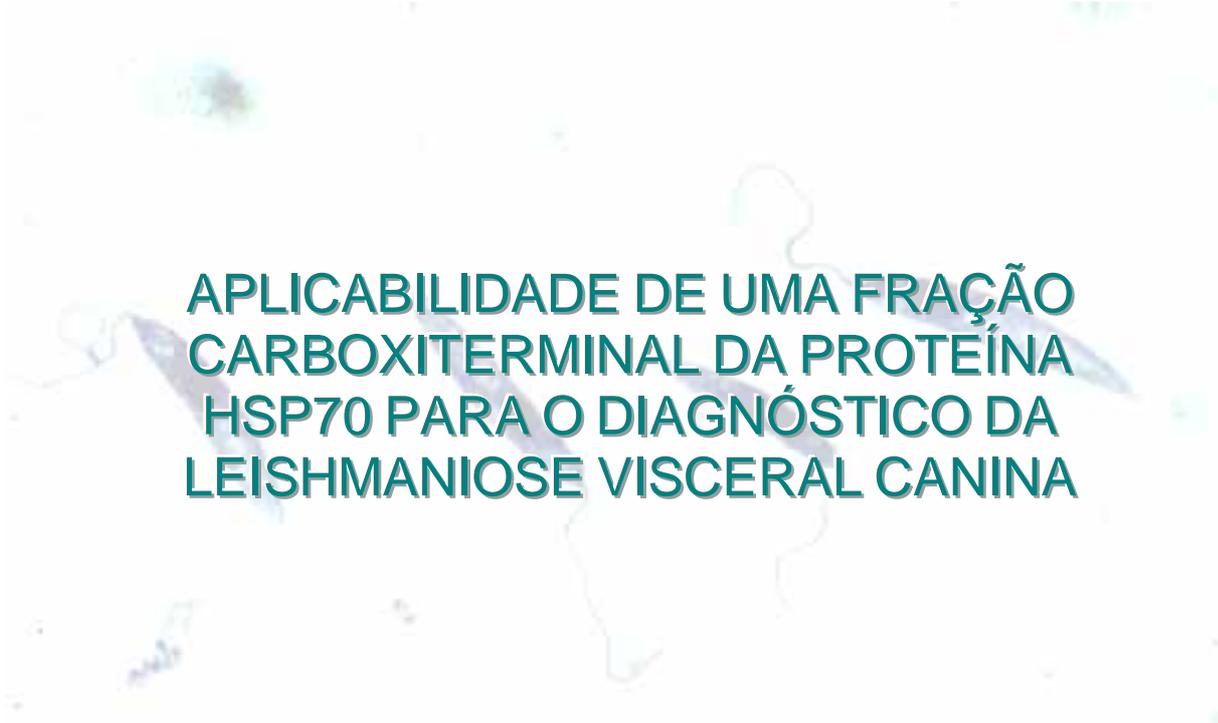


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**APLICABILIDADE DE UMA FRAÇÃO  
CARBOXITERMINAL DA PROTEÍNA  
HSP70 PARA O DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**Geane Maria de Oliveira**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

RECIFE  
2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

# APLICABILIDADE DE UMA FRAÇÃO CARBOXITERMINAL DA PROTEÍNA HSP70 PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**Geane Maria de Oliveira**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

RECIFE  
2001

*Ao meu pai, que embora não  
esteja mais entre nós, continua  
me orientando através dos  
ensinos deixados.  
A saudade é grande...*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, Criador de tudo o que há e Senhor da minha vida. Ele que me deu vida e me capacitou para este trabalho e me presenteou com todos vocês que dividem comigo hoje esse momento tão importante para mim. A Ele seja dada toda honra e toda glória para todo o sempre.*

*À minha família, em especial à minha mãe, GRANDE GUERREIRA, pelo incentivo e confiança depositada em mim.*

*Ao meu Orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade, pela confiança, paciência nos meus momentos de crise, e disposição, mesmo sempre muito cansado, em sentar e partilhar um pouco do seu vasto conhecimento. A este GRANDE MESTRE, meu verdadeiro MUITO OBRIGADA!!!*

*Aos meus colegas do LACEN / LABEND, por todo o apoio durante o período em que precisei me ausentar do laboratório, em especial a Andréia, Josemar, Geni, Sônia e Arlene.*

*À diretora do LACEN, Dr<sup>a</sup> Ana Lima, e minha chefe imediata, Valéria Melo, por acreditarem no meu potencial.*

*Aos colegas da Fundação Nacional de Saúde, Dr. Valdenilson Aguiar por adequar as atividades de campo às minhas necessidades de pesquisa, e a equipe de campo, em especial, Otávio, Zé Pedro, Fernando, Marcos e Renilson, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.*

*Ao município de Glória do Goitá, na pessoa da prefeita Fernanda Paes, por todo o apoio dispensado à nossa equipe de trabalho; à secretária de Saúde, Dr<sup>a</sup> Solange; ao Médico Veterinário do Município, Dr. Marcelo Pereira, e em particular a Reudete por acolher a mim e a Sheila em sua casa de forma tão calorosa, o que foi fundamental para o nosso bem estar durante as atividades de campo.*

*À minha amada Igreja Batista em San Martin, pelas orações nos momentos difíceis, e alegria proporcionada nos momentos de lazer.*

*Ao Pastor Dr. Ágabo Borges de Souza e sua família, pelos conselhos e incentivo repassados na época da seleção para o mestrado.*

*A TODOS os amigos (e aí vão todos mesmo, porque se eu começar a citar nomes, vou acabar esquecendo alguém) que compreenderam minha ausência nos momentos em que precisei dedicar-me apenas aos estudos.*

*Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFPE, agradeço a todos que contribuíram de forma importante para minha formação através das disciplinas do mestrado em Bioquímica.*

*Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial a Neide, Miron e Djalma, pela amizade, paciência e prontidão em servir quando solicitados.*

*A Biogene Ind. Com. Ltda. por ceder os kits de coleta e o material necessário para a realização dos testes de ELISA S7.*

*Aos colegas de turma do mestrado, companheiras e companheiros de estudo (momentos algumas vezes angustiantes, mas também de muita descontração): Teodora, Taciana, Isaura, Morgana, Rosângela, Veridiana, Vânia, Emília, Shirley, Teodomiro, César e Cláudio.*

*Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular da UFPE, que compartilharam comigo bons momentos. Em especial a: Sheila Herculano, estagiária e amiga, companheira no árduo trabalho de campo em Glória do Goitá e também na bancada; Prof<sup>a</sup>. Aline Alexandrino, pelo companheirismo, orientações e bate-papos; Mileide, Lígia e Lindinalva, por me ajudarem na execução dos testes de ELISA recombinante; a Rafael Queiroz, por tudo! enfim a todos vocês do GENTROP que fizeram do tempo que passamos juntos não só um tempo de aprendizado, mas também momentos de prazer e descontração.*

*A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.*

*Enfim, a todos que passaram em minha vida e que de alguma forma me fizeram uma pessoa melhor.*

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
Lista de Figuras e Tabelas	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 As Leishmanioses	11
1.1.1 Epidemiologia	14
1.2 Distribuição Geográfica	17
1.3 Agente Etiológico	18
1.4 Vetores	22
1.5 Reservatórios da LV	23
1.5.1 Aspectos clínicos do calazar canino	24
1.6 Diagnóstico do calazar canino	26
1.7 Tratamento	27
1.8 As proteínas de choque térmico	28
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	49
7. INFRA-ESTRUTURA	50
8. FONTES DE FINANCIAMENTO	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

# Lista de figuras e tabelas

Figura 1 –	Leishmaniose cutânea	12
Figura 2 –	Leishmaniose cutâneo-mucosa	12
Figura 3 –	Leishmaniose cutânea difusa	12
Figura 4 –	Leishmaniose visceral	12
Figura 5 –	Desenho esquemático da dinâmica da leishmaniose	16
Figura 6 –	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral	17
Figura 7 –	Desenho esquemático das formas promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i>	18
Figura 8 –	Forma promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i>	19
Figura 9 –	Ciclo de vida das leishmanioses	20
Figura 10 –	Fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (aumento em 100 x)	23
Figura 11 –	Conjuntivite em cão com calazar	25
Figura 12 –	Espessamento da borda da orelha em cão com calazar	25
Figura 13 –	Demonstração da eficácia do tratamento para LV	27
Figura 14 –	Diagrama esquemático da molécula de HSP70	29
Figura 15 –	Hepatoesplenomegalia observada em cão com calazar	38
Figura 16 –	Resultados da IFI com diluição seriada	39
Figura 17 –	Resultados do ELISA S7	39
Tabela 1 -	Espécies de <i>Leishmania</i> do Novo Mundo isoladas de pacientes e formas clínicas associadas	21
Tabela 2 -	Resultado comparativo entre o ELISA S7 e a IFI com diluição seriada do soro.	40
Tabela 3 -	Resultados obtidos na IFI com diluição seriada e sua relação com o ELISA S7	40

# Lista de abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DOU – Diário Oficial da União

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HEM - Hepatoesplenomegalia

HSP – Proteínas de Choque Térmico

IFI – Imunofluorescência Indireta

LABEND – Laboratório de Endemias

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LC – Leishmaniose cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCM – Leishmaniose Cutânea Mucosa

LV – Leishmaniose visceral

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – Ortofenileno-diamino

PKDL – Leishmaniose Dérmica Pós Calazar

PBST – Tampão Fosfato Tween

SUCEN – Superintendência do Controle de Endemias

## RESUMO

As leishmanioses em Pernambuco representam um grave problema de saúde pública, não apenas pelo aumento do número de casos novos, mas também pela urgência em implementar mecanismos de controle descentralizados, em resposta às diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS) e de acordo com as proposições emanadas das Conferências Nacionais de Saúde. O município de Glória do Goitá, situado na Zona da Mata Norte de Pernambuco, a 72 Km de Recife, com uma população de aproximadamente 27.000 habitantes, caracteriza-se como uma área em expansão para o calazar, atingindo tanto trabalhadores como crianças. Para o diagnóstico da leishmaniose canina, elemento fundamental para o controle da endemia, o teste sorológico a ser escolhido para a identificação dos animais sororeagentes deve ser de prática e rápida execução, além de ter boa especificidade e sensibilidade. Neste sentido a imunofluorescência (IFI) é a técnica recomendada pelo Ministério da Saúde desde 1978, com boa sensibilidade, mas baixa especificidade. Neste trabalho foi comparado este método utilizando um ELISA recombinante e um método de coleta de sangue melhorado para o trabalho no campo na investigação da leishmaniose canina. Um total de 1151 cães oriundos de 84 localidades daquele município foram examinados por IFI com amostras em papel de filtro, obtendo-se 92 reagentes, 28 reações inconclusivas e 1031 negativas. Quando da eliminação dos cães cujas amostras foram reagentes ou inconclusivas (em média 8 meses após a primeira coleta), 72 deles já haviam morrido e 7 desaparecido, o que representa uma perda de cerca de 65% da amostragem. A soropositividade encontrada aponta para a elevada endemicidade do calazar nas localidades estudadas e sugere fortemente que a elevada mortalidade observada entre os cães sororeagentes se deva de fato ao calazar. Dos 41 cães sobreviventes coletou-se 2 ml de sangue por punção venosa para a realização da IFI com diluição seriada e 20 µL de sangue por punção auricular, depositados em microtubo contendo 500 µL de uma solução de imunoabsorção para realização do ELISA recombinante. Os animais foram submetidos à eutanásia e em seguida necropsiados. O material colhido foi examinado por ELISA recombinante (empregando um sonicado de *Escherichia coli* expressando a fração carboxi-terminal da HSP70 de *Leishmania chagasi*) e por IFI com diluição seriada. Houve uma elevada concordância entre os testes, embora, com base nos resultados da necrópsia, o ELISA S7 tenha sido mais sensível e específico. Em conclusão, o sistema de coleta por punção auricular e aspiração de gota em micropipeta é efetivo e aplicável em campo sem problemas e o ELISA recombinante é um teste mais específico e sensível do que o teste atualmente empregado. A associação destas duas técnicas, de coleta e de diagnóstico, pode trazer grande avanço no controle do calazar.

## ABSTRACT

The Leishmaniasis are a serious health problem in the State of Pernambuco, Brazil, because of the steady increase in incidence in the last years and of the challenge and urgency in implementing the SUS (Unified Health System – Brazil) guidelines for the decentralized control of endemics, as proposed at the National Health Conferences. Glória do Goitá county, located at Zona da Mata, State of Pernambuco, 72 km north of Recife, has ca. 27.000 inhabitants and has suffered an increased incidence of visceral leishmaniasis in the last years, affecting all age groups. For the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, a fundamental element in the present control program, a method should be easy to perform, cost effective, sensitive and specific, four characteristics that rarely come together. The indirect immunofluorescence technique (IFI) was chosen by the Ministry of Health as the standard diagnostic method for canine leishmaniasis since 1978 and has a high sensitivity, but poor specificity. In this work we compare this method with a new recombinant ELISA and an improved blood collection method for field work on canine leishmaniasis. A total 1151 dogs from Glória do Goitá county were examined by IFI, using eluates from blood blots in paper filter with the following results: 92 samples were reagent, 28 inconclusive and 1031 negative. Only 41 serum reactive dogs could be retrieved for further study after 8 months, as 72 were already dead and 7 moved. With a overall mortality of 65%. The high prevalence among dogs is in accordance with the high incidence of human kala-azar in the county. Furthermore, it points to this disease as the cause of death among serum positive dogs. Blood was collected by venopuncture (2 ml) or by ear pricking (20 µL collected in 500 µL of a *E. coli* sonicate for immunoabsorption) and used in serial dilutions for IFI and recombinant ELISA (using the carboxi-terminal moiety of *Leishmania chagasi* HSP70). The dogs were subsequently killed and submitted to necropsy. Results obtained with both tests were in almost complete agreement, but ELISA was more sensitive and, specially, more specific than IFI. In conclusion, the use of a recombinant ELISA and of an improved system for blood collection can be an important contribution for kala-azar control campaigns in Brazil.

# 1 – INTRODUÇÃO

Vive-se em um novo tempo: a tão esperada virada do milênio chegou e trouxe o não menos esperado Século XXI. Grandes avanços tecnológicos foram conseguidos até aqui: o homem conquistou o espaço; novas drogas foram descobertas; chegaram os computadores e com eles a Internet, abolindo as fronteiras existentes entre os povos; a clonagem de mamíferos deixou de ser uma utopia; equipamentos hospitalares e laboratoriais da mais alta tecnologia estão à disposição dos centros de pesquisas.

Entretanto, apesar de todo esse progresso, um grande número de doenças infecciosas e parasitárias, algumas quase erradicadas, vêm tomando uma dimensão importante no mundo, em especial nas Américas, contribuindo para o recrudescimento de diversos agravos, tais como as leishmanioses. As populações mais expostas a essas doenças possuem geralmente péssimas condições de vida, tanto sanitárias quanto de moradia. Os principais registros de casos concentram-se nas áreas periféricas e em assentamentos humanos irregulares.

Em Pernambuco as leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, não apenas pelo aumento do número de casos novos, mas também pela necessidade em implementar mecanismos de controle descentralizados, em resposta às diretrizes da NOB91/ NOB96 (Normas de Operacionalização Básica) do Sistema Único de Saúde (SUS) e de acordo com as proposições emanadas das Conferências Nacionais de Saúde.

## 1.1 Leishmanioses

Leishmaniose é a terminologia utilizada para designar um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*.

A clínica das leishmanioses é muito variável tanto no homem como nos reservatórios, variando desde uma simples lesão cutânea a uma doença visceral

fatal, causadas por espécies diferentes (Wu *et al.*, 2000). As diversas formas clínicas são atualmente classificadas no homem sob 4 diferentes formas principais, são elas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV), observadas nas figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Todas com diferentes graus de morbidades (Bittencourt e Barral-Neto, 1995). Apenas a LV tem uma mortalidade importante, oscilando entre 5 e 10%.



Figura 1 – Leishmaniose cutânea  
Fonte: [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



Figura 2 – Leishmaniose cutânea-mucosa  
Fonte: [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



Figura 3 – Leishmaniose cutânea-difusa  
Fonte: [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)

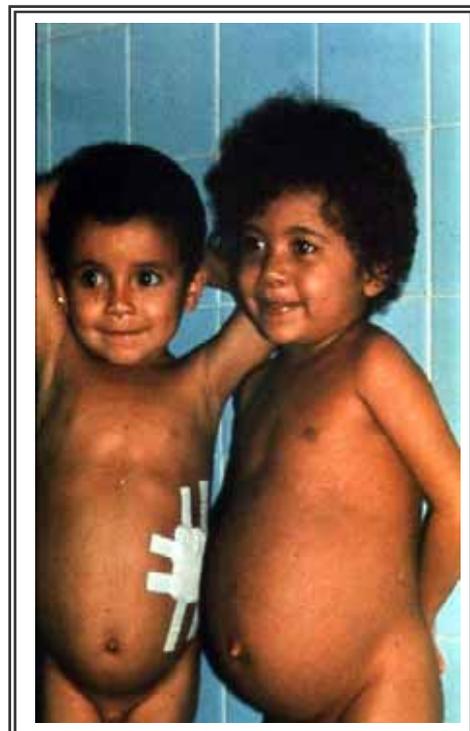


Figura 4 – Leishmaniose visceral  
Fonte: [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma zoonose de caráter endêmico no Nordeste do Brasil, que afeta canídeos, seja doméstico ou silvestres (Deane e Deane, 1955; Deane, 1956; Deane e Deane, 1964; Silveira *et al.*, 1982; Vieira e Coelho, 1998) e, ainda que com menor importância epidemiológica, outros animais silvestres, como os marsupiais didelfídeos (Sherlock *et al.*, 1984).

No homem, caracteriza-se clinicamente e laboratorialmente, na maioria dos casos, por febre irregular de longa duração, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (Gonçalves *et al.*, 1986). O período de incubação é estimado entre 2 e 4 meses. A LV pode apresentar-se com evolução aguda, subaguda ou crônica, porém muitos indivíduos infectados permanecem assintomáticos. As formas aguda e subaguda acometem geralmente crianças, e constitui freqüentemente um quadro clínico grave (Bittencourt e Barral-Neto, 1995).

A LV é a forma clínica mais freqüente associada à AIDS no sul da Europa. A co-infecção *Leishmania*/HIV tem surgido como resultado da sobreposição entre LV e AIDS, seja pela invasão da AIDS em áreas rurais ou da LV em áreas urbanas. Casos de co-infecção têm sido relatados em 33 países, a maioria deles na França, Itália, Portugal e Espanha. Em 1994 a Organização Mundial de Saúde (OMS) organizou uma rede de vigilância mundial para co-infecção *leishmania*/HIV que incluía 13 instituições. Em 1998, este número cresceu para 28 instituições que contribuem para melhoria da detecção de ambas as doenças, melhor descrição e manejo destes pacientes (SUCEN, 2001).

O nome kala-azar (febre negra ou pele negra, no dialeto Hindi) originou-se a partir de características da doença observadas em países como a Índia, onde os pacientes apresentam um aumento da pigmentação da pele após o tratamento para LV, que muitas vezes é acompanhado por lesões cutâneas, denominadas de PKDL – lesões dérmicas pós-calazar (Bittencourt, e Barral-Neto, 1995; Garg *et al.*, 2001; Zijlstra e El-Hassan, 2001).

### 1.1.1 Epidemiologia

As leishmanioses estão entre as endemias que mais crescem nos últimos tempos, sendo atualmente considerada a segunda doença endêmica do país, perdendo apenas para a esquistossomose. Cerca de 4.000 casos de LV humana são notificados anualmente no Brasil e o índice de mortalidade está em torno de 10% (OMS, 2001). A transformação no meio ambiente - desmatamentos e a migração do homem da área rural para as periferias da cidade, em condições precárias de habitação e saneamento, são alguns dos fatores que contribuíram para a expansão da ocorrência da doença.

O primeiro registro da LV no Brasil data de 1913, um caso provavelmente proveniente do Mato Grosso e diagnosticado no Paraguai (Deane, 1956).

A LV tem-se apresentado como um grave problema de saúde pública no estado de Pernambuco, podendo estar relacionada aos fatores climáticos, econômicos e sociais da nossa Região. No Brasil o número de casos de LV está em franca expansão. Essa tendência é explicada tanto pelo incremento real dos casos como também pela melhoria do sistema de notificação (Monteiro *et al.*, 1994).

A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem; entretanto Vieira e Coelho (1998), Costa *et al.* (1999) e Costa e Vieira (2001), demonstram um aumento dos casos humanos que não está diretamente relacionado ao aumento de casos caninos, sugerindo que outros fatores além da circulação do parasita no reservatório canino possam estar envolvidos na determinação da doença humana.

Esta zoonose estabeleceu-se inicialmente em áreas rurais, tendo esse perfil mudado em decorrência dos novos hábitos das pessoas, que deixaram de freqüentar a mata apenas para caçar, passando a morar cada vez mais perto delas, desmatando para plantio e moradia, trazendo consigo animais domésticos que serviam de alimentação e trabalho. Esses animais atraíam animais silvestres e insetos vetores de diversas doenças. Entre os animais trazidos pelo homem para próximo da mata,

estava o cão, excelente reservatório doméstico da *L. chagasi*, sendo confirmado pelos trabalhos de Deane e Deane (1938) e Alencar (1963). Foi demonstrado então, através da infecção experimental do *Lutzomyia longipalpis* uma maior freqüência de flebótomos infectados quando estes picavam cães do que quando sugavam homens doentes (Leite, 1958; Gonçalves *et al.*, 1986; Alencar *et al.*, 1991).

Posteriormente, a leishmaniose começou a apresentar-se também como uma doença urbana, principalmente devido à “ruralização” da periferia das cidades (Figura 5), como demonstrado por Cesse (1999). Em algumas situações distintas, surgiu como pequenos surtos epidêmicos em diversos pontos do país, destacando-se aqueles ocorridos em Teresina/PI, Rio de Janeiro/RJ, Santarém/PA, Corumbá/MS, São Luiz/MA, Camaçari/BA, Natal/RN, Fortaleza/CE, Petrolina/PE, expandindo-se para Belo Horizonte e Sabará em Minas Gerais, e algumas cidades do interior de São Paulo, como Araçatuba (Marzochi *et al.*, 1985; Genaro *et al.*, 1989; Costa *et al.*, 1990; Tesh, 1995; Duarte *et al.*, 1997). Uma série de causas inter-relacionadas é atribuída como principal determinante dos níveis endêmicos atuais. Destaca-se a má nutrição como fator de risco (Anstead *et al.*, 2001) e o baixo padrão de qualidade de vida de migrantes que, pressionados pelas adversidades de sobrevivência rural, procuram melhores condições em centros urbanos, instalando-se nas periferias das cidades. Esta parcela da população passa a residir em condições subumanas, desprovidas de saneamento básico, dividindo o restrito espaço com animais de criação, reduzindo assim o espaço ecológico da doença. Outro possível determinante desses surtos epidêmicos pode ser o aumento da densidade vetorial (Monteiro *et al.*, 1994).

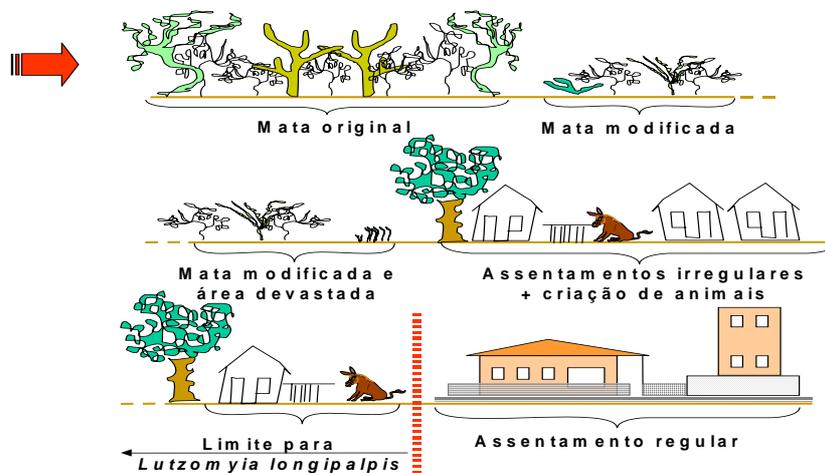


Figura 5 – Desenho esquemático da dinâmica da leishmaniose em áreas periurbanas  
 Fonte: GENTROP

O potencial de urbanização da LV verificado nos últimos anos, associado a um método de controle controverso e que tem se mostrado ineficaz, tem contribuído para que esta doença seja considerada uma parasitose reemergente, além de responsabilizá-la pelo acréscimo da mortalidade infantil e pela diminuição da capacidade de trabalho de adultos em plena fase produtiva, ocasionando sérios problemas de saúde pública (Cesse, 1999).

O modo de transmissão usual é através da picada de dípteros, pertencentes à família Psychodidae (subfamília Phlebotominae). O homem se infecta ao ser envolvido secundariamente no ciclo do parasita, ao contrário do que ocorre na Índia, onde o papel reservatório do homem é incontestado e primordial na manutenção da transmissão (Young e Duncan, 1994); adicionalmente Costa *et al.* (2000) demonstraram a possibilidade de flebotomos se infectarem ao picarem pessoas infectadas e sintomáticas no Piauí. Meineck *et al.* (1999), relataram um caso de transmissão congênita de LV de uma mãe assintomática para seu bebê.

## 1.2 Distribuição Geográfica

As leishmanioses têm ampla distribuição tanto no Velho Mundo como nas Américas, ocorrendo em mais de 100 países, situados nas zonas tropicais e subtropicais de quatro continentes (Ashford *et al.*, 1992) (Figura 6), sendo considerada endêmica em 88 países. Em relação a LV, 90% dos casos registrados ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão; dos casos notificados de LCM 90% encontram-se na Bolívia, Brasil e Peru; e dos casos notificados de LC 90% ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS, 2001).

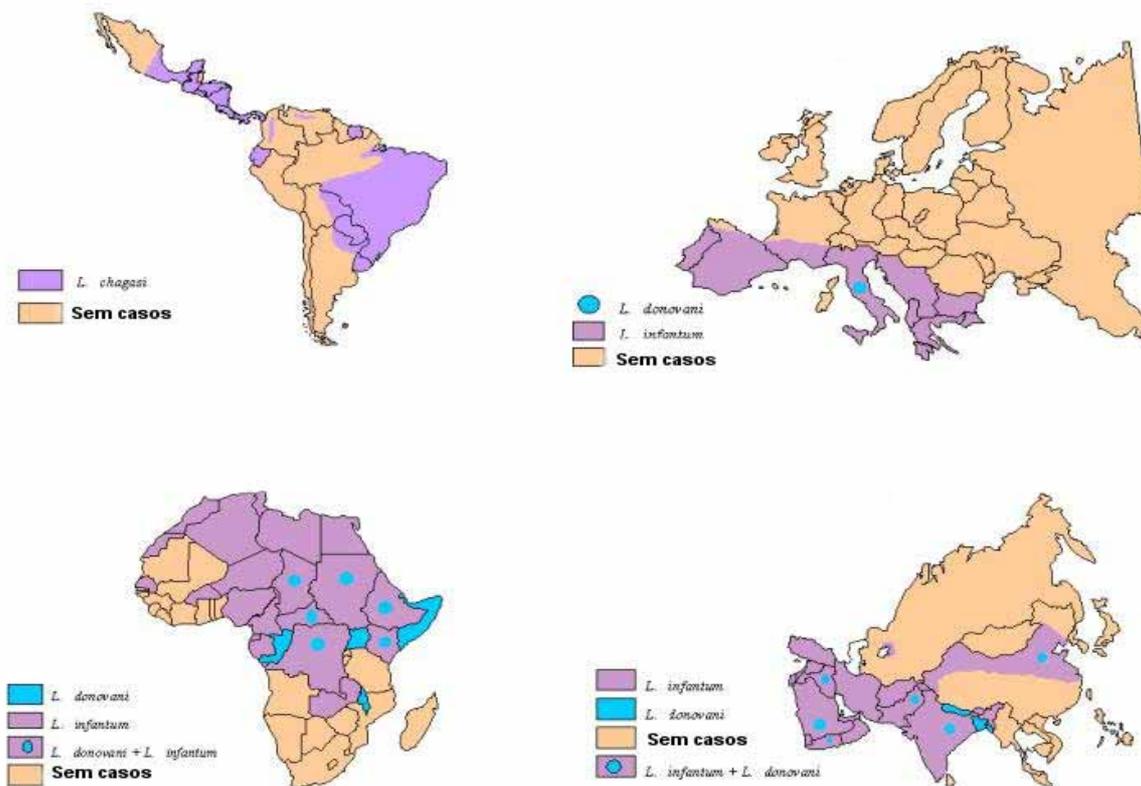


Figura 6 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral  
Fonte: WHO / TDR

No Continente Americano, a LV está disseminada desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (Lainson, 1983). No Brasil, ocorrem 90% dos casos de calazar sul-americanos e está distribuída em 17 dos 27 estados da federação, abrangendo quatro das cinco regiões. A maior incidência é no Nordeste, com 92% do total de casos, seguido pela Região Sudeste – 4%, Região Norte – 3%, e, finalmente, Região Centro-Oeste – 1% (Vieira e Coelho, 1998; Marzochi *et al.*, 1999; FUNASA, 2000, Nunes *et al.*, 2001).

### 1.3 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são parasitas unicelulares flagelados pertencentes a ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*.

Estes parasitas apresentam durante seu ciclo de vida duas formas distintas (Figuras 7 e 8): promastigota, caracterizada pela presença de uma organela rica em DNA (núcleo), o cinetoplasto, e um flagelo que emerge anteriormente; é encontrada no trato intestinal do inseto vetor, tanto livre no lúmen do intestino, como ligada pelo flagelo à cutícula intestinal; e amastigota, ovalada, sem flagelo aparente, exclusiva dos reservatórios ou do hospedeiro intermediário e geralmente encontrada no interior de macrófagos e outras células fagocíticas (Pessoa e Martins, 1988; Wu *et al.*, 2000 ).

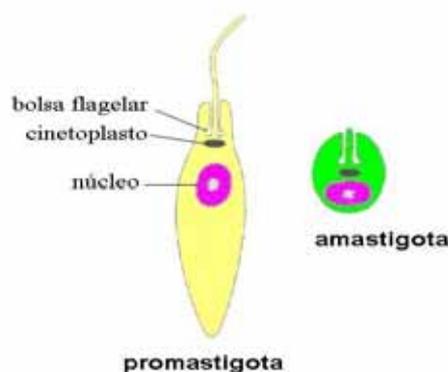


Figura 7 - Ilustração das formas promastigota (em amarelo) e amastigota (em verde) de *Leishmania*.  
Fonte: GENTROP

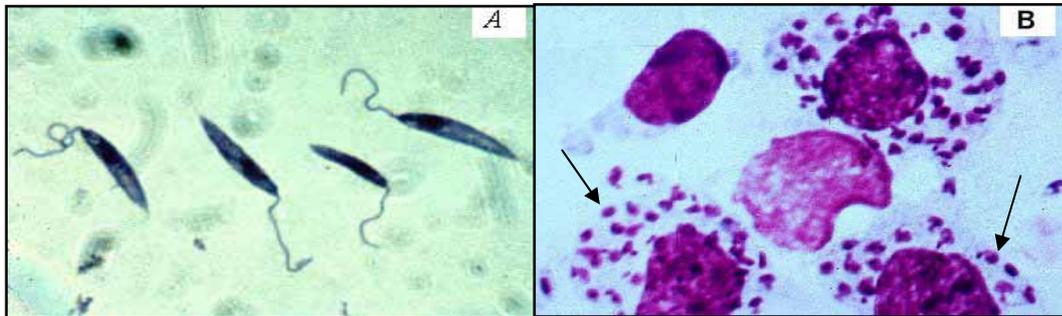


Figura 8 - No quadro "A" forma promastigota de *Leishmania* desenvolvida em cultura e no quadro "B" formas amastigotas de *Leishmania* (setas) no interior de macrófagos em esfregaço de medula óssea de paciente com calazar.

Fonte: <http://medlib.med.utah.edu/parasitology/ldonoim.html>

O parasita multiplica-se por divisão binária no interior do citoplasma dos macrófagos do hospedeiro vertebrado sob a forma imóvel do protozoário (amastigota), até o rompimento da célula parasitada e invasão de outras células do sistema fagocítico monocitário. Ao picar um indivíduo infectado o flebótomo ingere juntamente com o sangue formas amastigotas da leishmania. No intestino médio do flebótomo, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, que aderem ao epitélio do tubo digestivo, onde se multiplicam por divisão binária. Posteriormente estas formas migram para a parte anterior do tubo digestivo do inseto onde se tornam infectantes e invadem a faringe do inseto infectando outro indivíduo durante novo repasto sanguíneo (Figura 9).

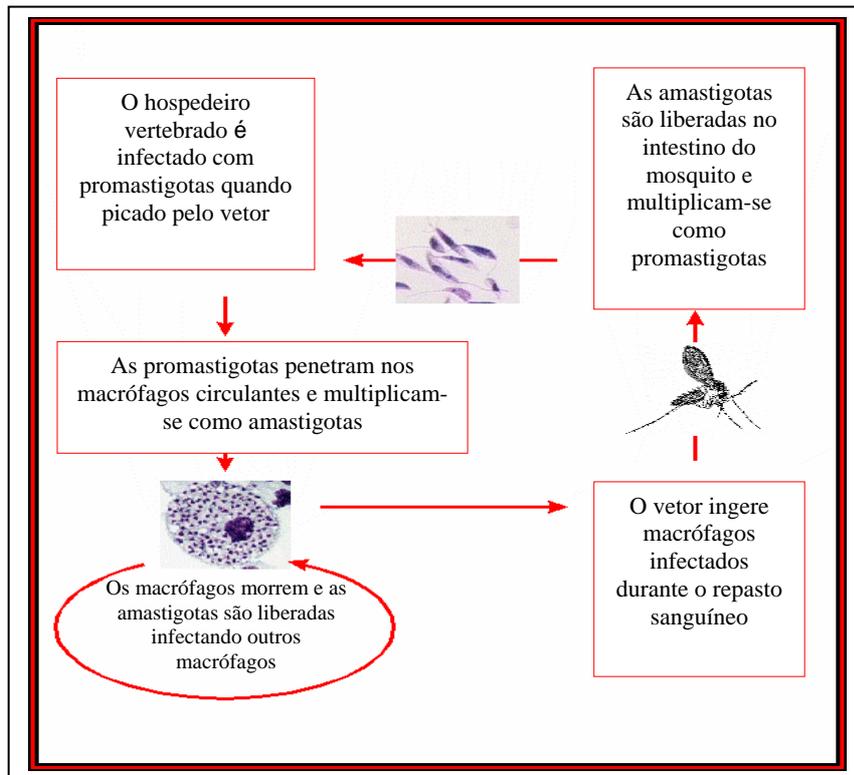


Figura 9 – Ciclo de vida das leishmanioses

Modificado de: [http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/lifecycles/leishmania\\_lifecycle.html](http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/lifecycles/leishmania_lifecycle.html)

Embora existam diversas espécies de *Leishmania* que parasitam vertebrados, as que infectam o homem têm recebido maior atenção dos pesquisadores. A espécie etiológica mais comumente isolada no homem, em cães e no vetor é a *Leishmania chagasi* (Alencar *et al.*, 1991; Sherlock, 1996).

A classificação taxonômica mais recente do gênero *Leishmania* admite três espécies distintas causadoras da LV: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, embora alguns autores defendam a teoria de que *L. chagasi* é somente um sinônimo de *L. infantum*, trazida para as Américas pelos cães dos colonizadores europeus (Lainson *et al.*, 1987; Momen *et al.*, 1987; Thomaz-Soccol *et al.*, 1993). Em relação às espécies causadoras da leishmaniose tegumentar nas Américas, as subespécies do complexo *L. braziliensis* foram elevadas recentemente a espécies e agrupadas em um novo subgênero, *Viannia*; a *L. amazonensis* pertence atualmente ao subgênero

*Leishmania*, como os parasitas que causam a forma visceral e as formas cutâneas do Velho Mundo. Há relatos de *L. L. mexicana* causando LV em casos de co-infecção com HIV (Ramos-Santos *et al.*, 1998). Entretanto, a classificação do gênero *Leishmania* ainda é assunto de considerável controvérsia. A tabela 1 resume o conhecimento atual sobre as leishmanias humanas existentes no Brasil e as formas clínicas associadas a elas.

**Tabela 1:** Espécies de *Leishmania* do Novo Mundo isoladas de pacientes e formas clínicas associadas

<b>Espécie</b>	<b>Forma clínica</b>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa anérgica, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose visceral (raramente)
<i>L. (L.) mexicana</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose visceral
<i>L. (L.) chagasi</i>	Leishmaniose visceral ou calazar, leishmaniose cutânea (raramente)
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Leishmaniose cutânea
<i>L. (V.) naiffi</i>	Leishmaniose cutânea
<i>L. (V.) shawi</i>	Leishmaniose cutânea

*L.L.* – *Leishmania (Leishmania)* e *L.V.* – *Leishmania (Viannia)*

## 1.4 Vetores

Os vetores responsáveis pela transmissão de leishmanioses são dípteros, pertencentes à subfamília Phlebotominae (DIPTERA : PSYCHODIDAE) conhecidos como flebótomos (Young e Duncan, 1994). São insetos pequenos, com cerca de 2 a 3 milímetros de comprimento, o que lhes permite atravessar as malhas dos mosquiteiros; em geral são pouco observados pela população, exceto quando a densidade intradomiciliar é muita elevada. Apresentam vôos curtos e baixos; cor amarelada ou acinzentada, têm o corpo densamente piloso e suas asas são salientes no dorso por estarem permanentemente abertas quando em repouso (Queiroz, 2001)

No Velho Mundo as espécies transmissoras pertencem ao gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo ao gênero *Lutzomyia*. Os adultos alimentam-se de sucos vegetais e apenas as fêmeas realizam a hematofagia, através da qual obtém ferro e proteínas para produção dos ovos. Geralmente realizam repasto sangüíneo durante a noite, sendo sua atividade mais intensa no crepúsculo. As fêmeas são fecundadas no momento do repasto sangüíneo e após 5 a 9 dias realizam a oviposição em local úmido, sombreado e com solo rico em matéria orgânica ou em decomposição. A eclosão dos ovos ocorre após uma semana aproximadamente. As larvas se alimentam da matéria orgânica e entre 40 a 60 dias após a eclosão, dependendo da espécie e temperatura, surgem os novos adultos. As fêmeas que já fizeram uma postura, e conseqüentemente um repasto sangüíneo, voltam a procurar alimento novamente para uma nova postura, quando então têm oportunidade de transmitir o parasita (Andrade, 1998; Castro *et al.*, 1996). Os flebótomos se infectam durante o repasto sangüíneo, quando as fêmeas ingerem junto com o sangue, os macrófagos da derme contendo as formas amastigotas de *Leishmania* em seu citoplasma. No intestino do inseto, essas formas amastigotas transformam-se em promastigotas, forma infectante do parasita. A transmissão então se dá pelo regurgitamento do sangue pré-ingrido, no ato da refeição seguinte (Schlein *et al.* 1992).

No Brasil o único gênero implicado como transmissor das leishmanioses é o *Lutzomyia*, composto por cerca de 430 espécies, distribuídas ao

longo de toda a Região Neotropical. Do total de espécies do gênero, pouco mais de 20 encontram-se atualmente envolvidas na transmissão das espécies de *Leishmania* ao homem (Young e Duncan, 1994). No entanto, o número de espécies de *Lutzomyia* implicados na manutenção das leishmanioses na América Latina deverá crescer consideravelmente, à medida que novos trabalhos sejam conduzidos nas áreas endêmicas (Killick-Kendrick, 1990).

O vetor da LV é a *Lutzomyia longipalpis* (Figura 10) , sendo encontrada em domicílios, peri domicílios e em densidades em geral mais baixas na mata (Castro *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 1998). Recentemente a *Lutzomyia cruzi* foi apontada como provável vetor da LV no Mato Grosso do Sul (Santos *et al.*, 1998).



Figura 10 – Fêmea de *Lutzomyia longipalpis* (aumento em 100 x)  
Fonte: WHO / TDR Image Library

## 1.5 Reservatórios da LV

São mamíferos, principalmente canídeos. No Brasil, o reservatório mais importante da LV é o cão que age como mantenedor do ciclo da doença (Chagas *et al.*, 1937; Deane, 1956); embora a raposa (Deane, 1956; Silveira *et al.*, 1982) e outros animais silvestres como os marsupiais didelfídeos (Sherlock *et al.*, 1984) sejam também citados como reservatórios da doença, apresentam pouca importância epidemiológica. O homem provavelmente atua como fonte de infecção secundária, principalmente quando o calazar incide sob a forma de epidemia (FUNASA, 2000).

### 1.5.1 Aspectos Clínicos do Calazar Canino

A doença no cão é precedida por um período de incubação bastante variável, de três meses até vários anos. Um fator importante a considerar e que destaca a importância epidemiológica do cão é que o mesmo quando infectado, ainda que aparentemente sadio, apresenta intenso parasitismo cutâneo, sendo assim infectante para o inseto vetor (Marzochi *et al.*, 1985), tornando-o o elo mais importante na manutenção da cadeia de transmissão (SUCEN, 2001).

Os cães infectados podem ser classificados clinicamente em três categorias: assintomáticos – ausência de sinais sugestivos de infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos – perda de peso moderada e/ou pêlo opaco; e sintomáticos – todos ou alguns dos sinais severos da doença (Mancianti *et al.*, 1988) A presença de anticorpos específicos se faz nos três grupos clínicos. Os animais assintomáticos ocorrem sempre em maior número (60%), podendo evoluir para a cura espontânea, para uma forma assintomática crônica ou, ainda, para a morte (Marzochi *et al.* 1985).

Os sinais clínicos descritos para o calazar canino são: lesões cutâneas, particularmente no focinho, ao redor dos olhos e nas orelhas, caracterizadas principalmente por alopecia, descamação e eczema; pêlo opaco; pequenas úlceras nas orelhas, focinho, cauda e articulações. Observa-se ainda o aumento de tamanho dos linfonodos palpáveis (cervical e poplíteo). Outros sinais podem ainda estar presente, como a apatia, onicogribose, ceratoconjuntivite (Figura 11), coriza, diarreia e hemorragia intestinal, edema das patas, vômitos e epistaxe, além de hemorragia na mucosa bucal. Na fase final da doença, ocorre em geral a paresia dos membros posteriores e caquexia (Deane, 1956; Alencar 1959; Genaro *et al.*, 1988, Marzochi *et al.*, 1981; Nunes *et al.*, 1988; Castro *et al.*, 1996; Santa Rosa e Oliveira, 1997). Uma lesão freqüentemente observada é o espessamento na borda da orelha (Figura 12), e comparada com a borda desgastada de um chapéu velho (Andrade, 1998).



Figura 11 – Conjuntivite em cão com calazar  
Fonte: OMS LEISH 96/40



Figura 12 – Espessamento da borda da orelha em cão com calazar  
Fonte: Arquivo pessoal

Em relação às alterações histopatológicas, Genaro (1993) relata que as mais freqüentes são observadas na pele, baço, medula óssea, linfonodos, fígado, rins, pulmões e intestinos. Exceto pelas lesões cutâneas observadas nos cães, que são intensas e ocorrem na maioria dos casos caninos, as demais lesões observadas são semelhantes às descritas na doença humana (Winslow, 1971, Keenan *et al.*, 1984). O exame da pele mostra uma dermatite crônica e infiltrado histiocitário com grau variável de parasitismo (Genaro, 1993). A medula óssea apresenta-se hiperplásica, podendo ou não conter parasitas, dependendo do grau de parasitismo (Keenan *et al.*, 1984). A hepatoesplenomegalia (HEM) é bastante freqüente. O baço pode apresentar-se com tamanho normal, ou um aumento de forma moderada, porém com decréscimo do número de linfócitos e proliferação de macrófagos na bainha linfóide periarteriolar (Genaro, 1993). O fígado, geralmente aumentado, apresenta um infiltrado plasmolinfocitário e hiperplasia das células de Küpffer. Genaro (1993) relata ser freqüente a ocorrência de hepatite difusa e reação inflamatória exsudativa com infiltrado linfoplasmocitário nos espaços portais e interlobulares. Os linfonodos encontram-se freqüentemente aumentados com perilinfoadenite, hipertrofia dos cordões e dos folículos; intensa fibrose, seios dilatados e hiperplasia de macrófagos (Alencar, 1959). Apresentam ainda redução na população de linfócitos nas áreas paracorticais, extensiva hiperplasia folicular e aumento do número de células plasmáticas (Keenan *et al.*, 1984). Nos rins, geralmente ocorrem nefrite intersticial crônica e glomerulonefrite mesangioproliferativa

(Genaro, 1993).

## 1.6 Diagnóstico do Calazar Canino

O diagnóstico laboratorial do calazar canino pode ser feito por meios de métodos parasitológicos ou imunológicos. Os exames parasitológicos baseiam-se na visualização microscópica da forma amastigota do parasita em esfregaços preparados a partir de raspados de pele íntegra ou pele lesionada, punção de linfonodos ou de medula óssea, e muito raramente punção de baço ou fígado. As lâminas são coradas pelos métodos de Giemsa ou Leishman. Se, por um lado, o exame parasitológico é específico, sua sensibilidade é baixa; assim, o animal que esteja no início da infecção, ou aqueles assintomáticos, que formam a maioria da população canina infectada, não têm carga parasitária suficientemente elevada para permitir o encontro de amastigotas no material de biópsia. Essa baixa carga parasitária pode ter como resultado um diagnóstico falso-negativo determinado pelo não encontro do parasita, o que depende também da experiência do profissional que dará o diagnóstico (Reed, 1996). Adicionalmente, o exame é bastante invasivo, Por outro lado, na nossa prática, algumas vezes resíduos de corante podem confundir o técnico inexperiente, e liberar resultados falso-positivos.

O diagnóstico sorológico mais utilizado atualmente é a imunofluorescência indireta (IFI), porém possui o inconveniente de apresentar reações cruzadas com outras parasitoses. Outros testes têm sido propostos para o diagnóstico sorológico, como o teste de aglutinação direta – DAT (Harith *et al.*, 1986; El Safi *et al.*, 1989; Neogy *et al.*, 1992; Semião-Santos *et al.*, 1996), o Fast Elisa (Ashford *et al.*, 1993), o ELISA, a imunocromatografia, comercialmente conhecido como TRALd - Teste rápido Anticorpo *Leishmania donovani* (Genaro *et al.*, 1996), e o *western blot* (Aisa *et al.*, 1998). A detecção de DNA parasitário em amostras de sangue tem sido possível na maior parte dos cães infectados, mas o método é ainda dispendioso e sujeito a contaminações laboratoriais freqüentes.

## 1.7 Tratamento

Para o tratamento das leishmanioses humanas utiliza-se como princípio ativo o antimônio pentavalente (antimoniato de meglumina ou estibogluconato de sódio). O esquema recomendado é de 20 mg por quilograma de peso por dia, até o máximo de 850 mg, em doses diárias por 20 dias consecutivos, aplicadas por via endovenosa ou intramuscular. Em casos de intolerância ou resistência a essas drogas, pode-se optar por outra, em geral a anfotericina B (Prata, 1963, Jah *et al.*, 1995). Após 8 dias do início do tratamento é observada uma melhora do paciente com redução das visceromegalias (baço e fígado) e da febre, aumento de peso e retorno gradual do quadro hematológico a valores normais (Alencar, 1991) (Figura 13).

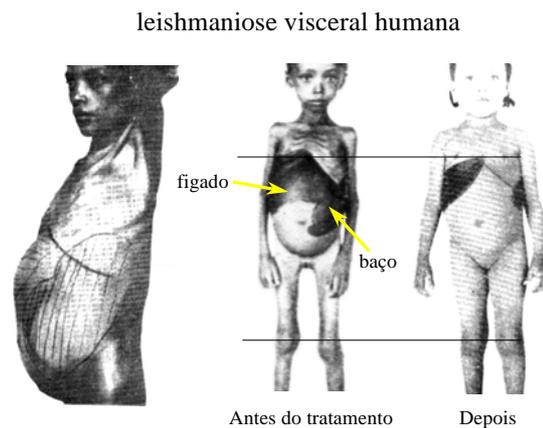


Figura 13 – Demonstração da eficácia do tratamento para LV

Não existe um tratamento preconizado para o calazar canino, e como o cão representa um reservatório em potencial do parasita, o tratamento não é recomendado pela OMS, sendo a eliminação a única medida utilizada em relação ao reservatório. Por esta razão há sempre uma resistência por parte da população na apreensão dos mesmos. As drogas utilizadas para o tratamento da LV humana geralmente não apresentam a mesma eficiência no tratamento do calazar canino. Por não haver ainda drogas específicas para o tratamento do calazar canino, vários testes têm sido feitos, ora utilizando-se as drogas usuais em associação com outros agentes,

ora utilizando-se outras alternativas de tratamento. Estes procedimentos, porém, não apresentaram sucesso, mas apenas uma suspensão temporária dos sinais clínicos (Melo, 1998; Vexenat *et al.*, 1998; Denerolle e Bourdoiseau, 1999; Lamothe, 2001; Valladares *et al.*, 2001).

## 1.8 Proteínas de Choque Térmico - HSP

Todas as células, desde o mais simples procaríoto, até o mais complexo organismo multicelular, contêm grupos de proteínas altamente conservadas que aumentam rapidamente em concentração quando as células são expostas a situações de estresse. A maioria dos estudos demonstra que uma elevação de 5/10° C na temperatura ideal para o crescimento das células, provoca estresse nas células induzindo a expressão dessas proteínas o que lhes confere o nome de **proteínas de choque térmico - HSP** (Heat Shock Proteins) (Eden e Young, 1996; Coronato *et al.*, 1999).

As HSP, ou chaperonas moleculares estão entre as mais abundantes e conservadas proteínas na natureza e mostram uma elevada conservação da sua seqüência de aminoácidos. Suas funções em diferentes organismos são geralmente similares, assim como suas características estruturais e seus pesos moleculares (Queiroz, 2001). Essas funções começaram a ser definidas há pouco tempo, assim existe uma variedade de nomes na literatura. Uma terminologia conveniente é baseada em suas migrações durante eletroforese em gel de poliacrilamida, dessa forma, quatro grupos principais podem ser reconhecidos: HSP 90, HSP 70, HSP 60 e as pequenas HSP (HSP 15-30). Todos estes grupos contêm famílias de proteínas conservadas, e os números representam valores aproximados da massa molecular relativa de suas subunidades, e possuem algumas características comuns: seqüências altamente conservadas, atividade ATPase e uma habilidade para ligar e liberar segmentos hidrofóbicos de cadeias de polipeptídeos desdobrados.

As chaperonas moleculares são um grupo de proteínas que mediam o correto dobramento, montagem, reparação, translocação através da membrana celular

e degradação de outras proteínas (Mak, 1998). Originalmente acreditava-se que as chaperonas moleculares atuavam somente evitando uma agregação promíscua de proteínas, ainda quando dobradas (por essa razão recebeu o nome de chaperona, *chaperon* palavra de origem francesa que significa acompanhante). Entretanto agora se sabe que elas também interagem mais intimamente com suas "proteínas clientes", proporcionando efeitos semelhantes a uma "massagem" nas regiões da proteína que parecem estar erroneamente dobradas, mudando sua estrutura de tal forma que dá à proteína uma outra oportunidade de se dobrar corretamente (Alberts *et al.*, 1987).

As HSP70 contêm dois domínios principais. O domínio N-terminal ATPase é mais conservado (cerca de 64% entre HSP70 de eucarióticos) enquanto que a parte C-terminal é ocupada por um domínio mais variável que liga peptídeos. As regiões são ligadas por sítios protease-sensível (Figura 14).

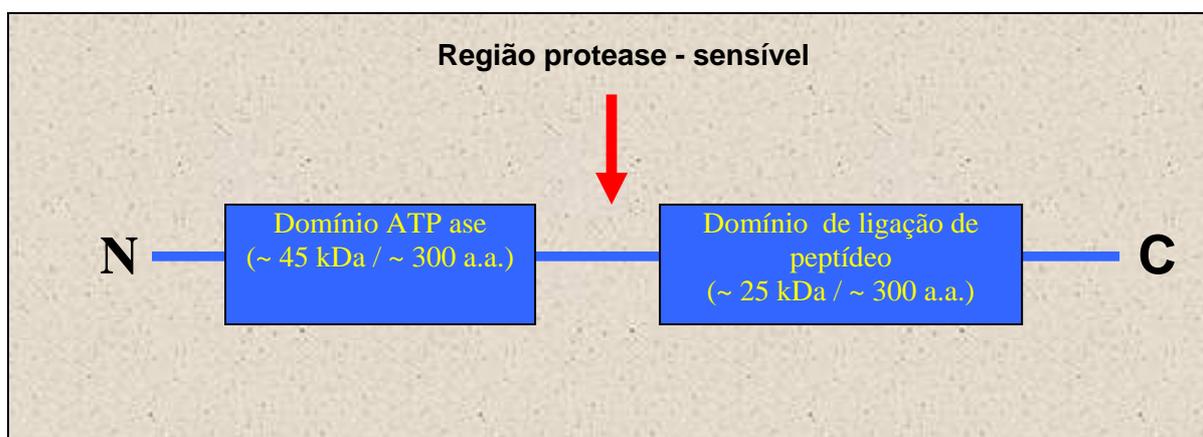


Figura 14– Diagrama esquemático da molécula de HSP70  
Fonte: MAK P., 1998

As proteínas pertencentes à família das HSP70 tanto auxiliam para garantir um dobramento adequado de cadeias de polipeptídeo quanto desempenham uma função essencial na importação de proteínas para as mitocôndrias e para o retículo endoplasmático se ligando à proteína precursora, sem sua conformação nativa, durante o transporte. A liberação de polipeptídeos recentemente sintetizados da

família HSP70 necessita de hidrólise de ATP, e justifica parcialmente a dependência desse gasto de energia durante os estágios subseqüentes de importação para a mitocôndria.

A natureza antigênica das HSP foi inicialmente detectada na malária e na esquistossomose (Bianco *et al.*, 1986; Nene *et al.*, 1986; Zhang *et al.* 2001). É certo que a resposta ao choque térmico de alguns outros parasitas já era conhecida, mas se percebeu de imediato que muitas das proteínas induzidas pelo estresse poderiam ser antígenos em infecções naturais e experimentais (Andrade e Andrade, 1996). Hunter *et al.*, 1984 (*apud* Andrade e Andrade, 1996) já haviam descrito a expressão diferencial de alguns genes de *Leishmania mexicana*, quando observaram *in vitro* que sete proteínas foram sintetizadas em quantidades elevadas durante a diferenciação induzida pelo calor, de promastigota em amastigota. Estas proteínas correspondiam, em peso molecular, às conhecidas HSP observadas em *Drosophila*. Outros estímulos indutores de estresse celular, como a exposição ao arsenito de sódio, assim como o choque térmico, logo foram implicados no aumento da síntese de certas proteínas em *L. tropica*, *L. enrietti* e *L. donovani* (Lawrence e Robert-Gero, 1985; *apud* Andrade e Andrade, 1996). Em 1987 Yuckenberg *et al.* descreveram a resposta ao choque térmico do *Schistosoma mansoni*, que expressa diferencialmente um grupo de proteínas quando submetido a estresse, sendo uma imediatamente identificada como homóloga a HSP 70. No mesmo ano, Hedstrom *et al.* demonstraram que esta proteína apresentava-se como um importante imunógeno, que induzia uma produção de anticorpos em indivíduos infectados e em animais imunizados contra células irradiadas, em experimentos de proteção. As HSP foram observadas ainda em outras espécies de *Leishmania* (Ul'masov *et al.*, 1988), em *Trypanosoma cruzi* (Engman *et al.*, 1987); entretanto a prova formal da antigenicidade das HSP entre os tripanosomatídeos só foi obtida mais tarde, já nos anos 90 MacFarlane *et al.*(1990), e Andrade *et al.*(1990), mostraram que o soro de pacientes com calazar tinha anticorpos dirigidos contra antígenos homólogos a família HSP70. Embora os pacientes com doença de Chagas não tivessem anticorpos séricos de reação cruzada contra o homólogo da HSP70 de *Leishmania*, eles tinham anticorpos específicos contra uma proteína similar do *T. cruzi*,

e que em infecções mistas *T. cruzi* / *L. braziliensis* os pacientes desenvolviam anticorpos contra as HSP de ambos os parasitas (Engman *et al.*, 1987).

Não obstante as proteínas de choque térmico estarem entre as mais conservadas na natureza, observa-se uma elevada propriedade antigênica (Zhang *et al.*, 2001). A base molecular para esta especificidade pode ser encontrada nas seqüências de aminoácidos pouco conservadas encontradas na fração carboxi-terminal das HSP70. De fato, embora a parte amino-terminal destas proteínas seja extraordinariamente conservada, os fragmentos C-terminais das HSP70 têm em geral menos de 65% de homologia entre espécies não aparentadas. Apesar dessa divergência limitada, isso parece ser suficiente para produzir uma resposta imune discriminatória com produção de anticorpos específicos contra esta proteína parasitária. Embora não se saiba como o hospedeiro evita a produção de anticorpos contra as regiões conservadas das HSP, o fato é que, os animais quando imunizados experimentalmente contra HSP parasitárias, produzem anticorpos que reconhecem HSP homólogas de outros parasitas, possivelmente ligando a seqüências conservadas, bem como as não conservadas, enquanto em uma infecção natural, os anticorpos são geralmente parasita-específicos, dirigidos possivelmente contra os epitopos não conservados na HSP70 (Andrade, 1997).

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Geral**

- Comparar os resultados da sorologia obtidos pelo ELISA recombinante, com aqueles obtidos pela IFI com diluição seriada.

### **2.2 – Específicos**

- Avaliar um método de diagnóstico que possa subsidiar o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral canina, na rápida identificação dos animais sororeagentes, possibilitando o emprego da eutanásia como medida de esvaziamento do reservatório;
- Avaliar um sistema de coleta de sangue por punção auricular e aspiração com micropipeta;
- Avaliar a soroprevalência canina em uma área endêmica no Estado de Pernambuco;
- Encontrar sinais da doença nos cães sororeagentes através do exame clínico e da necrópsia;

## **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos de laboratórios foram executados de acordo com as normas para diagnóstico de doenças parasitárias estabelecidas por Guimarães *et al.* (1987).

### **3.1 Coleta do Material Inicial**

Foram coletadas pelos agentes de saúde e por funcionários da FUNASA, no período de setembro de 2000, 1151 amostras de sangue por punção auricular, em papel de filtro (Guimarães, 1984) de cães procedentes do Município de Glória do Goitá, Pernambuco. Foram trabalhadas 84 localidades daquele município. A coleta ocorreu durante a campanha de vacinação antirábica em postos fixos e também porta a porta. Os cães foram devidamente contidos e amordaçados, para então proceder-se a coleta. As amostras coletadas foram processadas nas instalações do LABEND/LACEN (Laboratório de Endemias/Laboratório Central de Saúde Pública) pelo pesquisador deste trabalho e a equipe técnica daquele laboratório, utilizando a técnica da IFI realizada segundo o protocolo da Biomanguinhos, fabricante dos reagentes utilizados naquela rotina.

### **3.2 Coleta de Material para a Sorologia Final**

A partir dos resultados obtidos na IFI com papel de filtro, doravante chamado teste de triagem, voltou-se a Glória do Goitá no mês de fevereiro de 2001, neste momento como participante da equipe e auxiliada por uma estagiária, para apreender os animais cujos resultados foram reagentes ou inconclusivos. Após exame clínico geral, coletou-se sangue por punção venosa em tubos sem anticoagulante e após centrifugação, foram separados os soros, identificados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$

para posterior realização dos testes. Coletou-se também sangue periférico por punção auricular, aspirando-se 20  $\mu$ L de sangue com pipeta automática e ponteira descartável, dispensando em microtubos com 500  $\mu$ L de solução de imunoadsorção contendo uma bactéria, denominada DH5 $\alpha$ , PBS E KCl (este último a fim de crenar as hemácias para impedir a hemólise), obtendo-se assim a diluição de 1:50. Após centrifugação, os soros foram separados e armazenados sob refrigeração para posterior realização dos testes de ELISA recombinante.

Após exame clínico, foram anotados os seguintes sinais: presença de lesões, principalmente nas orelhas e no focinho; onicogribose (crescimento exagerado das unhas); aspecto das mucosas (principalmente ocular e bucal), bem como presença de conjuntivites em geral. Os animais foram então submetidos a eutanásia de acordo com as normas preconizadas pela OMS com o uso de uma injeção intravenosa (I.V.) de KCl a 19 %, sendo então necropsiados, atentando-se para o aspecto do baço e do fígado.

### 3.3 Produção do Antígeno Recombinante

A bactéria *E. coli* linhagem DH5 $\alpha$ , transformada com o plasmídeo pBluescript contendo o inserto para a fração carboxi-terminal da HSP70 de *L. chagasi* (proteína S7), foi cultivada em meio LB contendo ampicilina, a 37 °C, sob agitação, até que a cultura atingisse a fase estacionária. As bactérias foram coletadas por centrifugação, lavadas 3 vezes em tampão fosfato (pH 7,2), resuspensas no mesmo tampão de lavagem em um volume final igual a 1/10 do volume de cultura, sendo em seguida sonicadas a 200 W, em ciclos de 30 segundos, imersas em banho de gelo, até que a solução resultante fosse essencialmente cristalina. O material não sonificado e insolúvel foi retirado por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos; a concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry (1951) e o mesmo foi estocado a -20°C até o uso.

## **3.4 Testes**

### **3.4.1 Imunofluorescência Indireta com Diluição Seriada**

A imunofluorescência indireta consiste em um teste baseado em uma reação antígeno-anticorpo. O “kit” empregado em nosso trabalho utiliza como antígeno promastigotas de leishmanias fixado em lâminas para imunofluorescência com 10 poços. Foi feita diluição seriada dos soros a partir de 1/40 até 1/640. Após a fixação do antígeno, os soros foram colocados nas lâminas nas diluições supracitadas. A reação ocorreu a uma temperatura de 37°C por 30 min. Após lavagens em PBS (tampão fosfato salina – pH 7,2) e secagem das lâminas foi aplicado o conjugado (anti-igG de cão ligada à fluoresceína); em seguida efetuou-se incubação a 37°C durante 30 min. As lâminas foram novamente lavadas em PBS, e após a secagem recobertas com lamínulas sobre glicerina tamponada. A leitura foi feita em microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerado reagente os soros que apresentaram fluorescência e não reagente os que tiveram ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controles positivo e negativo incluídos em cada lâmina. Foram considerados reagentes os que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1/40.

### **3.4.2 ELISA Recombinante**

O teste ELISA utilizando a proteína recombinante (ELISA S7), consiste de um método imunoenzimático que utiliza como antígeno a proteína recombinante S7 fixada em placas de microtitulação (Andrade, 1992). A leitura destas placas é feita através de um microfotômetro (leitor de ELISA). Os resultados são apresentados em densidade óptica (DO) e o ponto de corte é calculado a partir da média aritmética de 5 soros padrões (soros de cães comprovadamente negativos) mais 2 vezes o desvio padrão. Utilizou-se para a realização desses testes microplacas com 96 poços em

fundo chato, previamente incubadas com 50µL de uma solução de poli-l-lisina a 0,01%, diluída em água destilada, por aproximadamente 30 minutos a 37°C. Depois de descartar a solução de poli-l-lisina, a placa foi sensibilizada com o sonicação do antígeno recombinante. Em cada poço, foram pipetados 50 µL do soro imunoadsorvido de modo a se ter 3 diluições: 1/50, 1/100 e 1/200, e todas as diluições de um mesmo cão foram sempre realizadas em uma mesma placa de ELISA. A incubação com os soros foi realizada por 45 minutos a 37°C. Após três lavagens com tampão PBS contendo tween 20 a 0,05% (PBST), foram acrescentados 50 µL do conjugado em cada poço (Proteína A – peroxidase diluído na proporção de 1/5000 em PBST e leite desnatado a 2%). A placa com o conjugado foi incubada por 45 minutos a 37°C. Após esse período foram feitas 3 lavagens com PBS e acrescentados 50 µL em cada poço da solução reveladora que foi preparada com 0,004 g de Ortofenileno-diamino (OPD), diluído em 5 mL de tampão citrato-fosfato (ácido cítrico 0,05 M + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,09M), e 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A revelação ocorreu a 37°C durante 30 min. Foram efetuadas as leituras de absorbância, em leitor de ELISA (Microassay Reader Diamedix BP-96 da LabSystems) em 405 nm. Em cada placa um dos poços não recebeu soro, apenas PBST e leite, servindo como controle da reação. Em cada placa também foram usados um soro controle positivo e um negativo. Para o cálculo do ponto de corte utilizou-se amostras de soros de 5 cães comprovadamente negativos de diversas áreas endêmicas e não endêmicas. A média das absorbâncias desses cães mais 2 vezes o desvio padrão foi tomada como ponto de corte da reação que era calculado individualmente para cada placa de ELISA. Isto evitou possíveis variações de ponto de corte para as 5 avaliações de cada animal. O resultado final foi obtido a partir de uma média aritmética das absorbâncias de cada soro.

## 4 – RESULTADOS

Das amostras examinadas no teste de triagem, 92 foram reagentes, 28 foram inconclusivas e 1031 negativas. Dos cães cujos resultados foram reagentes ou inconclusivos, um total de 120, 41 foram apreendidos e após exame clínico geral e coleta do material a ser examinado, foram submetidos a eutanásia de acordo com as normas preconizadas pela OMS e necropsiados segundo Vasconcelos (1997). Os demais cães cujas amostras foram reagentes ou inconclusivas já haviam morrido (72), desaparecido ou mudado de endereço (7). Das 41 amostras coletadas, houve a perda de duas amostras por hemólise.

De acordo com o sexo dos animais examinados, 27 foram machos e 12 foram fêmeas, apresentando um percentual de 69% e 31% , respectivamente.

Das 84 localidades trabalhadas 26 (31%) apresentaram pelo menos um caso canino sororreagente. As 4 localidades com maior incidência agrupam-se a oeste do município, em uma área onde também ocorreram casos humanos nos últimos anos.

Dos 41 cães apreendidos, 16 apresentavam estado geral bom, e estavam aparentemente sadios. Caquexia foi observada em 8 animais; espessamento na borda das orelhas em 25; onicogribose em 7; ulcerações, alopecia geral ou localizada em 10; hemorragias na gengiva em 2 e conjuntivite ou outras alterações oculares em 2; no exame *post-mortem* observou-se através de necropsia hepatomegalia e esplenomegalia em 26 dos cães examinados (Figura 15).

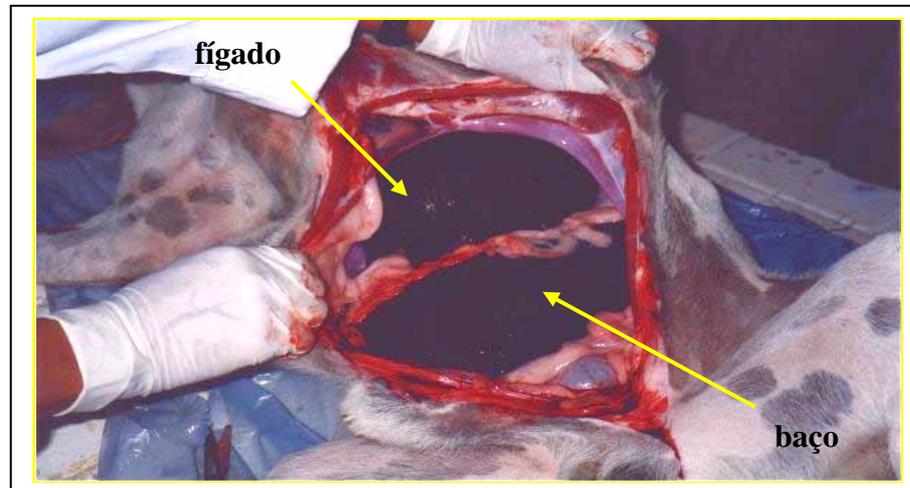


Figura 15 – Hepatoesplenomegalia observada em cão com calazar  
Fonte: arquivo pessoal

Dos 41 cães sororeagentes encontrados, apenas 39 foram submetidos ao teste do ELISA S7 e IFI com diluição seriada. A figura 16 mostra os resultados obtidos na imunofluorescência com diluição seriada, considerando-se negativas as amostras cujos títulos foram  $< 1/40$ ; a figura 17 mostra os resultados obtidos no ELISA S7.

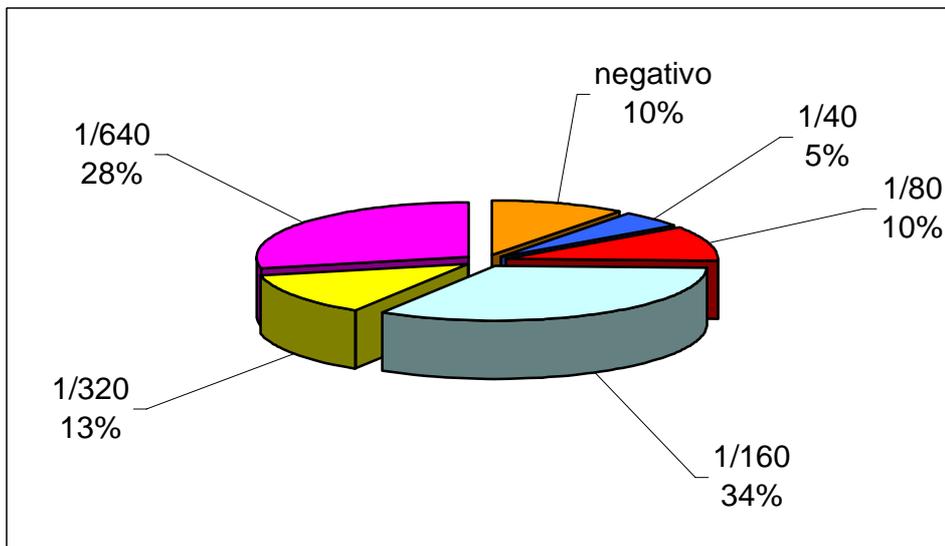


Figura 16 – Resultados da IFI com diluição seriada sendo consideradas negativas as amostras com títulos < 1/40.

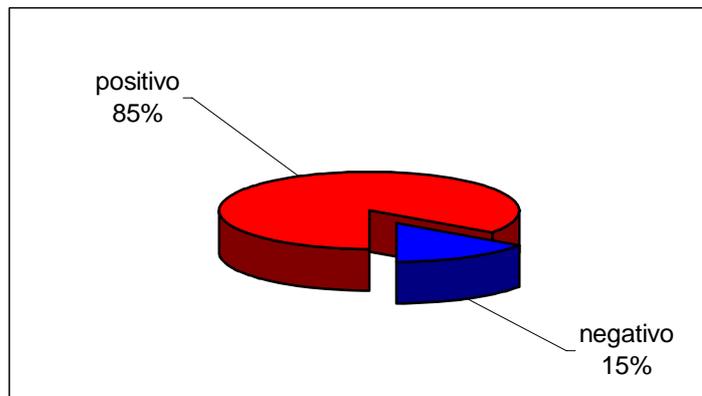


Figura 17 – Resultado do ELISA S7 considerando-se o ponto de corte estabelecido pela média dos soros negativos

A tabela 2 mostra um elevado grau de concordância entre os dois testes, quando os resultados do ELISA S7 e da IFI foram comparados: 35 em 39 amostras foram igualmente avaliadas pelos dois testes (89,7%). A tabela 3 mostra que, quando os resultados da IFI são discriminados por titulação, observa-se que a discordância entre os dois testes, no que concerne aos resultados negativos em IFI, se deve a uma amostra com título “borderline”. Quanto aos testes positivos em IFI e negativos em ELISA, os títulos estão distribuídos entre 1:80 e 1:640.

Tabela 2 – Resultado comparativo entre o ELISA S7 e a IFI com diluição seriada do soro.

RESULTADOS	TESTES		ELISA S7 / IFI
	ELISA S7	IFI	
Reagen tes	33	35	32
Negativos	6	4	3
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>35</b>

Dos 39 cães examinados, 32 foram reagentes e 3 foram negativos por ambos os testes com uma concordância de 89,7%

Tabela 3 – Resultados obtidos na IFI com diluição seriada e sua relação com o ELISA S7, discriminados por título na IFI.

RESULTADOS	IFI	ELISA S7	
		reagen tes	negativos
Negativo	1	0	1
Inconclusivos	3	1	2
1/40	2	2	0
1/80	4	3	1
1/160	13	13	0
1/320	5	5	0
1/640	11	9	2

## 5 – DISCUSSÃO

Analisando o espaço amostral trabalhado, e levando-se em consideração a densidade populacional do município de Glória do Goitá, percebe-se que o número de cães examinados no teste de triagem, tido como a totalidade da população canina do município, provavelmente estava subestimado, uma vez que a relação média de cão/habitante é de 1:7 em área rural; Glória do Goitá tem cerca de 27.000 habitantes e a quantidade de cães examinados foi de 1151, resultando em uma relação de 1:27. A coleta dessas amostras aconteceu durante a campanha de vacinação anti-rábica, dando continuidade à proposta da SES para a integração da campanha de raiva e calazar. Entretanto, apesar dos benefícios obtidos com esta associação, o estabelecimento de postos fixos de vacinação e coleta, onde o encaminhamento dos cães ocorre de forma passiva (o proprietário é quem leva o animal ao posto) contribui para que haja uma taxa subestimada da prevalência do calazar canino. Todavia, ainda assim, a prevalência encontrada foi de 10%, o que representa uma taxa relativamente alta para áreas endêmicas, em geral em torno de 5%.

O Programa de Controle das Leishmanioses tem sido falho em muitos aspectos, e vários fatores podem ser implicados como agravantes destas falhas; um exemplo é a dificuldade em se manter uma linhagem de parasitas viáveis para a produção de antígenos utilizados pelo laboratório responsável pelo fornecimento de “kits” para o diagnóstico da LV canina na Rede Pública. A dificuldade em manter um padrão na produção de antígenos acarreta dois grandes problemas: uma solução de continuidade na entrega dos “kits” e eventualmente a liberação de “kits” ineficazes, ambos provocando paralisação das atividades laboratoriais e conseqüentemente um atraso na realização dos testes. Outro agravante é que, muitas vezes, o tempo decorrido da coleta até a volta do agente para eliminação do cão sororreagente pode ser de até 8 meses (no caso deste trabalho foi de 5 meses, o que já representa um longo tempo). A demora na eliminação do cão sororreagente, por sua vez, traz

problemas ainda maiores, como a permanência do reservatório na área endêmica, mantendo ativo o ciclo da doença, bem como desperdícios financeiros, pois em muitos casos alguns cães já foram a óbito, mudaram de endereço ou simplesmente desapareceram. Particularmente neste trabalho cerca de 65% dos cães enquadraram-se nestas condições. Dos 120 cães sororreagente, 72 morreram em um período de 5 meses. Queiroz (2001) cita uma redução média de 25% da amostra/ano por morte de diversas causas na população canina em área endêmica de baixo poder aquisitivo; o percentual de mortes observadas neste trabalho foi muito maior do que o encontrado por Queiroz, podendo-se atribuir ao calazar a quase totalidade das mortes entre os cães sororreagente. Os cães não encontrados quando da apreensão para eliminação foram aqueles oriundos de postos fixos de vacinação e coleta, dificultando-se assim a localização dos mesmos.

Levando-se em consideração os resultados do teste de triagem onde se obteve um total de 120 amostras entre reagentes e inconclusivas em um montante de 1151 cães examinados, chega-se a uma prevalência do calazar canino de aproximadamente 10%. Essa taxa encontra-se dentro do esperado, uma vez que área trabalhada é endêmica, e está correlacionada com o registro de casos humanos do município. No ano de 2000, 5 casos humanos foram notificados. Sabendo-se que o município tem cerca de 27.000 habitantes, isto corresponde a uma incidência de 18 casos/100.000 habitantes, o que significa uma incidência bastante elevada, pois a incidência média em Pernambuco é de cerca de 4 casos/100.000 habitantes (FUNASA, 2001).

Em relação ao número de machos e fêmeas sororreagente, os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados por Queiroz (2001) e Santos (2001). Entretanto o fato de ter uma maior quantidade de machos do que de fêmeas, não tem nenhuma significância epidemiológica.

Analisando os achados clínicos, os resultados encontrados são semelhantes aos já relatados por vários autores (Deane, 1956; Castro, *et al.*, 1996; Santa Rosa e Oliveira, 1997; Nunes, *et al.*, 2001). Embora 41% dos cães apresentassem estado geral bom, a hepato ou esplenomegalia foi observada em 80%

dos cães, o que confirma que o cão, mesmo aparentemente sadio, pode estar infectado, e portanto, fonte de infecção para os flebótomos. Esses dados demonstram a lacuna existente na prática clínica veterinária, onde um cão é tido como “assintomático” ou “subclínico” apenas pelo exame externo visual. A palpação do fígado e do baço, a fim de detectar possíveis alterações nos seus tamanhos, não faz parte da rotina da maioria dos médicos veterinários, e menos ainda a prática de recorrer a exames de imagem (Rx ou ultra-som); em alguns casos, o baço chega a atingir três vezes o tamanho médio normal, o que seria facilmente detectável em uma palpação bem feita. O espessamento da borda da orelha, descrito por Andrade (comunicação pessoal) como aspecto patognomônico do calazar canino, foi observado em 34% dos cães, dos quais apenas um provavelmente não tinha calazar de fato, sendo o ELISA S7 negativo, e IFI com título  $< 1/40$ . Urge portanto, repensar a prática veterinária, de modo que o exame clínico possa de fato fornecer subsídios importantes para um diagnóstico preciso.

A coleta da amostra para o diagnóstico vem sendo, em si, um problema adicional, já que a coleta do sangue em papel de filtro a partir da orelha do animal implica na produção de uma lesão muitas vezes profunda com a lanceta, para que o volume de sangue obtido seja suficiente para embeber o papel de coleta. Diferentes tipos de papel de filtro e diferentes volumes de sangue coletados têm complicado ainda mais o cenário de coleta. Por outro lado, a busca de um sistema de coleta que seja seguro, quantitativo e confortável para o cão também é importante no contexto do controle, pois abrevia o tempo de trabalho das equipes, reduz a tensão entre equipe e proprietários e permite a obtenção de soro ou plasma de qualidade para um posterior exame sorológico.

Analisando o método de coleta utilizado neste trabalho, a punção auricular com pipeta automática, dispensando o sangue em microtubos com a solução de imunoadsorção, mostrou-se prática e facilmente aplicável à rotina do inquérito sorológico canino, uma vez que a equipe responsável pela coleta já estava acostumada com a punção, necessitando apenas uma adaptação em relação ao uso da pipeta. O transporte e armazenamento do material coletado também oferecem praticidade, pois o

mesmo pode permanecer à temperatura ambiente até 72 horas, quando isso for necessário. Depois de centrifugado, o soro pode permanecer até um mês na geladeira (4-8°C) ou congelado por tempo indeterminado. A hemólise das amostras também é reduzida não só pela quantidade de sangue coletada, como também pela presença do KCl na solução de imunoabsorção, que tem a função de crenar as hemácias, impedindo a lise, e permitindo uma eficiente separação do soro.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) está analisando uma resolução que estabelece o Regulamento Técnico sobre diretrizes gerais de procedimentos de manejo de resíduos de serviços de saúde, desde a geração dos resíduos até a sua disposição final; são diretrizes para a segregação, descarte, acondicionamento, coleta, transporte, armazenamento, tratamento e disposição final dos resíduos de serviços de saúde (Diário oficial da União – DOU 05/07/2000). Este regulamento aplica-se a todos os serviços que prestem atendimento à saúde humana ou veterinária, inclusive em atendimentos domiciliares, e tem, entre outros objetivos, o propósito de promover a minimização de resíduos, reduzir a incidência de acidentes ocupacionais e contribuir para a redução dos índices de infecção em serviços de saúde. Segundo resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA nº 5, de 5 de agosto de 1993 (DOU do dia 31 de agosto de 1993), são considerados resíduos biológicos todos os resíduos que possuam agentes biológicos, ou outros que se apresentem contaminados por eles, que possam trazer riscos à saúde pública e ao meio ambiente, tais como materiais descartáveis que tenham entrado em contato com quaisquer fluidos orgânicos, bem como materiais perfurocortantes contaminados com agentes biológicos.

Ao se pensar em um inquérito sorológico canino, onde a coleta de sangue seja por punção venosa, algumas questões devem ser consideradas, a saber:

- A equipe envolvido na coleta vem fazendo isso durante anos por punção auricular. Uma mudança radical, em uma situação que requer uma certa urgência, pode significar uma possível solução de continuidade nos serviços;
- O risco de acidentes de trabalho tende a aumentar significativamente, tanto em relação a agressões pelos animais, quanto em acidentes com as agulhas ou prováveis tubos de coleta quebrados;
- O acondicionamento e transporte do material coletado requerem cuidados especiais para que não haja quebra dos tubos, nem hemólise do material, o que prejudicaria os resultados nos testes, significando perda de dados;
- Os resíduos biológicos gerados por este serviço também requerem cuidados especiais, uma vez que as seringas e agulhas representam um risco em potencial de infecções, bem como os coágulos produzidos.

As questões levantadas acima podem ser evitadas ao se utilizar o método de coleta testado neste trabalho.

Comparando os resultados obtidos nos dois testes e analisando o grau de discordância e concordância entre eles, observa-se que:

- A IFI utilizando papel de filtro é de fato uma técnica pouco específica, uma vez que ao compará-la com a mesma técnica utilizando soro, houve uma discordância de 10% em relação a falso-positivos (Figura 19).
- Dos 39 cães examinados pelo ELISA S7, 6 foram negativos (Tabela 2). Quando comparamos com os resultados obtidos pela IFI, percebe-se que desses negativos, três cães também foram negativos nesta técnica; dos 3 restantes, um deles apresentou um título de 1/80 na IFI (Tabela 3), talvez um título muito baixo para estabelecer um diagnóstico. Trata-se de um cão assintomático,

apresentando apenas uma HEM que pode ter uma outra origem que não o calazar. Os outros dois cães tiveram um título de 1/640 na titulação; um deles era completamente assintomático, inclusive no exame *post-mortem*, levando a supor que o ELISA S7, foi de fato mais específico, sendo o resultado da IFI um falso-positivo; (testes de Elisa negativos praticamente afastam a possibilidade de calazar). O outro porém, apresentava clínica característica do calazar e HEM, o que demonstra uma falha no ELISA S7, seja por alguma falha técnica (embora pouco provável) ou pelos níveis baixos de anticorpos específicos contra a HSP70 decorrente de uma baixa resposta imunológica. As amostras com resultados discordantes eram, em dois casos, negativas em ELISA S7 e “borderline” na IFI (tomadas como reações inconclusivas neste teste, e por recomendação do Ministério da Saúde, esses cães devem ser eliminados). Como os cães não apresentavam qualquer sinal da doença, as amostras foram consideradas negativas, atribuindo-se ao ELISA S7 os resultados corretos. Uma segunda amostra positiva em IFI, com título baixo (1:80), também foi negativa em ELISA S7 e correspondia a outro cão sem sinais da doença. Assim, mais uma vez, a amostra foi considerada negativa e o resultado do ELISA S7 correto. Por fim, para a última amostra positiva em IFI (título de 1:640) e negativa em ELISA S7, a situação inverteu-se, com o cão apresentando sinais claros de calazar. Desta vez o resultado do ELISA S7 foi considerado como falso-negativo.

- Em relação a sensibilidade e especificidade do ELISA S7, de acordo com a tabela 3, encontramos uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 90%. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Andrade (1997) e Braga *et al.* (1998).

Dos métodos sorodiagnósticos disponíveis a IFI foi adotada pelo Ministério da Saúde pelo custo baixo e pela disponibilidade de uma rede de técnicos familiarizados com este método no país. Entretanto, a especificidade do teste está longe de ser a desejável, o que implica na eliminação de um elevado número de cães sem infecção, todo ano, pelos agentes das campanhas de controle do calazar. A

eliminação de cães com aspecto normal tem sido um problema crescente, principalmente devido a reação contrária por parte dos proprietários. A impossibilidade de realizar o teste em campo e o preço do equipamento de análise são dois fatores adicionais que vêm limitando o uso da técnica, além de implicarem em limitação de estoques e em um longo tempo entre a coleta e a eliminação do cão soropositivo.

Os principais fatores que devem ser levados em consideração são a alta sensibilidade/especificidade do teste, com uma elevada capacidade de reprodutibilidade dos resultados obtidos, o que não se consegue quando se utiliza a IFI. Nesta última técnica uma variabilidade nos resultados é obtida em virtude de muitos fatores, indo desde a qualidade do microscópio utilizado até o preparo profissional do responsável pelo diagnóstico, uma vez que a leitura da IFI é muito subjetiva, levando assim a resultados falso-positivos ou falso-negativos. Os resultados do ELISA S7 são feitos por um microfotômetro (leitor de ELISA), o que permite precisão no diagnóstico.

O teste de ELISA utilizando uma proteína recombinante oferece ainda a vantagem de poder ser produzido em grande escala, sem necessitar do cultivo de parasitas, uma vez que utiliza a técnica de clonagem para produção do mesmo; adicionalmente a bactéria utilizada para expressão da proteína não apresenta nenhum risco para o meio ambiente.

Em relação ao custo-benefício da implantação da técnica de ELISA S7, a aquisição dos “kits” de diagnósticos tem aproximadamente os mesmos custos dos “kits” de imunofluorescência. Com a descentralização das ações de saúde do nível federal para estadual e municipal, ocorre o repasse de verbas permitindo assim o fim do monopólio no fornecimento de “kits” de diagnóstico para o calazar canino. É certo que a aquisição de leitores de ELISA representa um alto investimento para os estados e municípios. Mas, além de terem um menor valor de compra em relação aos microscópios de imunofluorescência, a manutenção dos mesmos é menos onerosa.

Outras técnicas sorológicas têm sido propostas para implantação no inquérito sorológico canino. A reação de cadeia em polimerase (PCR) possui a desvantagem de ter um custo muito elevado e exigir condições especiais para que não haja risco de contaminação. O DAT, além de ser trabalhoso em relação a produção de

antígeno, trabalha com diluição seriada, e necessita de várias horas para a liberação dos resultados; apesar do DAT ser utilizado fora do país há pelo menos 15 anos no diagnóstico canino e humano (Harith *et al.*, 1986), no Brasil ainda não se conseguiu obter uma reprodutibilidade dos resultados para cães. Garcez *et al.* (1996) obtiveram bons resultados quando utilizaram o DAT no diagnóstico humano, mas concluíram que não é a melhor opção em inquéritos sorológicos caninos, apresentando uma especificidade menor que o ELISA convencional, e especialmente a IFI, na detecção dos anticorpos. Alexandrino (2001) obteve uma boa resposta do DAT no diagnóstico canino utilizando um antígeno liofilizado, mas admite que ainda há muitas questões que precisam ser melhoradas para que esta técnica seja adotada no inquérito canino.

Os métodos de imunoensaio são em geral mais quantitativos, versáteis e adaptáveis que as demais técnicas sorológicas (Reed, 1996).

Neste trabalho, foi possível demonstrar a aplicabilidade da proteína HSP70 como uma ferramenta importante no diagnóstico do calazar canino na técnica de ELISA recombinante, atendendo assim uma das exigências do Ministério da Saúde em utilizar uma técnica que fosse prática, tão sensível quanto específica, e que não mais utilizasse papel de filtro (Costa e Vieira, 2001); foi possível também apresentar uma técnica de coleta de sangue canino prática e aplicável à rotina do inquérito sorológico canino.

A associação do método de coleta proposto com a técnica de ELISA S7 pode representar grande avanço no controle da leishmaniose visceral.

## 6 – CONCLUSÕES

Através dos trabalhos realizados, foi possível concluir que:

- A coleta de sangue por punção auricular e armazenamento em microtubos, com a solução de imunoabsorção, mostrou ser prática, eficiente e aplicável à rotina do inquérito sorológico canino;
- Os benefícios proporcionados utilizando-se uma técnica sensível e específica, como o ELISA S7, aliados às exigências do Ministério da Saúde de mudanças no atual sistema de diagnóstico do calazar canino, compensam o investimento necessário para a implantação da técnica.
- A implantação da técnica ELISA S7 na rotina do inquérito sorológico canino representa uma excelente ferramenta no Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, e pode significar um grande avanço em busca do tão desejado controle da leishmaniose visceral canina.

## **7 – INFRA-ESTRUTURA**

Para realização deste trabalho contou-se com a infra-estrutura do Laboratório do Hospital de Glória do Goitá, na etapa de coleta de sangue, para centrifugar e separar os soros. Do Laboratório de Endemias – LACEN / PE para os testes de imunofluorescência; e do Laboratório de Genética Molecular do Depto. de Genética da UFPE em parceria com a Biogene Ind. e Com. Ltda. para realização dos Testes de ELISA S7.

## **8 – FONTES DE FINANCIAMENTO**

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação Volkswagen (Alemanha) na realização dos testes sorológicos pelo ELISA S7, em uma parceria com o Laboratório de Genética Molecular do Depto. de Genética da UFPE e Biogene Ind. e Com. Ltda. que cedeu o “kit” de coleta, e todo o material necessário para o processamento das amostras. Para os trabalhos de campo e laboratoriais na realização da Imunofluorescência, contou-se com o apoio da Fundação Nacional de Saúde e do LACEN/SES-PE; durante as atividades realizadas em Glória do Goitá todo o apoio daquele município quanto a alimentação e hospedagem foi obtido.

## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISA, MJ *et al.* Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58(2), 154-159, 1998.

ALBERTS, B. *et al.* Biologia molecular da célula. 3. Ed. Artes Médicas, 1997.

ALENCAR, JE. Calazar Canino. **Imprensa Oficial**, Fortaleza, 1959.

ALENCAR, JE *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI. **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.706-717. 1991.

ALEXANDRINO, AC. Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil, 2001.

ANDRADE, C.R. *et al.* Use of recombinant HSP-like polypeptides in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 85: 92. 1990.

ANDRADE, CR *et al.* Recombinant Leishmania Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not by chagas' disease patients. **J. Clin. Microbiol.** 30: 330 – 335, 1992.

ANDRADE, CR. Resposta Imune anti-proteínas de choque térmico na leishmaniose visceral. **Tese de Doutorado em Medicina Tropical**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. 1997.

ANDRADE, CR; ANDRADE PP. Recombinant *Leishmania* proteins in the diagnosis of human kala azar *IN* "Research and control of leishmaniasis in Brazil", Edit. S. Brandão Filho, **Fundação Oswaldo Cruz/CpqAm**, 217-227, 1993.

ANDRADE PP; ANDRADE CR. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. *IN* "Stress protein in medicine". Edit W. Van Eden, **Marcel Dekker Publish. Co.** N.Y., EUA, 308-326, 1996.

ANDRADE, PP. <http://www.prodiase.com.br/informativo.html> (1997).

ANDRADE, PP. *et al.* *Leishmania* recombinant heat shock protein in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, *IN* "Research and control of leishmaniasis in Brazil", Edit. S. Brandão Filho, **Fundação Oswaldo Cruz/CpqAm**, 129-206, 1993.

ANDRADE, PP. *et al.* ELISA using recombinant leishmanial heat shock proteiin in the diagnosis of canine kala-azar. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 91, Suppl., 1996.

ANDRADE, PP. *et al.* Assessment of a Recombinant *Leishmania* Hsp70 ELISA for the Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 93, Suppl II, pag 217. Nov. 1998.

ANDRADE, PP. Eco-epidemiologia das leishmanioses e da doença de Chagas em Pernambuco; uma abordagem molecular. **Projeto de pesquisa encaminhado ao CNPq.** 3 pp. 1998.

ANSTEAD GM *et al.* Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infect. Immun.** 69(8):4709-4718, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

[http://www.anvisa.gov.br/consulta/48\\_2000.htm](http://www.anvisa.gov.br/consulta/48_2000.htm)

ARAÚJO, FG e MAYRINK, W. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II studies on the specificity of the test. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 10: 41- 45, 1968.

ASHFORD RW et al. Estimation of population at risk of infection and numbers of cases of Leishmaniasis. **Parasitol. Today.** 8: 104-5. 1992.

ASHFORD, DA. *et al.* Validation of the fast elisa for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 62 , pp 1-8, 1993.

ASHFORD DA. *et al.* Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 48(1):1-8, 1993.

BIANCO AE. *et al.* A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock protein 70 of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 83 (22): 8713 – 8717, 1986.

BITTENCOURT, AL; BARRAL-NETO, M. Leishmaniasis. In: **Trop. Pathol.** 2 ed. Germany: Springer Verlag, V.8., p. 597-651.) 1995.

BRAGA, MDM *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagente por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagente por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 31 (5): 419-424, 1998.

BRANDÃO, SPF. Research and Control of Leishmaniasis in Brazil. Proceedings of a workshop held in Recife, Brazil, **Fundação Oswaldo Cruz**, 1993.

CAMARGO, ME; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 18:500-505, 1969.

CASTRO, AG *et al.* Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Visceral (calazar) **Fundação Nacional de Saúde**, Brasília, 1996.

CESSE, E.A.P. Expansão e Urbanização da Leishmaniose Visceral: Estudo Epidemiológico do Processo de Transmissão Ativa em área Urbana – Petrolina/PE 1992-1997. **Dissertação de Mestrado**. 175 f. Recife, 1999.

CHAGAS, E. *et al.* Leishmaniose visceral americana (nova entidade mórbida do homem da América Latina) – relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada dos estudos de leishmaniose visceral americana em 1937. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V.33, n. 1, p. 89-229, 1937.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

<http://www.mma.gov.br/port/conama/>

CORONATO, S. *et al.* Biología de las proteínas del shock termico. **Medicina** (Buenos Aires) 59: 477-486, 1999.

COSTA, CA *et al.* Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 24:21-25, 1991.

COSTA CH, VIEIRA JB. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 34(2):223-8, 2001

COSTA CH *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.** 182(3):997-1000, 2000.

COSTA, CHN *et al.* Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 93, 464. 1999.

COSTA, CN *et al.* Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. de saúde pública**, São Paulo, V.24, n.5, p. 361-372, out. 1990.

DEANE, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Serviço nacional de Educação Sanitária**, Rio de Janeiro, 161 p. 1956.

DEANE LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. **Tese de Livre-Docência**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956.

DEANE LM; DEANE MP. Observações preliminares sobre a importância do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **Hospital**. 48:61-70, 1955.

DEANE LM; DEANE MP. Encontro de leishmania nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**. 45: 419. 1964.

DENEROLLE P.; BOURDOISEAU G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). **J. Vet. Intern. Med.** 13(5):413-5, 1999.

DUARTE, FFB *et al.* Análise da distribuição dos casos de leishmaniose visceral na área urbana do município de Petrolina, 1955-1996. 28p **Monografia** (Curso de Especialização em Epidemiologia e Controle Descentralizado de Endemias). NESC/CPqAM/FIOCRUZ. Recife, 1997.

EDEN, WV; YOUNG, DB. Stress Proteins in Medicine. **Marcel Dekker Publish. Co.** N.Y., EUA, 1996.

ELLIS, RJ. Stress Proteins as molecular chaperones *IN* "Stress Proteins in Medicine". Edit W. Van Eden, **Marcel Dekker Publish. Co.** N.Y., EUA, 1-26, 1996.

El Safi, SH. *et al.* A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 83, 334-337, 1989.

ENGMAN DM. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra- strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. **Mol. Biochem. Parasitol.** 22 (2-3): 115-123, 1987.

GARCEZ, LM. *et al.* Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 29 (2): 165-180, 1996.

GARG, YK *et al.* Post-kala-azar dermal leishmaniasis in Nepal. **Int. J. Dermatol.** 40(3):179-184, 2001.

GENARO, O. *et al.* Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte. MG. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 23, 121. 1989.

GENARO, O. - Leishmaniose visceral canina experimental. **Tese de Doutorado.** ICB, UFMG. Belo Horizonte – MG, Brasil. 1993.

GENARO, O. *et al.* Evaluation of the immunochromatography assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. a prospective study on experimentally infected dogs with leishmania chagasi **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 91, Suppl., 1996.

GONÇALVES, AJR *et al.* Calazar: relato de três pacientes adultos internados no HSE/INAMPS (RJ). Considerações sobre esta endemia de grande importância no nosso território. **Arq. Bras. de Med.** V.60, n.5, p. 369-376, set./out. 1986.

GOMES, YM *et al.* Serodiagnosis of chronic chagas infection by using EIE-recombinant- Chagas- Biomanguinhos – KIT. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 96 (4) : 497-501.2001.

\_\_\_\_\_. GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – MINISTÉRIO DA SAÚDE, **FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE**, 4ª ed., Cap. 5.17, Brasília, 2000.

GUIMARÃES, MC. Coleta de sangue em papel de filtro para fins de inquéritos soroepidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 17:17-45, 1984.

GUIMARÃES, MC *et al.* Avaluation of DOT- Enzyme-linked immunossorbent assay for Mucocutaneus leishmaniasis and comparison with microplate enzyme imunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, 24:364-367, 1986.

GUIMARÃES, MC *et al.* Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 20 (1): 55-58, 1987.

HARITH, AE *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 80, 583-587, 1986.

HEDSTROM R. *et al.* A major immunogen in *Shistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein HSP70. **J. Exp. Med.** 165 (5): 1430-1435, 1987.

JAH, T.K. *et al.* Use of anphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 52:536-538. 1995.

KEENAN, C.M *et al.* Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. **Vet. Pathol.** 21:74-79. 1984

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 1: 37-42. 1990.

LAINSON R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 77, p. 569-596. 1983.

LAINSON R. *et al.* American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 81 (3): P 517. 1987.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericine B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.** 42 (4), 170-5, 2001.

LEITE, G. Leishmaniose visceral – 1ª parte: prêmio, histórico e epidemiologia. **Rev. Bras. de Med.**, v. 15, n. 9, p. 665-670, set. 1958.

LOWRY OH, Rosebrough NJF. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**;193:265-8, 1951.

MacFarlane J. *et al.* Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70 Kda heat shock protein family. **Eur. J. Biochem.** 190: 377-384, 1990.

MAK, P. The HSP70 Chaperone System.

<http://pps98.cryst.bbk.ac.uk/assignments/projects/mak/main.htm> (1998).

MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82: 566, 1988.

MARZOCHI, MC *et al.* Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cad. de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MARZOCHI, MCA *et al.* Leishmaniose tegumentar americana. In: **Parasit. Med.** Cimerman, B. e Cimerman, S. São Paulo: Ed. Atheneu, 375 p. 1999.

MEINECKE CK. *et al.* Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**. 104(5):E65,1999.

MELO, MA. Ensaio Clínico Terapêutico na leishmaniose visceral canina. Imunoquimioterapia em animais assintomáticos. Belo Horizonte-MG, Brasil. Escola de Medicina Veterinária da UFMG, 74p. **Dissertação de mestrado**, 1998.

MOMEN, H *et al.* *Leishmania infantum*, the ethiological agent of the American visceral leishmaniasis (AVL)? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 82 (3): 447-448, 1987.

MONTEIRO, PS *et al.* Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** , 27 (suplemento III): 67-72, 1994.

NENE V. *et al.* Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. **Mol. Biochem. Parasitol.** 21 (2): 179-188, 1986.

NEOGY, AS *et al.* Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot análisis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 47 (6), 772-777, 1992.

NUNES VL. *et al.* Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 34(3):299-300, 2001.

NUNES VLB, *et al.* Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 8 (1/2): 17-21, 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE <http://www.who.int/home-page> . 2001.

PRATA, A. Treatment of Kala-azar with amphotericin B. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 57:266-268. 1963.

PESSÔA, SB; MARTINS, AV. Gênero *Leishmania*. In **Parasit. Med.**. 11<sup>a</sup> Ed., pp 66-77, 1988.

QUEIROZ, AFS. Avaliação do potencial vacinal da hsp70 de *Leishmania chagasi* em cães. **Dissertação de Mestrado**, UFPE, 81 p., 2001.

RAMOS-SANTOS *et al.* Visceral leishmaniosis caused by *Leishmania (L.) mexicana* in a Mexican patient with human immunodeficiency virus infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 95(5), 1998.

REED, SG. Diagnosis of leishmaniasis. **Clinics in Dermatology.** 14; 471-478, 1996.

SANTA ROSA ICA; OLIVEIRA ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clín. Veterinária** 2: 24-28, 1997.

SANTOS, ESC. Biogene produtos biotecnológicos. <http://www.biogene.ind.br>. 2001.

SANTOS, SO *et al.* Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**;12(3):315-7, 1998.

SCHLEIN, Y *et al.* *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89(20): 9944-9948, 1992.

SEMIÃO-SANTOS SJ. *et al.* Reliability of serological methods for detection of leishmaniasis in portuguese domestic and wild reservoirs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 91(6): 747-750, 1996.

SHERLOCK, IA *et al.* Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 79 (4):511.1984.

SILVEIRA, ST *et al.* Leishmaniasis in Brazil. XVIII Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of amazonian visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 76: 830-832. 1982.

SUCEN – SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS -

<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm> (2001)

SUS – Sistema Único de Saúde

<http://www.saude.mt.gov.br/index07main02a1.html>

THOMAZ SOCCOL, V. *et al.* Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 68 (2): 107-108. 1993.

VALLADARES JE *et al.* Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. **Vet. Parasit.** 97 – 1, 2001.

VEXENAT JA *et al.* Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasit.** 77(1):71-3, 1998.

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

WU *et al.* A new developmentally regulated gene family in leishmania amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Mol. and Biochemical Parasit.** 110, 345-357, 2000.

YOUNG DG.; DUNCAN MA. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Am. Entomol. Inst.**, Associated Publishers, Gainesville, F1, 881 pp. 1994.

YUCKENBERG PD. *et al.* *Shistosoma mansoni*: protein composition na synthesis during early development; evidence for early synthesis of heat shock proteins. **Exp. Parasitol.** 63(3): 301-311, 1987.

ZHANG M. *et al.* Antibodies specif for heat shock proteins in human and murine malaria. **Microbes Infect.** 3(5): 363-7, 2001.

ZIJLSTRA EE; EL-HASSAN AM. Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis. **Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.** 95 :S59-S76, 2001.

*" Quando fixamos o nosso olhar nos  
obstáculos, é porque já perdemos de  
vista os objetivos. "*

*Henry Ford*