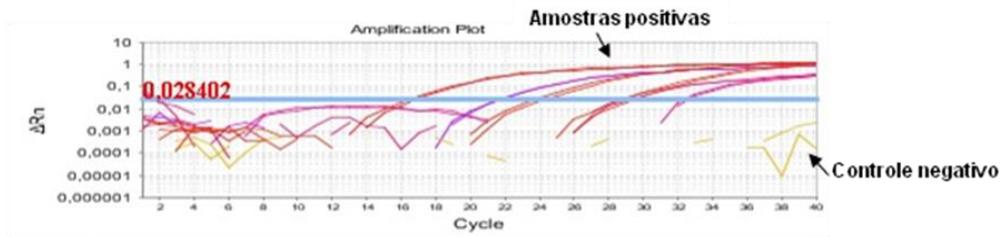


Figura 05 – Apresentação da curva de amplificação evidenciando em lilás as amostras dos cães infectados por *L. infantum* (L34, L38 e L41), em vermelho a curva de controle positivo (DNA de *L. infantum*) e em amarelo o controle negativo (NTC).

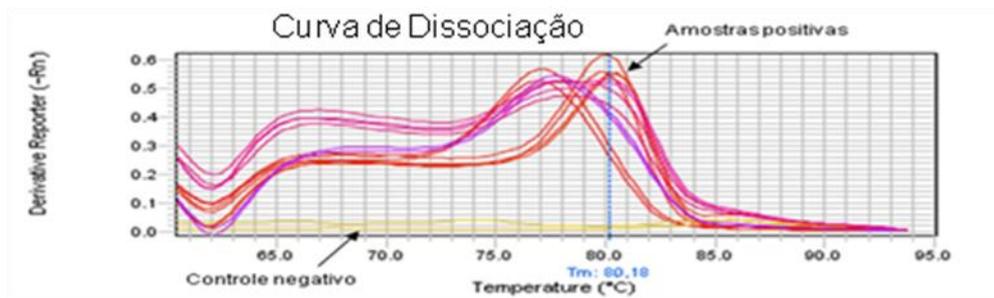


Figura 06 – Curva de dissociação apresentando as amostras dos cães positivos (L34, L38 e L41) infectados por *L. infantum* através do sistema Linf1B, evidenciando a formação dos picos correspondentes a T_m de ~81°C. Legenda: T_m = temperatura de *Melting*.

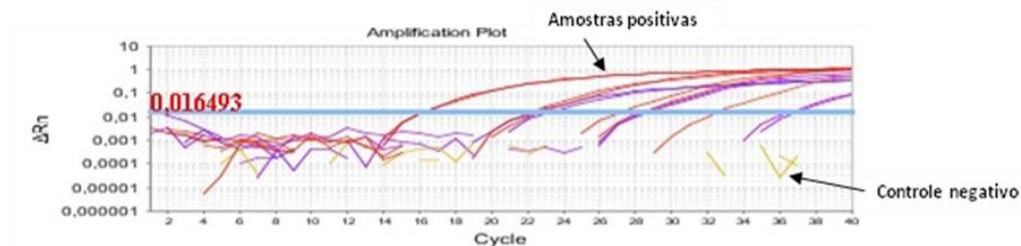


Figura 07 – Apresentação da curva de amplificação evidenciando em lilás as amostras dos cães infectados por *L. infantum* (L73, L75 e L76), em vermelho a curva de controle positivo (DNA de *L. infantum*) e em amarelo o controle negativo (NTC).

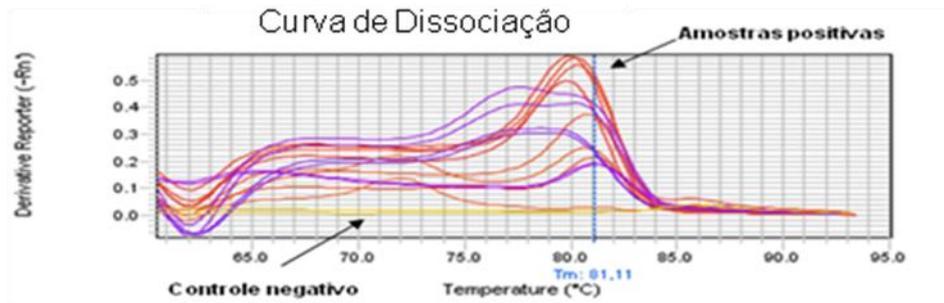


Figura 08 – Curva de dissociação apresentando as amostras dos cães positivos (L73, L75 e L76) infectados por *L. infantum* através do sistema Linf1B, evidenciando a formação dos picos correspondentes a Tm de ~81°C. Legenda: Tm= temperatura de *Melting*.

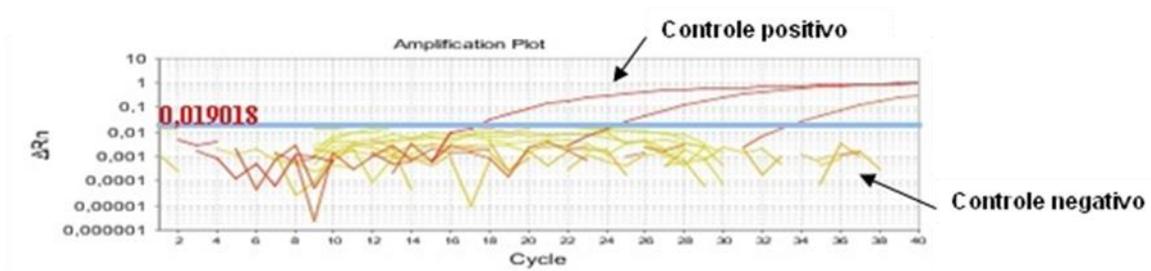


Figura 09 – Apresentação da curva de amplificação evidenciando em vermelho a curva de controle positivo com 2ng, 100pg e 1pg (DNA de *L. infantum*) e em amarelo controle negativo (NTC). Neste caso, não houve nenhum cão infectado.

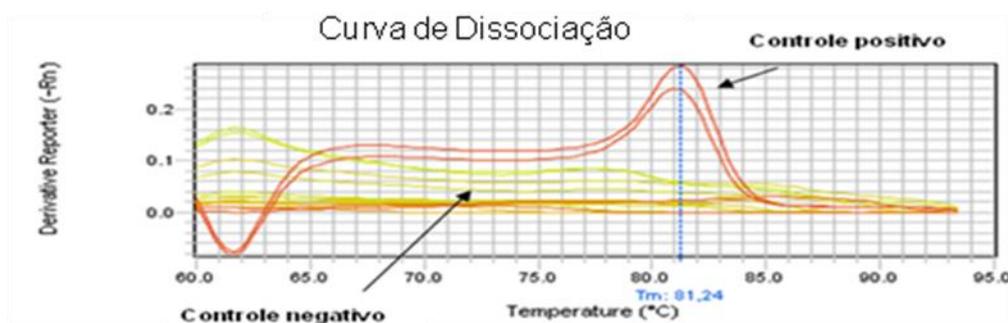


Figura 10 – Curva de dissociação apresentando os controles positivos e negativos (nenhum amostra de cão positiva), através do sistema Linf1B, evidenciando a formação dos picos correspondentes a Tm de 81°C. Legenda: Tm= temperatura de *Melting*.

5.2. Amplificação dos genes de defensina e MBL2

A Tabela 02 contém as informações referentes à definição dos *primers* de defensina e MBL2, apresentando todos os parâmetros utilizados nas reações. Todos os valores se apresentaram dentro dos padrões previstos. Os resultados da PCR convencional para os marcadores de MBL2 e defensina apresentaram um padrão de bandas de aproximadamente 600pb para os dois marcadores (Figura 11).

Tabela 02 - Informações sobre a definição dos *primers* de defensina e MBL2 baseado em sequencias de *Canis familiaris*, evidenciando os padrões utilizados para definição e padronização dos mesmos.

Primer	Sequência (5'-3')	TM (°C)	Diferença entre as TM (°C)	ΔG (Kcal/mol)	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento (pb)
DEFEX1	ATCCCTGCCCTATAAAGGATG	53,9	0,5	-0.36	55°C	582
	CCAAACACAGTCAGGAGGTC	53,4				
MBL2EX4	TCTGGCTGAGGAAGAGCAG	58,5	2,4	0.18	64°C	603
	GAATTCTCTTTCAGGGCTACCG	56,1				

Legenda: TM = Temperatura de *melting*; ΔG = Delta G; pb = pares de bases

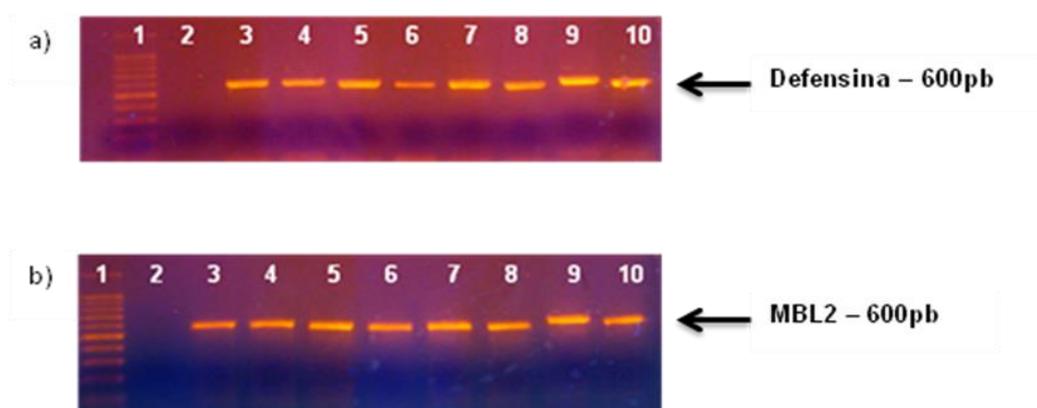


Figura 11- Gel de agarose exibindo os padrões de amplificação dos *primers* definidos para defensina (a) e MBL2 (b). Amostra 1: marcador de peso molecular de 100 pb; amostra 2: controle negativo; amostras de 3 a 10: amostras de DNA canino.

Os cromatogramas resultantes da reação de sequenciamento de cada marcador evidenciaram a boa qualidade das sequências produzidas (valores de Phred iguais ou superiores a 40), viabilizando a correta inferência dos genótipos das amostras. A especificidade das reações de sequenciamento foi confirmada através da análise realizada com o BLAST, que resultou na detecção de elevados valores de identidade dos produtos sequenciados com as sequências dos genes da defensina (AC186962.12) e MBL2 (XM536402.3) de cão utilizadas como referência para a definição dos primers utilizados neste trabalho (Figuras 12 e 13).

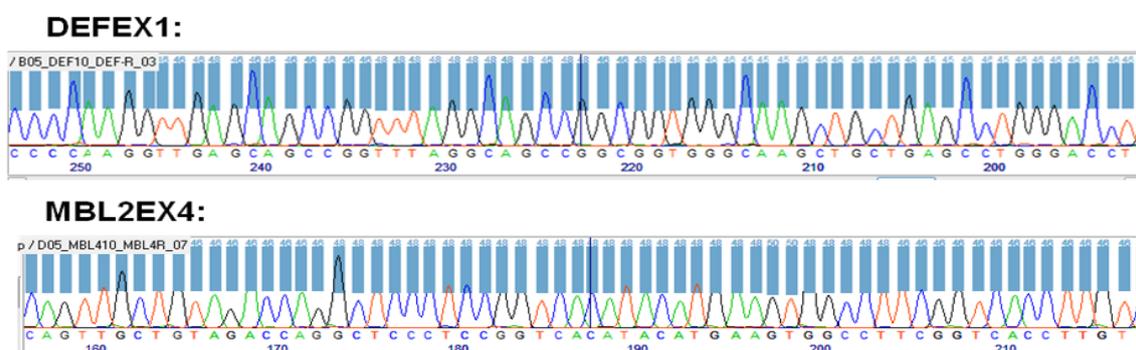


Figura 12 – Cromatogramas ilustrativos utilizados para avaliar a confiança das bases em relação a sequencia de referência. Foi utilizado a amostra de DNA do cão nº 10 para defensina e MBL2. A imagem mostra a qualidade da reação.

DEFEX1:

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AC186962.12	Canis familiaris chromosome 16, clone XX-202C11, complete sequ	1029	1169	100%	0.0	99%
AC191121.9	Canis familiaris chromosome 16, clone XX-465H6, complete sequer	1029	1169	100%	0.0	99%
NM_001113713.1	Canis lupus familiaris defensin, beta 1 (DEFB1), mRNA >gb DQ0115	337	337	32%	7e-89	100%
EU315073.1	Canis lupus familiaris beta-defensin 1 mRNA, partial cds	71.8	71.8	6%	5e-09	100%
AK394268.1	Sus scrofa mRNA, clone: LVRM10128A09, expressed in liver	66.1	66.1	18%	3e-07	78%

MBL2EX4:

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XM_536402.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris mannose-binding protein A-like	733	733	96%	0.0	100%
XM_002922414.1	PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca mannose-binding protein A-	437	437	94%	4e-119	87%
XM_001496624.1	PREDICTED: Equus caballus mannose-binding protein A-like (LOC	385	385	94%	2e-103	84%
AC212678.6	Pongo abelii BAC clone CH276-321E7 from chromosome unknown	375	626	97%	1e-100	83%
EU421730.1	Sus scrofa mannan-binding lectin A (MBL-A) mRNA, complete cd	369	369	96%	7e-99	83%
NM_001007194.2	Sus scrofa mannan-binding lectin (A) (MBL1), mRNA >gb AY771:	369	369	96%	7e-99	83%

Figura 13 – A imagem mostra que o resultado do BLAST revelou similaridade de 99% e 100% (defensina e MBL2, respectivamente) em relação as sequencias utilizadas como referência.

5.3. Associação dos polimorfismos de defensina com *L. infantum*

Foram sequenciadas 82 amostras, possibilitando a obtenção de um fragmento de 582pb. Nas análises dos polimorfismos deste marcador foram detectados 572 sítios conservados e 10 sítios variáveis, sendo que nove destes últimos eram informativos para parcimônia. Os sítios informativos foram encontrados na região do promotor (sítios -7) e do íntron (sítios 85, 144, 147, 164, 282, 319, 348, 360), não tendo sido detectados sítios polimórficos na região do éxon.

Foram identificados indivíduos heterozigotos nos nove sítios informativos de parcimônia. A Tabela 3 mostra os nucleotídeos presentes na sequência de referência (AC186962.12) e as mudanças de nucleotídeos detectadas em alguns destes sítios, bem como os genótipos dos cães infectados. Os cromatogramas mostrando os heterozigotos dos cães infectados encontram-se em anexo.

Tabela 03 - Mudança de nucleotídeo nos polimorfismos dos cães infectados por *L. infantum*

	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7	SNP 8	SNP 9
Sítios	-7	85	144	147	164	282	319	348	360
S.R.	A	A	C	T	A	C	C	G	T
DEF34	A/A	A/A	C/C	G/G	A/G	T/T	T/T	A/G	C/C
DEF38	A/G	A/G	C/C	G/T	A/A	C/T	C/C	G/G	C/T
DEF41	A/A	A/A	C/C	G/G	A/G	T/T	T/T	A/G	C/C
DEF73	G/G	G/G	C/T	G/T	A/G	C/T	C/T	A/G	C/C
DEF75	A/A	A/A	C/C	G/T	A/A	C/T	C/C	G/G	C/T
DEF76	A/A	A/A	C/C	G/T	A/G	C/T	C/T	G/G	C/T

Legenda: S.R. = Sequência de referência

Na avaliação das frequências alélicas e genóticas dos nove SNPs de beta-defensina e de sua associação com a presença de *Leishmania*, observou-se que nenhum desses nove SNPs obteve associação para suscetibilidade com *L. infantum*, apresentando p-values sempre acima de 5% (Tabela 04).

Tabela 04 - Avaliação das proporções genóticas e sua associação com *L. infantum*. Os SNPs em destaque (4 e 9) apresentaram relação com a doença.

	Genótipos	Frequencia total	Frequencia casos	Frequencia controle	p-value
SNP 1	A/A	0.33	0.67	0.30	0.18
	G/A	0.46	0.17	0.49	
	G/G	0.21	0.17	0.21	
SNP 2	A/A	0.32	0.67	0.29	0.17
	G/A	0.45	0.17	0.47	
	G/G	0.23	0.17	0.24	
SNP 3	C/C	0.54	0.83	0.51	0.26
	C/T	0.43	0.17	0.45	
	T/T	0.04	0	0.04	
SNP 4	G/G	0.49	0.33	0.5	0.38
	G/T	0.44	0.67	0.42	
	T/T	0.07	0	0.08	
SNP 5	A/A	0.27	0.33	0.26	0.17
	A/G	0.49	0.67	0.47	
	G/G	0.24	0	0.26	
SNP 6	C/C	0.07	0	0.08	0.52
	T/C	0.51	0.67	0.5	
	T/T	0.41	0.33	0.42	
SNP 7	C/C	0.26	0.33	0.25	0.82
	C/T	0.45	0.33	0.46	
	T/T	0.29	0.33	0.29	
SNP 8	A/A	0.05	0	0.05	0.73
	G/A	0.49	0.5	0.49	
	G/G	0.46	0.5	0.46	
SNP 9	C/C	0.61	0.5	0.62	0.5
	C/T	0.33	0.5	0.32	
	T/T	0.06	0	0.07	

Em relação à associação haplotípica, constatou-se que o haplótipo **(AACGATTAC)** apresentou uma possível associação com a presença de *L. infantum* nos cães infectados (**p = 0,029 e OR = 37.36 (1.55 – 903.16)**).

5.4. Associação dos polimorfismos de MBL2 com *L. infantum*

As análises dos polimorfismos do gene MBL2 evidenciaram a presença de um único sítio polimórfico localizado na região correspondente ao sítio 147 do íntron da sequência de referência (NC_006586). Das 17 sequências analisadas, nove apresentaram a citosina e oito delas apresentaram um gap no sítio polimórfico encontrado. Dentre as sequências que apresentou o gap estão os cães infectados por *Leishmania*, assim como a sequência de referência utilizada para definição dos *primers*. O teste de associação (caso-controle) utilizando apenas este sítio polimórfico (*indel*) não evidenciou a associação com a doença (p = 0,21).

6. Discussão

A determinação da taxa de infecção em cães pela *Leishmania infantum chagasi*, assim como da relação de polimorfismos associados a doenças, são parâmetros importantes e que devem ser considerados nos estudos voltados para o monitoramento da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), doença tida pela OMS como uma das mais importantes endemias de origem parasitaria do mundo (Brasil, 2010).

Este estudo viabilizou a detecção de cães errantes infectados por *L. infantum* (~7%) no município de Serra Talhada. O resultado observado é nitidamente superior aos encontrados nos municípios de Campina Grande (3%) e João Pessoa (3,8%), na Paraíba (Vidal, 2008), e Recife (3%), Pernambuco (Dantas-Torres, 2006). A prevalência de cães infectados encontra-se de acordo com as observações de Rosário *et al.* (2005), ao relatarem que a prevalência da LVA canina no Brasil deve variar entre 1,9 a 35%, dependendo das condições socioeconômicas e do perfil de transmissão da doença em cada uma das regiões brasileiras (Santa Rosa e Oliveira, 1997; Alves e Bevilacqua, 2004).

De acordo com Alves e Faustino (2005), as características epidemiológicas da LVA canina no Brasil podem estar associadas a problemas socioeconômicos e sanitários. Entretanto, o perfil da doença na região Nordeste está associado à pobreza e subnutrição da população humana e, conseqüentemente, da população canina. Neste contexto, observamos que a maioria dos cães infectados foi capturada em bairros situados na periferia do município de Serra Talhada, à semelhança do que foi observado por Vidal (2008) em Campina Grande. Essa constatação se suporta na afirmação de Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006), ao considerarem que os casos de LVA acontecem

principalmente nas periferias, por formarem aglomerados de pessoas e por apresentarem precárias condições de infraestrutura e de saneamento básico. Estes autores também relatam que, devido à seca que devasta o interior do estado de Pernambuco, muitos indivíduos (especialmente crianças) apresentam-se mal nutridos, favorecendo a expressão e o agravamento da LVA.

A quantificação dos parasitas da *L. infantum* por qPCR foi muito importante e tem sido considerada uma ótima ferramenta para monitorar a quantidade dos parasitas circulantes durante o tratamento da leishmaniose visceral (Martínez *et al.*, 2011). Assim como ocorreu neste estudo, Paiva-Cavalcanti (2008) também observou que, além das vantagens operacionais, a qPCR é altamente reprodutível e sensível, podendo substituir a PCR convencional em rotinas de diagnósticos (Bretagne *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2002; Rolão *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Khosravi *et al.*, 2012).

O número de estudos genéticos que associam polimorfismos genéticos a patologias ou à susceptibilidade a doenças vem crescendo gradativamente (Costa *et al.*, 2007), como é o caso de polimorfismos associados a hipertensão (Kimura Lilian, 2010), transtornos neuropsiquiátricos (Souza e Oliveira, 2012) e diabetes em seres humanos (Grant *et al.*, 2006).

A associação entre polimorfismos no gene da defensina e a infecção por *L. infantum* em cães é descrita pela primeira vez em nosso estudo. Observamos que não houve associação significativa de nenhum dos nove SNPs encontrados no conjunto de sequências com a presença do parasita e à susceptibilidade a LVA em cães.

Estes resultados coincidem com estudos de outros genes que apresentam associação com a leishmaniose visceral e valores igualmente significativos, como

é o caso do estudo de Sanchez-Robert *et al.* (2008), que identificaram haplótipos localizados no gene *Slc11a1* relacionados com a Leishmaniose visceral em cães. Em um estudo mais recente, Quilez *et al.* (2012) sugeriram que vários locos genéticos do cromossomo 4 do cão devem estar associados à evolução clínica da leishmaniose após a infecção por *Leishmania*.

O tamanho amostral limitado pode ter gerado algumas inconsistências nos resultados apresentados no presente trabalho, à semelhança do que foi observado por Williams *et al.* (1996), Correa *et al.* (2002), Golimbet *et al.* (2002) e Cho *et al.* (2007). Portanto, se faz necessário novos estudos com um maior número amostral em regiões hiperendêmicas, a fim de dar mais suporte na confirmação destes resultados. Entretanto, mesmo com a limitação na quantidade de sequências avaliadas, o haplótipo encontrado no gene de defesa demonstraram que a união desses SNPs são bons indicativos quando associados com a leishmaniose visceral em cães.

Em relação ao gene *MBL2* o teste de associação realizado com um único *indel* encontrado no conjunto de sequências não evidenciou associação significativa com a presença de *L. infantum* ($p = 0,21$). Contudo, não podemos afirmar que a presença desse *indel* possa ou não ser um fator de susceptibilidade à infecção, fazendo-se necessário uma análise prospectiva envolvendo um maior número de casos e controles. Nosso resultado para o gene *MBL2* não apresentou similaridade com outros trabalhos que utilizaram *indels* em estudos de associação, os quais relatam que *indels* são importantes indicadores em investigações de associações dos mesmos com doenças (e.g. Souza e Oliveira, 2012).

Resultados interessantes obtidos de trabalhos de associação de MBL2 com doenças em humanos apontam para o fato de que algumas variantes alélicas de MBL2 resultam em baixos níveis séricos da proteína e podem ser vantajosos para o portador de algumas doenças (Lipscombe *et al.*, 1992; Garred *et al.*, 1994). Estudos também mostraram uma clara associação entre a presença de variantes alélicas do gene MBL2 e a ocorrência de imunodeficiência associada às infecções crônicas (Garred *et al.*, 1997; Turner, 1998; Turner and Hamvas, 2000).

Os resultados obtidos por Alonso (2007) também dão suporte à ideia de que níveis baixos de MBL2 podem conferir vantagens aos seus portadores; ou seja, indivíduos com alelos variantes do gene MBL2 em humanos estariam parcialmente protegidos de uma infecção pelo patógeno intracelular *L. infantum*.

A avaliação dos cães de Serra Talhada infectados por *L. infantum* nos permitiu determinar de maneira rápida e eficiente a prevalência de cães infectados no município no período de 2011/2012. A identificação desses cães foi muito importante, visto que o município se encontra em uma área endêmica de leishmaniose visceral. A análise dos SNPs encontrados nos genes defensina e MBL2 relacionados com a infecção por *L. infantum* foram descritos pela primeira vez em nosso estudo e nos permitiu observar possíveis associações desses genes com leishmaniose visceral em cães. Diante da escassez de trabalhos sobre polimorfismos associados a doenças (principalmente em cães), podemos evidenciar a importância da realização e dos resultados obtidos neste estudo.

7. Conclusões

- O uso da PCR em tempo real permitiu a identificação de cães errantes infectados por *L. infantum* em Serra Talhada – PE, no período de 2011-2012.
- Para os genes de defensina e MBL2, o processo de padronização dos experimentos apresentou desempenho satisfatório e bem definido para o desenvolvimento das análises.
- Nenhum dos nove sítios polimórficos encontrados no gene beta-defensina apresentaram associação com a infecção por *L. infantum*.
- O haplótipo formado pela interação dos nove SNPs do gene de defensina exibiu forte associação com a presença de *L. infantum* nos cães infectados.
- Não foi possível estabelecer correlação entre o único polimorfismo (*indel*) encontrado no gene de MBL2 e a infecção por *L. infantum*, provavelmente em decorrência do pequeno número de espécimes analisados.

8. Referências Bibliográficas

- Alberola J, Rodriguez A, Francino O, Roura X, Rivas L and Andreu D (2004) Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Am Soc Microbiol* 48: 641-643.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA and Atta AM (2005) Clinical and sorological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 127: 227-232.
- Alonso DP (2007) Mutações no gene que codifica a lectina ligante de manose e suas relações com a infecção por *Leishmania chagasi*. Dissertação (Mestrado em Genética) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, SP, Brasil.
- Alonso DP, Ferreira AF, Ribolla PE, de Miranda Santos IK, do Socorro Pires e Cruz M, Aécio de Carvalho F, Abatepaulo AR, Lamounier Costa D, Werneck GL, Farias TJ, Soares MJ and Costa CH (2007) Genotypes of the Mannan-Binding Lectin Gene and Susceptibility to Visceral Leishmaniasis and Clinical Complications. *J Infect Dis* 195: 1212–1217.
- Alonso DP, Costa DL, de Mendonça IL, Costa CH and Ribolla PE (2010). Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Med Hyg* 82: 819-821.
- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C and Sánchez A (2002) Mapping and Sequencing of the Canine NRAMP1 Gene and Identification of Mutations in Leishmaniasis-Susceptible Dogs. *Infect Immunol* 70: 2763–2771.
- Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J and Rodriguez F (1994) Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 371-378.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J and Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88.
- Alves WA e Bevilacqua PD (2004) Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Public* 20: 259-265.

- Alves LC e Faustino MAG (2005) Leishmaniose visceral canina. Manual da Schering-Plough 14p.
- Anbu KA, More T and Kumar A (2003) Isolation and characterisation of cationic antibacterial proteins and peptides from goat tongue epithelium. *Indian J Anim Sci* 73: 1307–1311.
- Andrade TM, Carvalho EM and Rocha H (1990) Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *The Journ. Infect. Dis.* 162: 1354-1359.
- Applied Biosystems. (2005) Real Time PCR Systems. Absolute Quantification Getting Started Guide. Atlanta. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/realtimelguide>>. Acesso em: 03 nov. 2012.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP and Badaró R (1998) Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 59: 53-57.
- Bagnicka E, Strzałkowska N, Szreder T, Prusak B, Jóźwik A, Kościuczuk E, Krzyżewski J and Zwierzchowski L (2008) A/C polymorphism in the β -4 defensin gene and its association with phenotypic and breeding values of milk production traits in Polish-Friesian cows. *Anim Sci Pap Rep* 26: 239–250.
- Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakava AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ and Kwak LW (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 298: 1025–1029.
- Bonates A (2003) Leishmaniose visceral (calazar). *Vet News* 61: 4-5.
- Borges BKA (2006) Fatores de risco para leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.
- Braida L, Boniotto M, Pontillo A, Tovo PA, Amoroso A and Crovella S (2004) A Single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in the Italian children. *Offic J Soc International AIDS* 18: 1598-1600.

- Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde (2004) Programa Nacional de DST e AIDS. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção *Leishmania*-HIV. Brasília, DF, Ministério da Saúde.
- Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde (2005) Leishmaniose Visceral Grave Normas e Condutas. Brasília, DF, Ministério da Saúde.
- Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde (2006) - Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF, Ministério da Saúde.
- Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde (2010) Boletim eletrônico epidemiológico – Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Brasília, DF, Ministério da Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiol_zoonoses_br.pdf>. Acesso em 15 nov. 2012.
- Bretagne, S. Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M and Deniau M (2001) Real Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clinic and Diag Lab Immunol* 8: 828-831.
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formation or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–250.
- Carvalho SFG (2000) Utilização de baixas doses de Desoxicolato de Anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J and Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873-882.
- Cho H, Yoob HJ, Parkc M, Sik LY and Kime SA (2007) A family-based association study of 5-HTTLPR and the 5-HT2A receptor gene polymorphisms with autism spectrum disorder in Korean trios. *Brain Res* 139: 34-41.
- Correa H, Romano-Silva MA, Bóson W, Machado M, Lima V e Juarez O (2002) Estudo de associação entre o polimorfismo T102C do gene 5-HT2A e tentativas severas de suicídio em pacientes psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiat* 24: 44-46.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J and Campino L (2004) PCR as rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania*

- donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Trans Rev Soc Trop Med Hyg 98: 12-17.
- Costa APP, Garcia AHC, Copreski B e Brunoni D (2007) Estudos de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento. Cad de Pós_Grad em Disturb do Desenvol 7: 112-131.
- Costa PL (2012) Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Passira, Agreste de Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, PE, Brasil.
- Costa CHN e Vieira JBF (2001) Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. Rev Socied Bras Med Trop 34: 223-228.
- Cunha AM and Chagas E (1937) New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. O Hospital, Rio de Janeiro 11: 3-9.
- Cunha S, Freire M, Eulalio C, Critosvao J, Netto E, Johnson WD Jr, Reed SG and Badaró R (1995) Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. Transact of the Royal Soc Trop Med Hyg 89: 155-158.
- Dantas-Torres F (2006) Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. Rev. Saúde Pública 40: 537-541.
- Dantas-Torres F e Brandão-Filho SP (2006) Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 39: 352-356.
- Desjeux P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transact of the Royal. Soc of Trop Med and Hyg 95: 239-243.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27: 305-318.
- Ezekowitz, RAB (1991) Ante-antibody immunity. Curr. Biol. 1: 60–62.
- França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, da Costa CA, Mayrink W and Vieira EP (2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipally, Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol 111:161-173.

- Franceschi A, Compagnoni F and Mancianti F (2007). A simple duplex-PCR protocol for routine diagnosis and follow up of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 49: 43-48.
- Fontes CJF (2007) A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 42-48.
- Ganz T (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biologies* 32: 539–549.
- Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C and Svejgaard A (1994) Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet* 21:125–131.
- Garred P, Richter C, Andersen AB, Madsen HO, Mtoni I, Svejgaard A and Shao J (1997) Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *J of Immunol* 46: 204-208.
- Golimbet VE, Alfimova MV, Manandyan KK, Mitushina NG, Abramova LI, Kaleda VG, Oleichik IV, Yurov Y and Trubnikov VI (2002) 5HTR2A gene polymorphism and personality traits in patients with major psychoses. *Eur Psychiatry* 17: 24-28.
- Gomes AHS, Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL and Pereira-Chiocola VL (2007) PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 144: 234-241.
- Gomes Neto CMB (2006) Pesquisa sobre o envolvimento do marsupial *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) e de cães domiciliados no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral no município de Camaçari, localidade de Barra do Pojuca, Bahia. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.
- Gontijo, CMF e Melo MN (2004) Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 7, 338-349.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE and Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin Am Mus Nat Histor* 299: 1-262.

- Green PJT, Feizi MS, Stoll S, Thiel A, Prescott and McConville MJ (1994) Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66: 319–328.
- Grimaldi GJr, Tesh RB and McMahon-Pratt A (1989). A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 4: 687-725.
- Grimaldi GJr and Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinic Microbiol Rev* 6: 230-250.
- Guan LR, Qu JQ and Chai JJ (2000) Leishmaniasis in China—present status of prevalence and some suggestions on its control. *End Dis Bull* 15: 49-52.
- Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV and Abee T (1999) The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 274: 7286–7291.
- IBGE (2012) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativa populacional. 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 07 jan. 2013.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M and Gorgoulis VG (2003) Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay onclinical samples. *Vet Parasitol* 113: 99-113.
- Instituto Fleury (2004) PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR). Manual Fleury de Diagnóstico em Hematologia. Disponível em: <www.institutofleury.org.br/educacao/manuais/manual_hemato/capitulo3b_impre_sao.htm>. Acesso em: 21 dez 2012.
- Isabel KFMS, Carlos HN, Costa HK, Mary FF, David Z, Babak F, Regis BB, Gomes, Debra LW, Donald AH, Ezekowitz RAB and Judith EE (2001) Mannan-Binding Lectin Enhances Susceptibility to Visceral Leishmaniasis. *Am Soc Microbiol* 69: 5212-5215.
- Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW and Klein NJ (2001) Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human

- professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. J Infect Dis 184: 1152-1162.
- Jülicher S, Luckner D, Mordmüller B, May J, Weierich A, Lell B, Luty A, Kremsner PG and Kun JF. (2000) Promoter variants of the human mannose-binding lectin gene show different binding. Bioch and Biophys Research Communic 275: 617-622.
- Kagan BL, Selsted ME, Ganz T and Lehrer RI (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. Proc Natl Acad Sci 87: 210– 214.
- Kamysz W, Okrój M and Lukasiak J (2003) Novel properties of antimicrobial peptides. Acta Biochim Pol 50: 461–469.
- Khosravi S, Hejazi SH, Hashemzadeh M, Eslami G and Darani HY (2012) Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: Real-time PCR based on trypanothione peroxidase gene for the detection and identification of *Leishmania spp.* J Vector Borne Dis 49: 15-18.
- Kimura L (2010) Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira- SP. Tese (Doutorado em Genética) USP – São Paulo, SP, Brasil.
- Kubista M, Andrade JM, Forootan MBA, Lind JJK, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L and Zoric ASN (2006) The Real Time Polymerase Chain Reaction. Mol Aspec of Med 27: 95–125.
- Kuipers S, Aerts PC and van Dijk H. (2003) Differential microorganism-induced mannose binding lectin activation. Immunol and Med Microbiol, 36: 33-39.
- Lainson R and Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution In The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press 1: 1-120.
- Lehrer RI and Ganz T (2002) Defensins of vertebrate animals. Curr Opin Immunol 14: 96–102.
- Leite RS, Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN and Andrade ASR (2010) PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet. Parasitol. 170: 201-206.
- Leonard BC, Affolter VK and Bevins CL (2012) Antimicrobial peptides: agents of border protection for companion animals. Vet Dermatol 23: 177-e36.

- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD and Mylonakis M (2002) A cross-sectional study of *Leishmania sp.* Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 109: 19-27.
- Lipscombe RJ, Sumyia M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA and Turner MW (1992) High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1: 709-715.
- Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM e Luna EA (2008) Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. *Cad. Saúde Pública* 24: 2941-2947.
- Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Pavone ML, Caracappa S and Gravino AE (2006) *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 142: 271-280.
- Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O and Altet L (2011) Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit & Vector* 4: 53-57.
- Mehrotra S, Fakiola M, Mishra A, Sudarshan M, Tiwary P, Rani DS, Thangaray K, Rai M, Sundar S and Blackwell JM (2012) Genetic and functional evaluation of the role of DLL1 in susceptibility to visceral leishmaniasis in India. *Infect Genet and Evol* 12: 1195-1201.
- Michalsky EM, Guedes KS, Silva FOL, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA and Dias ES. (2011) Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44: 58-62.
- Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL and Crovella S (2006) DEFB1 gene polymorphism and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *AIDS* 12: 1673-1675.
- Miller AS, Dykes DD and Olesky HF (1988) A simple salting-out procedure for extract DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1255.
- Miranda GMD (2008) Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e desigualdade social. *Dissertação (Mestrado em Saúde*

- Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, PE, Brasil.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Coelho GLLM, Rocha MF, Dias CLF e Dias ES (2005) Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 38(2): 147-152.
- Moshfe A, Mohebal M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, Jamshidi S, Mahmoodi M (2009). Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. Acta Trop. 112: 101-105.
- Nascimento MDSB, Sousa EC, Silva LM, Leal PC, Cantanhede KL, Bezerra GFB e Viana GMC (2005) Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. Cad. Saúde Pública. 21: 1801-1807.
- Naveda LBA, Moreira EC, Machado JG, Moraes JRC e Marcelino AP (2006) Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58: 988-993.
- Nicolas P and Mor A (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. Annu R Microbiol 49: 277-304.
- Nicolas L, Prina E, Lang T and Milon G (2002) Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. Jour of Clinic Microbiol 40: 1666-1669.
- Nygren J, Svanvik N and Kubista M (1998) The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. Biopolymers 46: 39-51.
- Paiva-Cavalcanti M (2008) Desenvolvimento e Avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.
- Paiva-Cavalcanti M, Brito MEF, Souza WV, Gomes YM and Abath FGC (2009) The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. The Veter J. 189: 356-358.

- Pawlik A, Sender G and Korwin-Kossakowska A (2009) Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. *Anim Sci Pap Rep* 27: 263–271.
- Quilez J, Martínez V, Woolliams JA, Sanchez A, Pong-Wong R, Kennedy LJ, Quinnell RJ, Ollier WER, Roura X, Ferrer L, Altet L and Francino O (2012) Genetic Control of Canine Leishmaniasis: Genome-Wide Association Study and Genomic Selection Analysis. *J Plos One* 7: 1-10.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Junior HFA and Tempone AG (2003) Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quím Nova*. 26: 550-555.
- Ribeiro VM (2007) Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. *Clín Vet* 71: 66-76.
- Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR and Campino L (2004) Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzymelinked immunosorbent assay. *J Parasitol* 90: 1150-1154.
- Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB and Carneiro M (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Instit Oswal Cruz* 100: 197-203.
- Sacks D and Sher A (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3: 1041-1047.
- Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A and Francino O (2008) *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 39: 36-47.
- Santa Rosa ICA e Oliveira CSO (1997) Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clín Vet* 2: 24-28.
- Santoro D, Bunick D, Graves TK and Segre M (2013) Evaluation of canine antimicrobial peptides in infected and noninfected chronic atopic skin. *Vet Dermatol* 24: 39-e10.
- Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL and Costa CH (2002) Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 629-633.

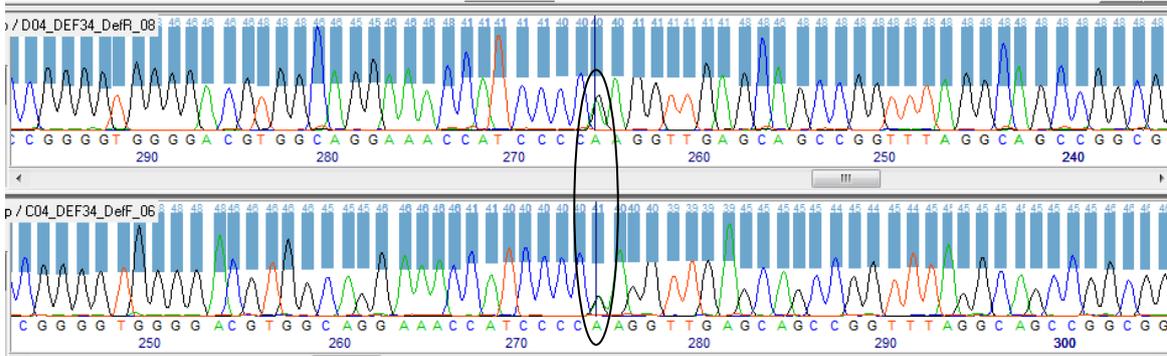
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W and Jaffe CL (2003) PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microbiol. Insect. Dis.* 47: 349-358.
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462: 55–70.
- Shaw J (2007) The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A minireview. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 102: 541- 547.
- Silveira FT, Lainson R and Corbett CEP (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251.
- Soares MR, de Mendonça IL, do Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL and Costa CH (2011) Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop* 117: 6-9.
- Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J and Ferrer L (2000) The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet parasitol* 90: 37-45.
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X and Alberola J (2007) Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 147: 315-319.
- Solé X, Guino E, Valls J, Iñesta R and Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928–1929.
- Souza MBR and Oliveira JRM (2012) Searching for New Genetic Variations in Expression Databases for the GABAergic and Glutamatergic Systems 48: 257-264.
- Staden R, Beal KF and Bonfield JK (2000) The Staden package 1998. *Methods molecular biology* 132: 115-130.
- Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ and Turner MW (1989) Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. *Lancet* 2: 1236-1239.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.". *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor ME, Brickell PM, Craig RK and Summerfield JA (1989) Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem Journ* 262: 763-771.
- Turner MW (1998) Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunol* 199: 327-339.
- Turner MW and Hamvas RM (2000) Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associated Reviews in Immunogenetics 2: 305-322.
- Turner MW (2003) The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*, 40: 423-429.
- Untergasser A, Veen HN, Rao X, Bisseling T, Guerts R and Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids R* 35: 71-74.
- Vidal IF (2008) Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.
- Vizioli J and Salzet M (2002) Antimicrobial peptides versus parasitic infections? *Trends Parasitol* 18: 475-476.
- Wiechula BE, Tustanowski JP and Martirosian G (2006) Antimicrobial peptides. *Wiad Lek* 59: 542–547.
- Williams J, Spurlock G, McGuffin P, Mallet J, Nöthen MM, Gill M, Aschauer H, Nylander PO, Macciardi F and Owen MJ (1996) Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. Europ Multicent Associat Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet* 347: 1274-1276.
- Yang DM, Chertov O, Bykowskaia SN., Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Scroder JM, Wang JM, Howard OM and Oppenheim JJ (1999) BETA defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525–528.

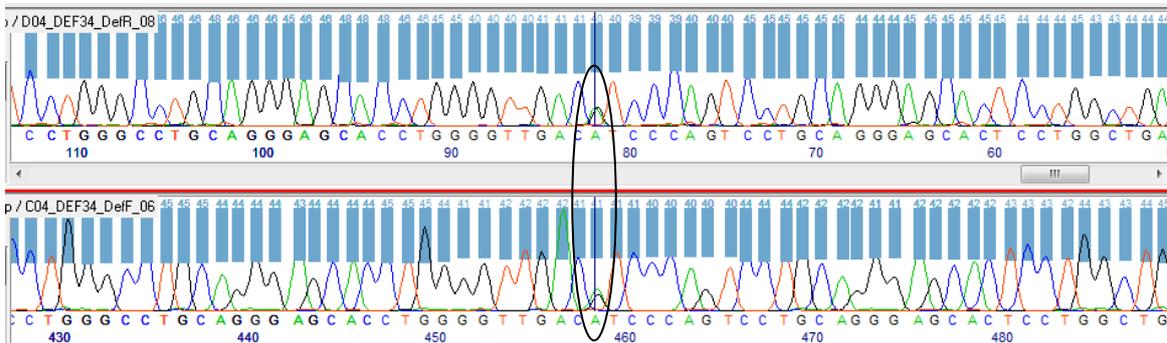
9. Anexo

Cromatogramas mostrando os sítios heterozigotos dos cães infectados.

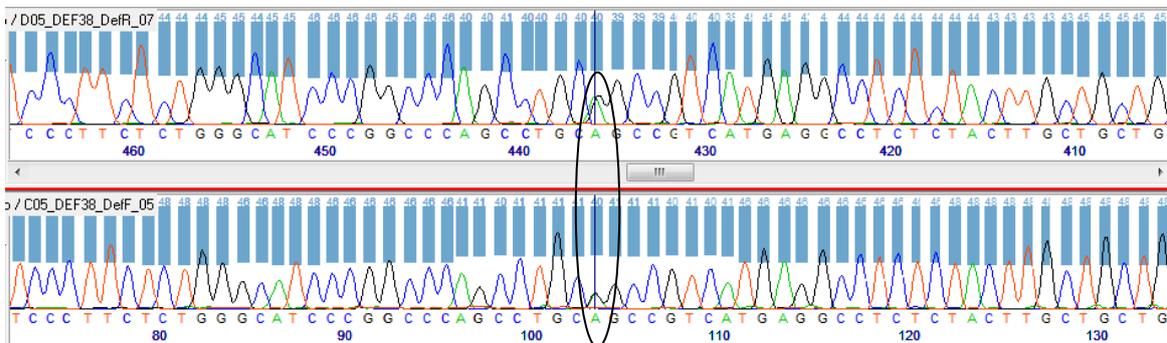
Cão 34- sítio 164



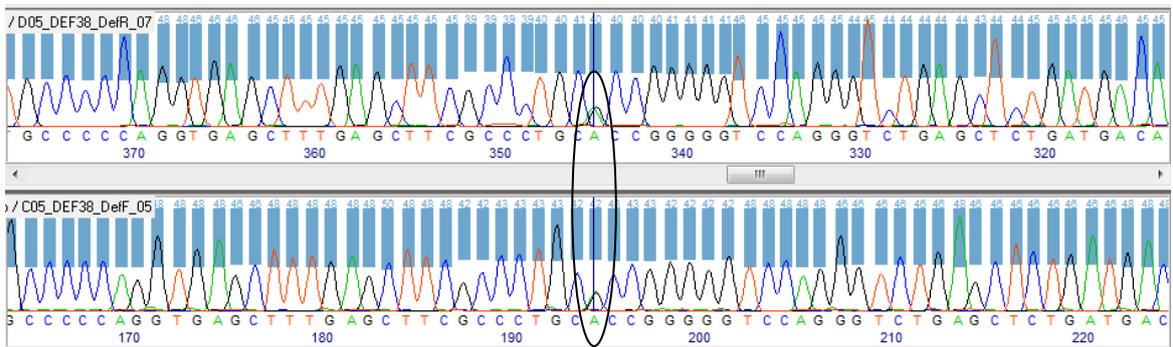
Cão 34 – sítio 348



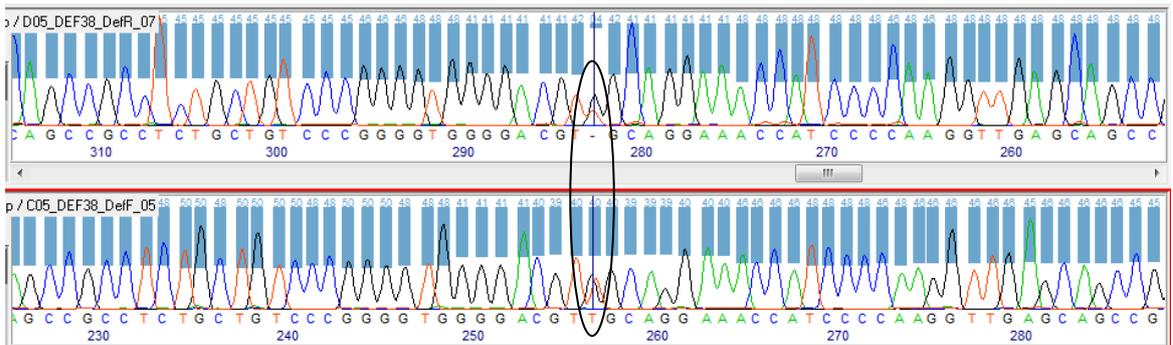
Cão 38 – sítio -7



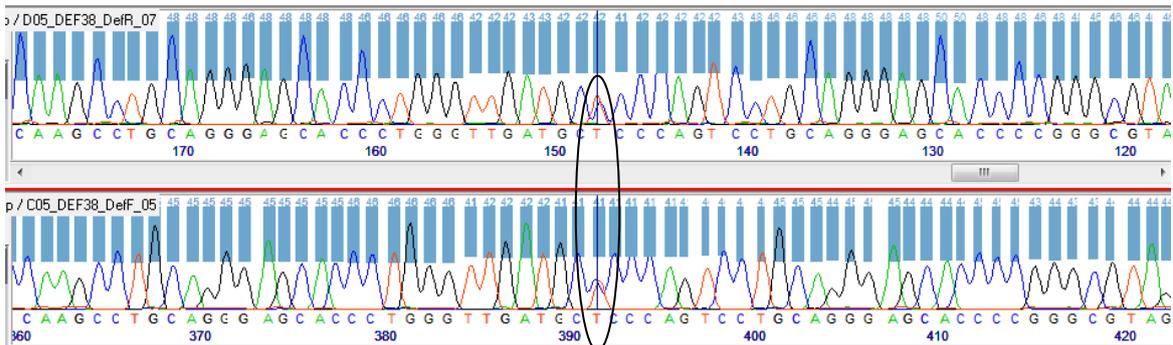
Cão 38 – sitio 85



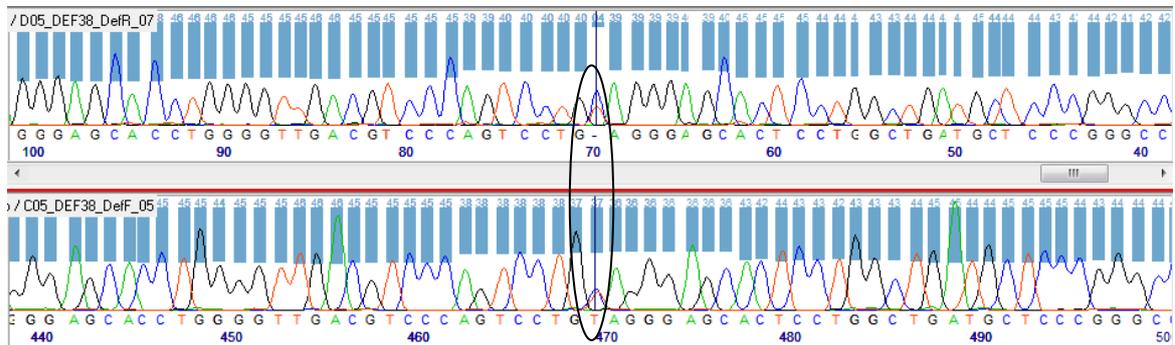
Cão 38 – sitio 147



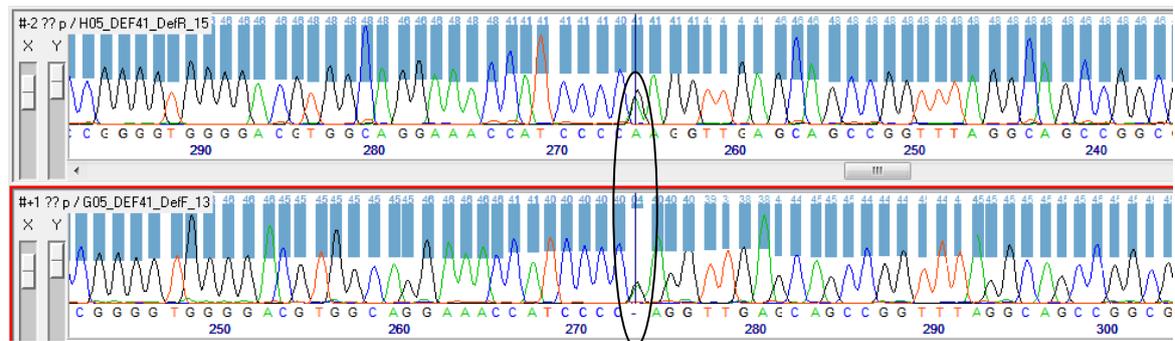
Cão 38 – sitio 282



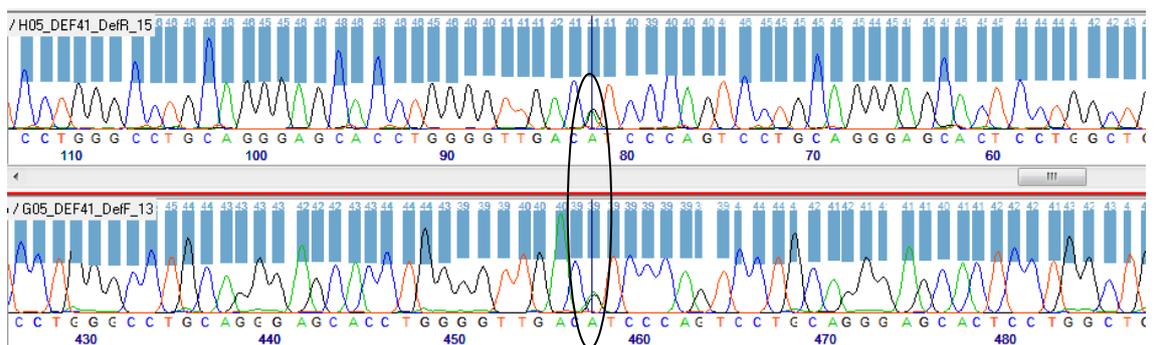
Cão 38 – sitio 360



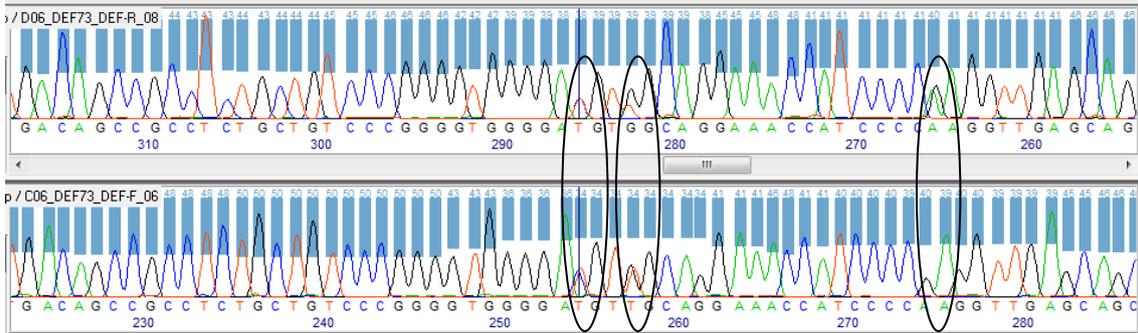
Cão 41 – sitio 164



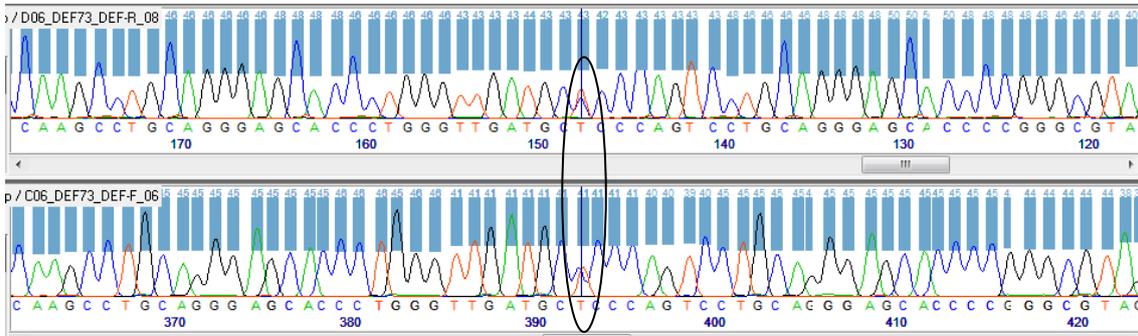
Cão 41 - sitio 348



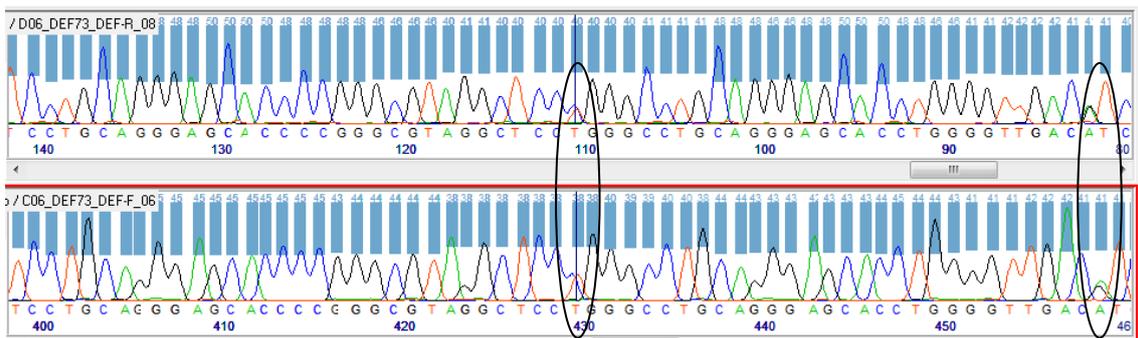
Cão 73 - Sítios 144, 147 e 164



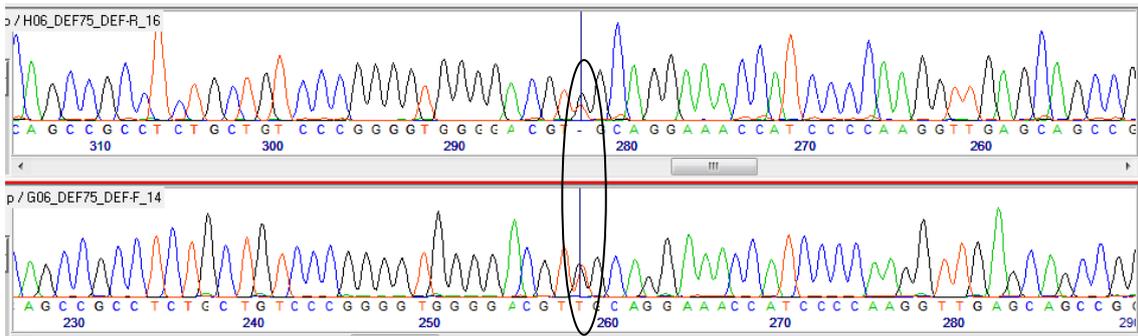
Cão 73 - Sítio 282



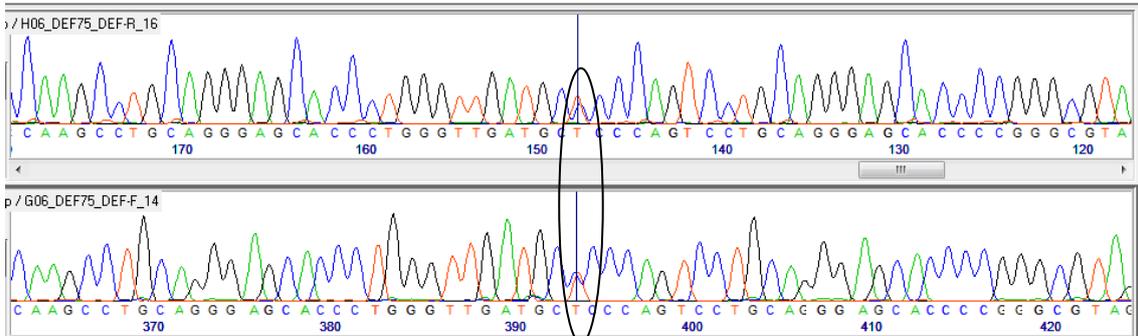
Cão 73 - Sítios 319 e 348



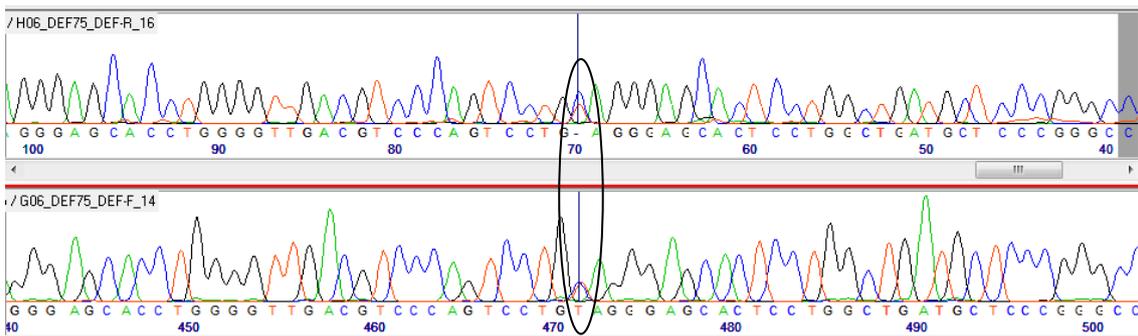
Cão 75 - Sítio 147



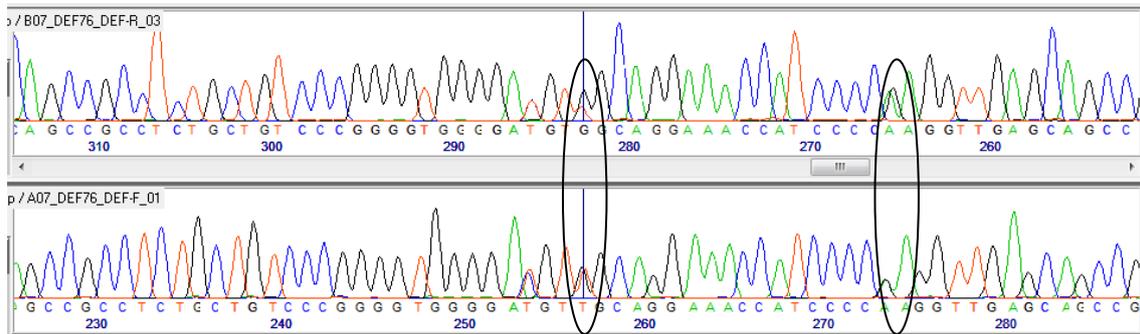
Cão 75 - Sítio 282



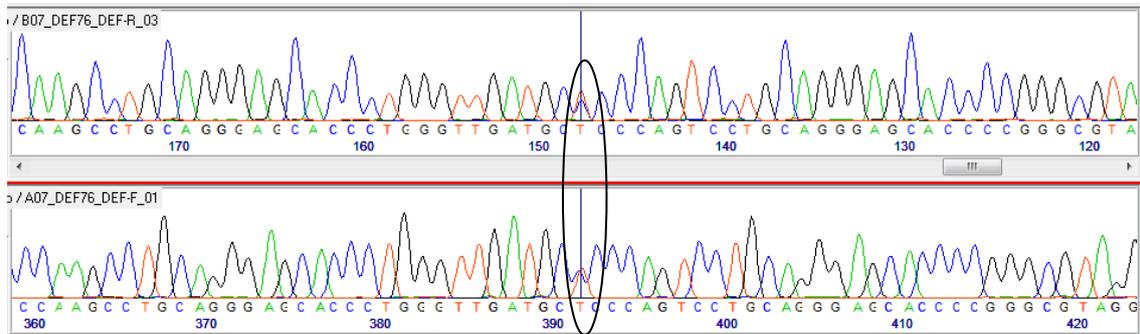
Cão 75 - Sítio 360



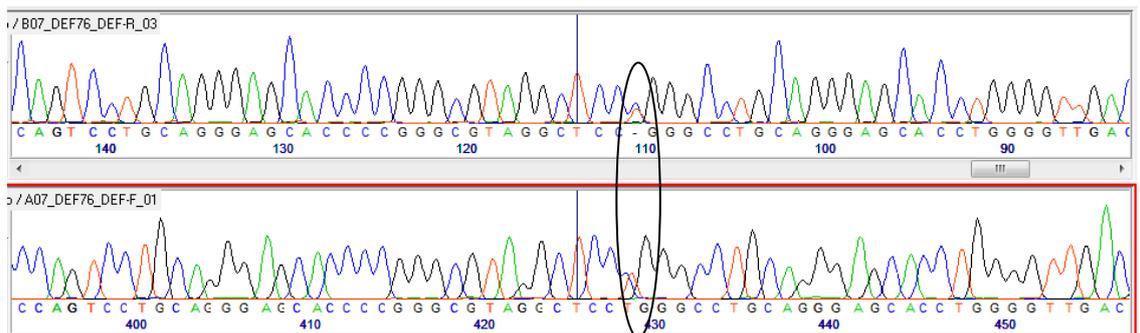
Cão 76 - Sítio 147 e 164



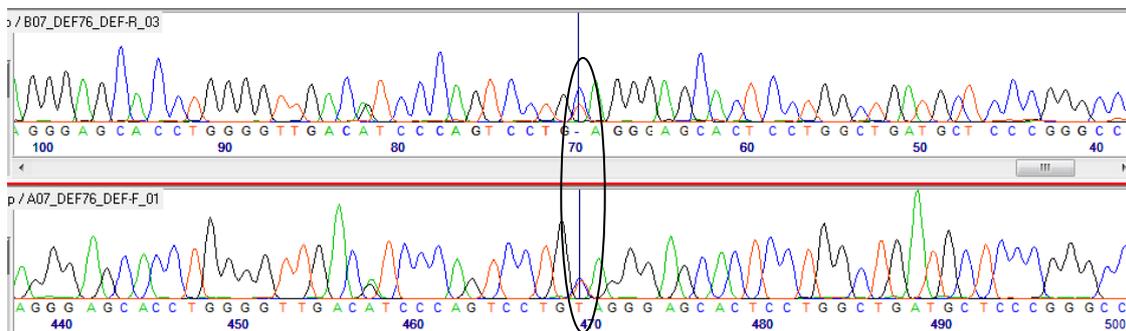
Cão 76 - Sítio 282



Cão 78 - Sítio 319



Cão 78 - Sítio 360



10. Curriculum vitae (Lattes)

Lidiane Gomes da Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1019258263225905> / Última atualização do currículo em 14/01/2013

Dados pessoais:

Nome: Lidiane Gomes da Silva

Filiação: Josenildo Gomes da Silva e Audenir Gomes da Silva

Nascimento: 07/10/1987 - Gravatá/PE - Brasil

Carteira deldentidade: 7322743 SDS - PE - 23/10/2004

CPF: 071.405.724-02

Endereço residencial: Rua Siqueira Campos, Prado – Gravata 55642-140, PE – Brasil. Telefone: 81 35333754

Endereço eletrônico: e-mail alternativo : lidiangomesp@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação:

2011 Mestrado em Genética. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: Avaliação da Relação entre Polimorfismos nos Genes Beta-Defensina e MBL2 e a Predisposição da Infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em Cães de Serra Talhada-PE. Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Atuação profissional:

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional 2011 - 2012 Vínculo: Discente de mestrado , Carga horária:

40, Regime: Dedicção exclusiva

Áreas de atuação:

1. Genética

Projetos de pesquisa:

2011 - 2012 USO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO ESTUDO DOS PADRÕES DE TRANSMISSÃO VETORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO ATIVA NO SERTÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Prêmios e títulos

2012 Menção honrosa pela melhor apresentação em pôster, Programa de Pós Graduação em Genética da UFPE.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ROCHA, P. K. L., SANTOS, M. A. O., **SILVA, L. G.**, ARAGAO, N. C., FIGUEIREDO JUNIOR, C. A. S., COSTA-JUNIOR, C. R. L, TAVARES, J. R., MORAIS, M. A., BALBINO, V. Q. Mitogenome of the Main Vector of American

Visceral Leishmaniose. In: 58° Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. 58° Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

2. **SILVA, L. G.**, BALBINO, V. Q. Avaliação da Relação entre Polimorfismos nos Genes Beta-Defensina e MBL2 e a Predisposição da Infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em Cães de Serra Talhada-PE. In: II Jornada de Genética da UFPE, 2012, Recife. II Jornada de Genética da UFPE. Lidiane, 2012.

3. FREITAS, M. T. S., ARAGAO, N. C., COSTA-JUNIOR, C. R. L, **SILVA, L. G.**, MARCONDES, C. B., BALBINO, V. Q. Population Genetics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Caririáçu, Ceará In: XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine. , 2012.

4. ARAGAO, N. C., ROCHA, P. K. L., SANTOS, M. A. O., **SILVA, L. G.**, MARCONDES, C. B., BALBINO, V. Q. Primeira Parte do Genoma Mitocondrial de *Psorophora ferox* (Diptera: Culicidae). In: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2012, Curitiba. XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. , 2012.

5. **SILVA, L. G.**, ROCHA, P. K. L., COSTA-JUNIOR, C. R. L, ARAGAO, N. C., FREITAS, M. T. S., SANTOS, M. A. O., TAVARES, J. R., MORAIS, M. A., BALBINO, V. Q. Sequencing Mitochondrial Genome of *Lutzomyia umbratilis*,

vector of Cutaneous Leishmaniasis. In: 58° Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu. 58° Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

6. ARAUJO, A.L, GOMES, Jr P.P, ARAGAO, N. C., **SILVA, L. G.**, CARDOSO, M. V., BALBINO, V. Q. The use of ovitraps in monitoring *Aedes aegypti* populations of Serra Talhada, Pernambuco, Brazil In: XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine. , 2012.

7. **SILVA, L. G.**, COSTA-JUNIOR, C. R. L, ARAGAO, N. C., FREITAS, M. T. S., Okuyama, F. Y. U, VELASQUEZ CMR., PESSOA, F.A. C, BALBINO, V. Q. Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of *Lutzomyia umbratilis*. In: I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies, 2012, Foz do Iguaçu. I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies. , 2012.

8. **SILVA, L. G.**, BALBINO, V. Q. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) PELA *Leishmania infantum chagasi* EM UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO ATIVA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO SERTÃO DE PERNAMBUCO. In: I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011, Recife. I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE. , 2011.

Orientações e Supervisões:

Iniciação científica

1. FERNANDA YUKIE UCHOA OKUYAMA. AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR LEISHMANIA EM CÃES DE SERRA TALHADA, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR. 2012. Iniciação científica - Universidade Federal de Pernambuco.

Participação em eventos:

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) II Jornada de Pós Graduação em Genética, 2012. (Congresso) Avaliação da Relação entre Polimorfismos nos Genes Beta-Defensina e MBL2 e a Predisposição da Infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em Cães de Serra Talhada-PE.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) 58º Congresso Brasileiro de Genética, 2012. (Congresso) Mitochondrial Genome of *Lutzomyia umbratilis*, vector of Cutaneous Leishmaniasis.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies, 2012. (Simpósio) Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of *Lutzomyia umbratilis*..

4. Entomol 5 - WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS, 2012. (Congresso)

.

5. IV Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares, 2012.

.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2011 Avaliação da Infecção Natural de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) pela *Leishmania infantum chagasi* em uma área de transmissão ativa de Leishmaniose Visceral no Sertão de Pernambuco.

Organização de evento:

1. SILVA, L. G. I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011.