



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

GUILHERME MARX DE OLIVEIRA

**USO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA DETECÇÃO
DE DNA PARASITÁRIO E NO ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA EM DIFERENTES
FRAGMENTOS TECIDUAIS DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis***

Rio de Janeiro

2013

Uso de técnicas moleculares na detecção de DNA parasitário e
no estudo da variabilidade genética em diferentes fragmentos
teciduais de cães naturalmente infectados por *Leishmania*
(Viannia) braziliensis

Guilherme Marx de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas para obtenção do grau de
Mestre em Ciências

Orientadoras: Dra. Raquel da Silva Pacheco

Dra. Maria de Fátima Madeira

Rio de Janeiro

2013

GUILHERME MARX DE OLIVEIRA

Uso de técnicas moleculares na detecção de DNA parasitário e
no estudo da variabilidade genética em diferentes fragmentos
teciduais de cães naturalmente infectados por *Leishmania*
(Viannia) braziliensis

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas para obtenção do grau de
Mestre em Ciências

Orientadoras: Dra. Raquel da Silva Pacheco

Dra. Maria de Fátima Madeira

Aprovada em 28/02/2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fabiano Borges Figueiredo (Presidente)

Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Dr. Paulo Murillo Neufeld

Doutor em Saúde Pública
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Fernanda Santos Oliveira

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Aos meus pais, José Carlos e Karin, que não pouparam esforços para que eu chegasse até aqui. Nunca poderei expressar a minha gratidão por tudo.

Às minhas irmãs, Clarice e Maria Julia, vocês foram minhas inspirações nas horas de estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar em minha vida e me amparar nos momentos de angústia.

Agradeço a toda minha família, especialmente meus tios Augusto e Kathia pelo incentivo e oportunidade de crescimento. À minha avó Victoria, meu muito obrigado pelo apoio nas horas que tanto precisava. Vocês fazem parte de todas as minhas conquistas!

Agradeço a Dra. Raquel da Silva Pacheco pela excelente orientação todos esses anos na Fiocruz, por sua confiança e incentivo desde o período de Iniciação Científica. Agradeço por sua paciência e respeito durante todos esses anos. Meu muito obrigado!

À Dra. Maria de Fátima Madeira, por sempre me receber no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses e esclarecer minhas dúvidas e também pelo apoio prestado durante todas as fases desse trabalho.

À Dra. Fernanda Santos de Oliveira pelas orientações e sugestões durante a Iniciação Científica e finalização dessa dissertação.

Ao Dr. Fabiano Figueiredo, pelas avaliações dos meus seminários durante o mestrado e suas valiosas sugestões.

Ao Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, pelos esclarecimentos a respeito dos programas estatísticos usados nesse trabalho.

À Marize Quinhones Pires pela ajuda prestada durante os procedimentos laboratoriais e ter me ensinado técnicas desde o meu primeiro dia no Laboratório de Sistemática Bioquímica.

À Priscilla Sá, por sempre tirar minhas dúvidas pacientemente durante o curso de mestrado no IPEC.

À Fundação Oswaldo Cruz, pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Kinder do Brasil (IKB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro para realização do projeto.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais bonita ou uma concha mais lisa que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

Oliveira, G M. **Uso de técnicas moleculares na detecção de DNA parasitário e no estudo da variabilidade genética em diferentes fragmentos teciduais de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Rio de Janeiro, 2013. 51 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), em cães, costuma estar associada à resposta humoral baixa ou mesmo negativa, o que inviabiliza os métodos sorológicos convencionais, como ferramenta única no diagnóstico. A busca por métodos mais sensíveis no diagnóstico tem avançado muito com o emprego de métodos moleculares, e a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem fornecido inúmeros resultados fundamentais nos estudos epidemiológicos. Métodos convencionais de diagnóstico parasitológico, não têm sido capazes de detectar a presença do parasito em outros sítios anatômicos diferentes da lesão cutânea, em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Diante dos questionamentos sobre o papel do cão doméstico no ciclo de transmissão da LTA e sobre o valor de métodos diagnósticos aplicados na rotina, principalmente em áreas de sobreposição da forma tegumentar e visceral, faz-se necessário a avaliação desses animais sob diversos aspectos. O presente estudo teve como objetivo empregar a PCR específica associada à hibridização molecular e a técnica da reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência (LSSP-PCR) visando detectar a presença de DNA parasitário e investigar a variabilidade genética de populações parasitárias presentes em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis*. Os animais foram selecionados entre os cães sororeatores para *Leishmania* procedentes de cidades do estado do Rio de Janeiro e encaminhados para eutanásia ao Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz. Durante a necropsia, foram obtidas amostras de lesão cutânea, pele íntegra (região escapular e abdominal), baço, fígado e linfonodos (poplíteo e cervical). Os fragmentos teciduais foram submetidos ao isolamento parasitário e à extração de DNA. A detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis* foi realizada através da amplificação, pela PCR específica, utilizando-se um par de iniciadores que amplificam a região variável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) de espécies do subgênero *Viannia*. Os produtos positivos na PCR foram reamplificados, pela técnica de LSSP-PCR, utilizando-se um único iniciador do par específico, em condições de baixa temperatura de anelamento. O polimorfismo genético da região variável dos minicírculos foi avaliado através de métodos de análise numérica. Nove animais foram estudados. O isolamento parasitário foi possível somente nos fragmentos de lesão cultivados em todos os animais, no entanto com a aplicação das técnicas moleculares mencionadas, foi possível detectar DNA de *L. (V.) braziliensis* em pele íntegra de cães naturalmente infectados tendo sido, ao nosso conhecimento, o primeiro relato no Brasil. Foi também possível observar o tropismo diferenciado e a capacidade de disseminação parasitária para outros sítios anatômicos, além da lesão cutânea, no cão naturalmente infectado. Nossos resultados contribuirão para o diagnóstico e a epidemiologia da LTA canina no Rio de Janeiro fornecendo elementos na discussão da importância do papel do cão no ciclo de transmissão e subsídios para os programas de controle.

Palavras-chave: 1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 2. Leishmaniose tegumentar canina; 3. PCR; 4. Hibridização molecular; 5. LSSP-PCR; 6. Análise numérica

Oliveira, G M. **Use of molecular techniques in parasite DNA detection and genetic variability study in different tissue fragments from naturally infected dogs by *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Rio de Janeiro, 2013. 51f. Dissertation [Master's degree in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

In dogs, American tegumentary leishmaniasis (ATL) is usually associated to a low humoral response or even to negative results which turns not unfeasible the conventional serological methods. The search for more sensitive methods in the diagnosis has progressed by the use of molecular methods and, the technique of polymerase chain reaction (PCR) has been furnishing several results which can be consider of fundamental importance in epidemiological studies. Conventional methods of parasitological diagnosis have failed to detect the presence of the parasite anatomic sites others than the cutaneous lesion, in dogs naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Regarding the questions on the rule of domestic dogs in the transmission cycle of ATL and, on the applicability of diagnostic methods mainly in areas where both visceral and tegumentary disease are found, the evaluation of these animals under different aspects is needed. The objective of this project is to apply specific PCR assays associated to molecular hybridization and the technique of Low-Stringency Specific-Single Primer – PCR (LSSP-PCR) in order to detect the presence of parasite DNA and evaluate the genetic variability of parasite populations found in different tissues of dogs naturally infected by *Leishmania (V.) braziliensis*. The animals were selected among dogs which were *Leishmania* seropositive from cities of Rio de Janeiro state and referred for euthanasia to the Dermozoo laboratory (Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz). Samples were obtained from cutaneous lesions, health skin, spleen, liver and lymph nodes (popliteal and cervical). Tissue fragments were submitted to parasite isolation and to DNA extractions. The detection of *L. (V.) braziliensis* was performed by specific PCR assays, using a par of primers that amplify the variable region of the minicircles of the kinetoplast DNA (kDNA) from species of the *Viannia* subgenus. The positive PCR products were re-amplified by the technique of LSSP-PCR using a unique primer of the specific par, in low stringency conditions. The genetic polymorphism of the variable region of kDNA minicircles were investigated through numerical analysis methods. Nine animals were studied. The parasitic isolation was only possible in fragments cultured in lesion of all animals. Using such methods, it was possible to detect *L. (V.) braziliensis* DNA in heath skin of dogs naturally infected. To our knowledge this is the first report in Brazil. It was also possible to observe the differentiate tropism and the capacity of parasite dissemination to other anatomic sites beyond the cutaneous lesion. Our results will contribute, at the same time, to the diagnosis and the epidemiology of canine ATL in Rio de Janeiro, providing basis for the discussion of the rule of the dog in the transmission cycle of ATL and, also providing subsidies to the control programs.

Keywords: 1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 2. Canine tegumentary leishmaniasis; 3. PCR; 4. Molecular Hybridization; 5. LSSP-PCR; 6. Numerical analysis

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - UMA BREVE VISÃO BIOLÓGICA, CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA	1
1.2 - O DNA DO CINETOPLASTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	4
1.3 - TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO E O ESTUDO GENÉTICO-POPULACIONAL	5
2 – JUSTIFICATIVA	7
3 – OBJETIVOS	8
3.1 – OBJETIVO GERAL	8
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4 – METODOLOGIA	9
4.1 - DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM	9
4.2 – CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	10
4.3 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	10
4.3.1 – Extração do DNA	10
4.3.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	11
4.3.3 – Hibridização Molecular	12
4.3.4 - LSSP-PCR - Reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência	13

4.4 – ANÁLISE NUMÉRICA	14
5 – RESULTADOS	15
5.1 – ARTIGO N° 1	15
5.2 – ARTIGO N° 2	22
6 – COMENTÁRIOS FINAIS	37
7 – CONCLUSÕES	39
8 – REFERÊNCIAS	40
ANEXO 1	50
ANEXO 2	51

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – UMA BREVE VISÃO BIOLÓGICA, CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 que pertencem à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae. As diferentes formas clínicas respondem por significantes índices de mortalidade e morbidade em países em desenvolvimento. Estes protozoários são organismos heteroxenos completando o seu ciclo no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor. A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), conhecidos como flebotomíneos. Os hospedeiros se infectam com a forma extracelular flagelada (promastigota) através da picada do inseto. As promastigotas são rapidamente fagocitadas e transformadas em formas sem flagelo livre intracelulares (amastigotas) no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. A doença clínica é uma consequência da multiplicação de amastigotas no interior dos macrófagos e da resposta imunológica do hospedeiro (BERMAN; WYLER 1980). Existe uma grande variedade de hospedeiros vertebrados. Embora os mamíferos mais comuns sejam os canídeos e os roedores, foram descritas infecções em edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e primatas. As espécies de *Leishmania* estão reunidas em dois subgêneros segundo Lainson e Shaw (1987): *L. (Leishmania)* Saf'janova, 1982 e *L. (Viannia)* Lainson & Shaw, 1987. Atualmente, são conhecidas 31 espécies que infectam uma ampla variedade de mamíferos hospedeiros silvestres ou domésticos e vetores (SHAW, 1994; ASHFORD, 2000; SILVEIRA et al. 2002). Destas, 15 espécies são patogênicas para o homem, nas Américas (SHAW, 1994; SILVEIRA et al. 2002). No continente Americano, as leishmanioses podem ser agrupadas em leishmaniose visceral (LVA) e leishmaniose tegumentar (LTA) de acordo com o tropismo tissular da espécie envolvida. As principais formas clínicas da LTA são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A LTA foi descrita pela primeira vez no Brasil por Alexandre Cerqueira em 1885 (DA-CRUZ; PIRMEZ 2005), que reportou a existência do botão endêmico dos países quentes, chamando então de “Botão do oriente”. A identificação e confirmação de formas do protozoário em úlceras cutâneas deu-se somente em 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em trabalhadores de áreas que estavam sendo submetidas ao processo de desmatamento de florestas para construção de rodovias no interior do estado de São Paulo. Em 1911 Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença e então Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis*. Em 1913, Rabello relata no Rio de Janeiro um caso de LM em paciente com antecedente de lesão cutânea, fato este que situa a existência da LTA no estado do Rio de Janeiro desde pelo menos 1897. No ano de 1922, Aragão demonstrou o papel do flebotomíneo no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar .

A mudança de comportamento das leishmanioses, induzida pela adaptação dos vetores a uma nova realidade é fato já bastante conhecido. A devastação de grandes áreas silvestres para exploração econômica traz a doença para a periferia dos centros urbanos, sendo que tanto os vetores como os hospedeiros são obrigados a migrarem para o peridomicílio humano em busca de alimentos, levando consigo os agentes da doença. Alterações no ambiente rural e o constante movimento migratório de populações rurais carentes para as periferias das cidades têm facilitado este processo. As leishmanioses são um bom exemplo, pois nos últimos anos têm se tornado um importante problema de saúde pública em vários países não só por sua expansão geográfica invadindo áreas antes livres da doença, mas também por sua reemergência em focos endêmicos antigos (WHO, 1999). Atualmente consideram-se três perfis epidemiológicos da LTA: a) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária; b) Ocupacional – relacionada ao desmatamento das áreas de mata para diversos fins; c) Rural ou Periurbana – onde houve uma adaptação do vetor ao peridomicílio.

A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e são registrados aproximadamente 2 milhões de novos casos ao ano nas Américas, Ásia, África e Europa (DESJEUX, 2004). Ao todo, 88 países estão expostos à doença, sendo 66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo. De 2000 a 2008 foram registrados 23.8749 novos casos de LTA no Brasil, com uma média anual de 26.528 casos. Apesar de serem descritos casos da doença em todos os estados do Brasil, as regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo, ao longo dos anos, com os maiores índices do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% (94.169/238.749) ocorreram na região Norte;

31,7% (75.657/238.749), na região Nordeste; 15,9% (37.853/238.749), na região Centro-Oeste; 9,6% (22.903/238.749), no Sudeste; e 2,6% (6.161/238.749), na região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A distribuição da LTA estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, a LTA é caracterizada como uma doença que possui uma gama de agentes causadores, várias manifestações clínicas e diferentes reservatórios e vetores, onde o conhecimento de alguns aspectos ainda está em discussão, como por exemplo, o papel do cão doméstico na manutenção do parasito em ambiente peridoméstico, uma vez que, o aumento de casos humanos da doença não seria devido somente aos reservatórios silvestres da doença, indicando a participação do homem e do cão em ciclos parasitários (HEUSSER-JUNIOR et al. 2010).

No estado do Rio de Janeiro, as leishmanioses são causadas principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, respectivamente associadas às formas tegumentar e visceral. Mais recentemente, um caso autóctone de LCD por *L. (L.) amazonensis* (AZEREDO-COUTINHO et al. 2007) foi reportado. A transmissão de ambas as doenças é ativa em várias regiões do estado com padrões epidemiológicos característicos conforme a localidade em questão (MARZOCHI; MARZOCHI 1994). O processo migratório aliado ao tipo de ocupação do solo foi por diversas vezes associado ao aparecimento de novos casos (KAWA; SABROSA 2002). A topografia observada em particular no município do Rio de Janeiro também contribuiu para esse processo cujas regiões de encostas foram pouco valorizadas propiciando a instalação de moradias e interferindo na cobertura vegetal natural. Os casos de LTA no município do Rio de Janeiro tendem a se concentrar em bairros localizados no entorno dos maciços da Pedra Branca e Gericinó associados à espécie *L. (V.) braziliensis* e ao vetor *Lutzomyia intermedia*. Esta espécie de vetor é adaptada ao ambiente peridomiciliar com hábitos bastante antropofílicos. A transmissão em diferentes áreas do município é do tipo domiciliar e peridomiciliar envolvendo indiscriminadamente crianças, adultos e animais domésticos. A frequente presença de animais domésticos, como cães e equinos infectados em áreas endêmicas de LTA e LVA levou, ao longo dos anos, a inúmeros argumentos favoráveis à implicação, principalmente, dos cães como possíveis reservatórios domésticos no ciclo de transmissão da LTA (COUTINHO et al. 1985; MARZOCHI et al. 1985; PACHECO et al. 1986, BARBOSA-SANTOS et al. 1994, 1998; PADILLA et al. 2002; REITHINGER et al. 2003; GOMES et al.

2007). Ultimamente, tais posições têm sido revistas, tanto na LTA, na qual o cão doméstico desempenha um papel ainda não definido (REITHINGER; DAVIES 1999; DANTAS-TORRES, 2007; BRITO et al. 2012), quanto na LVA, na qual existe consenso sobre esse papel mas, as medidas de diagnóstico e de controle direcionadas para este reservatório têm sido revisadas (ASHFORD et al. 1998).

A infecção canina causada por *L. (V.) braziliensis* geralmente não compromete o estado geral do animal, e a doença geralmente se manifesta com lesões cutâneas únicas e localizadas preferencialmente na bolsa escrotal, pavilhão auricular e focinho. A LTA em cães costuma estar associada à resposta humoral baixa ou mesmo negativa (MADEIRA et al. 2003), o que inviabiliza os métodos sorológicos convencionais, como ferramenta única, no diagnóstico. Devido a essas características da LTA, o diagnóstico confirmatório deve ser realizado por métodos parasitológicos, que podem ser feitos de forma direta, através do *imprint* e seções de cortes de tecido e por métodos indiretos através do isolamento parasitário em meios de cultura, realizados a partir de fragmentos da lesão cutânea. O isolamento em cultura e a caracterização do parasito que são primordiais em diversos estudos podem sofrer interferências de acordo com as condições de coleta e cultivo das amostras biológicas.

1.2 - O DNA DO CINETOPLASTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Os protozoários da ordem Kinetoplastida possuem, como o próprio nome indica, uma região diferenciada da mitocôndria única destes organismos, denominada cinetoplasto, localizada na base do flagelo e em cujo interior encontra-se o DNA do cinetoplasto (kDNA). O kDNA é constituído por uma rede concatenada de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos. O tamanho dos maxicírculos varia de 20 a 40 Kb, dependendo da espécie. São formados por sequências homogêneas e estão presentes com cerca de 50 cópias por rede e codificam os genes mitocondriais estruturais. Os minicírculos são as moléculas responsáveis pela estrutura da rede, sendo homogêneos em tamanho e usualmente heterogêneos em sequências possuindo cerca de 10.000 a 20.000 cópias por rede. Esta heterogeneidade não é igualmente distribuída em toda a molécula de minicírculo. O tamanho dos minicírculos varia de 700 a 900 pares de bases (pb) entre as diferentes espécies *Leishmania* (SIMPSON, 1987;

RODGERS et al. 1990). A função genética principal do minicírculo é a de codificar os pequenos RNAs guia que governam a especificidade da edição de RNA.

Nas moléculas de minicírculos do kDNA, são encontradas duas regiões distintas: uma região denominada conservada que apresenta uma sequência nucleotídica de 120 a 200 pb compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA (SIMPSON, 1987). Na região conservada, encontram-se pequenos blocos conservados de sequências muito semelhantes entre os diferentes tripanosomatídeos e um destes, idêntico a todos os membros da família conhecido como Sequência Universal dos Minicírculos, que corresponde à origem de replicação de uma das fitas de DNA. A outra região denominada variável apresenta uma heterogeneidade nas sequências e difere entre as diferentes classes de minicírculos da mesma rede. Acredita-se que a rápida taxa evolutiva da região variável pode ter levado a uma grande diversidade de tipos de moléculas de minicírculos que foram agrupadas em classes. Os minicírculos do kDNA apresentam algumas características que os tornam excelentes alvos em estudos sobre a evolução da espécie e para diagnóstico molecular: regiões conservada e variável que podem ser evidenciadas em toda a molécula e um grande número de cópias na rede de kDNA do parasito (DEGRAVE et al. 1994).

1.3 - TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO E O ESTUDO GENÉTICO-POPULACIONAL

A busca por métodos mais sensíveis no diagnóstico das leishmanioses tem avançado muito com o emprego das ferramentas moleculares, e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem fornecido inúmeros resultados fundamentais nos estudos epidemiológicos da LTA (GONTIJO et al. 2002; BRANDÃO-FILHO et al. 2003; OLIVEIRA et al. 2005, GOMES et al. 2007, MARCO et al. 2012). Essa metodologia é capaz de amplificar regiões específicas do genoma do parasito e conseqüentemente revelar a presença do agente diretamente em diversas amostras biológicas (DE BRUIJN; BARKER 1992; DEGRAVE et al. 1994; FAGUNDES et al. 2010).

Dentre as técnicas baseadas na PCR com aplicabilidade em epidemiologia molecular e em estudos genético-populacionais podemos citar: a técnica de Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição – RFLP-PCR que se baseia na digestão do DNA parasitário, previamente amplificado, por enzimas de restrição que reconhecem e clivam a fita dupla da molécula de DNA em sítios específicos. Esta metodologia foi utilizada para a discriminação de amostras de *L. (L.) braziliensis* e *L. (V.) amazonensis* obtidas a partir de lesões cutâneas (VOLPINI et al. 2004). Alguns estudos que utilizaram a técnica RFLP-PCR na epidemiologia molecular de *Leishmania* elegeram o gene que codifica a proteína gp63 e os produtos desta amplificação como substrato para a digestão por enzimas de restrição (MAURICIO et al. 2001). Esta técnica quando direcionada ao gene de minixon foi capaz de gerar padrões de bandas espécie-específicos em *Leishmania* do Novo e do Velho Mundo (MARFURT et al. 2003).

A técnica da PCR Ancorada a Repetições de Sequências Simples – SSR-PCR fundamenta-se no fato dos genomas eucariotos apresentarem grande quantidade de sequências repetidas, os minissatélites e os microssatélites altamente polimórficos e úteis como marcadores genéticos. Regiões que contêm sequências simples repetidas podem ser amplificadas individualmente através de PCR. A técnica SSR-PCR, empregada em estudos de epidemiologia molecular de *L. (L.) infantum* discriminou genótipos desta espécie em cães e humanos (BULLE et al. 2002). A limitação da técnica, no entanto, reside na necessidade de desenvolvimento prévio dos marcadores, que envolve a construção de uma biblioteca de fragmentos genômicos pequenos para o organismo de interesse. Embora já tenham sido identificados microssatélites contendo todas as combinações de bases, as repetições (CA)_n, parecem ser as mais comuns (ROSSI et al. 1994).

A técnica de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso – RAPD consiste na amplificação aleatória de fragmentos de DNA parasitário utilizando-se oligonucleotídeos inespecíficos que reconhecem sequências curtas no genoma. Um padrão de bandas distinto é gerado para as amostras geneticamente divergentes. A principal limitação da técnica é o relativamente baixo conteúdo de informação genética por *locus* (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF 1994) e o fato de somente poder ser empregada em amostras isoladas em meio de cultura. Estudos com marcador RAPD permitiram detectar clones geneticamente relacionados de *L. (V.) braziliensis* nas lesões inicial e reativada de um mesmo paciente, no Rio de Janeiro (BAPTISTA et al. 2009).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com Primer Único em Condições de Baixa Estringência – LSSP-PCR, descrita por Pena et al. (1994), consiste na reamplificação de um fragmento alvo de DNA, previamente amplificado, sob condições de baixa estringência, utilizando-se concentrações elevadas de DNA polimerase e apenas um dos iniciadores específicos para uma das extremidades do fragmento analisado. O produto da reação analisado seria como uma impressão digital do DNA, focalizando o polimorfismo existente em um único segmento gênico. Esta metodologia tem sido empregada em abordagens distintas para estudos de variação de sequências do DNA, traduzindo um polimorfismo intraespecífico e, portanto, constituindo uma nova ferramenta para os estudos de variabilidade genética. Abordagens, utilizando a técnica da LSSP-PCR tem sido usada em diferentes organismos como tripanosomatídeos (VAGO et al. 1996; ANDRADE et al. 1999; CABRINE-SANTOS et al. 2001; BAPTISTA et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2010, 2012; ALVARENGA et al. 2012), amebas (GOMES et al. 1997), vírus (STAMENKOVIC et al. 2001; GADIOU et al. 2009) e bactérias (OOTEMAN et al. 2004).

Obter uma caracterização precisa e mais confiável de genótipos de espécies de *Leishmania* é de grande importância para um melhor entendimento clínico e epidemiológico da doença. O uso do marcador molecular LSSP-PCR tendo como alvo os minicírculos do kDNA para discriminar diferentes variantes de parasitos diretamente de material clínico é uma ferramenta potencial para investigar polimorfismos genéticos. Esta técnica molecular produz perfis que refletem os polimorfismos de classes dominantes de minicírculos, sendo útil em estudos que visam discriminar genótipos de espécies de *Leishmania* (FERREIRA et al. 2007; BAPTISTA et al. 2009; ALVARENGA et al. 2012).

2 – JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, os métodos tradicionais não foram capazes de detectar a presença de *L. (V.) braziliensis* em locais diferentes da lesão cutânea em cães naturalmente infectados (HERRER; CHRISTENSEN 1976; PIRMEZ et al. 1988; MADEIRA et al. 2005). Alguns autores afirmam que a possibilidade da participação do cão no ciclo de transmissão da LTA parece ser pequena, provavelmente pela baixa probabilidade dos flebotomíneos se

infectarem fora do sítio das lesões cutâneas (SILVEIRA et al. 1989, MADEIRA et al. 2005). No entanto, Reithinger et al. (2002) e Velasquez et al. (2006) através da PCR demonstraram, respectivamente, a presença de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em diversos sítios anatômicos de cães infectados no Peru e, a presença de DNA parasitário em cães naturalmente infectados no Paraná. Esses resultados evidenciam mais uma vez, a sensibilidade da PCR frente aos métodos tradicionais e seguramente corroboram com elementos favoráveis sobre a importância do cão nos ciclos de transmissão peridoméstico, embora ainda, inúmeros questionamentos sejam feitos.

Em cães naturalmente infectados, *L. (V.) braziliensis* tem sido isolada somente de lesões cutâneas, entretanto, em áreas de sobreposição da forma tegumentar e visceral, faz-se necessário a avaliação desses animais sob diversos aspectos, incluindo estudos de identificação, classificação e caracterização de espécies do gênero *Leishmania* por métodos moleculares. No presente trabalho, a aplicação da técnica da PCR específica contribuirá em nível diagnóstico e, a da LSSP-PCR permitirá evidenciar possíveis polimorfismos genéticos nas amostras estudadas e rastrear a diversidade genética de *L. (V.) braziliensis* possibilitando a identificação de genótipos particulares. Esses resultados seguramente contribuirão para o diagnóstico e a epidemiologia da LTA canina no Rio de Janeiro fornecendo subsídios para os programas de controle.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Verificar a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* diretamente em amostras teciduais de diferentes sítios anatômicos de cães naturalmente infectados empregando a técnica da PCR associada à hibridização molecular e investigar a variabilidade genética de populações parasitárias através da técnica da LSSP-PCR.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a PCR específica utilizando iniciadores que amplificam a região variável dos minicírculos do kDNA de espécies do subgênero *Viannia*, diretamente em diferentes tecidos dos animais selecionados para o estudo;
- Realizar a hibridização molecular utilizando sonda de kDNA específica para o complexo *L. braziliensis*, visando confirmação subgenérica dos produtos amplificados;
- Utilizar a técnica da LSSP-PCR na investigação de polimorfismos genéticos intrafragmentos amplificados;
- Aplicar métodos de Taxonomia Numérica (análise fenética) para a avaliação dos polimorfismos genéticos gerados.

4 – METODOLOGIA

4.1 – DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Trata-se de um estudo que visa detectar a presença de DNA de parasitos do subgênero *Viannia* em diferentes amostras teciduais de cães naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* e, discriminar possíveis polimorfismos intrafragmentos amplificados. Foram empregadas técnicas moleculares baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) direcionadas para o alvo mitocondrial do genoma de parasitos do subgênero *Viannia*.

Foram avaliadas 52 amostras coletadas de 09 cães, procedentes de cidades do estado do Rio de Janeiro (Anexo 1) e que foram eutanasiados no Laboratório de Pesquisa Clínica em

Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz por apresentarem reatividade sorológica positiva para *Leishmania*. Essas amostras constituem fragmentos de lesão cutânea, pele íntegra da região escapular e abdominal, baço, fígado, linfonodo poplíteo e linfonodo cervical que estavam estocadas à -20° C.

Este estudo constitui um desdobramento de outros projetos já aprovados e licenciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob o nº L-23/06 (Anexo 2) no qual as amostras foram coletadas.

4.2 – CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Amostras coletadas de cães naturalmente infectados por *L. (V.) braziliensis*, com diagnóstico confirmado através do isolamento em cultura e identificação do agente etiológico por eletroforese de isoenzimas.

Foram excluídos do estudo cães com isolamento de outras espécies de *Leishmania*.

4.3 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

4.3.1 – Extração de DNA

Para o isolamento do DNA, empregamos o Kit “Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation” (Amersham Pharmacia). Fragmentos de tecido (10-25mg), macerados com o auxílio de pistilo, foram colocados em tubo contendo solução de lise celular e proteinase K (20 mg/ml) e submetidos à temperatura de 65°C durante 3h. Após a incubação, acrescentou-se RNase A (2 mg/ml) invertendo o tubo diversas vezes e incubando-o à 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionada solução de precipitação de proteínas, homogeneizando vigorosamente, e após centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo isopropanol

100%, invertendo o tubo até a formação de um precipitado branco. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e etanol 70% foi adicionado, centrifugando e desprezando novamente o sobrenadante. Ao final do processo foi adicionada solução de hidratação do DNA. Os tubos foram estocados a -20°C para posteriores análises moleculares.

4.3.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção de DNA parasitário foi realizada através da amplificação do material isolado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se um par de iniciadores (B1: 5' - GGGGTTGGTGTAATATAGTGG - 3'; B2: 5' - CTAATTGTGCACGGGGAGG - 3') que amplificam a região variável dos minicírculos do kDNA de espécies do subgênero *Viannia* que pertencem ao complexo *Leishmania braziliensis* (DE BRUIJN; BARKER 1992).

A reação foi realizada em um volume final de 25,0 µl, contendo 3,0 µl de amostra de DNA, solução tampão Tris-HCL a 10 mM, MgCl₂ a 1,5 mM, deoxinucleosídeo trifosfato (dNTPs) a 0,2 mM, 10 pmol de cada iniciador, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase e água ultra pura para PCR.

A amplificação do kDNA foi realizada em equipamento termociclador automático (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação consistiram em um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido por 33 ciclos a 94°C por 30 s, 60,5°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Como controle positivo da reação, foi utilizado o kDNA (5 ng/µl) da cepa referência de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e um controle negativo contendo todos os componentes, exceto o DNA.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em géis de agarose a 1,5%. Foram adicionados ao gel, 10,0 µl do produto amplificado com 1,0 µl de corante sendo submetido a uma corrida de 80V por aproximadamente 2 h. Foi utilizado o marcador de tamanho de DNA - 100 Base-Pair DNA Ladder (Amersham Pharmacia). O gel

foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho UVP GDS 7.500 (Gel Documentation System).

4.3.3 – Hibridização Molecular

Para a hibridização molecular foi aplicada a técnica de “Southern Blot” (SOUTHERN, 1975) que consiste na transferência passiva dos produtos amplificados para membranas de nylon, estando os mesmos previamente tratados como a seguir: 1) desnaturação do gel em 250ml de NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M por 30 min sob agitação suave, e lavagem rápida em água; 2) neutralização em 250 ml de TRIS 1M, pH 8,0 por duas vezes durante 15 min cada. Completada a transferência por difusão passiva em SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M, pH 7,3), as membranas foram imersas rapidamente em SSC 2X e o DNA fixado por irradiação com luz ultra violeta por 2,5 min. A metodologia de marcação radioativa por extensão de iniciadores randômicos é baseada na hibridização de uma mistura de todos os possíveis hexanucleotídeos (Random primers) do DNA a ser marcado (FEINBERG; VOLGELSTEIN 1983). A fita complementar é sintetizada a partir da terminação 3’OH dos hexanucleotídeos usando-se a enzima Klenow (DNA polimerase I de *Escherichia coli*, “large fragment”). Esta enzima catalisa a adição de mononucleotídeos provenientes dos dNTPs à extremidade 3’OH do DNA. Desta forma, o dATP ou dCTP radioativos presentes na reação são incorporados à fita complementar do DNA sintetizada.

Cerca de 150 ng (3,0 µl) de sonda de kDNA [*Leishmania (Viannia) braziliensis* - MHOM/BR/1975/M2903] foi desnaturado em 15,0 µl de água contendo 2,0 µl da mistura dos hexanucleotídeos iniciadores, por 3 min a 95°C seguido de resfriamento em banho de gelo. 1,0 µl de cada dNTP a 0,5 mM, 3,0 µl de tampão Klenow 10X (TRIS-HCL 0,5 M, pH 7,5, MgCL₂ 0,1M, ditiotreitól 1,0 mM), 1,0 µl da enzima Klenow (5,0 U/µl) e 30 µCi de $\square^{32}\text{P}$ dCTP (Amersham Inc., 10,0 µCi/µl, atividade específica 800 Ci/mM) foram misturados à sonda previamente desnaturada. A reação foi processada durante 3 h a temperatura ambiente e interrompida pela adição de 2,0 µl de EDTA 0,5M. A sonda de kDNA total foi marcada com esta metodologia, segundo o protocolo modificado descrito por Pacheco et al. (2000).

A pré-hibridização de cada membrana foi realizada em 20,0 ml de SSC 1,5X, SDS 1%, 0,5% (p/v) de leite desnatado (Molico[®]) a 60°C por 3 h. O kDNA marcado e previamente desnaturado foi adicionado à membrana em solução de pré-hibridização e a hibridização processada a 60°C durante a noite com agitação suave.

Após a hibridização, a membrana foi lavada três vezes em solução contendo SSC 0,1X, ou 0,3X / 0,5% SDS por 30 min com agitação suave, dependendo da condição de estringência requerida. A cada lavagem, a quantidade de radioatividade presente na solução foi avaliada, utilizando-se um contador Gieger-Muller. A membrana foi exposta a filmes de Raio X (Kodak X-OMAT) a -70°C com tela amplificadora de sinal por período de tempo variável (24 a 96 h).

4.3.4 - LSSP-PCR - Reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência

Os produtos positivos pela PCR específica para o complexo *L. braziliensis* foram purificados utilizando-se o kit Wizard PCR Prep system (Promega, Madison, WI) de acordo com o manual do fabricante. A reação ocorreu com 40 pmol de iniciador (B2), 200 µmol/L de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP)s, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8.6), 50 mmol/L de KCl, 1.5 mmol/L de MgCl₂, 4U de Taq polymerase e 3 µL (60 ng/µL) do produto da PCR (fragmento de 750 pb), totalizando 25 µL. A amplificação foi realizada com os seguintes ciclos: 95° C por 5 minutos; 95°C for 1 minuto, 36°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos (45 ciclos), com uma extensão final de 10 minutos a 72°C (OLIVEIRA et al. 2010). Os fragmentos gerados após a reamplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (High Resolution, Sigma) a 1.8% em TBE 1X, sendo submetidos à corrida em 80V por 5 horas.

4.4 – ANÁLISE NUMÉRICA

Para a análise fenética foram calculados os níveis de similaridade dos perfis genéticos obtidos empregando-se o Coeficiente de Concordância Simples (“Simple Matching”). A matriz de similaridade foi transformada em um dendrograma através do método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA). Para a realização desta análise foi usado o programa NTSYS versão 2.0.

5 – RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados no formato de artigos científicos submetidos à publicação.

5.1 – ARTIGO Nº 1: *PCR associated to molecular hybridization detects Leishmania (Viannia) braziliensis in healthy skin in Canine Tegumentary Leishmaniasis.*

Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma protozoonose apresentando uma incidência anual de 28.000 casos no Brasil. No estado do Rio de Janeiro, a LTA é considerada endêmica, sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis* a espécie prevalente causadora desta doença. Muito se discute sobre o papel do cão como reservatório doméstico no ciclo de transmissão da LTA. Até o momento, métodos parasitológicos não foram capazes de evidenciar o parasito em locais diferentes da lesão cutânea. Neste estudo, reportamos a detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis* em diferentes sítios anatômicos, incluindo a pele íntegra de cães naturalmente infectados procedentes do estado do Rio de Janeiro – Brasil, utilizando-se a técnica da PCR associada à hibridização molecular. O encontro de DNA parasitário em pele sã constitui um dado relevante na discussão sobre a importância do cão como reservatório doméstico em áreas endêmicas de LTA. Além disso, nossos resultados indicam que a infecção canina por *L. (V.) braziliensis* pode manifestar-se com tropismo tissular diferenciado, corroborando o uso da PCR associada à hibridização molecular como um método de diagnóstico da LTA canina.

Comentários: Artigo submetido em formato de *short communication* à revista *Parasitology Research* reportando os resultados da PCR em vários sítios anatômicos dos cães estudados, dando ênfase à detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis* em órgãos internos e pele sadia. Além disso, os resultados confirmaram os dados do isolamento em cultura e eletroforese de isoenzimas de todas as amostras de lesão. Foi observada a eficiência da PCR associada à hibridização molecular como um método de diagnóstico na leishmaniose tegumentar canina. Ao nosso conhecimento este é o primeiro relato no Brasil que evidencia a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em pele sã de cães naturalmente infectados procedentes de áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro. Os resultados do presente trabalho abrem

questionamentos sobre o real papel do cão na cadeia epidemiológica da LTA canina além de fornecerem subsídios para os programas de controle.

5.2 – Artigo nº2: Canine Tegumentary Leishmaniasis: Dissemination and Tissue Tropism of Genetically Distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* Populations.

Pouco é conhecido sobre a disseminação interna a partir de uma lesão cutânea e o tropismo tissular de populações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. O objetivo deste trabalho foi investigar o polimorfismo genético de *L. (V.) braziliensis* em diferentes sítios anatômicos de cães naturalmente infectados utilizando a técnica da PCR e a Low-Stringency Single-Specific Primer – PCR (LSSP-PCR). Cinquenta e duas amostras foram analisadas. Os produtos amplificados foram submetidos à LSSP-PCR para investigar a variabilidade genética de populações parasitárias presentes em diversos sítios anatômicos. Vinte e três das 52 amostras tiveram resultado positivo na PCR. Assim, foi observado que existiam populações de *L. (V.) braziliensis* que permaneciam restritas à lesão cutânea, e outras, com características de disseminação para órgãos internos e pele sadia. A LSSP-PCR dos produtos amplificados na PCR juntamente com a análise numérica revelou que populações restritas à lesão cutânea mostraram-se geneticamente similares sendo agrupadas em um *cluster* diferenciado. Por outro lado, populações que apresentaram característica de disseminação revelaram um perfil genético mais polimórfico. Apesar da heterogeneidade, populações com perfil genético idêntico foram observadas em linfonodo poplíteo e linfonodo cervical. Nossos resultados reforçam a ideia de que a infecção, em cães, pode se manifestar com disseminação e tropismo tissular por populações de *L. (V.) braziliensis* geneticamente distintas.

Comentários: Artigo submetido à revista *Veterinary Medicine International* com o objetivo de avaliar o perfil genotípico de subpopulações de *L. (V.) braziliensis* que estão presentes em diferentes sítios anatômicos de cães naturalmente infectados procedentes do estado do Rio de Janeiro, além de verificar se haveria uma diferença genética entre as amostras que estavam restritas às lesões, e as que estavam presentes em órgãos internos além da pele sadia. Através desses resultados foi possível concluir que a LTA em cães pode manifestar-se com disseminação, para órgãos internos, por populações geneticamente distintas de *L. (V.) braziliensis*. No entanto, populações parasitárias com perfil genético idêntico aos daquelas observadas em lesões cutâneas causadas por cepas disseminantes, não foram observadas em órgãos internos do mesmo animal.

6 – COMENTÁRIOS FINAIS

A LTA foi provavelmente introduzida no estado do Rio de Janeiro no início do século 20. Uma revisão de Silva (1915) aponta várias localidades do estado onde a doença foi assinalada: Angra dos Reis, Campos, Cantagalo, Carmo, Itacuruçá, Itaocara, Macaé, Mangaratiba, Maricá, Porto das Flores, São Jose da Boa Morte e Cidade do Rio de Janeiro. Embora seja difícil comprovar a autoctonia dos casos nesta época, diversos outros surtos foram sendo descritos denotando a expansão da LTA para diferentes municípios como Magé, Macuco, Ilha Grande (ARAÚJO-FILHO, 1978), Maricá (SERRA et al. 2003) bem como nos bairros de Laranjeiras, Jacarepaguá (MARZOCHI et al. 1985) e Campo Grande (OLIVEIRA-NETO et al. 1986). Algumas áreas da cidade do Rio de Janeiro, como o bairro de Campo Grande, por exemplo, são áreas de superposição das doenças tegumentar e visceral e, casos de infecção mista por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* já foram reportados no homem (OLIVEIRA-NETO et al. 1986) e no cão (MADEIRA et al. 2006). Apesar de que, em nível de isoenzimas, somente um zimodema (Z27) *L. (V.) braziliensis* tenha sido mostrado em cães e humanos (CUPOLLILO et al. 2003). A heterogeneidade, em nível de kDNA, de cepas de *L. (V.) braziliensis* circulantes na população humana e/ou canina no estado do Rio de Janeiro vem sendo demonstrada por diferentes marcadores moleculares (LOPES et al. 1984; PACHECO et al. 1984, 1986; BAPTISTA et al. 2009, 2012; OLIVEIRA et al. 2010, 2012).

Os cães estudados nesse trabalho são oriundos da zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, de bairros como Campo Grande e Jacarepaguá ou de outros municípios próximos (Anexo 1). A área geográfica em questão é conhecida por apresentar cães com diagnóstico confirmado para LTA (MADEIRA et al. 2003) e, quanto à localização das lesões, o predomínio foi em orelhas e bolsa escrotal, o que vai de acordo com dados anteriores (FALQUETO et al. 1986; PIRMEZ et al. 1988). Nesse estudo, todos os animais apresentaram títulos para a reação de imunofluorescência indireta (IFI) para *Leishmania* superiores a 1:40, o que é preconizado pelo Ministério da Saúde para a realização da eutanásia como método de controle do reservatório.

Apesar do cão ter um papel controverso na transmissão da LTA, há relatos que evidenciam o cão como um possível reservatório doméstico da doença (REITHINGER; DAVIES 1999). Por outro lado, o parasitismo da pele íntegra encontrado em cães domésticos (DEANE; DEANE 1954) corroborou como um dos fatores para definir esse animal como

importante elemento na cadeia de transmissão da LVA. Esse fato, associado ao isolamento parasitário a partir de pele íntegra em cães com LVA (MADEIRA et al. 2009) e o encontro de parasitos viáveis em cicatriz 11 anos após o tratamento da lesão cutânea humana (SCHUBACH et al. 1998) reforçam nossos resultados que evidenciam a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em amostras de pele íntegra, assim como em órgãos internos, sugerindo um papel muito mais importante do que se imagina para o cão doméstico. A possibilidade da participação mais efetiva do cão doméstico no ciclo de transmissão da LTA assim como na LVA não deve ser totalmente descartada. Da mesma forma, a possibilidade de transmissão antroponótica na LTA foi aventada por Vergel et al. (2006) baseando-se no encontro de PCR positiva e isolamento parasitário em pele sadia, como uma fonte de infecção para o inseto vetor.

Em nosso estudo, a técnica da PCR detectou DNA parasitário, tendo sido a especificidade subgenérica dos produtos amplificados confirmada pela hibridização molecular e o marcador polimórfico utilizado (LSSP-PCR) demonstrou a heterogeneidade intrafragmentos dos minicírculos de kDNA de *L. (V.) braziliensis* discriminando cepas que mostraram diferentes tendências à disseminação para órgãos internos. É conhecido que a infecção inicial pode ser resultante de um inóculo heterogêneo, devido a múltiplas infecções independentes (SARAVIA et al. 1990). Além disso, a circulação de populações parasitárias geneticamente distintas em determinadas áreas endêmicas de LTA tem sido descrita, da mesma forma que a comprovação da origem multiclonal de algumas cepas de *Leishmania* (PACHECO et al. 1990). Apesar do significado biológico desta heterogeneidade permanecer não desvendado, esses dados vão de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, onde a tendência do patógeno de disseminação para órgãos internos e pele sadia, parece estar relacionada à presença de populações específicas de *L. (V.) braziliensis*.

Pesquisas futuras são necessárias para elucidar a dúvida se o polimorfismo genético observado é devido a uma plasticidade genética (PACHECO et al. 1999) ou indica que as cepas presentes em lesões são compostas por mais de uma população parasitária. Por outro lado, essa variação genética pode ser o reflexo de uma mudança de classe específica de minicírculos (BORST, 1991) ou a geração endógena de novo polimorfismo (PACHECO et al. 1995).

O fator imunológico deve ser uma peça chave a ser considerada quando se discute polimorfismo genético e estabelecimento de certas populações geneticamente distintas em determinados grupos de hospedeiros / reservatórios. Estudo publicado recentemente indica a

presença de certos padrões genéticos de *L. (V.) braziliensis* em pacientes HIV positivos (OLIVEIRA et al. 2012). O sistema imune pode, dessa forma, ser responsável por selecionar cepas virulentas e avirulentas de *Leishmania* em humanos e cães (JIMÉNEZ et al. 1995). A correlação de um determinado perfil genético com tropismo tissular específico não pôde ser traçada, apesar de ter sido observado perfis genéticos idênticos em diferentes sítios anatômicos de um mesmo animal e em diferentes animais. Esses dados, pelo menos com o marcador utilizado, parecem ser recorrentes e não tem sido possível associar um determinado perfil genético e a condição clínica dos pacientes (BAPTISTA et al. 2009).

7 – CONCLUSÕES

- PCR associada à hibridização molecular detectou a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em vários órgãos internos e em pele sadia, demonstrando que na infecção canina o parasito não está restrito somente à lesão cutânea.
- O encontro de DNA parasitário em pele sadia de cães naturalmente infectados amplia a discussão sobre a participação destes animais na cadeia epidemiológica da LTA.
- No estado do Rio de Janeiro circulam cepas de *L. (V.) braziliensis* apresentando características fenotípicas de disseminação e não disseminação para órgãos internos.
- Populações de *L. (V.) braziliensis* restritas à lesões cutâneas são geneticamente similares enquanto que aquelas com disseminação interna são geneticamente divergentes.

8 – REFERÊNCIAS

Alvarenga JSC, Ligeiro CM, Gontijo CMF, Cortes S, Campino L, Vago AR et al. KDNA Genetic Signatures Obtained by LSSP-PCR Analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* Isolated from the New and the Old World. PloS one 2012; 7(8): e43363.

Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol 1999; 100: 163-172.

Araujo-Filho NA. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudo sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores. Tese de mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro 1978, 148p.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dogs control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 53-57.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30: 1269-81.

Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintela LP, Madeira MF et al. First report on diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* in Rio de Janeiro State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007; 101: 735-737.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. Exp Parasitol 2009; 121:317–22

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Miranda LFC, Pinto AGS, Barros JHS et al. Evaluation of genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* obtained from the same patient before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions. J Trop Med. 2012; 2012: 808132. doi:10.1155/2012/808132

Barbosa-Santos EGO, Marzochi MCA, Furtado W, Queiros F, Chicarino J, Pacheco RS. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) Immunotherapy and chemotherapy assays. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 217-220.

Barbosa-Santos EGO, Marzochi MCA; Conceição NF, Brito CMM, Pacheco RS. Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human american cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1998; 40: 41-47.

Berman JD, Wyler DJ. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. J Infect Dis 1980; 142: 83-86.

Borst P. Why kinetoplast DNA networks? Trends Genet 1991; 7(5):139-41.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco state, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97: 291-296.

Brito MEF, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EHG, Paiva-Cavalcanti M, Almeida AMP, et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2012; 45:425-429.

Bulle B, Millon L, Bart JM, Gállego M, Gambarelli F, Portús M et al. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. J Clin Microbiol 2002; 40:3391-7.

Cabrine-Santos M, Silva EL, Chapadeiro E, Ramirez LE. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol* 2001; 99(3): 160-167.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano NC. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1.342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human disease occurs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 17-22.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito ME, Falqueto A et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41:3126–3132.

Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura, José Rodrigues, organizador. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. v. 1. p. 697.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 2007; 149: 139–146.

De Bruijn MHL, Barker DC. Dianosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992; 52: 45-58.

Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital* 1954; 45: 419–421.

Degrave W, Fernandes O., Campbell D, Bozza M., Lopes U. Use of molecular probes and detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(3): 463-469.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27 305-18.

Fagundes A, Schubach A, Paul CC, Bogio, A, Antonio L, Schiaoni PB et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentar leishmaniasis in a referral center. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 109-112.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Carias VRD et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose Tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. Mem do Inst Oswaldo Cruz 81:155-163, 1986.

Feinberg AP, Volgelstein B. A technique of radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. An Biochem 1983; 132: 3-13.

Ferreira GA, Soares FC, Vasconcellos SA, Rodrigues EH, WerkhauserRP, Brito ME, et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. J Parasitology 2007; 93: 712-4.

Gadiou S, Safárová D, Navrátil M. Differentiation of Plum pox virus isolates by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR analysis of HC-Pro genome region. Acta Virologica 2009; (53)1: 53-6.

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, Pereira-Chiocola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Vet. Parasitol 2007; 144: 234-241.

Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. Parasitology 1997; 114: 517-20.

Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop 2002; 81: 143-150.

Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 1994; 137:1121-37.

Herrer A, Christensen HA. Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25: 59-63.

Heusser-Junior A, Bellato V, Souza AP, Moura AB, Sartor AA, Santos EGOB et al. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. *Rev Soc Bra Med Trop* 2010; 43:713-718.

Jiménez M, Ferrer-Dufol M, Cañvate C, Gutiérrez-Solar B, Molina R, Laguna F et al. Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 131:197-204.

Kawa H, Sabrosa PC. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública* 2002; 18: 853-865.

Lainson R., Shaw J.J. Evolution, classification and geographical distribution, 1-120. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (eds.) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1987 vol. 1. London: Academic Press.

Lopes UG, Momen H, Grimaldi Jr G, Marzochi MCA, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 1984; 70: 89-98.

Madeira MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev Soc Bra Med Trop* 2003; 36(5): 551-555.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira SA, Figueiredo FB et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res* 2005; 97: 73–76.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 442-445.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Research in Veterinary Science* 2009; 87: 260–262.

Marco JD, Barroso PA, Mimori T, Locatelli FM, Tomatani A, Mora M C et al. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. *BMC Infectious Disease* 2012; 12: 191.

Marfurt J, Niederwiese I, Divine MN, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46:115–24.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza W, Toledo LM., Grimaldi Jr G, Momen H et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil, clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 349-357.

Marzochi MCA, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública* 1994; 10: 359-375.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* 2001; 122:393-403.

Ministério da Saúde (Brasil). Boletim eletrônico epidemiológico [online]. Brasília, Brasil; 2010. [capturado 1 jun. 2010]. Disponível em : http://portal.saude.gov.br/portal/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral Leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 129: 219-227.

Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Schubach AO, Pacheco RS. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(4): 361-365.

Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Schubach AO, Madeira MF, Pacheco RS. Genetic Polymorphism in *Leishmania (Vianna) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106: 683-687.

Oliveira-Neto MP; Marzochi MCA, Grimaldi Jr G, Pacheco RS; Toledo LM et al. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80: 587-592.

Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Potencial application of low-stringency single primer-PCR in the identification of *Leptospira* in the serum of patients with suspected leptospirosis. *Can J Microbiol* 2004; 50(12): 1073-1079.

Pacheco RS; Momen H; Grimaldi Jr G; Lopes UG; Marzochi MCA; Morel CM. Biochemical characterization of the aetiological agent in two different foci of american cutaneous leishmaniasis *Arq Biol Tecnol* 1984; 27: 101.

Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi Jr G, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: J.A. Rioux, Ed. *Leishmania. Taxonomic et Phylogenese Application Eco-Epidemiologique*. (Coll. Int. CNRs/INSERM, 1984) IMEEE, Montpellier. 1986; 57-65.

Pacheco RS, Grimaldi Jr. G, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology* 1990; 100: 393-8.

Pacheco RS, Martinez JE, Valderama AI, Momem H, Saravia NG. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 1995; 69: 197-209.

Pacheco RS, Brito CM. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi* heterogeneity versus plasticity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 199-201.

Pacheco RS, Fernandes O, Salinas G, Segura I, Momen H, Degraeve W et al. Intraspecific heterogeneity in the mini-exon gene localization of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *leishmania (Viannia) guyanensis* from Colombia. *J Parasitol* 2000; 86: 1250-1253.

Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernandez MM et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol* 2002; 110, 1–10.

Pena SD, Barreto G, Vago AR, De Marco L, Reinach FC, Dias Neto E et al. Sequence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(5): 1946-1949.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MCA, Nunes MP, Grimaldi GJr. Canine american cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 38:52-58.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61:530-541.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza JC, Gonzalez JS et al. *Leishmania (Viannia) spp.* Dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96: 76-78.

Reithinger R, Espinoza JC, Coutenay O, Davies CR. Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass-Screening Tool To Detect *Leishmania (Viannia)* spp. in Domestic Dogs (*Canis familiaris*). Journal of Clinical Microbiology Abril 2003; 1486-1493.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol 1990; 71: 267-275.

Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pagés M, Bastien P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. Mol Biochem Parasitol 1994; 65:271-82.

Saravia NC, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco RS, Labrada LA et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection- reactivation or reinfection? Lancet 1990; 336 398-402.

Schubach, A, Marzochi, MCA, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo, ML, Pacheco RS et al. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 824-827.

Serra CM, Leal CA, Figueiredo FB, Schubach TMP, Duarte R, Uchoa CMA et al. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Águas (Serra da Tiririca), Marica, Rio de Janeiro, Brasil. Cad Saúde Pública 2003; 19: 1877-1880.

Shaw J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 471-478.

Silva OD. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. Mem Inst Oswaldo Cruz 1915; 7: 213-248.

Silveira FT, Lainson R, Shaw J, Ishikawa EA, Souza AAA, Braga RR. Sobre a sensibilidade da cultura de leucócitos circulantes na detecção da *Leishmania* no sangue periférico de pacientes com leishmaniose tegumentar. Rev Soc Bras Med Trop 1989; 22:143-146.

Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 2002; 9: 43-50.

Simpson L. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41: 363-382.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.

Stamenkovic G, Guduric J, Velickovic Z, Skerl V, Krtolica K, Veljkovic E et al. Analysis of 5' non-coding region in hepatitis C virus by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(10): 948-952.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Aandrade LO, Chiari E, Galvão LMC et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996; 149(6): 2153-2159.

Velasquez LG, Membrive N, Membrive U, Rodrigues G, Reis N, Lonardoni MV et al. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. *Cad Saude Publ* 2006; 22: 571-578.

Vergel C, Palacios R, Candena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M et al. Evidence for *Leishmania (Viannia)* parasites in skin and blood of patients before and after treatment. *The Journal of Infection Disease* 2006; 194: 503-511.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 2004;90:31-7.

WHO, 1999. Control of the *Leishmaniasis*. World Health Organization. Technical Report. Series 793. Geneva, 158pp.

ANEXO 1 – Origem, local de lesão e resultados do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)
dos cães analisados.

Animais	Origem	Lesão	Título
A1	Campo Grande	Escroto	1:160
A2	Mangaratiba	Orelha	1:160
A3	Campo Grande	Escroto	1:160
A4	Campo Grande	Focinho	1:80
A5	Miguel Pereira	Focinho	1:80
A6	Jacarepaguá	Escroto	1:40
A7	Maricá	Orelha	1:80
A8	Rio de Janeiro	Orelha	1:40
A9	Ilha Grande	Focinho	1:640