

1 **EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA-P E MRP1 EM TECIDOS DE CÃES COM**  
2 **LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

3 *(P-GLYCOPROTEIN AND MRP1 EXPRESSION IN TISSUES FROM DOGS WITH*  
4 *VISCERAL LEISHMANIASIS)*

5  
6 **A. M. C. CALADO<sup>1\*</sup>, R. A. N. RAMOS<sup>2</sup>, R. J. CINTRA<sup>3</sup>, L. C. ALVES<sup>4</sup>, M. TINUCCI-**  
7 **COSTA<sup>5</sup>**

8  
9 **RESUMO**

10 Buscou-se avaliar a expressão por imuno-histoquímica da gp-P e MRP1 em amostras de  
11 tecidos de 24 cães com *Leishmania (L.) infatum chagasi*. Os resultados mostraram que a  
12 expressão da gp-P nas amostras LVC foi maior ( $p < 0,01$ ) em todos os tecidos em comparação  
13 ao grupo controle, com exceção da pele, que não diferiu. Entretanto, apenas as glândulas  
14 adrenais nas amostras LVC, em comparação as controle, expressaram significativamente mais  
15 MRP1 ( $p < 0,01$ ). As expressões de gp-P e MRP1 foram menores ( $p < 0,01$ ) no baço e pele das  
16 amostras LVC positivas, em comparação aos demais tecidos. Os resultados sugerem que a  
17 falha da cura parasitológica poderia ser devido à alta expressão da gp-P e MRP1 no fígado,  
18 adrenal e rins, por impedir a ação parasiticida dos fármacos recomendados no tratamento.

19  
20 **PALAVRAS-CHAVE:** Cão. Imuno-histoquímica. *Leishmania (L.) infatum chagasi*. MDR.

21  
22  
23  
24  

---

<sup>1\*</sup> Universidade Estadual Paulista, FCAV-Unesp-Jaboticabal. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Email: andreabelfort@hotmail.com.

<sup>2</sup> Università degli Studi di Bari.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco.

<sup>5</sup> Universidade Estadual Paulista, FCAV-Unesp-Jaboticabal.

25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

## 32 **SUMMARY**

33 The aim of this study was to evaluate the P-gp and MRP1 expression through the  
34 immunohistochemical technique in tissue samples from dogs infected with *Leishmania (L.)*  
35 *infatum chagasi*. The results showed that the expression of P-gp was higher ( $p < 0.01$ ) in all  
36 tissues of the positive animals, except in the skin. When analyzing the expression of MRP1, it  
37 was possible to detect a significant difference ( $p < 0.01$ ) only in the adrenal glands of the  
38 positive animals compared with the control group. Considering only the results of the positive  
39 animals it was observed that the gp-P and the MRP1 expression were significantly lower  
40 ( $p < 0.01$ ) in the spleen and skin than the other tissues. These findings suggest that the high P-  
41 gp and MRP1 expression in dog tissues may impair the suitable action of antileishmanial  
42 drugs making difficult the treatment of the disease.

43

44 **KEY-WORDS:** Dog. Immunohistochemical. *Leishmania (L.) infatum chagasi*. MDR.

45

46

## INTRODUÇÃO

47 As opções existentes de tratamento para leishmaniose visceral canina (LVC) não são  
48 satisfatoriamente efetivas e seguras, pois não elimina completamente o parasita (PARADIES  
49 et al., 2012). No entanto, diversos pesquisadores a indicam, pois induz a melhora clínica e  
50 pode atrasar a progressão da doença, além da redução da carga parasitária (RIBEIRO et al.,  
51 2013). O arsenal de drogas é limitado, constituindo um impedimento importante para o

52 controle da enfermidade, e o aparecimento de resistência aos medicamentos poderia  
53 comprometer a utilização dos mesmos (ROUGIER et al., 2012).

54 Um dos mecanismos que podem explicar a falta de eficácia dos fármacos e o  
55 desenvolvimento de resistência é a ativação das proteínas da família transportadoras ABC  
56 (ATP Binding Cassete), que promovem o efluxo de diferentes substâncias do interior da  
57 célula, abrangendo uma gama de medicamentos com diferentes estruturas e objetivos,  
58 surgindo então, o fenótipo MDR (resistência a múltiplas drogas) (SCHRICKX & FINK-  
59 GREMMELS, 2008).

60 A gp-P, primeira proteína do tipo ABC a ser descoberta, atua como uma bomba capaz  
61 de expulsar drogas do citoplasma de diferentes tipos celulares, limitando o efeito citotóxico  
62 das mesmas no seu local de ação (JULIANO & LING, 1976; STAVROVSKAYA, 2000).  
63 Está expressa em células tumorais e em tecidos normais de cães, tais como fígado, epitélio  
64 tubular renal, córtex da adrenal, epitélio do cólon e barreira hemato-encefálica (GIN, 1996).  
65 Fisiologicamente a gp-P tem como função impedir a absorção de compostos tóxicos  
66 (HENNESSY & SPIERS, 2007), interferindo na absorção, distribuição, metabolização e  
67 excreção de fármacos, com redução da biodisponibilidade da droga (ROULET et al., 2003).  
68 Outro mecanismo de MDR esta ligado a MRP (proteína associada à resistência a múltiplas  
69 drogas). Sabe-se que existe um total de 9 genes MRP, porém a mais estudada é a MRP1  
70 (BERGMAN, 2003; GOTTESMAN et al., 2002). Ela age aumentando o efluxo das drogas,  
71 resultando na redução do acúmulo intracelular das mesmas (LOE et al., 1996). O papel  
72 fisiológico da MRP1 envolve o transporte de compostos excretórios e eliminação de  
73 xenobióticos, além de mediação da resposta inflamatória. São amplamente expressas,  
74 principalmente em tecidos importantes para absorção, metabolismo e eliminação (LESLIE et  
75 al., 2005).

76 Este estudo teve como propósito investigar se a LVC poderia induzir resistência a  
77 múltiplas drogas em cães com infecção naturalmente adquirida, com a expectativa de que os  
78 resultados obtidos possam oferecer perspectivas de uma abordagem terapêutica mais segura e  
79 eficaz nesta doença, além de fornecer mais subsídios às autoridades de saúde pública.

80

81

## MATERIAL E MÉTODOS

82

83

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Unesp/Jaboticabal), sob número 007763/10.

84

85

86

87

88

89

90

Amostras de pele, rins, glândulas adrenais, fígado e baço foram obtidas de 24 cães com sorologia (Imunofluorescência indireta e ELISA) e imuno-histoquímica positivas para *Leishmania (L.) infantum chagasi*, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) das cidades de Caruaru e Petrolina, no Estado de Pernambuco, Brasil. Amostras de tecidos dos mesmos órgãos foram colhidas de três cães saudáveis, de área não endêmica, imediatamente depois de declarado o óbito por causas naturais, durante atendimento emergencial no Hospital Veterinário da UNESP, campus de Jaboticabal, SP, que serviram como controle das reações.

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

Os cães soropositivos para LVC, de sexos e idades variados, após passarem por exame físico, receberam uma aplicação de 4mg/kg de Cloridrato de Lidocaína (Cloridrato de Lidocaína 2%, Hipolabor, Brasil), como anestésico local, para coleta de amostras da pele na face interna da orelha, com auxílio de “punch” com diâmetro de 4mm. Após a coleta, receberam injeção letal de Thionembutal a 30% (Tiopental sódico – Abbot Laboratórios do Brasil) em dose suficiente para produzir parada cardíaca, conforme protocolos estabelecidos nos CCZs de Pernambuco, Brasil. Após a confirmação dos óbitos, realizaram-se as necropsias, durante as quais foram coletadas as amostras em frascos com solução de formol a 10% tamponado com fosfatos, na qual permaneceram por um período aproximado de 48 horas, sendo então transferidas para álcool 70°.

101 A expressão da MRP1 e gp-P foram pesquisados em cortes de 3 µm de espessura  
102 montados em lâminas pré-tratadas com Poly-L-lisina (Cód. P4832 - Sigma ChemicalCo., St  
103 Louis, MO EUA). As lâminas contendo os cortes foram colocadas em estufa a 60°C por 30  
104 minutos, seguindo-se os processos de desparafinização, hidratação e bloqueio da peroxidase  
105 endógena (peróxido de hidrogênio a 8% em metanol, por 30 minutos). A recuperação  
106 antigênica para o anticorpo anti-MRP1 (MRP1 – Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle,  
107 UK, Cód. NCL-MRP1) foi feita com tampão tris-EDTA (pH 9,0), em panela de pressão,  
108 cozendo por 5 minutos, e em tampão citrato (pH 6,0) pré-aquecido a 92° em banho-maria para  
109 gp-P, clone C494 (SignetLaboratories, Inc. Dedham, MA, USA, Cód. 8720-01) por 30  
110 minutos. Seguiu o bloqueio das reações inespecíficas (Leite em pó Molico<sup>R</sup>- Nestlé Brasil  
111 LTDA) por 30 minutos e a incubação (4°C) com os anticorpos primários MRP1 ou gp-P, nas  
112 diluições de 1:25 e 1:200, respectivamente, durante 18 horas. Subseqüentemente, as lâminas  
113 foram incubadas com o anticorpo secundário (Envision® - DAKO North América,  
114 Carpinteria) durante 60 minutos para a gp-P e com o sistema de detecção de polímeros  
115 (MACH 4 – Biocare Medical, Concord) durante 30 minutos para a MRP1. Finalmente, as  
116 reações foram reveladas pelo substrato cromogênico, 3,3 diaminobenzendina (Cód. SK4100 –  
117 DAB – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), contra coradas com a hematoxilina de  
118 Harris por um minuto, desidratadas e montadas.

119 Como controle positivo utilizou-se cólon canino e como controle negativo substituiu-se  
120 o anticorpo primário por imunoglobulina G de camundongo (Dako North America,  
121 Carpinteria).

122 A frequência das imunomarcações foi obtida através das contagens de 100 células do  
123 tecido, entre marcadas e não marcadas, com auxílio de um retículo micrométrico (Nikon, Inc.  
124 – Japan) em aumento de x400, em cinco campos por corte. Destes foram extraídas  
125 porcentagens de células marcadas em relação ao total.

126 Para avaliar a expressão entre os animais com LVC e do grupo controle, foi utilizado o  
127 teste de normalidade Jarque-Bera (JARQUE & BERA, 1987). E depois submetidos ao teste T  
128 ou Wilcoxon. Em todas as situações, o nível de significância considerado foi de  $p = 0,01$ .

129 Para análise dos dois marcadores apenas em tecidos com LVC empregou-se um teste  
130 não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, através da análise de variância de via única. Em  
131 seguida, foi realizado o teste de Tukey para comparar as médias entre os anticorpos (SSPS-  
132 SigmaStat 3.0<sup>®</sup>, Systat Software inc, San Jose, USA), considerando-se o nível mínimo de  
133 significância  $p \leq 0,05$ .

## 134 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

135 As amostras de fígado, baço, rins e adrenais dos 24 cães LVC positivos mostraram  
136 imunorreatividade aos anticorpos monoclonais anti-glicoproteína-P, clone C494, e anti-  
137 MRP1, clone MRP1. Todas as amostras de pele foram reativas ao clone MRP1, porém apenas  
138 21 delas ao C494. Também exibiram reatividade as amostras de cólon canino, sem alterações  
139 patológicas, que foram utilizados como controle positivo das reações, e todas as amostras dos  
140 animais do grupo controle. Embora estes clones tenham sido concebidos para uso em  
141 humanos e animais de laboratório, tecidos caninos também são reativos, como visto neste  
142 estudo e nos de Ginn (1996) e de Gerardi et al. (2014).

143 A localização da imunomarcagem da gp-P foi em membrana plasmática nas amostras de  
144 fígado, com total delineamento do hepatócito (figura 1), e no córtex das adrenais;  
145 citoplasmática e granular na polpa branca e vermelha do baço, na epiderme e glândulas  
146 sudoríparas e sebáceas e no epitélio tubular renal. A intensidade de coloração variou de  
147 moderada a intensa. Esses achados foram parcialmente congruentes ao descrito por Ginn  
148 (1996), que descreveu padrão de marcação semelhante em vários órgãos (fígado, glândula  
149 adrenal, cólon, rim, estômago, pâncreas, ductos das glândulas salivares), marcação não  
150 uniforme na epiderme, entretanto não obteve marcação em baço, discordando dos nossos

151 resultados. Diferenças nos procedimentos laboratoriais adotadas poderiam justificar a  
152 ausência de marcação no baço. Uma das possibilidades poderia estar relacionada a diferenças  
153 no sistema de recuperação antigênica. Enquanto Ginn (1996) utilizou um sistema enzimático,  
154 em nossa pesquisa utilizamos o calor. Além deste, o tipo e o tempo de fixação e  
155 armazenamento das amostras também poderiam interferir nos resultados, mas esses dados não  
156 foram detalhados na publicação.

157 Já na MRP1, todos os tecidos apresentaram marcação citoplasmática, de aspecto  
158 granular, com intensidade de coloração que variou de intensa a moderada (figura 2),  
159 semelhante ao que ocorre em tecidos humanos, onde é onipresente (BORST et al., 2000). Nos  
160 caninos sua expressão já foi assinalada em fígado, rim, intestino, pulmão, cérebro e testículo  
161 (CONRAD et al., 2001).

162 A porcentagem de células marcadas com o anticorpo gp-P nas amostras LVC positivas  
163 foram de 79,23%, 75,94%, 72,08%, 35,03% e 12,14%, nas adrenais, fígado, rins, baço e pele,  
164 respectivamente, ao passo que nas amostras controle a média foi de 0,73%, 3,49%, 21,13%,  
165 9,81% e 22,33%, nas adrenais, fígado, rins, baço e pele, respectivamente. Estatisticamente, a  
166 expressão foi significativamente maior ( $p < 0,01$ ) em todos os tecidos LVC positivos em  
167 relação ao grupo controle, com exceção da pele, que não diferiu. Variação na expressão da  
168 gp-P em tecidos humanos também foi identificada por Gottesman & Pastan (1993). Esses  
169 pesquisadores observaram que a expressão da gp-P pode variar de muito baixo a indetectável  
170 nas células epidérmicas, a níveis altos no córtex da adrenal e epitélio tubular renal.

171 A porcentagem média de células imunomarcadas para o anticorpo MRP1 nas amostras  
172 LVC positivas das adrenais foi de 79,21%; no fígado de 74,56%; nos rins de 70,09%; no baço  
173 de 37,43%; e de 28,67% na pele. Nas amostras controle foram de 53,13% nas adrenais,  
174 60,68% no fígado, 77,67% nos rins, 26,01% no baço, e de 14,93% na pele. Entretanto, apenas  
175 as amostras das glândulas adrenais nas amostras LVC positivas em comparação as amostras

176 controle expressaram significativamente mais MRP1 ( $p < 0,01$ ). E analisando em conjunto os  
177 resultados das imunomarcações apenas entre as amostras LVC positivas pode-se observar que  
178 a gp-P e a MRP1 apresentaram expressões significativamente menores ( $p < 0,01$ ) no baço e  
179 pele, em comparação aos demais tecidos testados, os quais não diferiram entre si.

180 Embora até o momento não existam trabalhos que correlacionem a expressão dessas  
181 proteínas em tecidos caninos, muito menos em cães com LV, esses resultados podem explicar,  
182 ao menos em parte, a redução da parasitemia cutânea de cães durante o tratamento com  
183 antimoniato associado ao alopurinol, bloqueando a transmissão de parasitos encontrados na  
184 pele para os flebotomíneos (DANTAS-TORRES et al., 2012).

185 Para alguns pesquisadores, há correlação positiva entre a carga parasitária em baço e  
186 pele com o estado clínico da doença, sendo este parâmetro importante no acompanhamento da  
187 terapia (FERRER et al., 1988; REIS et al., 2006). Esses mesmos órgãos foram considerados  
188 os principais sítios de localização e proliferação da LVC, e em menor intensidade o fígado  
189 (ALVES et al., 2009). Outros pesquisadores comentam que nos rins e glândulas adrenais, o  
190 parasita também não é facilmente encontrado (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004).  
191 Todavia, para Reis et al. (2006) o baço e a pele de orelha são mais intensamente parasitados,  
192 independente da sintomatologia clínica.

193 Como a pele apresenta baixa expressão desses marcadores de resistência a múltiplas  
194 drogas, é possível que os fármacos antiprotozoários administrados corretamente exerçam  
195 atividade parasiticida eficiente na pele. Talvez por isso, o cão durante o tratamento apresente-  
196 se negativo nos testes que pesquisam a parasitemia cutânea, tendo em vista que alguns  
197 fármacos podem proporcionar em torno de 93% de cura clínica, como no caso da anfotericina  
198 B. Todavia, a interrupção ou falha na administração dos fármacos proporciona a reincidência  
199 da parasitemia cutânea (RIBEIRO & MICHALICK, 2001). Isto sugere que durante o  
200 tratamento, o parasita possa ficar albergado em outros órgãos, possivelmente nos que

201 expressem elevados níveis desses marcadores de resistência a múltiplas drogas, nos quais os  
202 fármacos não conseguem atingir concentrações suficientes para exercerem sua atividade.

203 Mesmo com a cura clínica, até o momento não existe a cura parasitológica no cão  
204 (PARADIES et al., 2012) e apesar da baixa densidade parasitária no fígado, adrenal e rins, foi  
205 verificado neste trabalho que estes órgãos apresentaram maior expressão da gp-P em  
206 comparação com o grupo controle, enquanto a MRP1 apenas nas glândulas adrenais. Isto  
207 sugere que nestes órgãos os fármacos leishmanicidas não consigam exercer sua atividade,  
208 favorecendo a permanência do parasita no interior da célula e, conseqüentemente, a não  
209 erradicação da doença no cão.

210 Estudos posteriores poderiam ser realizados, como a análise desses marcadores em  
211 tecidos de cães sob tratamento para LVC, muito embora possam existir outros fatores que  
212 podem influenciar na resistência a fármacos, tais como o aparecimento de cepas resistentes; a  
213 presença de homólogos desses marcadores na *Leishmania (L.) infantum chagasi* e a própria  
214 resposta imunológica do cão.

215 Os resultados deste estudo, nas condições em que foi desenvolvido, permitiram mostrar  
216 que a presença dessas bombas de efluxo em células do fígado, das glândulas adrenais e dos  
217 rins, principalmente, podem favorecer o parasita na sua sobrevivência contra os fármacos  
218 anti-leishmania.

219

220

221

222

223

224

225

226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249

### REFERÊNCIAS

ALVES, C. F.; AMORIM, I. F. G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R.; ALVES, C. F.;  
MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.;  
TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in  
limph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally  
infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and  
Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.

BERGMAN, P. J. Mechanisms of anticancer drug resistance. **The Veterinary Clinics of the  
North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 651-667, 2003.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJINHOLDS, J. A family of drug transports: the  
multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n.  
16, p. 1295-1302, 2000.

CONRAD, S.; VIERTELHAUS, A.; ORZECOWSKI, A.; HOOGSTRAATE, J.;  
GJELLAN, K.; SCRENK, D.; KAUFFMANN, H. M. Sequencing and tissue distribution of

250 canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 81-91,  
251 2001.

252

253 DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALEGO, L.; JANETH, G.; RIBEIRO, V. M.;  
254 CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds:  
255 unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

256 FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D.  
257 Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase  
258 staining. **Research in Veterinary Science**, v. 44, n. 2, p. 194-196, 1988.

259

260 GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVEIRA, A. C. T.; MORO, J. V. Expression of  
261 P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, glutathione-S-transferase pi and p53  
262 in canine transmissible venereal tumor. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1,  
263 p. 71-78, 2014.

264

265 GINN, P. E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and  
266 paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 5,  
267 p. 533-543, 1996.

268

269 GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-  
270 dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n.1, p. 48-58, 2002.

271

272 GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the  
273 multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 385-427, 1993.

274

275 HENNESSY, M.; SPIERS, J. P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug  
276 transporter. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 1, p. 1–15, 2007.  
277

278 JARQUE, C. M.; BERA, A. K. A test for normality of observations and regression residuals.  
279 **International Statistical Review**, v. 55, n. 5, p.163–172, 1987.  
280

281 JULIANO, R. L.; LING, V. A. A surface glycoprotein modulating drug permeability in  
282 Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, n. 1, p. 152-  
283 162, 1976.  
284

285 LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-  
286 glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied**  
287 **Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 216-237, 2005.  
288

289 LOE, D. W.; ALMQUIST, K. C.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Multidrug resistance protein  
290 (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane  
291 vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. **Journal of Biological**  
292 **Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 9675-9682, 1996.  
293

294 PARADIES, P.; SASANELLI, M.; AMATO, M. E.; GRECO, B.; DE PALO, P.; LUBAS, G.  
295 Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval  
296 time using four different treatment protocols for canine leishmaniosis in an endemic area.  
297 **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 843-847, 2012.  
298

299 REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.;  
300 MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-  
301 OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated  
302 with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary**  
303 **Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

304

305 RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose  
306 visceral canina. **Revista Nosso Clínico**, v. 4, p. 10-20, 2001.

307

308 RIBEIRO, V. M.; SILVA, S. M.; MENZ, I.; TABANEZ, P.; NOGUEIRA, F. S.;  
309 WERKHAÜSER, M.; FONSECA, A. L. S.; DANTAS-TORRES, F. Control of visceral  
310 leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 8, p.  
311 1-2, 2013.

312

313 ROUGIER, S.; HASSEINE, L.; DELAUNAY, P.; MICHEL, G.; MARTY, P. One-year  
314 clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine  
315 leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n.3-4, p. 245-253, 2012.

316

317 ROULET, A.; PUEL, O.; GESTA, S.; LEPAGE, J. F.; DRAG, M.; SOLL, M.; AVINERIE,  
318 M.; PINEAU, T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-  
319 glycoprotein substrate ivermectin. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 2-3, p.  
320 85-91, 2003.

321

322 SCHRICKX, J. A.; FINK-GREMMELS, J. Implications of ABC transporters on the  
323 disposition of typical veterinary medicinal products. **European Journal of Pharmacology**, v.  
324 585, n. 2-3, p. 510-519, 2008.

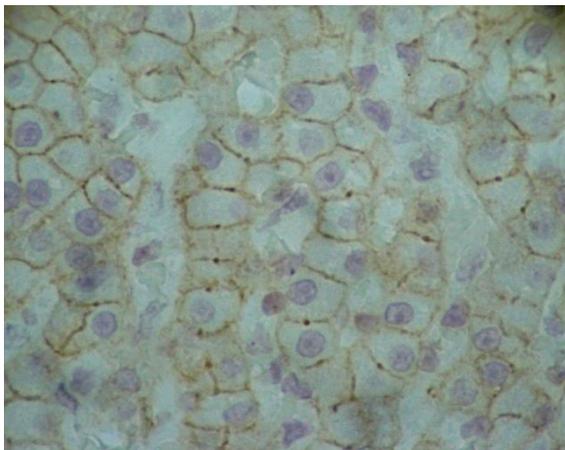
325

326 STAVROVSKAYA, A. A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells.  
327 **Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 95-106, 2000.

328

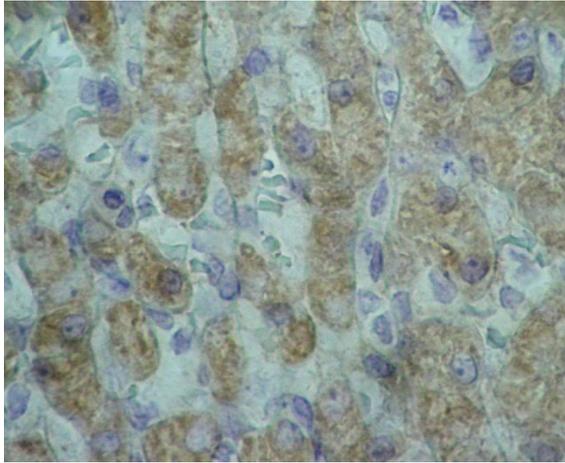
329 TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.;  
330 MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for  
331 detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of**  
332 **Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

333



334

335 **Figura 1:** Fotomicrografia de fígado de cão com LVC, imunomarcado pelo anticorpo anti-  
336 glicoproteína-P (clone c494), onde podemos ver marcação de membrana com total  
337 delineamento do hepatócito. Reação imuno-histoquímica, método ABC, contracoloração  
338 hematoxilina de Harris. Obj. 40x.



339

340 **Figura 2:** Fotomicrografia de fígado de cão com LVC, imunomarcado pelo anticorpo anti-  
341 MRP1 (clone MRP1), onde podemos ver marcação citoplasmática granular no hepatócito.  
342 Reação imuno-histoquímica, método ABC, contracoloração hematoxilina de Harris. Obj. 40x.