

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE MARCADOR GENÉTICO E SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO POR *Leishmania* sp. EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.

Juliano Rodrigues Sangalli, Cárís Maroni Nunes, Henrique Borges de Paula, Cristiana de Melo Trinconi, Valéria Marçal Felix de Lima, José Fernando Garcia – Inter-áreas -Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal - Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba.

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença sistêmica com uma variedade de sinais clínicos em cães e no homem. Neste processo parasítico, infecção não é sinônimo de doença, uma vez que a prevalência da infecção por *Leishmania* em uma área de endemicidade geralmente é mais alta que a soroprevalência e que a prevalência da doença, sugerindo um papel da genética do hospedeiro no desenvolvimento da doença.

Genes candidatos à resistência, tais como *Slc11a1* e MHC têm sido analisados em relação à leishmaniose canina (SOLLANO-GALLEGO et al., 2000). *Slc11a1* é um gene que codifica proteína envolvida no transporte de cátions divalentes/prótons sendo mais bem conhecido por sua designação antiga - NRAMP1 (VIDAL et al., 1993). Altet et al. (2002) mapearam este gene no cromossomo canino CFA37 e descreveram região promotora de 700 pares de base, 15 éxons, e um microssatélite polimórfico (TAAA) no íntron 1. Observaram que a *Slc11a1* é uma proteína de 547 aminoácidos, que possui 87% de semelhança com a proteína *Slc11a1* de outros mamíferos. Estes autores observaram ainda que havia diferença estatisticamente significativa no alelo 145 do microssatélite polimórfico do intron 1 entre cães resistentes e suscetíveis a leishmaniose visceral canina (LVC).

Objetivou-se avaliar a influência da genética no curso da LV em cães através de amplificação de um microssatélite polimórfico no íntron 1 do gene *Slc11a1*.

Desde 1998, o município de Araçatuba, localizado na Região Noroeste do estado de São Paulo, apresenta casos de leishmaniose visceral, tanto humana como canina. Após consentimento esclarecido dos proprietários, amostras de sangue de cães adultos (> 2 anos de idade), domiciliados, que foram atendidos no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” do Curso de Medicina Veterinária da UNESP-câmpus Araçatuba, bem como dos animais encaminhados para eutanásia junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba foram colhidas. Dados epidemiológicos como idade, sexo e raça foram coletados no momento da colheita de sangue. Considerando-se que não há dados prévios referentes à distribuição da frequência alélica na população canina, o tamanho da amostra foi calculado com base na prevalência da LVC no município de Araçatuba. Assim, o tamanho mínimo da amostra foi calculado em 162 cães, ao nível de confiança de 95%, precisão absoluta de 5% e prevalência esperada de 12% (LWANGA; LEMESHOW, 1991).

O microssatélite polimórfico no íntron 1 foi amplificado por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) usando-se os oligonucleotídeos descritos por Altet et al. (2002):

NRMICR11-F 5'-FAM-GAGTCTGCTTGAGATTCTCTC-3' e

NRMICR11-R 5'-TATCACCTCCACCCTTCAAAC-3'

A amplificação foi realizada em volume de 25 microlitros contendo 10 a 20 nanogramas de DNA genômico, 1.5mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 0.2mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido por 55°C por 30s, e 72°C por 30s, e uma extensão final a 72°C, por 7 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel capilar, em equipamento Mega Bace (GE®).

Para a avaliação da positividade para leishmaniose, um fragmento de DNA de kinetoplasto de *Leishmania* spp. foi amplificado, por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 13A (5'- GTC GGG GAG GGG CGT TCT -3') e 13B (5'- ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT -3'), descrito por Rodgers et al. (1990). A amplificação foi realizada em volume de 25 microlitros contendo 10 a 20 nanogramas de DNA genômico, 1.5mM de MgCl₂,

200mM de cada dNTP, 0.2mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen®). As amostras serão submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido por 63°C por 45 segundos, e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A amplificação de kDNA de *Leishmania* sp, por PCR, em amostras de sangue periférico de cães de área endêmica foi comparada com a frequência alélica do microsatélite e a associação foi testada por meio do teste exato de Fisher.

Das 77 amostras até então avaliadas, os alelos mais frequentes foram o 145 seguido do 149 e 141, enquanto Altet et al. (2002) relatam que o alelo mais frequentemente observado foi o 137, seguido do 141 e 145 numa população de 117 cães. Das amostras avaliadas, 50 foram positivas e 27 negativas para presença de kDNA de *Leishmania* sp. (Tabela 1).

Tabela 1- Resultado da avaliação de amplificação de DNA, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em amostras de sangue de cães segundo a positividade para *Leishmania* sp. e a frequência alélica do microsatélite do intron 1 do gene *Slc11a1*.

Alelo	Positivo		Negativo	
	N	%	N	%
133	1	0,7	1	0,7
137	1	0,7	0	0,0
141	13	8,4	23	15,0
145	40	25,9	20	13,0*
149	45	29,2	10	6,5*

* associação estatisticamente significativa ($P < 0,0001$)

No presente trabalho foi observada associação estatisticamente significativa entre a frequência de ocorrência dos alelos 145 e 149 e positividade para LVC. Altet et al. (2002) também observaram diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo 145 entre cães resistentes e suscetíveis, sendo mais frequente nestes últimos. Neste estudo, porém, os autores observaram que o alelo 145 foi observado em estado homozigoto na população suscetível, resultado este não observado no presente trabalho, particularmente por se tratar de trabalho em andamento, com número reduzido de amostras já analisadas.

Em estudo realizado por Sanchez-Robert et al. (2005) os autores observaram o alelo 145 como o mais frequente nos cães resistentes (81%) da raça Boxer e, principalmente, no estado homozigoto enquanto que os cães suscetíveis carregavam o alelo 141 (50%), todos heterozigotos (141/145). Em outras raças, o alelo 141 esteve igualmente distribuído entre cães suscetíveis e resistentes, indicando não relação genótipo-fenótipo. Entretanto, neste estudo também foram analisados três polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) e polimorfismo da região promotora (variação no número de Gs, de 7 para 9) em conjunto com o microsatélite polimórfico do intron 1, dificultando a comparação de resultados observados no presente estudo.

Os resultados obtidos até o momento indicam uma relação entre a genética do hospedeiro e o curso da doença, entretanto, maior número de amostras devem ser analisadas num futuro próximo para melhor comprovação desta hipótese.

Bolsa: FAPESP