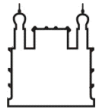

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* SP. EM PEQUENOS MAMÍFEROS
SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO MUNICÍPIO DE
BELO HORIZONTE, MG.”**

por

Lutiana Amaral de Melo

Belo Horizonte
Fevereiro/2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* SP. EM PEQUENOS MAMÍFEROS
SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO MUNICÍPIO DE
BELO HORIZONTE, MG.”**

por

Lutiana Amaral de Melo

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Belo Horizonte

Fevereiro/2008

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M528d
2008

Melo, Lutiana Amaral.

Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG / Lutiana Amaral Melo. – Belo Horizonte, 2008.

xvii, 105 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 89 - 105

Dissertação – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/diagnóstico 2. Vetores de doenças/classificação 3. Leishmaniose/epidemiologia
I.Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“DETECÇÃO DE LEISHMANIA SP. EM PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES E
SINANTRÓPICOS NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MG.”**

por

Lutiana Amaral de Melo

Avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Dr. Eduardo Sérgio da Silva

Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho

Dissertação defendida e aprovada em: 29/02/2008

“Se realmente entendemos o problema, a resposta virá dele, porque a resposta não está separada do problema”.

Krishnamurti

Dedico este trabalho:

Aos profissionais que trabalham em prol da saúde coletiva e que muitas vezes sacrificam objetivos pessoais por acreditarem no bem comum acima de interesses individuais e no direito universal à saúde;

À comunidade da Regional Nordeste pela receptividade e cooperação com a nossa equipe.

Agradeço aos órgãos de fomento:

CPqRR, PAPES – IV FIOCRUZ, Comunidade Europeia
e PIBIC-CNPq por viabilizarem financeiramente a
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela minha vida, saúde, capacidade e sanidade intelectual.

À FAMÍLIA:

Ao André por ser o grande mentor deste empreendimento. Por ser um companheiro e tanto, carinhoso, paciente, que confia e acredita em mim. Agradeço pelo “sem fim” de pedidos feitos (e atendidos!) que possibilitaram a elaboração deste.

Aos meus pais, Fátima e Admir, pelo amor, incentivo, valores morais, exemplos e por financiarem de bom grado meu desenvolvimento cultural e profissional.

Ao meu irmão Lucas pela amizade e pela excelência na consultoria técnica na questão das palmeiras.

À Tia Fia (e Santo Expedito) e ao Vovô pelas providenciais orações.

À ORIENTADORA:

Meus mais profundos agradecimentos à Celinha, por confiar em mim adotando-me como aprendiz sem que eu tivesse experiência em trabalhar com leishmanioses. Agradeço pelo tempo dispendido, por tudo o que me ensinou, sempre com muita ética, experiência, segurança, mas acima de tudo com amizade, doçura e dedicação impressionantes! Verdadeiramente obrigada!

AOS COLABORADORES DIRETOS OU INDIRETOS:

Agradeço ao Centro de Pesquisas René Rachou na pessoa do seu diretor Dr. Álvaro Romanha e à pós-graduação, nas pessoas das coordenadoras Dra. Virgínia Schall e Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, por oportunizarem este aprendizado.

Agradeço ao LALEI na pessoa do Dr. Edelberto dos Santos Dias, por ter me recebido tão bem, ser sempre muito gentil e disponibilizar equipamentos e apoio técnico-científico para a execução deste trabalho.

A todos, sem exceção, os amigos do LALEI, eu agradeço. São peças fundamentais na elaboração deste trabalho e grandes amigos: o Filipe, especialista na captura de gambás (mas não só destes!), a Paty por me ensinar a técnica da PCR, a Tina pela perícia no cultivo e identificação de *Leishmania* sp. Agradeço ao não menos amigo, Rafa, por compartilhar angústias e alegrias, pela boa vontade na divisão de tarefas e pela assessoria tecnológica. À Érika e à Karla por me ajudarem com as PCRs e géis. À Lara pelos resultados com os flebotomíneos. Ao Du, principalmente por dividir comigo os tópicos da sua tese original e também pelas extrações. À Cynthia e mais uma vez à Tina pelo apoio técnico e à Lu pela eficiência no secretariado. À Dona Alda e Regina pelo acesso ao acervo bibliográfico do Centro de Referência em Flebotomíneos e ao Leco pelos esclarecimentos.

À Dra. Maria Norma Melo, coordenadora do projeto junto à Comunidade Européia e grande incentivadora deste trabalho, por sua empolgação, pelos seus ensinamentos, suas sugestões, apoio financeiro e de infra-estrutura.

Ao Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, na pessoa da Dra. Liléia Diotaiuti pela cessão do espaço físico para execução das incontáveis reações de PCR. Também ao Evandro M. M. Machado pela fundamental contribuição na identificação molecular do isolado referente ao gênero *Trypanosoma* e pela colaboração técnico-científica.

Ao Laboratório de Mastozoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, especialmente ao Adriano Pereira Paglia e ao Heitor Cunha pelo apoio técnico científico na captura e identificação dos pequenos mamíferos.

À Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito e à Dra. Marilene Susan Marques Michalick, pela participação na banca de qualificação desta dissertação e pelas providenciais sugestões e correções.

À Carol da Bioestatística pelos cálculos e explicações estatísticas imprescindíveis à apresentação destes resultados.

Agradeço também à Rosângela e ao Antero S. R. de Andrade pela ajuda técnica na realização do teste de hibridização com sondas para a caracterização de *Leishmania* sp.

À Dra Elisa Cupolillo pela caracterização isoenzimática dos isolados de medula dos gambás.

Ao Segemar Oliveira Magalhães, responsável pela biblioteca do CPqRR, pelas orientações normativas e aquisição de vários artigos junto a bibliotecas conveniadas.

Aos motoristas do CPqRR, especialmente Toninho, Cláudio e Ronaldo, pela boa vontade, perícia e eficiência no apoio logístico.

Ao pessoal da CEVIU e também ao Filipe e Rafa (de novo!) pela ajuda com o processamento das figuras.

AOS AMIGOS:

A todos os meus amigos simplesmente, ou melhor, fundamentalmente pela amizade. Aos amigos de Ouro Preto, muito especialmente à Renata Aline de Andrade, por me apresentar à Celinha, logo, responsável direta pelo meu retorno acadêmico e também à Denise e Elaine pelo apoio e sugestões. Aos meus amigos de Carmo da Mata, especialmente à Fer por me oferecer sua casa e à Andresa pela ajuda com o inglês. Às minhas amigas da pós-graduação, tão talentosas e ao mesmo tempo tão gentis e companheiras, em especial à Kátia Reis, Maíra Neves, Grasi Caldas, Ana Vitta, Vanessa Freitas e Luanda Liboreiro pelos trabalhos em grupo.

SUMÁRIO

Introdução	18
1. <u>Leishmanioses: aspectos gerais</u>	19
2. <u>As Leishmanioses do Novo Mundo: fatores eco-epidemiológicos envolvidos</u>	20
2.1. O caráter zoonótico das Leishmanioses Neotropicais	20
2.2. Transmissão vetorial de <i>Leishmania</i> com ênfase para o que ocorre no Brasil: breve resumo sobre os fatores ecológicos envolvidos	23
2.3. Registro histórico dos animais infectados por parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	26
2.3.1. <i>Leishmania infantum chagasi</i>	26
2.3.2. <i>Leishmânias dermatrópicas</i>	27
3. <u>Urbanização das leishmanioses</u>	33
4. <u>Técnicas moleculares aplicadas à detecção e identificação de <i>Leishmania</i> sp.</u>	34
4.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
4.2. Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP)	36
4.3. Hibridização do DNA alvo utilizando sondas complementares	37
Justificativa	38
Objetivos	41
1. <u>Objetivo geral</u>	42
1.1. Objetivos específicos	42
Material e Métodos	43
1. <u>Área de estudo</u>	44
2. <u>Captura dos animais</u>	48
3. <u>Avaliação do estado clínico dos animais e coleta das amostras</u>	49
4. <u>Método parasitológico para detecção de <i>Leishmania</i> sp.</u>	50
5. <u>Métodos moleculares para detecção de <i>Leishmania</i> sp.</u>	51
5.1. Extração do DNA das amostras de pele, baço e fígado	51
5.2. Extração do DNA da medula	52

5.3. Extração do DNA do sangue em papel de filtro	52
5.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	52
5.5. Visualização dos resultados	53
6. Métodos moleculares para identificação de <i>Leishmania</i> sp.	54
6.1. PCR-RFLP	54
6.2 Hibridização com sondas	55
7. Análise estatística	55
Resultados	56
1. Animais capturados	57
2. Exame clínico e parasitológico	60
3. Testes moleculares	63
3.1. PCR para detecção do gênero <i>Leishmania</i>	63
3.2. Técnicas moleculares para identificação de <i>Leishmania</i> sp.	69
3.2.1. PCR-RFLP.....	69
3.2.2. Hibridização.....	71
Discussão	72
1. Situação da doença e dados sobre a transmissão na área	73
2. Pequenos mamíferos, roedores e marsupiais, como hospedeiros de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) na área em estudo	74
3. Presença de parasitos flagelados em material obtido a partir de medula de <i>D. albiventris</i> (gambás)	76
4. Aspectos relacionados à detecção de DNA de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>)	77
5. Importância de roedores e marsupiais na transmissão de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) na área em estudo – aspectos eco-epidemiológicos envolvidos	80
6. Perspectivas para o controle de LTA em Belo Horizonte	85
Conclusão	87
Referências bibliográficas	89

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Área de estudo. Região Metropolitana de Belo Horizonte, imagem gravada por satélite, destacando a Regional Nordeste (amarelo) e a área de coleta (circundada em vermelho) (A); detalhe esquemático da Regional Nordeste mostrando os bairros (B). 45
- Figura 2:** Área verde onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 46
- Figura 3:** Área peridomiciliar onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 47
- Figura 4:** Pontos de coleta (georeferenciados) na área peridomiciliar e na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 48
- Figura 5:** *Didelphis albiventris* coletado em armadilha do tipo gaiola na primeira campanha (junho/2006) numa região de fazenda, Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 58
- Figura 6:** Número de exemplares capturados por espécie e por campanha (junho/2006 a junho/2007) na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 59
- Figura 7:** Formas flageladas isoladas em cultura obtida a partir de material de medula de *D. albiventris* (amostra T) coletado em junho de 2006 na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 61
- Figura 8:** Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata para visualização do produto de PCR gerado após amplificação com os iniciadores específicos para *T. rangeli* (TR) ou *T. cruzi* (TC) para identificação do parasito isolado a partir de material de medula (AT) de *D. albiventris* coletado em junho de 2006 na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 62

- Figura 9:** Formas flageladas isoladas em cultura obtida a partir de material de medula de *D. albiventris* (amostra L) coletado em setembro de 2006 na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 63
- Figura 10:** Percentual de positividade na PCR para o gênero *Leishmania* segundo o local de captura dos pequenos mamíferos na Regional Nordeste no período de junho/2006 a junho/2007 no município de Belo Horizonte, MG. 65
- Figura 11:** Pontos de coleta (georeferenciados) na área peridomiciliar e na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 66
- Figura 12:** Total de animais capturados e número de exemplares positivos, na PCR para o gênero *Leishmania* por campanha de captura (junho/2006 a junho/2007) na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 66
- Figura 13:** Percentual de positividade na PCR para o gênero *Leishmania* por tecido coletado em pequenos mamíferos, no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 67
- Figura 14:** Percentual de positividade na PCR para o gênero *Leishmania* por tecido coletado em pequenos mamíferos, no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG, em relação ao grupo ao qual o animal pertence (marsupial ou roedor). 69
- Figura 15:** PCR-RFLP utilizando a enzima *Apa* I para identificação das espécies nas amostras positivas para *Leishmania* sp. coletadas dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste, entre junho 2006 a junho 2007, Belo Horizonte, MG. 70
- Figura 16:** Reação de hibridização (dot-blot) com a sonda para o complexo *L. braziliensis*. Caracterização das amostras positivas coletadas dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste, entre junho 2006 a junho 2007, Belo Horizonte, MG. 71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão do kDNA das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. 54
- Tabela 2:** Lista dos pequenos mamíferos capturados, por espécie e ambiente, no período de junho/2006 a junho/2007 na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 57
- Tabela 3:** Resultado da PCR para o gênero *Leishmania*, por espécie e ambiente, dos animais capturados no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 64
- Tabela 4:** Positividade na PCR para o gênero *Leishmania* para cada espécie coletada no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG, em relação ao tecido analisado. 67
- Tabela 5:** Distribuição por espécie e pelo número de tecidos positivos na PCR para o gênero *Leishmania* dos exemplares capturados, no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
COBEA	Comitê Brasileiro para Experimentação Animal
DNA	Ácido Desoxirribonucleotídico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – (Ensaio imunoenzimático)
fg	Fentogramas
IBAMA	Instituto Brasileiro para o Meio Ambiente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kDNA	DNA do cinetoplasto
LCD	Leishmaniose Cutânea-Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea-Localizada
LCM	Leishmaniose Cutânea-Mucosa
LIT	Liver Infusion Tryptose – (Infusão de fígado triptose)
LV	Leishmaniose Visceral
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
NNN	Meio de cultura de Novy, McNeal e Nicolle
PBS	Phosphate Buffer Solution – (Tampão salina fosfato)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorfism – (Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
U	Unidades

RESUMO

As Leishmanioses do Novo Mundo são classicamente caracterizadas como zoonoses de ecótopos silvestres. No entanto, os parasitos do gênero *Leishmania* têm demonstrado ao longo dos anos uma notável plasticidade, exemplificada pela diversidade de espécies deste gênero encontrada nas Américas, bem como sua adaptação a diferentes vetores e hospedeiros. Foi esta capacidade de adaptação que, lhes permitiu persistir, ao longo dos anos, frente às mudanças ecológicas impostas pelo comportamento humano. As profundas modificações ambientais, em razão do desmatamento e da urbanização descontrolada podem resultar na extinção de espécies vetoras e hospedeiras e na subsequente adaptação e interação dos parasitos com novas espécies. A interação parasito-vetor-hospedeiro no contexto das leishmanioses é complexa e dinâmica. Um processo de “sinantropização” do ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros como o cão doméstico, vem sendo observado para a Leishmaniose Visceral e de forma mais lenta e menos evidente, também para a Leishmaniose Tegumentar. Belo Horizonte, nos últimos 20 anos, caracterizou-se como região endêmica para leishmanioses. Estudos epidemiológicos para busca ativa de reservatórios silvestres destas doenças são escassos no país e em Belo Horizonte não há qualquer estudo prévio. Com o objetivo de detectar a presença de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos, silvestres e sinantrópicos, capturados na Regional Nordeste em Belo Horizonte, MG, foram colocadas armadilhas no peridomicílio e em fragmentos de mata da área de estudo. Os animais capturados foram sacrificados e amostras biológicas (baço, fígado, pele, sangue, medula óssea) foram coletadas para a detecção da infecção através de métodos parasitológicos (cultura) e moleculares. Durante o período de coletas (junho 2006 a junho 2007) foram capturados (1) *Akodon* sp., (4) *Bolomys lasiurus*, (22) *Mus musculus*, (5) *Oryzomys* grupo *subflavus*, (9) *Rattus novergicus*, (19) *Rattus rattus* entre roedores e (33) *Didelphis albiventris* e (1) *D. aurita*, marsupiais, além de (2) *Galictis* sp., carnívoro. Dentre os animais capturados, dois espécimes de gambás apresentaram formas flageladas na cultura de medula. Detectou-se infecção mista, por *T. cruzi* e *T. rangeli*, através da PCR em um dos isolados, tendo sido confirmada a infecção por *T. cruzi* através de isoenzimas. O outro isolado foi identificado como *Leishmania* (*Leishmania*) através de testes moleculares e isoenzimas. Além disso, 28 animais (29%), das diferentes ordens, apresentaram-se positivos na PCR convencional para o gênero *Leishmania*. Destaca-se, pela primeira vez, o achado de *Leishmania* (*Viannia*) em *D. aurita*, *Galictis* sp., *Mus musculus* e *Rattus novergicus*. Nas amostras de tecido identificou-se, através da PCR-RFLP e da hibridização com sondas subgênero específicas, *Leishmania* (*Viannia*) como agente etiológico. Provavelmente, trata-se de *L. (V.) braziliensis*, pois esta tem sido a única espécie deste subgênero isolada na área. Esta espécie circula entre os mamíferos sinantrópicos, roedores e gambás, capturados tanto na área verde quanto peridomiciliar, urbana e densamente habitada. Inquéritos entomológicos, na mesma área, têm encontrado *Lutzomyia whitmani* como a espécie mais freqüentemente capturada. Diante disso, observa-se que, todos os elos da cadeia epidemiológica de transmissão de LTA, agente etiológico, vetor, animais infectados apresentando parasitismo cutâneo e o homem, coexistem neste ambiente. Sendo assim, é possível que estes animais possam, em determinadas circunstâncias, participar do ciclo de transmissão. No entanto, a sua real contribuição deve ser objeto de investigações complementares que envolvam, por exemplo, xenodiagnóstico e quantificação da carga parasitária.

ABSTRACT

In the New World, the leishmaniasis are classically characterized as zoonoses of sylvatic ecotopes. Nevertheless, *Leishmania* parasites have demonstrated a remarkable plasticity, e.g. a diversity of species of this genus found in the Americas, as well as their adaptation to different vectors and hosts. This adaptation capacity has allowed them to subsist along the years in the presence of ecological changes imposed by the human behavior. The profound environmental changes due to deforestation and the uncontrolled urbanization can cause the extinction of some vector and host species, and the subsequent adaptation and interaction of the parasites with new species. The interaction parasite-vector-host in the context of leishmaniasis is complex and dynamic. A incorporation process of others hosts to the transmission cycle, such as the domestic dog, is being observed in studies of visceral and cutaneous leishmaniasis, although in the last case in a slower and less evident manner. In the last 20 years, Belo Horizonte has been characterized as an endemic region for leishmaniasis. Epidemiological studies for searching sylvatic reservoirs of these diseases are scant in our country, and in Belo Horizonte there are no previous studies. With the purpose to detect the presence of *Leishmania* sp. in small mammals in northeastern Belo Horizonte, MG, various traps were placed in the household surroundings and remains of the woods in the research area. The captured animals were sacrificed, and biological samples (spleen, liver, skin, blood, bone marrow) were gathered for detection of the infection by means of parasitological (culture) and molecular methods. Throughout the collecting period (June/2006 to June/2007), the following animals were captured: (1) *Akodon* sp., (4) *Bolomys lasiurus*, (22) *Mus musculus*, (5) *Oryzomys* group *subflavus*, (9) *Rattus norvegicus*, (19) *Rattus rattus* among the rodents, and (3) *Didelphis albiventris* and (1) *D. aurita*, opossums, besides (2) *Galictis* sp., carnivore. Among these captured animals, two specimens of opossums showed flagellated forms in the culture. A mixed infection *T. cruzi* / *T. rangeli* was detected in one of the isolates by means of PCR. The *T. cruzi* infection was confirmed by isoenzymes. Another isolate was identified as *Leishmania* (*Leishmania*) via molecular tests and isoenzymes. It was further observed that 28 animals (29%), from different orders, were PCR positive for *Leishmania* and the tissues more frequently positive were skin and kidney. It was possible to identify the causative agent as *Leishmania* (*Viannia*) when PCR-RFLP and hybridization with specific subgenus probes were used. Probably, it is concerned with *L. (V.) braziliensis*, since this is the only species of this subgenus isolated in the studied area. This species could be found among synanthropic mammals, rodents and opossums, captured either in the green area or in the household surroundings, urban and crowded inhabited area. Entomological surveys in the same area have shown *Lutzomyia whitmani* as the species most frequently captured. These findings show that all links of the epidemiological cycle of ATL, etiological agent, vector, infected animals presenting cutaneous parasitism and humans coexist in the same environment. Thus, it is possible that these animals can participate in the transmission cycle under specific circumstances. Nevertheless, their real contribution must be the target of further investigations.

Introdução

1. Leishmanioses: aspectos gerais

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903, pertencentes à família *Trypanosomatidae* e à ordem *Kinetoplastida*. Estes parasitos possuem reprodução clonal e ciclo heteroxênico, que acontece, parte no inseto vetor, conhecido como flebotomíneo e parte em diferentes espécies de mamíferos hospedeiros. No tubo digestivo do vetor, o parasito pode ser encontrado sob duas diferentes formas flageladas e móveis, as promastigotas e as paramastigotas. No vertebrado, o parasito caracteriza-se por se alojar intracelularmente em células fagocíticas do sistema mononuclear sob a forma amastigota, imóvel e sem flagelo aparente.

Os parasitos do gênero *Leishmania* podem causar doença, que se apresenta sob duas principais formas clínicas, a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A forma visceral é grave, crônica, atinge principalmente os órgãos ricos em fagócitos como baço, fígado, linfonodo e medula óssea, podendo levar ao óbito número significativo de casos. Segundo Alvar *et al.* (2006), a mortalidade causada pela LV é de cerca de 59 mil óbitos ao ano e só é menor, dentre as doenças parasitárias, que aquela provocada por malária. A forma tegumentar por sua vez, apesar de não ser letal, pode se apresentar em graus variados de morbidade desde simples lesões que, ainda sim, podem deixar cicatrizes desfigurantes, até formas difusas, porém, não ulcerativas ou formas mais graves envolvendo as mucosas do nariz e da boca.

Essas doenças são um importante problema de saúde pública, uma vez que estão amplamente distribuídas por 88 países em todos os continentes, com exceção da Oceania. Sua área de abrangência coincide com o mapa sócio-econômico da pobreza pelo mundo (Alvar *et al.*, 2006) com 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões correndo risco de se infectar e adoecer (Desjeux, 2001). A OMS estima que a cada ano ocorram novos 1,5 milhão de casos de LT e 0,5 milhão de casos de LV. Noventa por cento dos casos da forma tegumentar ocorrem em Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria. Por sua vez, Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, respondem por 90% dos casos da forma visceral. A maioria destes países é classificada como em desenvolvimento sendo que, em todos, as leishmanioses ocorrem em suas regiões mais empobrecidas. Assim, a morbi-mortalidade desses agravos é motivo de grande preocupação uma vez que, nas áreas sob maior risco, há grande proporção de miseráveis em situação de má-nutrição, debilidade imunológica e inadequadas condições de higiene e moradia. Somam-se a isso o risco da co-infecção com HIV.

2. As Leishmanioses do Novo Mundo: fatores eco-epidemiológicos envolvidos

2.1. O caráter zoonótico das Leishmanioses Neotropicais

As Leishmanioses Neotropicais são zoonoses, doenças naturalmente transmitidas entre o homem e outros vertebrados. No ciclo natural da doença zoonótica o(s) parasito(s) circula(m) naturalmente entre animais silvestres. O homem se infecta quando penetra neste ambiente e provoca um desequilíbrio na relação entre o parasito e seus hospedeiros naturais. Nas Américas, o hospedeiro humano é considerado com pouca importância para a manutenção do ciclo da doença por longo prazo (Shaw, 1988; Ashford, 1996).

No Novo Mundo, a única espécie causal da forma visceral da leishmaniose (LV) é a *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Shaw, 2006). No entanto, várias são as espécies de *Leishmania* que já foram descritas como apresentando importância epidemiológica na etiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Quadro 1).

As leishmanioses tegumentares são documentadas na América desde 400-900 aC. pelos povos ameríndios em seus "totens" apresentando faces mutiladas. Os conquistadores espanhóis também relataram a ocorrência da doença na população que habitava o continente quando da sua chegada (Lainson & Shaw, 1998; Da-Cruz & Pirmez, 2005). O contexto eco-epidemiológico das leishmanioses do Novo Mundo, especialmente no que diz respeito à LTA, é bastante complexo. Isto se deve ao número de espécies de *Leishmania* envolvidas em ciclos dos quais podem participar diferentes espécies de mamíferos e vetores.

No Brasil, pelo menos seis espécies de *Leishmania* de ambos os subgêneros *L. (Vianna)* e *L. (Leishmania)* são agentes etiológicos de formas tegumentares da doença (Lainson & Shaw, 1987) (Quadro 1). Destas, quatro, todas *L. (Vianna)*, são encontradas principalmente na região amazônica: *L. (V.) guyanensis* que causa predominantemente lesão cutânea, em geral mais de uma e de pouca gravidade e *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* que raramente causam doença humana. *L. (V.) braziliensis* é encontrada espalhada pelo Brasil, além de vários outros países da América Latina e causa úlceras cutâneas e mucosas. Somente um parasito do subgênero *L. (Leishmania)* é considerado agente etiológico de LTA neste país, *L. (L.) amazonensis*. Esta espécie tem sido identificada no nordeste, sudeste e meio oeste do Brasil e em geral causa leishmaniose cutânea sem envolvimento mucoso, com lesões únicas, de pouca gravidade, com evolução prognóstica favorável podendo curar-se espontaneamente (Passos *et al.*, 1999). Em alguns casos, no entanto, o parasito pode

disseminar-se, metastaticamente, a partir da lesão inicial no local da picada, para outros locais na pele, ocasionando lesões múltiplas, não ulceradas caracterizando a forma difusa da doença.

Quadro 1. Espécies do gênero *Leishmania* Ross, 1903, responsáveis pela LTA.

Subgênero <i>Leishmania</i> Ross, 1903	Subgênero <i>Viannia</i> Lainson & Shaw, 1987
	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>
	<i>L. (V.) colombiensis</i>
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i> *	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>
<i>L. (L.) pifanoi</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>
	<i>L. (V.) peruviana</i>
	<i>L. (V.) shawi</i>

Adaptado de Lainson & Shaw, 1987.

* As espécies em negrito já foram identificadas no Brasil

Para entender a relação entre o parasito e seus hospedeiros é precisar ter em mente que estes co-adaptam-se de maneira a reduzir atritos e a conviverem em certa harmonia. Quanto menor for a morbidade causada pelo parasito ao hospedeiro e quanto mais constante for a incidência da infecção em dada população, mais antiga e equilibrada deve ser a relação entre eles (Ashford, 1996; Avila-Pires, 2005). Existem várias discussões sobre os conceitos acerca de hospedeiros e reservatórios (Shaw, 1988; Ashford, 1996; Haydon *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2007). O termo hospedeiro é bem generalista, diz respeito a uma espécie que abriga ocasionalmente um parasito oportunista que, pode ou não, comprometer sua sobrevivência (Avila-Pires, 2005).

Shaw (1988) reconhece dois principais tipos de hospedeiros vertebrados para o caso da leishmaniose americana. Hospedeiro primário, que se refere ao vertebrado que alberga o parasito no ambiente silvestre e que seria responsável pela manutenção da infecção sem a necessidade da co-existência de um outro. Hospedeiro secundário, que diferentemente do

primário, seria um animal infectado, porém, incapaz de manter um ciclo enzoótico indefinidamente.

Para Ashford (1996, 2003) no que ele chama de “sistema reservatório”, estão incluídos todos os componentes da transmissão, incluindo os vetores. Ele divide os hospedeiros vertebrados em subpopulações, de acordo com o papel que desempenham na transmissão. Os reservatórios seriam aqueles animais capazes de servirem como fonte de infecção para o vetor por longo tempo. Os hospedeiros incidentais, por outro lado, poderiam, ocasionalmente, serem infectivos para os vetores, mas seriam irrelevantes para a manutenção da infecção por longo prazo. Quando um hospedeiro incidental transmitisse, ao menos circunstancialmente, a infecção para outro hospedeiro incidental deveria ser chamado hospedeiro de ligação.

Chaves e colaboradores (2007) propõem a divisão dos hospedeiros vertebrados em fontes “sources” ou rebedores “sinks”. Os hospedeiros fontes (reservatórios) seriam aqueles capazes de sustentar a infecção pois “forneceriam” o patógeno para outros hospedeiros, ou seja, serviriam de fonte de infecção para o vetor a longo prazo. Os hospedeiros rebedores se infectariam, mas não serviriam como novas fontes de infecção. Estes na verdade, funcionariam como agentes diluidores do parasitismo, diminuindo o risco de um outro indivíduo se infectar, em função da maior diversidade de alvos possíveis para o agente infeccioso se instalar. Neste sentido, a retirada deste tipo de hospedeiro poderia até, em algumas situações, aumentar o número de casos de doença.

De certa forma, estes conceitos estão de acordo com aqueles propostos por Haydon *et al.* (2002). Para estes autores, o que caracteriza um reservatório é o fato dele servir como fonte de infecção para uma população alvo, sob determinadas condições ecológicas, que não necessariamente podem ser extrapoladas para outros ecossistemas. Porém, para estes autores a condição de fonte de infecção pode não se perpetuar por longo prazo podendo um reservatório ser substituído por outro.

Apesar das diferenças conceituais e nas nomenclaturas, há consenso entre os autores, de que a importância de determinado hospedeiro vai depender das condições eco-epidemiológicas em que ele estiver inserido, podendo um mesmo animal contribuir diferentemente, em dois sistemas ecológicos diversos, para a dinâmica da transmissão (Ashford, 1996; Haydon *et al.* 2002; Chaves *et al.*, 2007).

2.2 Transmissão vetorial de *Leishmania* com ênfase para o que ocorre no Brasil: breve resumo sobre os fatores ecológicos envolvidos

A principal forma de transmissão de *Leishmania* para o vertebrado é através da picada de fêmeas hematófagas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente como flebotomíneos (Gontijo & Melo, 2004).

Os flebotomíneos são pequenos dípteros, 2 a 3 mm, que possuem o corpo recoberto por pelos de coloração acastanhada e que pousam com as asas abertas (Brazil & Gomes Brazil, 2003). Estes insetos vêm se adaptando a uma enormidade de ambientes muito diferentes em termos de altitude, temperatura e umidade. Na América do Sul são comumente capturados desde o semi-árido nordestino brasileiro, até as florestas amazônicas e as montanhas andinas. Aproximadamente 400 espécies e subespécies foram descritas nas Américas e destas, aproximadamente 30, são suspeitas como prováveis vetoras de leishmânias que causam doença para o homem (Shaw, 1999).

Os habitats naturais desses insetos caracterizam-se por apresentar pouca variação de temperatura e umidade pois estes fatores interferem no desenvolvimento larval (Dias *et al.*, 2007) embora se saiba pouco sobre seus criadouros. Estudos experimentais demonstram que a temperatura e umidade relativas ótimas para reprodução são 23 a 28°C e 70 a 100% respectivamente, enquanto temperaturas inferiores a 10°C ou maiores que 40°C são desfavoráveis ao desenvolvimento (Reithinger *et al.*, 2007). Em geral, a densidade populacional é maior após quatro a cinco semanas do término das chuvas. No entanto, chuvas persistentes como na região amazônica podem diminuir a densidade populacional uma vez que destroem as larvas (Lainson, 1982). De fato, a umidade é um dos fatores que mais interfere na densidade populacional (Barata *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007). Outro fator que pode interferir é a altitude, em altitudes maiores que 700 m (em média) acima do nível do mar, o número de insetos coletados diminui (Margonari *et al.*, 2006).

Em geral, os adultos possuem hábitos noturnos, período que saem para se alimentar de açúcares de plantas. As fêmeas necessitam também de sangue na época da postura e em geral são ecléticas na escolha das fontes. Quando fecundadas, depositam seus ovos em fendas, pedras, raízes tubulares e sobre substratos orgânicos onde eles ficam aderidos por uma substância viscosa. O local de desenvolvimento das larvas é ainda, objeto de dúvidas, mas especula-se que seja o solo rico em matéria orgânica próximo às casas (Shaw, 1999). Durante o dia, ambos, machos e fêmeas adultos, escondem-se em frestas, buracos ou debaixo de folhas (Brazil & Gomes Brazil, 2003).

A infecção dos flebotomos ocorre no momento em que a fêmea, ao fazer o repasto sanguíneo essencial para maturação dos ovos, ingere macrófagos parasitados. No intestino, as células se rompem liberando os parasitos que, imediatamente, iniciam o processo de transformação em formas flageladas. Estas se multiplicam e colonizam o intestino. Ao final de seu processo evolutivo neste hospedeiro, atingem a probóscida, podendo, a seguir, serem transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo (Da-Cruz & Pirmez, 2005). Estes insetos são extremamente eficientes na transmissão do parasito e isto é creditado, principalmente, aos componentes de sua saliva que contém substâncias vasodilatadoras e imunossupressoras (Brazil & Gomes Brazil, 2003).

A ecologia dos vetores é determinante para a eco-epidemiologia da doença. A infecção do homem será diretamente proporcional ao grau de antropofilia do vetor. Assim, algumas espécies de *Leishmania* cujos vetores são pouco antropofílicos, não causarão doença humana ou causarão numa incidência muito baixa (Lainson, 1982). A transmissão das leishmânias pertencentes ao complexo *L. braziliensis*, agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar, por exemplo, é função do comportamento de seus vetores. A transmissão mais freqüente de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no Brasil, deve-se, em grande parte, ao fato de que os vetores destas duas espécies se alimentam com freqüência em seres humanos. Ao contrário, a transmissão de *L. lainsoni* ao homem é relativamente rara, pois seu vetor, *Lu. ubiquitalis*, é pouco antropofílico (Shaw, 1999).

De acordo com Killick-Kendrick (1988), para confirmar o envolvimento de um vetor na transmissão da leishmaniose, é preciso observar os seguintes critérios: a espécie deve ser altamente antropofílica e abundante no foco, ser capaz de apresentar formas evolutivas do parasito na ausência de sangue no intestino e demonstrar alta taxa de infecção natural por parasitos indistinguíveis daqueles isolados em humanos. Observadas estas condições, os insetos vetores de maior importância médica na América são espécies que pertencem ao gênero *Lutzomyia* dentre outras, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. intermedia*, *Lu. longipalpis*, *Lu. umbratilis*, *Lu. whitmani*.

Lu. longipalpis é a principal espécie relacionada com a transmissão de *L. infantum chagasi* nas Américas. Sua distribuição geográfica é ampla, estendendo-se desde o México até a Argentina. Dentre todas as espécies de flebotomíneos comumente incriminadas como vetoras das leishmanioses, nenhuma é tão bem adaptada ao ambiente antropizado quanto esta, alimentando-se tanto em animais silvestres quanto domésticos como cavalos, vacas e galinhas.

Lu. intermedia, possui um comportamento muito parecido com *Lu. longipalpis* em relação aos hábitos alimentares, habitualmente alimenta-se de sangue humano e de animais domésticos e à proximidade ao homem, porém é considerado vetor de *L. braziliensis* (De Souza *et al.*, 2006; Margonari *et al.*, 2006). É bem adaptada ao ambiente peridomiciliar podendo também ser coletada dentro das residências. Costuma ser a espécie mais comum em áreas endêmicas para LTA que apresentam graus variáveis de degradação (Shaw, 1999). Foi a primeira espécie de flebotômico encontrada parasitada por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*), esta descrição foi feita por Aragão (1922) na cidade do Rio de Janeiro. A distribuição geográfica desta espécie é muito ampla, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Paraguai e em todas as regiões brasileiras sendo, mais prevalente nos estados do sul e sudeste (Andrade-Filho *et al.*, 2007).

Lu. (Nyssomyia) whitmani também possui uma distribuição ampla, já havendo sido capturada em praticamente todos os estados brasileiros e em vários outros países latino-americanos. É associada com a transmissão de *L. shawi*, *L. braziliensis* e hipoteticamente, ocasionalmente, poderia também transmitir *L. guyanensis*. Como vetora de *L. braziliensis*, pode ser associada tanto com o ciclo de transmissão silvestre quanto peridoméstico. Vários estudos têm demonstrado que, esta espécie vem se adaptando a áreas urbanas pois, têm sido coletada no peridomicílio e em áreas verdes contidas dentro de perímetros urbanos (Camargo-Neves *et al.*, 2002; Margonari *et al.*, 2005). Em algumas localidades no Brasil, alguns isolados de *L. braziliensis* têm sido feitos a partir de *Lu. whitmani*, capturados ao redor das casas no meio rural nos estados do nordeste (Lainson & Shaw, 1998; Shaw, 1999).

Em Belo Horizonte, foi observada uma alta incidência desta espécie (16%) coletada praticamente nas mesmas proporções dentro e fora de casa, no peridomicílio. Nas áreas verdes, esta proporção sobe para 61% do total de espécies capturadas. Neste município, esta deve ser a espécie mais importante na transmissão de LTA (Margonari *et al.*, 2005). Na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, área deste estudo, tem sido a mais freqüentemente capturada (74%) especialmente nos resquícios de área verde como em parques e pequenos sítios remanescentes dentro do perímetro urbano (Saraiva *et al.*, 2007, dados não publicados).

2.3. Registro histórico dos animais infectados por parasitos do gênero *Leishmania*

2.3.1 *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Dentre os animais silvestres, o primeiro achado de infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi*, foi registrado por Deane & Deane (1954) em raposa capturada no estado do Ceará, identificada como *Lycalopex vetulus*. Estudos posteriores mostraram que a espécie que ocorre na região é, na verdade, *Cerdocyon thous*, também encontrada infectada no Pará e em Minas Gerais (Lainson *et al.*, 1969; Silva *et al.*, 2000).

Outros animais encontrados parasitados por *L. infantum chagasi* são *Proechimys canicollis* (Travi *et al.*, 1998 a) um pequeno roedor silvestre e gambás do gênero *Didelphis* (Sherlock *et al.*, 1984; Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1998 b; Cabrera *et al.*, 2003; Schallig *et al.*, 2007). Em relação a estes últimos, já foi observada alta taxa de soropositividade (Schallig *et al.*, 2007) e experimentalmente, capacidade infectiva para flebotomíneos (Travi *et al.*, 1998 b). Além disso, Cabrera *et al.* (2003) correlacionaram positivamente a presença destes animais no ambiente peridoméstico à maior soropositividade canina.

No entanto, em áreas modificadas como no peridomicílio, várias são as evidências de que, a espécie *Canis familiaris*, é a principal mantenedora da infecção por *L. infantum chagasi*. Um trabalho que documentou o avanço da epidemia na cidade de Belo Horizonte, na década de 90, mostrou claramente que a doença humana predominava nos bairros onde se instalara previamente a enzootia canina (Oliveira *et al.*, 2001). Nesta mesma cidade, Margonari *et al.* (2006) também encontrou correlação positiva entre casos humanos de LV e cães soropositivos, além de alta incidência de *Lu. longipalpis*. Além disso, estudos de variabilidade genética intra-específica mostram que, os isolados que circulam nas populações humana e canina possuem os mesmos esquizodemas (Lopes *et al.*, 1984; Pacheco *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2001). O cão é fonte eficiente de infecção para o vetor (Costa-Val *et al.*, 2007), uma vez que apresenta alto grau de parasitismo cutâneo e é capaz, em muitos casos, de conviver com o parasito por longos períodos. De fato, embora muitos animais possam morrer em decorrência da doença, um grande número permanece infectado e assintomático durante anos. Graças a todas estas características, além da sua estreita proximidade ao homem, aparentemente, este é capaz de manter o ciclo zoonótico de transmissão sem a necessidade de

qualquer outro reservatório (Gontijo & Melo, 2004) apesar de não ser um hospedeiro silvestre da infecção (Deane & Deane, 1955).

O gato doméstico, *Felis domesticus*, também já foi encontrado naturalmente infectado por *L. infantum chagasi* (Savani *et al.*, 2004) e recentemente, comprovou-se capacidade infectiva deste animal para *Phlebotomus perniciosus*, um vetor competente na região do Mediterrâneo (Maroli *et al.*, 2007) sugerindo que, possa representar um reservatório doméstico adicional para o parasito.

2.3.2 *Leishmânias dermatópicas*

Em relação aos possíveis reservatórios de LTA, os estudos eram escassos até que, em 1957, no Panamá, Hertig e colaboradores, conseguiram resultados interessantes com algumas espécies de roedores silvestres. Partindo do princípio de que os reservatórios naturais não teriam necessariamente que apresentar lesão cutânea, estes pesquisadores passaram a realizar hemoculturas, principalmente em roedores e marsupiais. Seguindo esta orientação, conseguiram obter resultados positivos em apreciável número de exemplares, pertencentes a algumas espécies de ratos de espinho, *Proechimys semispinosus* e *Haplomys gymnurus*. A associação dos parasitos isolados em cultura, à leishmaniose tegumentar, foi comprovada pelos mesmos autores, mediante inoculação em voluntário, e, subsequente produção da lesão leishmaniótica (Forattini, 1960; Nery-Guimarães *et al.*, 1968). Estes estudos inspiraram então, um estudo prospectivo para busca de reservatórios silvestres pela primeira vez no Brasil.

Assim, em São Paulo, em área endêmica para LTA, no final da década de 50, Forattini e colaboradores, capturaram e examinaram 928 animais, a maioria dos gêneros *Akodon*, *Oryzomys* e *Cavia*. Dentre todos estes animais, apenas três, das espécies *Cuniculus paca*, *Dasyprocta azarae* e *Kannabateomys amblyonyx*, revelaram-se positivos ao exame parasitológico da pele. Não foi possível, porém, por inoculação do material, induzir aparecimento de lesões leishmanióticas em cobaias (Forattini, 1960).

Nas florestas de Utinga, município de Belém do Pará, Nery-Guimarães e colaboradores (1968) pesquisaram a infecção natural por *Leishmania* em roedores do gênero *Oryzomys*. Em 334 espécimes deste gênero, analisados entre agosto de 1963 e fevereiro de 1966, foi possível encontrar o parasito, a partir de material de lesão de cauda, em 34 (10,2%). Em trabalho publicado em 1968, Lainson & Shaw, na mesma região, analisaram 398

espécimes de diferentes gêneros e foram capazes de demonstrar *Leishmania* (provavelmente *L. amazonensis*, nota da autora), em *O. capito* (16/89 ou 18%) e em *Proechimys guyanensis* (3/92 ou 3,3%) (Lainson & Shaw, 1968). A alta incidência de infecção, aliada aos hábitos compatíveis destas duas espécies com as do vetor silvestre, *Lu. flaviscutellata*, foram indicativas da sua importância como reservatórias na região do Baixo Amazonas. *Lu. flaviscutellata*, possui o hábito de voar baixo e se alimenta avidamente tanto em *Oryzomys* quanto em *Proechimys*, pequenos roedores terrestres, porém apresenta pouca antropofilia. Na mesma região, estes autores demonstraram pela primeira vez, a infecção em um marsupial, *Marmosa murina*, que apresentava lesão na cauda (Lainson & Shaw, 1969).

Em 1970, Lainson & Shaw detectaram *Leishmania* nos roedores do gênero *Oryzomys*, pela primeira vez, no estado do Mato Grosso. Nos isolados foram observadas duas cepas distintas do parasito, uma cepa de crescimento rápido “luxuriante” (semelhante às cepas isoladas nas florestas de Utinga) e outra de crescimento lento. Os autores observaram também que, os isolados provenientes de humanos com a forma cutâneo-mucosa tinham sempre um crescimento lento em cultura. Estas observações levaram os autores a suspeitar, se tratar, de fato, de mais de uma espécie ou de um complexo de espécies, até aquele momento, denominadas genericamente como uma única espécie, *Leishmania braziliensis* (Lainson & Shaw, 1970). De fato, até 1972, todos os casos de LTA eram creditados ao mesmo parasito, *Leishmania braziliensis*, descrito por Gaspar Vianna em 1911, em Minas Gerais. Este fato gera confusão ao se fazer uma revisão literária e dificulta a predição da verdadeira distribuição geográfica de *L. (V.) braziliensis* (Lainson & Shaw, 1998). Para não gerar contradições entre este texto e as referências originais, esta revisão pretende ser sempre fiel à nomenclatura do agente etiológico da forma como foi referido nos relatos originais.

Anos mais tarde, estes mesmos autores, trabalharam na região de Monte Dourado, norte do estado do Pará, procurando determinar o(s) reservatório(s) silvestre(s) para a leishmaniose tegumentar. Encontraram o roedor *Proechimys guyanensis* freqüentemente parasitado 15/57 (26%) pela espécie de crescimento rápido em cultura, *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972). Eles concluíram que esta deveria ser, realmente, a principal espécie hospedeira deste parasito (Lainson *et al.*, 1981; Shaw, 1988). Outros mamíferos hospedeiros de *L. amazonensis* são pequenos roedores silvestres como *Oryzomys sp.* (Lainson & Shaw, 1968); *Akodon sp.* (Telleria *et al.*, 1999) e diversas espécies de gambás (Lainson & Shaw, 1998).

O alto índice de infecção do gênero *Oryzomys* (18/36 ou 50%) no Mato Grosso bem como nas florestas de Utinga, locais distantes milhares de quilômetros, também levava a crer

se tratar de um importante hospedeiro do(s) agente(s) causal(ais) da leishmaniose tegumentar (Lainson & Shaw, 1970). Além disso, o aspecto das lesões, geralmente do meio para a base da cauda ou algumas vezes em toda a sua extensão, por vezes abarrotadas de parasitos, porém sem maiores conseqüências para o animal, fazia crer uma longa convivência entre ambos e excelente fonte de infecção para o vetor (Nery-Guimarães *et al.*, 1968; Lainson & Shaw, 1968; Lainson & Shaw, 1970).

Em 1972, Forattini e colaboradores, conseguiram isolar leishmânias, do tipo que apresentava “crescimento lento” como descrito por Lainson & Shaw em 1970, em 3/137 animais em área endêmica para LTA no estado de São Paulo. Estes animais eram dois *Akodon arviculoides*, um *O. nigripes* e em apenas um deles pode ser observada lesão macroscópica na cauda. Os autores ressaltam o difícil crescimento destas cepas em cultura, bem como a elevada contaminação por fungos. Em humanos, já havia sido observado que, este tipo de parasito causava, na maioria das vezes, lesões raras, de lenta evolução e pobres em leishmânias. Em um em cada quatro casos era observada a forma muco-cutânea. Os autores aventam a possibilidade de, o gênero *Oryzomys*, ser importante reservatório do parasito neste estado, à semelhança do que foi observado por Lainson & Shaw (1970) para *O. concolor* no Mato Grosso.

Um ano mais tarde e na mesma região, estes autores isolaram o mesmo parasito a partir de *O. capito laticeps*. A este parasito, de crescimento lento em cultura e associado à forma muco-cutânea da doença, consensualmente, resolveu-se denominar *L. braziliensis braziliensis*, parasito diferente daquele isolado nas florestas do Utinga (Lainson & Shaw, 1972; Forattini *et al.*, 1973). Mais tarde, na Venezuela, este parasito também foi isolado de *Rattus rattus* (rato preto) e *Sigmodon hispidus* (rato do algodão) enfatizando a importância dos roedores como prováveis reservatórios (De Lima *et al.*, 2002).

L. guyanensis, por sua vez, é o principal agente etiológico de LTA, “pian-bois” no extremo norte do país, prevalente em áreas de floresta nativa, acima do Rio Amazonas e nas Guianas (Deane & Grimaldi, 1985). O sistema ecológico de transmissão deste agente envolve o vetor *Lu. umbratilis* e os reservatórios edentados, preguiça (*Choloepus didactylus*) e tamanduá (*Tamandua tetradactyla*). Este vetor geralmente habita a copa das árvores mas, desce pelos troncos para ovipor, provavelmente no chão, neste caminho pode eventualmente picar o homem. A transmissão para o homem ocorre geralmente durante o dia onde há maior concentração de fêmeas sobre os troncos (Lainson, 1982)(Quadro 2).

Nos últimos anos, cresceu o interesse da comunidade científica pelos animais com hábitos sinantrópicos, ou seja, aqueles que de alguma maneira se utilizam do ambiente

modificado pelo homem para sobreviver. Este interesse se deu especialmente porque a doença começa a ser observada em áreas peridomiciliares. Neste contexto, dois trabalhos no Brasil merecem destaque, o trabalho de Brandão-Filho *et al.*, (2003) em Amaraji no estado de Pernambuco e de Oliveira *et al.* (2005) em Araçuaí, Minas Gerais. Os primeiros trabalharam em área endêmica para LTA na zona da mata nordestina capturando pequenos mamíferos, durante quatro anos. Em um total de 460 animais conseguiram isolar *L. braziliensis* em seis espécimes, cinco *Bolomys lasiurus* e um *Rattus rattus*. Detectaram ainda em 17,6% das espécies, kDNA identificado como pertencente à *Leishmania (Viannia)*. Em Minas Gerais foi detectado DNA pertencente aos dois subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* no roedor sinantrópico *Rattus rattus*, o que também foi encontrado em roedores silvestres *Trichomys apereoides* e *O. subflavus* (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

Desde Alencar *et al.* (1960) já havia relato de infecção natural por *Leishmania* em *R. rattus*, o rato preto ou rato de telhado, aquele que prefere locais secos, nos forros das casas. Vasconcelos *et al.* (1994) ressaltam que a presença de infecção em ratos pretos pode ser mais prevalente no Brasil do que os dados atuais demonstram, uma vez que há poucos estudos com roedores sinantrópicos em regiões endêmicas para LTA.

No entanto, as espécies mais pesquisadas têm sido mesmo os gambás, gênero *Didelphis*, especialmente a espécie que ocorre na região amazônica *D. marsupialis* (Costa & Patton, 2006). Este gênero tem sido considerado um potencial reservatório de vários agentes infecciosos dos quais os tripanosomatídeos são os mais importantes. Tendo em vista sua dieta onívora e o fato de ser um animal bem adaptado a ambientes silvestres bem como àqueles modificados pelo homem, subir em árvores e também buscar alimento no chão, vários pesquisadores apontam este animal como um forte candidato a reservatório (Arias *et al.*, 1981; Arias & Naiff, 1981). Servindo de fonte de alimento a diferentes espécies de flebotomíneos, seria o elo perfeito entre um ciclo silvestre e o periurbano (Cabrera *et al.*, 2003).

Arias e colaboradores (1981) trabalharam em florestas perto de Manaus no Amazonas e verificaram um alto percentual de infecção (16/36) por *L. braziliensis guyanensis* em *Didelphis marsupialis*. O percentual aumentava nas áreas mais degradadas, onde a floresta não era primária. Estes autores conseguiram isolar o parasito em flebotomíneos, homens e gambás numa região, onde casas foram construídas nas imediações de um Parque Florestal, na periferia de Manaus. Eles concluem que esta espécie assume importância em áreas onde o homem intervém no ambiente natural, destruindo os hospedeiros primários, mas concordam com Lainson *et al.* (1981) de que é pouco importante em áreas de mata virgem.

Também tem crescido o número de estudos para avaliar o real papel do canídeo doméstico como reservatório de LTA. Desde idos de 1949 que, Herrer, em região de leishmaniose tegumentar no Peru, “la uta”, conjecturou a hipótese de o cão ser o reservatório principal de algumas leishmanias dermatrópicas. Este autor conseguiu detectar a presença do parasito, embora escasso, na pele lesionada ou não, de vários animais (Herrer, 1949). Por outro lado, vários anos mais tarde, Madeira *et al.* (2005) em área de ocorrência de *L. braziliensis* no Rio de Janeiro, não conseguiram demonstrar a presença do parasito em pele não lesionada. Há que se considerar, no entanto, que o número de cães nos experimentos de 1949 foi maior que 500 e no estudo de 2005 foram apenas 19.

Assim, a hipótese do cão doméstico ser um importante reservatório de LTA permanece controversa. Na região de Caratinga, MG, Dias *et al.* (1977) sugerem a participação do cão na epidemiologia da doença. Mais recentemente, Gontijo *et al.* (2002) em área endêmica no Vale do Jequitinhonha, isolaram em cães, amostras de *Leishmania braziliensis* cuja caracterização bioquímica e molecular resultou idêntica à dos isolados em humanos na mesma região. O mesmo fato foi observado por Falqueto *et al.* (2003) no Espírito Santo. Este último autor sugere que os cães podem ter importância na manutenção do ciclo peridomiciliar, pelo menos na região estudada, uma vez que a ocorrência de casos é mais freqüente na presença de cães infectados com *L. braziliensis* (Falqueto *et al.*, 1991; 2003). No entanto, Reithinger & Davies (1999), em revisão de mais de 90 estudos com cães em áreas endêmicas para LTA, concluíram que existem somente evidências circunstanciais, para suportar a hipótese dos cães atuarem como reservatórios de *L. braziliensis*, sendo necessários, mais estudos. Os achados de Madeira *et al.* (2005) em Barra do Guaratiba e de Padilla *et al.* (2002) na Argentina, corroboram esta idéia, uma vez que os cães apresentam poucas lesões sendo estas com poucos parasitos.

Vários outros animais domésticos já foram encontrados infectados por leishmânias dermatrópicas, tais como eqüinos (Rolão *et al.*, 2005), suínos (Brazil *et al.*, 1987) e gatos (Pennisi, 2004). Estes últimos, no Brasil, já foram encontrados infectados por *Leishmania braziliensis* (Passos *et al.*, 1996) e *L. amazonensis* (Souza, 2005). Gramiccia & Gradoni (2005) ressaltam a importância de se avaliar melhor o papel de gatos e eqüinos na epidemiologia da LTA.

Quadro 2: Fatores eco-epidemiológicos envolvidos na gênese da Leishmaniose Tegumentar e Visceral no Brasil.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma da doença humana	Distribuição geográfica	Reservatório principal	Outros hospedeiros conhecidos	Vetores conhecidos
<i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i>	Leishmaniose Visceral	Ocorre em várias regiões do Brasil sendo mais prevalente na Região Nordeste	Cão (<i>Canis familiaris</i>) e raposa (<i>Cerdocyon thous</i>)	<i>Proechymis guyanensis</i> , <i>P. canicollis</i> , <i>Didelphis albiventris</i> , <i>D. marsupialis</i> , <i>Felis domesticus</i>	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> é suspeito
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)	Em todo o Brasil com exceção da Região Sul	Roedores silvestres (<i>Proechymis guyanensis</i>)	Vários, entre marsupiais como <i>D. marsupialis</i> , roedores <i>Oryzomys</i> sp., <i>Akodon</i> sp.	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Leishmaniose Cutânea Localizada e Leishmaniose cutaneomucosa (LCM)	Em todo o Brasil, com exceção de SC e RS	Roedores são suspeitos	<i>Oryzomys</i> sp., <i>Akodon arviculoides</i> , <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Rattus rattus</i> (roedores); <i>D. albiventris</i> , <i>Canis familiaris</i> , <i>Felis silvestres</i>	<i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. welcomei</i>
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	LCL	Região Norte do Brasil acima do Rio Amazonas	Tamanduá (<i>Tamandua tetradactyla</i>) e preguiça (<i>Choloepus didactylus</i>)	<i>P. guyanensis</i> ; <i>D. marsupialis</i>	<i>Lu. unbratilis</i> principal, <i>Lutzomyia whitmani</i> ?
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	LCL (rara)	Norte do Pará e Rondônia	Paca (<i>Agouti paca</i>)		<i>Lu. ubiquitalis</i>
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	LCL (rara)	Região Amazônica	<i>Dasypus novencinctus</i>		<i>Lu. ayrozai</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. squamiventris</i>
<i>Leishmania (V.) shawi</i>	LCL (rara)	Norte do Brasil ao sul do Rio Amazonas	Pequenos mamíferos arbóreos como macacos e preguiças (suspeitos)		<i>Lutzomyia whitmani</i>

Fonte: Adaptado de Gramiccia & Gradoni, 2007; Falqueto & Ferreira, 2005.

3. Urbanização das leishmanioses

As leishmanioses são doenças dinâmicas, sendo as circunstâncias da sua transmissão continuamente alteradas por influência de fatores ambientais e do comportamento humano. Modificações no habitat dos hospedeiros naturais e dos vetores e as migrações humanas decorrentes de conflitos ou condições sócio-econômicas precárias têm contribuído para a mudança no panorama eco-epidemiológico destas doenças (Gramiccia & Gradoni, 2005; Dujardin, 2006), com casos ocorrendo em áreas de colonização antiga.

O desmatamento, a urbanização descontrolada, com pessoas vivendo sob deficiência nutricional, em condições sanitárias e habitacionais precárias, além da associação com a epidemia de HIV, são alguns dos motivos apontados como responsáveis por estas alterações na história natural destas doenças (Desjeux, 2001; Alvar *et al.*, 2006). Conhecimentos insuficientes acerca da epidemiologia da transmissão em áreas urbanas contribuem para o agravamento deste quadro epidemiológico (Reithinger & Dujardin, 2007; Shaw, 2007).

Nas Américas, a transmissão das leishmanioses se caracterizou historicamente por ocorrer no ambiente silvestre e rural, sendo principalmente, relacionada ao sexo masculino e à atividade ocupacional (lavradores, operários construtores de estradas) (Orsini, 1940; Martins, 1956). Há algumas décadas, casos autóctones vêm sendo notificados e aumentam em grandes cidades (Desjeux, 2001; Murray *et al.*, 2005), como por exemplo, em Belo Horizonte no Brasil, uma metrópole com cerca de cinco milhões de habitantes (Genaro *et al.*, 1990; Passos *et al.*, 1990).

A região metropolitana de Belo Horizonte vem apresentando casos humanos tanto de LV quanto de LTA há mais de dez anos, bem como a presença de flebotomíneos vetores (Margonari *et al.*, 2006). No Brasil, dois outros importantes focos urbanos de LV ocorreram nas capitais dos estados do Maranhão e do Piauí, estados estes que nos anos 1993 e 1994 contribuíram percentualmente com 40 e 50% respectivamente, do total de casos registrados neste país (Arias *et al.*, 1996; Gontijo & Melo, 2004).

Em relação à LTA, a exemplo do que vem ocorrendo em Belo Horizonte (Passos *et al.*, 1993), o ciclo periurbano de transmissão vem sendo observado em grandes centros urbanos como na periferia da cidade de Manaus no Amazonas (Barrett & Senra, 1989). Com o desaparecimento das florestas primárias, roedores infectados e com hábitos sinantrópicos, circundando com maior frequência as casas, podem servir como fonte de infecção para

flebotomíneos bem adaptados ao ambiente modificado como *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* (Gramiccia & Gradoni, 2005).

Estudos realizados em focos ativos de LTA observaram a ocorrência da doença em ambos os sexos, com vários indivíduos da mesma família, incluindo mulheres e crianças, infectadas (Gontijo *et al.*, 2002). “Assim, temos encontrado várias pessoas de uma família, parasitadas, vivendo isoladamente e em locais distantes de qualquer floresta ou mata. Mesmo crianças que não deixam o domicílio ou a zona peridomicilar têm sido encontradas com úlceras leishmanióticas” (Alencar, 1960). Estas observações, associadas à coleta de um grande número de flebotomíneos vetores e antropofílicos no peridomicílio ou mesmo dentro de casa, são indicativas de que a transmissão possa ter ocorrido no ambiente peridomiciliar (Passos *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2004).

4. Técnicas moleculares aplicadas à detecção e identificação de *Leishmania* sp.

4.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseia-se na amplificação sequencial de determinado fragmento de um DNA alvo, através da utilização de uma DNA polimerase termoestável. O fragmento a ser amplificado é flanqueado por um par de iniciadores que delimitam o início e o fim da amplificação. O DNA molde e os precursores para a síntese de uma nova molécula são submetidos a ciclos repetidos nos quais, a temperatura varia para garantir desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão da fita. Cada ciclo sucessivo essencialmente duplica o DNA sintetizado no ciclo anterior. O resultado é um acúmulo exponencial do fragmento alvo de aproximadamente 2^n onde n é o número de ciclos (Saiki *et al.*, 1985).

A detecção do DNA e a identificação de diferentes espécies de *Leishmania* através de métodos moleculares, como a PCR, vêm sendo aplicadas ao estudo das leishmanioses para fins epidemiológicos, de diagnóstico e tratamento. Estudos recentes têm demonstrado que, tanto o DNA nuclear quanto o cinetoplasmático de *Leishmania* persistem por pouco tempo após a morte do parasito. Logo, a detecção do DNA implica, pela lei das probabilidades, na presença do parasito na totalidade praticamente absoluta dos casos (Disch *et al.*, 2004; Prina

et al., 2007). Além disso, pode-se monitorar a eficiência do tratamento mediante o acompanhamento do decréscimo do parasitismo através, por exemplo, da PCR quantitativa em tempo real (Prina *et al.*, 2007).

A PCR vem substituindo, paulatinamente, os métodos sorológicos no diagnóstico de leishmaniose canina (Solano-Galeno *et al.*, 2001; Reithinger *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006), e nos últimos anos, nas pesquisas clínicas com humanos (Andrade *et al.*, 2001), graças à sua sensibilidade e especificidade elevadas independentemente do gênero ou espécie. É ainda possível, utilizar a PCR para investigar a infecção em flebotomíneos (Michalsky *et al.*, 2002) e em outros animais hospedeiros como roedores (Costa, 1998; Bretagne *et al.*, 2001; Brandão Filho *et al.*, 2003; Cabrera *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005) e a PCR em tempo real para a quantificação da carga parasitária (Nicolas *et al.*, 2002; Rolão *et al.*, 2004; Mombrison *et al.* 2007; Quaresma, 2007).

A amplificação do DNA de *Leishmania* através da PCR pode ser específica para o gênero (Rodgers *et al.*, 1990), como pode ser específica para os complexos, *L. braziliensis* (De Bruijn & Barker, 1992), *L. mexicana* (Eresh *et al.*, 1994) e *L. donovani* (Cortes *et al.*, 2004). Também pode utilizar como alvos o DNA nuclear ou o DNA do cinetoplasto (kDNA).

O cinetoplasto é uma organela típica dos protozoários da ordem Kinetoplastida da qual o gênero *Leishmania* faz parte, contida no interior de uma mitocôndria modificada. O DNA do cinetoplasto é constituído por dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos, estes últimos se repetem de cinco a dez mil vezes por parasito. Nas moléculas de minicírculos são encontradas regiões conservadas, que são constantes para cada espécie e regiões variáveis. A região conservada está relacionada à replicação dos minicírculos e possui um tamanho aproximado de 120 a 200 pares de bases no gênero *Leishmania* (Rodgers *et al.*, 1990; De Bruijn & Barker, 1992). Amplificar a região conservada tem sido o objetivo da maioria dos trabalhos, em função do número de repetições da molécula do minicírculo, o que diminui muito a chance de se obter um resultado falso negativo. Uma técnica mais específica pode então ser associada para confirmar os verdadeiros positivos, como por exemplo, a hibridização com sondas específicas (Degrove *et al.*, 1994). Rodgers *et al.* (1990) propuseram o emprego da PCR no diagnóstico do gênero *Leishmania*, pela amplificação de parte da região conservada, uma região de 120 pares de bases (pb). Concluíram que a sensibilidade do método era capaz de detectar uma única forma amastigota de *L. braziliensis* e até 1% do kDNA de uma amastigota de *L. mexicana*. Esta elevada sensibilidade é muito útil nos inquéritos epidemiológicos, nos quais se pretende detectar o maior número possível de portadores ou hospedeiros.

Como este tipo de PCR é extremamente sensível, seu maior inconveniente seria mesmo o risco de falsos positivos, por ampliações de seqüências inespecíficas ou contaminação com produtos previamente amplificados, os amplicons. Outro problema, não desta, mas de qualquer tipo de metodologia que envolva biologia molecular é o alto custo para inquéritos em massa, permanecendo ainda, nos países em desenvolvimento, como técnica restrita aos grupos de pesquisa (Reithinger & Dujardin, 2007).

4.2. Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

Considerando os resultados descritos por vários autores, pode-se discriminar as espécies de *Leishmania* através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados após digestão com endonucleases (análise de esquizodemas) (Lopes *et al.*, 1984; Spanakos *et al.*, 2007). Endonucleases são enzimas capazes de reconhecer e cortar pequenas seqüências, de quatro a seis pares de bases, chamados sítios de restrição, no DNA molde. As enzimas de restrição são muito específicas, então, diferentes seqüências de bases nitrogenadas podem ou não, ser reconhecidas por uma endonuclease. Assim, a digestão diferenciada de DNAs de fontes diversas por uma enzima de restrição ou por uma combinação delas pode ser utilizada para distinguir entre duas ou mais espécies de parasito.

Estudos demonstram ser possível utilizar a PCR-RFLP para distinguir entre as espécies que ocorrem simpatricamente na área em estudo, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. Por esta metodologia, o fragmento de 120 pb, gerado após amplificação da região conservada do kDNA de qualquer uma destas espécies, ao ser digerido utilizando apenas uma enzima, *Hae* III, gera fragmentos diferentes o suficiente para discriminá-las. Uma outra enzima, *Apa* LI é capaz de distinguir *L. (V.) braziliensis* das outras duas pertencentes ao subgênero *L. (Leishmania)* as quais não são digeridas por esta enzima (Volpini, 2003; Volpini *et al.*, 2004; De Andrade *et al.*, 2006), sendo suficiente, então, para distinguir os dois gêneros.

4.3. Hibridização do DNA alvo utilizando sondas complementares

Um dos primeiros métodos de biologia molecular descritos para diagnóstico de doenças parasitárias foi a hibridização do DNA com sondas (*dot blot*). O DNA do parasito, geralmente um amplicon, ou seja, um produto de PCR, é primeiramente fixado a um suporte sólido, usualmente papel de nitrocelulose ou membrana de nylon (*blot*). Por meios químicos a fita dupla de DNA é desnaturada em duas fitas simples. Alternativamente, o DNA pode ser desnaturado antes da fixação na membrana. A matriz onde o DNA encontra-se fixado é primeiramente bloqueada para evitar hibridizações não-específicas com o suporte. Então, a sonda é colocada e se liga por complementaridade à fita simples de DNA. A seqüência complementar na molécula alvo deverá ser previamente conhecida e ser específica do gênero ou da espécie. Em seguida, o conjunto é lavado para retirar as sondas não ligadas. A sonda ou molécula repórter pode ser um outro fragmento de DNA que tenha sido clonado em um vetor como um plasmídeo. Mais comum, no entanto, é utilizar um oligonucleotídeo, pequeno pedaço de DNA fita simples com cerca de 20 a 30 bases nitrogenadas. A sonda deve ser marcada com uma enzima como a biotina ou com um elemento radioativo e a leitura deverá ser feita através de absorbância ou através de raios X, respectivamente. O processo com um todo consiste em obter o DNA, hibridizá-lo, lavar o *blot* e lê-lo. A sensibilidade e especificidade do método deverá ser previamente determinada utilizando-se cepas referência as quais se pretende detectar e distinguir (Singh, 1997).

As técnicas mais usualmente utilizadas para identificação de espécies de *Leishmania*, em geral utilizam um produto de PCR, gênero ou subgênero específico, como alvo a ser hibridizado com uma sonda marcada com radioisótopo, P^{32} por exemplo, específica para dado complexo de espécies (*L. braziliensis*, *L. donovani* ou *L. mexicana*). Estudos demonstram ser possível utilizar esta metodologia para se identificar o parasito, presente em biópsias de pele, de pacientes clinicamente diagnosticados como portadores de LTA, em área de ocorrência simpátrica de espécies de *Leishmania* (Passos *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001). Por outro lado, esta estratégia também já foi utilizada com sucesso para pesquisas de caráter eco-epidemiológico na investigação de potenciais reservatórios do parasito (Alexander *et al.*, 1998).

Justificativa

Algumas premissas fundamentaram a realização deste estudo:

No Novo Mundo, as leishmanioses são zoonoses sendo o homem um hospedeiro incidental (Ashford, 1996).

Em se tratando de uma zoonose, é imprescindível, para o sucesso de seu controle, conhecer os hospedeiros do parasito (Ashford, 1996; Chaves *et al.*, 2007).

Os fatores eco-epidemiológicos envolvidos na gênese das diferentes formas de leishmanioses no Novo Mundo são muito complexos (Rotureau, 2006). Várias espécies de *Leishmania* são capazes de causar doença no homem que por sua vez, interagem com diversas espécies de flebotomíneos (Murray *et al.*, 2005) e mamíferos hospedeiros. O resultado destas interações é uma profusa variedade epidemiológica de difícil entendimento e controle (Ashford, 1996; Shaw, 2007).

O ciclo epidemiológico de transmissão de *L. (V.) braziliensis*, agente etiológico mais freqüente de LTA, por exemplo, não é completamente conhecido (Ashford, 1996; Oliveira *et al.*, 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005).

Estudos para busca ativa de reservatórios de LTA em áreas de ocorrência de *L. braziliensis*, foram hábeis em demonstrar a presença do parasito em várias espécies de roedores silvestres e sinantrópicos (Forattini *et al.*, 1972; Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005) e em *Didelphis albiventris*, um marsupial (Brandão-Filho *et al.*, 2003).

No Brasil, os gambás já foram encontrados infectados por diversas outras espécies de tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (Deane *et al.*, 1984), *Trypanosoma rangeli* (Ramírez *et al.*, 2002) e *Leishmania* sp. (Arias *et al.*, 1981; Arias & Naiff, 1981; Cabrera *et al.*, 2003; Schallig *et al.*, 2007). Estes animais possuem hábitos sinantrópicos bem como freqüentam o ambiente silvestre. Sobem em árvores mas também buscam alimento no chão. Possuem hábitos nômades e são onívoros. Por todas estas características, são apontados por vários autores como excelentes candidatos a reservatórios e elos perfeitos entre o ciclo doméstico e o silvestre (Arias *et al.*, 1981; Arias & Naiff, 1981; Cabrera *et al.*, 2003).

No Brasil, as leishmanioses caracterizaram-se como endemias rurais (Orsini, 1940; Martins, 1956).

No entanto, há algumas décadas, casos autóctones vêm sendo notificados e aumentam em grandes cidades (Desjeux, 2001; Gontijo & Melo, 2004; Murray *et al.*, 2005), como por exemplo, em Belo Horizonte, uma metrópole com cerca de cinco milhões de habitantes que

vem apresentando casos autóctones tanto de LV quanto de LTA desde o início da década de 90 (Genaro *et al.*, 1990; Passos *et al.*, 1990).

Neste novo contexto, estudos de transmissão em áreas endêmicas urbanizadas são necessários, pois conhecimentos eco-epidemiológicos insuficientes podem contribuir para o aumento no risco da transmissão nestas áreas (Reithinger & Dujardin, 2007; Shaw, 2007).

Em Belo Horizonte, por exemplo, as leishmanioses têm sido foco de atenção e preocupação dos órgãos de saúde pública que vêm implementando as medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde (2003), baseadas no tripé de ações: eliminação de cães soropositivos, combate ao inseto vetor e tratamento dos casos humanos.

Em projeto anterior financiado pelo PAPES III, foi realizada na Regional Nordeste deste município, inquérito parasitológico e sorológico canino e o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte sacrificou todos os cães soropositivos aliado às outras medidas habituais de controle já praticadas (Ferreira *et al.*, 2007).

No entanto, essas ações não foram eficientes para conter o ciclo de transmissão e o que está sendo observado, é a manutenção de elevada incidência de casos humanos e caninos.

Este fato sugere que a epidemiologia das leishmanioses em Belo Horizonte, apresenta um quadro mais complexo do que o classicamente descrito, com possível ocorrência de uma transmissão secundária, peridoméstica, envolvendo outros reservatórios (Paranhos-Silva *et al.*, 1998).

Neste município não há qualquer estudo prévio para busca ativa de possíveis reservatórios silvestres e sinantrópicos de *Leishmania* sp.

Sabe-se que o papel que determinado reservatório desempenha na transmissão é um evento espacial e temporal. Assim, é preciso definir a importância destes animais no ciclo epidemiológico de transmissão da doença na área. Esta condição é primordial para que se possa estabelecer medidas de controle e vigilância epidemiológica mais eficazes.

Objetivos

1. Objetivo geral

Rastrear a presença de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos, capturados em área de transmissão de leishmaniose visceral e tegumentar, no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

1.1. Objetivos específicos

- Capturar pequenos mamíferos em área endêmica de LV e LTA no município de Belo Horizonte, MG;
- Verificar a presença de *Leishmania* sp. através de métodos parasitológicos e moleculares em amostras biológicas coletadas dos mamíferos capturados;
- Identificar a espécie de *Leishmania* nas amostras positivas dos animais capturados;
- Comparar a positividade da PCR em diferentes amostras biológicas;
- Comparar a positividade da PCR para as diferentes espécies e ambientes de coleta;
- Correlacionar os dados obtidos com a epidemiologia das leishmanioses na área estudada.

Material e Métodos

1. Área de estudo

O município de Belo Horizonte (19°46'35" e 20°03'34" sul; 43°51'27" e 44°03'47" oeste) está localizado a 852 m acima do nível do mar. Possui clima tropical de altitude, temperatura média em torno de 21°C, índice pluviométrico médio de 1450 mm/ano (www.ibge.gov.br). Trata-se de uma região intensamente urbanizada, cuja economia é baseada na atividade industrial de transformação e no comércio/serviços. Desde a década de 90 este município permanece como área endêmica, onde são registrados casos humanos de leishmaniose visceral e tegumentar.

Belo Horizonte é dividida em nove áreas político-administrativas: Barreiro, Centro-Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha e Venda Nova. A área escolhida para estudo foi a Regional Nordeste que contém 39,60 Km² (cerca de 10% da área total do município). A metade desta área, ou seja, 19,46 Km² está ocupada por áreas verdes compostas por parques, sítios e pastos. A área urbanizada é composta por 68 sub-regiões entre bairros, vilas e aglomerados sub-normais. Possui uma população de 273.892 habitantes (Censo IBGE/2000) (figura 1).

Esta área foi escolhida por haver apresentado, entre 2001 e 2005 (cinco anos anteriores ao início deste trabalho), número significativo de casos humanos de leishmaniose visceral (83 casos acumulados com média de 16,6 casos/ano) aliado à alta soroprevalência canina (média anual de 5,6%), bem como vários casos de leishmaniose tegumentar (média anual estimada de cerca de 30 casos). Em projeto anterior financiado pelo PAPES III/FIOCRUZ, foi realizada nesta área, a avaliação de métodos sorológicos e parasitológicos para o diagnóstico da LV canina. Foram coletadas amostras de 230 cães sendo 109 (47%) positivos ao exame parasitológico, 119 (52%) para a RIFI e 144 (63%) para o teste ELISA, mostrando um alto índice de cães infectados na área. Foi realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte o sacrifício de todos os cães soropositivos aliado a outras medidas de controle (Ferreira *et al.*, 2007). Entretanto, a soroprevalência canina se manteve elevada nos anos seguintes até os dias atuais, o que justifica o questionamento em relação à existência de outros possíveis reservatórios da infecção na área.

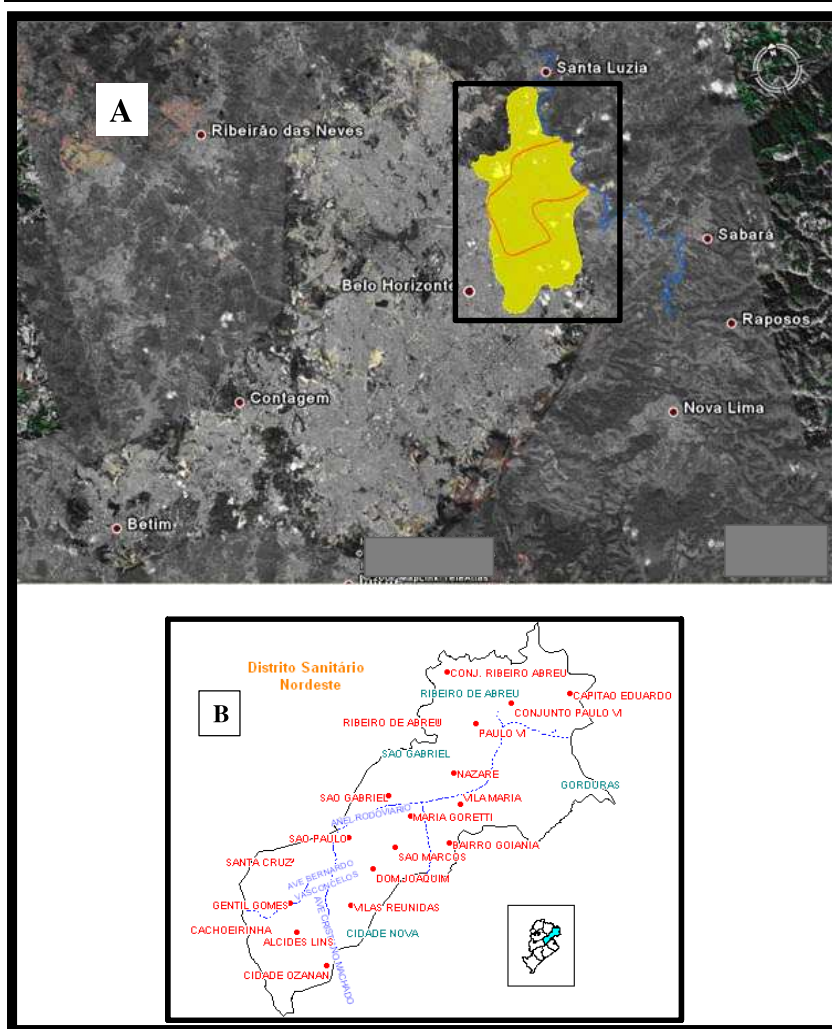


Figura 2: Área de estudo. Região Metropolitana de Belo Horizonte, imagem gravada por satélite, destacando a Regional Nordeste (amarelo) e a área de coleta (circundada em vermelho) (A); detalhe esquemático da Regional Nordeste mostrando os bairros (B).

Conforme descrito anteriormente, a Regional Nordeste é composta, em grande parte, por áreas de transição com baixa densidade demográfica, correspondentes a pequenos sítios, parques e matas secundárias. Neste trabalho, estas regiões foram genericamente denominadas “área verde” (figura 2) para diferenciá-las daquela peridomiciliar (figura 3), correspondente a quintais e anexos. A área verde escolhida para colocação das armadilhas é uma região de pequenos sítios chamada “Capitão Eduardo”. Está localizada na porção mais ao norte da regional, às margens do Rio das Velhas (figura 4) região limítrofe ao município de Sabará onde foram registrados os primeiros casos autóctones de LTA em Belo Horizonte (Passos *et al.*, 1990). A vegetação na área é em sua maior parte do tipo pasto, composta por capim e vegetação rasteira. Uma outra porção contém resquícios de vegetação nativa ou secundária com algumas árvores de médio porte como bambus e palmeiras (figura 2).



Figura 3: Área verde onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.



Figura 4: Área peridomiciliar onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Os pontos de coleta na área peridomiciliar (figura 4), foram escolhidos por conveniência, condicionados à presença no domicílio, ou próximo a ele, de casos humanos de LV e/ou LTA nos três anos anteriores ao início da pesquisa (2003, 2004 e 2005). Preenchida esta condição, foram escolhidas 20 residências espalhadas pela área, porém, mais concentradas na porção central e norte desta. Nos domicílios selecionados, foi explicado ao morador responsável o objetivo do trabalho e solicitado o consentimento para a realização da pesquisa. A colocação da armadilha, assim como o posterior resgate de seu conteúdo, estiveram condicionadas a essa autorização.

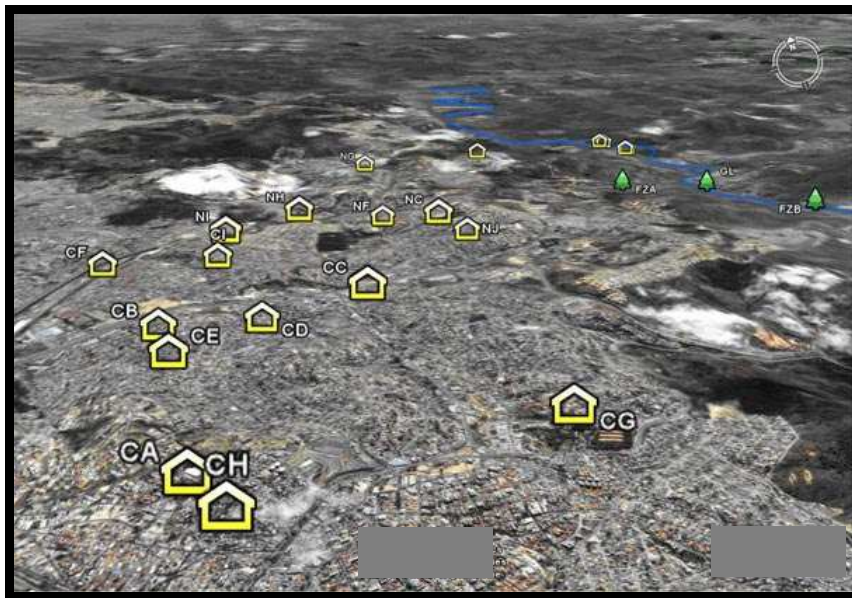


Figura 5: Pontos de coleta (georeferenciados) na área peridomiciliar e na área verde da Regional Nordeste do Município de Belo Horizonte, MG. Legenda: pontos da área peridomiciliar (amarelo, obs: os dois pontos ao fundo, são na verdade quatro pontos pois estão superpostos), pontos da área verde (verde), Rio das Velhas (azul); os pontos foram nomeados com duas letras, sendo a primeira (C ou N) referente à porção Central ou Norte, respectivamente, da Regional e a segunda (A a J) observando a seqüência em que foram colocadas as armadilhas na primeira captura .

2. Captura dos animais

O projeto obteve licença do órgão do Ministério de Meio Ambiente do Brasil, Instituto Brasileiro para o Meio Ambiente (IBAMA) para captura e sacrifício dos animais (licença 425/05). Por esta licença o projeto obteve autorização para sacrificar até 100 exemplares de espécies nativas e todos os exemplares das espécies exóticas como *Rattus norvegicus*, *R. rattus* e *Mus musculus* porventura capturados.

Este número (100 indivíduos) foi baseado na amostra de pequenos mamíferos necessária para o estudo, calculado através da equação para a estimativa de uma amostra populacional com nível de confiança de 95%, precisão de 10%, estimando-se uma prevalência

de 50% (WHO, 1995). Este valor foi estimado uma vez que não se dispunha de dados prévios de prevalência e porque com 50% obtém-se o maior “n” possível.

Para a captura viva dos animais, foram montadas, na área verde e nos arredores dos domicílios selecionados, armadilhas de arame galvanizado “tipo gaiola” (35x12x12 cm) com isca suspensa de abacaxi e bacon.

A distribuição dos pontos de captura na área verde foi feita em três trilhas, cada uma contendo 15 armadilhas, separadas entre si por uma distância de cerca de 20 metros. Foram realizadas cinco campanhas de captura nos meses de Junho, Setembro, Dezembro/2006 e Março, Junho/2007. As armadilhas foram iscadas e armadas a cada manhã e resgatadas na manhã seguinte, durante cinco dias. No máximo a cada dois dias, as iscas eram trocadas. Foi utilizado por campanha o total de 85 armadilhas/noite, sendo 40 expostas no peridomicílio e 45 na área verde. O esforço amostral previsto, ao final das cinco campanhas, foi de 1000 armadilhas no peridomicílio e 1125 armadilhas na área verde, somando um total de 2125 armadilhas. Os pequenos mamíferos capturados foram transportados vivos e em condições de conforto para o laboratório de Mastozoologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para os procedimentos de exame clínico, eutanásia e coleta das amostras.

3. Avaliação do estado clínico dos animais e coleta das amostras

No laboratório de Mastozoologia da UFMG, cada espécime foi devidamente identificado e uma ficha onde constam informações de importância para a investigação epidemiológica, preenchida. Nesta ficha consta dados como o local de coleta, espécie, se jovem ou adulto, sexo, estado de prenhez ou lactação, aspecto geral do animal e presença de alterações na pele como alopecia, descamação, hipocromia ou hiperpigmentação. Nesta mesma ficha foram posteriormente preenchidos os campos referentes aos resultados dos testes parasitológicos e moleculares.

O sacrifício animal e todos os procedimentos de coleta das amostras foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os primeiros dois exemplares de cada espécie foram taxidermizados sendo a pele e o crânio depositados na Coleção de Referência do Laboratório de Mastozoologia do

Departamento de Zoologia da UFMG. A identificação das espécies foi realizada por biólogo experiente, utilizando-se literatura específica, analisando-se caracteres morfológicos e a comparação junto aos exemplares depositados na coleção.

Antes da coleta das amostras, o animal era mergulhado em solução de etanol a 70% para assepsia. Foram então coletadas amostras de baço, fígado, medula óssea, pele da cauda e da orelha, que foram acondicionadas em álcool etílico absoluto para realização de testes moleculares. O sangue foi coletado a partir da cauda do animal ou diretamente do coração e impregnado em papel filtro especial para PCR (FTA cards® Whatman). Uma porção das amostras de baço, medula e pele da cauda foram coletadas em solução salina contendo os antibióticos estreptomicina (200 µg/mL) e penicilina (500 UI/mL) e, conforme metodologia proposta por Marzochi *et al.* (1993), o antifúngico flucitosina (500 µg/mL). A coleta dos tecidos foi feita próxima a uma chama acesa, na tentativa de diminuir a contaminação por fungos.

Durante a coleta, a equipe cuidou para que cada instrumento só entrasse em contato com um único tecido, para evitar contaminação seja por agentes biológicos seja por DNA. Assim, o material utilizado na coleta foi descartado adequadamente, quando de uso único (lâminas de bisturi, seringas, agulhas) ou separado para posterior lavagem e esterilização (tesouras e pinças) a cada tecido coletado.

4. Método parasitológico para detecção de *Leishmania* sp.

Os fragmentos de pele de cauda, baço e medula, coletados em solução salina contendo antibióticos e antifúngico, foram transferidos, em capela de fluxo laminar, para um novo tubo contendo 1 (um) mL de uma solução salina nova. Os pedaços de tecidos maiores, foram novamente recortados para retirada de um fragmento mais interno contendo em média 1 cm². Todos estes procedimentos foram feitos na tentativa de diminuir a contaminação por fungos.

Transcorridas 24 horas, o fragmento, então submetido a esta pré-lavagem, foi dilacerado com lâmina de bisturi, em placa de petri, tudo em ambiente estéril. Em seguida, foi colocado em meio de cultura NNN (Novy, McNeil e Nicolle), enriquecido com 0,4 mL de LIT (Liver Infusion Tryptose) contendo 20% de soro fetal bovino e mantido à 26°C ± 1°C. A cada sete a dez dias, uma alíquota foi observada ao microscópio óptico em aumento de dez e 40 vezes, sendo a amostra considerada positiva quando da presença de formas flageladas. Ao

mesmo tempo, foi realizado o repique de 0,3 mL da cultura para um novo tubo contendo 0,5 mL de LIT em NNN. Este processo foi repetido três vezes e após a quarta semana, as culturas negativas foram descartadas.

As amostras positivas foram postas a crescer, através de repiques semanais contendo quantidades seqüencialmente maiores de LIT, até constituírem uma massa de promastigotas com cerca de 10^9 parasitos, contados em câmara de Neubauer. Esta massa foi então submetida à lavagem por três vezes com PBS pH 7,2 para PCR ou solução de NaCl 0,85% e EDTA 0,1 M em pH 8 para análise de isoenzimas. A cada lavagem, procedeu-se à centrifugação durante 10 minutos a 4°C e cerca de 3800 g (8000 rpm). As amostras para PCR foram estocadas a -20°C e as amostras para isoenzimas no nitrogênio líquido. Os sistemas enzimáticos utilizados para identificação dos isolados foram 6PG, PGM, PEPD, GPI (Tampão maleico) e G6PDH, IDHNADP, ME, MDH (Tampão fosfato).

5. Métodos moleculares para detecção de *Leishmania* sp.

5.1. Extração do DNA das amostras de pele, baço e fígado

Os fragmentos de pele de orelha, pele de cauda, fígado e baço, coletados a partir dos animais capturados e acondicionados em álcool etílico absoluto a -20°C, foram submetidos à extração do DNA. A cada lote de amostras extraídas foram acrescentados controles para verificação da qualidade da extração. Como controle negativo foram utilizadas amostras, dos mesmos tecidos, de *Mus musculus* não infectado, proveniente do biotério do CPqRR e como controle positivo, amostras de tecidos de *Mesocricetus auratus*, hamster, experimentalmente infectado com *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). A metodologia para extração seguiu a orientação do fabricante do Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit® (Amersham Biosciences/GE).

Fragments de 10-20 mg do tecido foram submetidos à lise enzimática a 55°C por 12 a 16 horas para digestão das proteínas e em seguida à digestão pela RNase a 37°C por uma hora. As proteínas desnaturadas foram então precipitadas pelo acréscimo de solução saturante. Após centrifugação o DNA é recuperado no sobrenadante, precipitado com solução alcoólica, centrifugado, reidratado e armazenado -20°C até o momento do uso.

5.2. Extração do DNA da medula

A medula óssea, conservada e acondicionada adequadamente, foi submetida à extração utilizando-se o Kit de Cromatografia em Coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences/GE) conforme especificação do fabricante. Após lise das hemácias com solução de lise (10 mM KHCO₃; 155 mM NH₄Cl; 0,1 mM EDTA), obteve-se após centrifugação, uma massa de células brancas. Em seguida esta massa foi ressuspensa e submetida à extração. A mistura contendo as células brancas e a solução de extração foi então transferida para a coluna GFX e centrifugada por duas vezes. Ao novo pellet foi adicionada solução de lavagem (tampão Tris-EDTA adicionado de etanol absoluto) e então o DNA foi eluído com água destilada e deionizada aquecida a 65°C e estocado a -20°C até o momento do uso.

5.3. Extração do DNA do sangue em papel de filtro

Cada papel (FTA cards® Whatman) contendo sangue adsorvido foi picotado em cinco pedaços de 0,5 mm² cada, que foram, então, mergulhados em 200 µL de solução de lise (Whatman). Esta mistura foi então homogeneizada, deixada em repouso por cinco minutos e centrifugada por alguns segundos. A solução de lise foi então descartada por inversão. Este procedimento foi repetido três ou quatro vezes dependendo da turbidez da solução. Os papéis foram então lavados por duas vezes com TE e subsequentemente guardados em microtubos estocados a -20°C até o momento do uso.

5.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A metodologia utilizada permite amplificar um fragmento de 120 pares de base (pb) da região conservada do DNA minicircular do cinetoplasto de todas as espécies de *Leishmania* utilizando os iniciadores: 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC

AAC CCC 3' e 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degrave *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2000).

Foi utilizado o Kit Ready-To-Go™ PCR Beads® (Amersham Biosciences), cujos reagentes estão na concentração 2,5 U de Polimerase; 10 mM de Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 μM dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores incluindo BSA. A estes reagentes foram acrescentados 10 pmol de cada primer e 2 μL de DNA para 25 μL de solução final.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneampPCRSistem 2400®) utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos, seguindo de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo (10 ng de DNA extraído de cultura de *L. infantum chagasi* cepa MHOM/BR/74/PP75 ou *L. braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2903) e controle negativo (sem DNA). A sensibilidade dos iniciadores para as amostras biológicas foi verificada mediante teste com amostras de tecidos de *Mesocricetus auratus* (hamster) infectados experimentalmente com *L. braziliensis* ((MHOM/BR/75/M2903) cujo DNA foi extraído nas mesmas condições das amostras em teste. A sua especificidade foi testada com DNA extraído de tecidos de *Mus musculus* (camundongo) não infectados provenientes do biotério do CPqRR.

5.5. Visualização dos resultados

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata a 0,2%. Foram consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram a banda de peso molecular correspondente a 120 pb. O marcador de peso molecular utilizado foi o Φx174 (Invitrogen) digerido por *Hae* III, apresentando 11 fragmentos de 72 a 1357 pb.

6. Métodos moleculares para identificação de *Leishmania* sp.**6.1. PCR-RFLP**

As amostras positivas na PCR genérica foram submetidas à RFLP (polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição) utilizando as endonucleases *Apa* LI e *Hae* III tamponadas. A variabilidade dos tamanhos de fragmentos obtidos após a digestão com estas enzimas é mostrada na tabela 1.

Embora a *Hae* III seja teoricamente suficiente para discernir entre as três espécies sabidamente prevalentes na área, ela pode mascarar a presença de *L. braziliensis* em co-infecção com *L. chagasi* pois o DNA de ambas, ao ser digerido, gera fragmentos de 80 e 40 pb. Assim, optou-se por utilizar também a *Apa* LI em função de ela discriminar *Leishmania* (*Viannia*) de *L. (Leishmania)* e conseqüentemente possibilitar resultados mais facilmente visualizáveis. Resumidamente, 5 µL do produto da PCR foi digerido através da adição de 1 U da enzima de restrição e o seu tampão apropriado. A mistura foi incubada a 37°C por três horas. Os fragmentos de restrição foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. A revelação foi feita pela prata 0,2% e os fragmentos comparados a cepas referência (Volpini, 2003; Volpini *et al.*, 2004; De Andrade *et al.*, 2006).

Tabela 6: Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão do kDNA das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

<i>Espécie</i>	Enzima de restrição	
	<i>Hae</i> III	<i>Apa</i> LI
	Tamanho dos fragmentos após digestão (pb)	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	116	116
<i>L. (V.) braziliensis</i>	80, 40	88 e 32
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	120, 80, 60 e 40	120

Fonte: Quaresma, 2007.

6.2. Hibridização com sondas

Um total de 20 µL do produto da PCR de cada amostra positiva e 180 µL de água foram primeiramente aquecidos a 100°C por 10 minutos. Em seguida foi acrescentado 22 µL de solução desnaturante contendo NaOH 4 N em um microtubo resfriado por 10 minutos. Após a desnaturação, 100 µL desta solução foi aplicado em cada poço em uma membrana de nylon (Amersham) em duplicata. As sondas utilizadas foram o DNA total do minicírculo clonado de *L. (L.) infantum chagasi* (complexo *L. donovani*) ou de *L. (V.) panamensis* (complexo *L. braziliensis*) e marcado com dATP [α -³²P]. A membrana foi hibridizada separadamente, primeiro com a sonda para *L. (L.) infantum chagasi*, lavada e em seguida hibridizada com a sonda para *L. (V.) panamensis*. A revelação foi feita por exposição em raio X por 12 a 16 horas com um intensificação a -70°C (Degrave *et al.*, 1994; Passos *et al.*, 1999).

7. Análise estatística

As diferenças das frequências de positividade em cada comparação, seja entre tecidos, entre espécies, entre microambientes, foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) e para as comparações múltiplas foi utilizado o Método de Bonferroni. O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.

Resultados

1. Animais capturados

Foram distribuídas 1000 armadilhas no peridomicílio e 1125 armadilhas na área verde, sendo o esforço amostral total de 2125 armadilhas conforme previsto inicialmente. Ao final das cinco campanhas, foram coletados 96 espécimes (4,52% de sucesso nas capturas) de vários gêneros de roedores, *Akodon*, *Bolomys*, *Mus*, *Rattus* e *Oryzomys*, gambás do gênero *Didelphis* e carnívoros do gênero *Galictis* tanto na área peridomiciliar quanto na área verde (tabela 2).

Tabela 7: Lista dos pequenos mamíferos capturados, por espécie e ambiente, no período de junho/2006 a junho/2007 na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

<i>Espécie</i>	<i>Área peridomiciliar</i>	<i>Área verde</i>	Total por espécie n (%)
<i>Akodon</i> sp.	-	1	1(1,04%)
<i>Bolomys lasiurus</i>	-	4	4(4,17%)
<i>Didelphis albiventris</i>	2	31	33(34,38%)
<i>Didelphis aurita</i>	-	1	1(1,04%)
<i>Galictis</i> sp.	-	2	2(2,08%)
<i>Mus musculus</i>	18	4	22(22,92%)
<i>Oryzomys grupo subflavus</i>	-	5	5(5,21%)
<i>Rattus novergicus</i>	8	1	9(9,38%)
<i>Rattus rattus</i>	11	8	19(19,79%)
Total	39(40,63%)	57(59,38%)	96(100,01%)

Na área verde (figura 2) foi coletada a maioria dos espécimes, sendo que, algumas espécies foram encontradas somente nesta área: *Akodon* sp., *Bolomys lasiurus*, pequenos roedores silvestres, *Didelphis aurita*, uma espécie de gambá, *Galictis* sp., conhecido como furão e *Oryzomys grupo subflavus*, um roedor de tamanho médio.

Didelphis albiventris (figura 5), ocorreu principalmente na área verde (figura 2) demonstrando menor sinantropismo que *Mus musculus*, o camundongo de casa, *Rattus rattus*,

o rato preto de telhado e *R. norvegicus*, a ratazana de esgoto, todos roedores comensais sinantrópicos, que foram capturados principalmente na área peridomiciliar (figura 3).



Figura 6: *Didelphis albiventris* coletado em armadilha do tipo gaiola na primeira campanha (junho/2006) numa região de fazenda, Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Em um estudo epidemiológico, é preciso considerar além da diversidade de espécies, aspectos relativos à sazonalidade, como a distribuição destas ao longo do tempo, daí a importância de se realizar várias coletas. Foram coletados 31 espécimes na primeira campanha, 18 na segunda, 14 na terceira, 17 na quarta e 16 na quinta. Apesar de na primeira haverem sido capturados 32% do total de animais, não houve diferença significativa entre as campanhas em relação ao número de exemplares capturados ($p > 0,05$).

Também não houve diferença estatística significativa em relação ao número de exemplares capturados de cada espécie, nem no total, nem por campanha. Embora as campanhas tenham sido diversificadas em termos de número de exemplares de cada espécie capturados (figura 6), não pôde ser observada variação sazonal em função do tempo relativamente curto de observações (um ano). Somente em relação à espécie *Mus musculus* foi

verificada uma tendência linear, sem significância estatística, com diminuição gradativa do número de exemplares capturados ao longo do tempo.

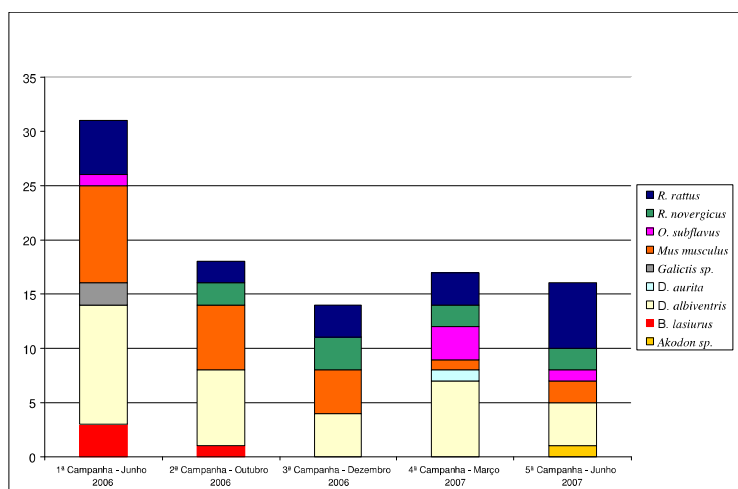


Figura 7: Número de exemplares capturados por espécie e por campanha (junho/2006 a junho/2007) na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

2. Exame clínico e parasitológico

Antes da coleta das amostras foi realizado o exame clínico dos animais. Em apenas um animal foi observada lesão na pata e na cauda, de causa desconhecida, mas que não parecia ser devida a atrito mecânico. Foram coletadas amostras para realização de teste parasitológico mas não resultaram positivas.

A cultura foi feita para amostras de baço, medula, pele de cauda e pele lesionada, de todos os 96 animais. Dentre as 290 tentativas de isolamento (três amostras habituais para cada animal e duas peles lesionadas), cerca de 60% tiveram que ser descartadas antes da quarta semana por estarem contaminadas por fungos.

Duas amostras foram positivas para formas flageladas, ambas oriundas da medula de *Didelphis albiventris*. Para identificação destes isolados, o material foi enviado para o IOC/FIOCRUZ para realização de teste isoenzimático. Foram também realizadas PCRs utilizando diferentes primers, para o gênero *Leishmania* (Rodgers *et al.*, 1990; Degraeve *et al.*, 1994), para *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1996) e para *T. rangeli* (Grisard *et al.*, 1999).

A primeira amostra (amostra T) foi isolada de um animal capturado na primeira campanha, na área verde, em uma região de sítios onde a vegetação é composta em grande parte por pequenas palmeiras como *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. e *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. (Lorenzi, 2002) (figura 2). No exame direto da cultura foi possível observar duas populações morfologicamente distintas de parasitos, uma mais fina e comprida e outra mais larga, porém mais curta. Em ambas as populações, a maior parte dos parasitos apresentava o núcleo ao lado do cinetoplasto como nas formas epimastigotas comuns em culturas mais jovens de *T. cruzi* (figura 7).

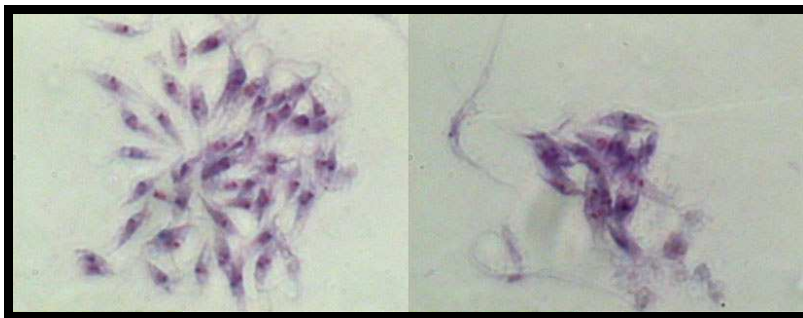


Figura 8: Formas flageladas isoladas em cultura obtida a partir de material de medula de *D. albiventris* (amostra T) coletado em junho de 2006 na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Os sistemas enzimáticos utilizados foram capazes de identificar a presença de *Trypanosoma cruzi*. O DNA extraído do material isolado foi negativo na PCR genérica para *Leishmania* (Degraive *et al.*, 1994). Porém, o material mostrou-se positivo na PCR para *Trypanosoma cruzi* tipo 1 relacionado ao ciclo silvestre de transmissão e *Trypanosoma rangeli*, detectando-se infecção mista (figura 8). Este teste foi realizado em colaboração com o Laboratório de Triatomíneos do CPqRR. Cabe ressaltar que, os iniciadores utilizados nas reações de amplificação para o gênero *Leishmania* foram testados com DNA de *Trypanosoma cruzi* e aqueles utilizados nas reações específicas para o gênero *Trypanosoma* testados com DNA de *Leishmania*. Os resultados foram negativos, demonstrando, não ocorrer amplificação cruzada quando da utilização destes iniciadores conforme previsto na literatura (Souto *et al.*, 1996; Grisard *et al.*, 1999).

A segunda amostra (amostra L) foi isolada de animal coletado na terceira campanha também na área verde. Ao exame do esfregaço da cultura, corado com solução de Giemsa, foi possível observar poucos parasitos, flagelados, muito finos e compridos apresentando núcleo próximo ao cinetoplasto (figura 9). Os sistemas enzimáticos utilizados não foram capazes de identificar a espécie. A PCR para o gênero *Leishmania* foi positiva, porém o produto amplificado não hibridizou nem com a sonda para o complexo *L. braziliensis* nem com a sonda para o complexo *L. donovani*. O parasito isolado permanece até o momento sem identificação sendo necessários outros testes para sua caracterização.

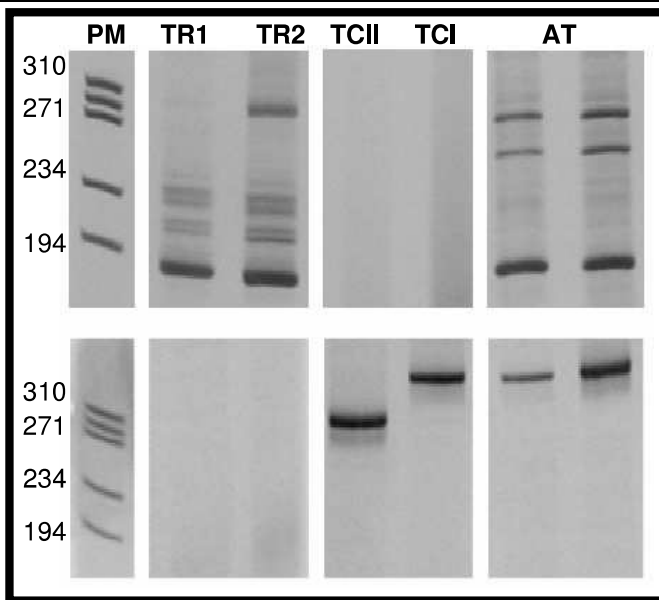


Figura 9: Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata para visualização do produto de PCR gerado após amplificação com os iniciadores específicos para *T. rangeli* (TR) ou *T. cruzi* (TC) para identificação do parasito isolado a partir de material de medula (AT) de *D. albiventris* coletado em junho de 2006 na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. Canaletas: **PM**, Marcador de Peso Molecular; **Cepas referência:** **TR1** cepa *T. rangeli* H8GS; **TR2** cepa *T. rangeli* San Agustin; **TCII** Cepa Y (*T. cruzi* II); **TCI** Cepa YUYU (*T. cruzi* I); **AT**: Amostra T em duplicata.

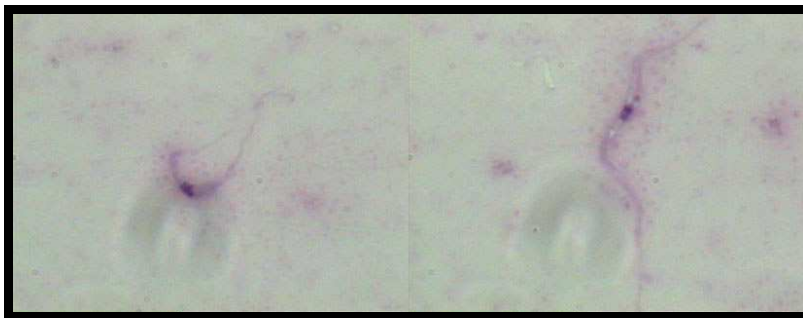


Figura 10: Formas flageladas isoladas em cultura obtida a partir de material de medula de *D. albiventris* (amostra L) coletado em setembro de 2006 na área verde da Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

3. Testes moleculares

3.1. PCR para detecção do gênero *Leishmania*

Todas as amostras coletadas de baço, fígado, medula, sangue, pele de cauda e de orelha, dos 96 animais, foram testadas com um par de iniciadores que amplifica a região conservada do DNA minicircular do cinetoplasto de todas as espécies de *Leishmania* (Rodgers *et al.* 1990; Degraeve *et al.*, 1994). Esta reação é muito sensível, pois o kDNA ocorre numa frequência em torno de dez mil cópias para cada célula. Quaresma (2007) encontrou uma sensibilidade da ordem de 0,1 fg/ μ L de DNA de *Leishmania* sp. para as reações utilizando estes iniciadores.

Foram testadas 543 amostras provenientes de seis diferentes tipos de tecidos dos 96 animais capturados. Destas, 47 (8,7%) foram positivas na PCR para o gênero *Leishmania* referentes a 28 (29%) exemplares do total capturado. Todas as espécies com exceção de *Akodon* sp., um único exemplar capturado, apresentou pelo menos um exemplar positivo (tabela 3). Não houve diferença significativa na proporção de positivos em relação às espécies ou ao ambiente de coleta ($p > 0,05$) (tabela 3 e figura 10). Em relação a este último parâmetro, ressalta-se que no ambiente peridomiciliar, de um total de 20 casas onde foram colocadas as

40 armadilhas em apenas quatro foram detectados os 12 animais positivos. Na área verde foram capturados animais positivos nas três trilhas (figura 11).

Tabela 8: Resultado da PCR para o gênero *Leishmania*, por espécie e ambiente, dos animais capturados no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Espécie	Ambiente				Total
	Peridomiciliar		Silvestre		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Akodon sp.	-	-	-	1	1
B. lasiurus	-	-	1	3	4
D. albiventris	-	2	7	24	33
D. aurita	-	-	1	-	1
Galictis sp.	-	-	2	-	2
M. musculus	6	12	2	2	22
O. grupo subflavus	-	-	2	3	5
R. novorgicus	1	7	1	-	9
R. rattus	5	6	-	8	19
Total	12	27	16	41	96

No entanto, a porcentagem de animais positivos em cada campanha, variou muito. O maior número relativo de animais positivos (13/17 ou 76%) foi conseguido no mês de março/2007 (quarta campanha) sendo significativamente maior ($p < 0,005$) do que em todas as demais (figura 12).

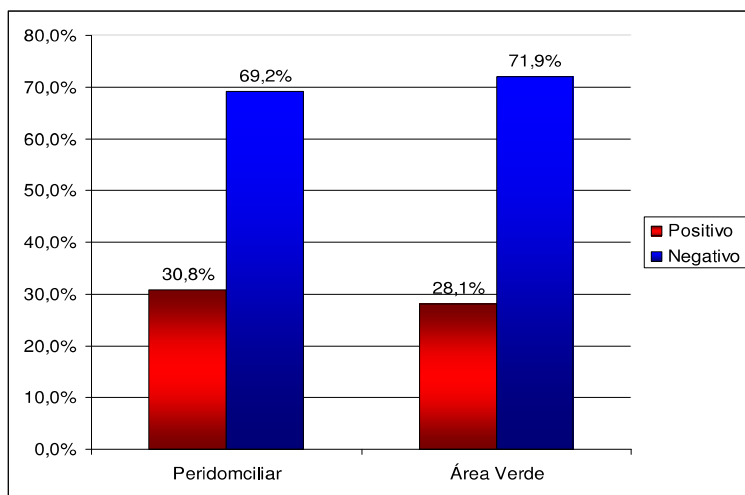


Figura 11: Percentual de positividade na PCR para o gênero *Leishmania* segundo o local de captura dos pequenos mamíferos na Regional Nordeste no período de junho/2006 a junho/2007 no município de Belo Horizonte, MG.

Em relação à efetividade de cada tecido em resultar positivo na PCR, foi observado que as proporções de positivos verificadas para os tecidos fígado e pele, foram significativamente maiores que aquelas obtidas a partir de material da medula óssea e de sangue ($p < 0,05$) (tabela 4 e figura 13), sendo que todas as amostras de sangue coletadas foram negativas (figura 13). Grande parte dos animais (46%) apresentou dois ou mais tecidos positivos (tabela 5). Não houve diferença estatística significativa entre tecidos para dada espécie ou grupo (marsupial ou roedor) apesar das discrepâncias observadas (tabela 4 e figura 14).



Figura 12: Pontos de coleta (georeferenciados) na área peridomiciliar e na área verde da Regional Nordeste do Município de Belo Horizonte, MG. Legenda: pontos da área peridomiciliar (amarelo, obs: os dois pontos ao fundo, são na verdade quatro pontos pois estão superpostos), pontos da área verde (verde), pontos onde foram encontrados animais positivos (marcados com cruz vermelha).

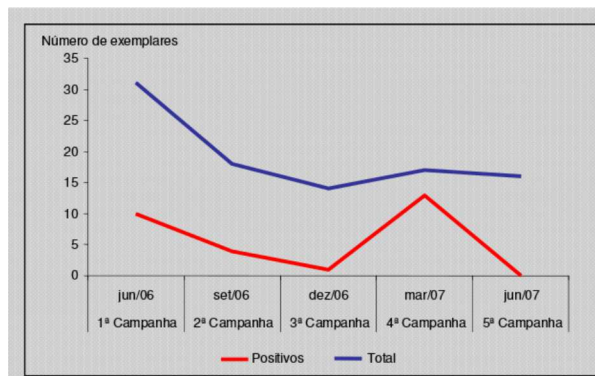


Figura 13: Total de animais capturados e número de exemplares positivos, na PCR para o gênero *Leishmania* por campanha de captura (junho/2006 a junho/2007) na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Tabela 9: Positividade na PCR para o gênero *Leishmania* para cada espécie coletada no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG, em relação ao tecido analisado.

Espécie	Tecidos				
	Baço +/total	Fígado +/total	Medula +/total	Pele Orelha +/total	Pele Cauda +/total
<i>Akodon</i> sp.	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>B. lasiurus</i>	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4
<i>D. albiventris</i>	0/33	3/33	1/33	2/33	6/33
<i>D. aurita</i>	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>Galictis</i> sp.	1/2	0/2	0/2	1/2	1/2
<i>Mus musculus</i>	4/22	6/21	0/20	3/22	5/22
<i>O. grupo subflavus</i>	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5
<i>R. novergicus</i>	0/9	1/9	0/9	1/9	1/9
<i>Rattus rattus</i>	0/19	1/19	1/19	3/19	1/19
Total	7/96	13/95	2/94	11/95	14/95

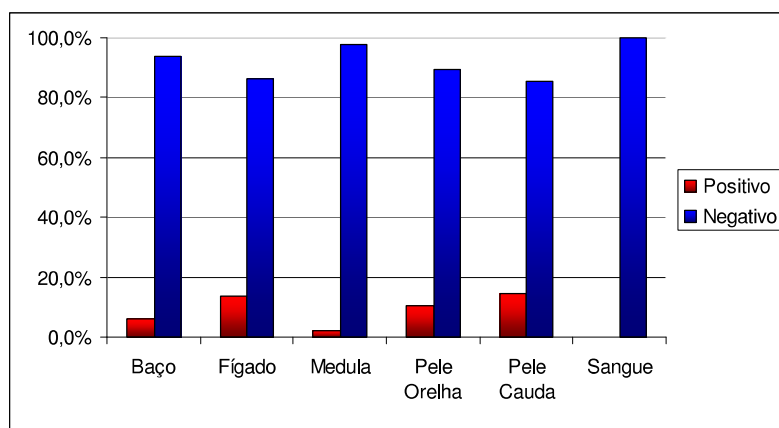


Figura 14: Percentual de positividade na PCR para o gênero *Leishmania* por tecido coletado em pequenos mamíferos, no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Tabela 10: Distribuição por espécie e pelo número de tecidos positivos na PCR para o gênero *Leishmania* dos exemplares capturados, no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

ESPÉCIE	1 TECIDO	2 TECIDOS	3 TECIDOS	4 TECIDOS	TOTAL
<i>B. lasiurus</i>		1			1
<i>D. albiventris</i>	4	1	2		7
<i>D. aurita</i>	1				1
<i>Galictis</i> sp.	1	1			2
<i>M. musculus</i>	2	3	2	1	8
<i>O. grupo subflavus</i>	2				2
<i>R. novergicus</i>	1	1			2
<i>R. rattus</i>	4	1			5
TOTAL	15	8	4	1	28

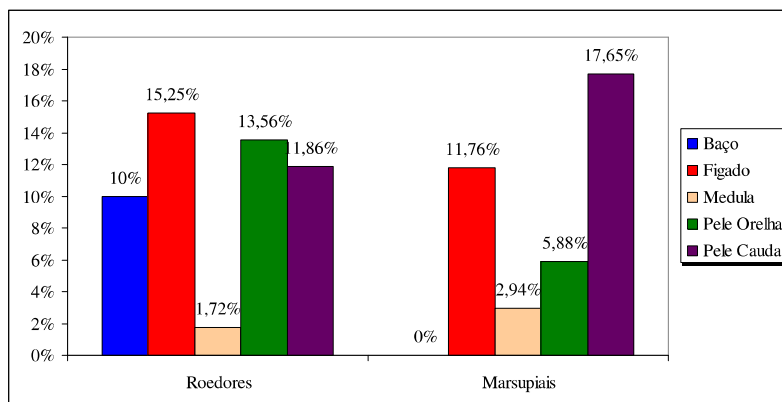


Figura 15: Percentual de positividade na PCR para o gênero *Leishmania* por tecido coletado em pequenos mamíferos, no período de junho/2006 a junho/2007, na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG, em relação ao grupo ao qual o animal pertence (marsupial ou roedor).

3.2. Técnicas moleculares para identificação de *Leishmania* sp.

3.2.1. PCR-RFLP

Todas as 47 amostras positivas, dos diferentes tecidos, na PCR para o gênero *Leishmania*, foram submetidas à digestão pela *Apa* LI e pela *Hae* III (Volpini *et al.*, 2003). Dentre estas, 42 (89,4%) apresentaram o perfil condizente com *L. (V.) braziliensis* (figura 15). Esta espécie é o agente causal mais comum de LTA em Minas Gerais bem como no resto do Brasil e na América Latina (Passos *et al.*, 1993, Gontijo *et al.*, 2002).

Somente *Leishmania (Viannia)* apresenta sítio de restrição para a enzima *Apa* LI (Volpini, 2003). O fragmento de 120 pb proveniente de *L. (V.) braziliensis* é cortado em dois outros com 88 e 32 pb. O amplicon proveniente das espécies de *Leishmania (Leishmania)* (*L. amazonensis* e *L. chagasi*) permanece intacto (Volpini *et al.*, 2004, Andrade *et al.*, 2006) (figura 15).

As cinco amostras restantes, não apresentaram um perfil de digestão claramente identificável com uma das três espécies que ocorrem em humanos na área estudada. Três

destas amostras são provenientes do mesmo animal, da espécie *Didelphis albiventris*, uma amostra de pele, uma de medula e outra isolada em cultura a partir de material de medula. Utilizando-se 8 sistemas enzimáticos, não foi possível identificar o isolado. Além disso, dentre estas cinco amostras, três eram de material de medula, as únicas amostras de medula positivas na PCR.

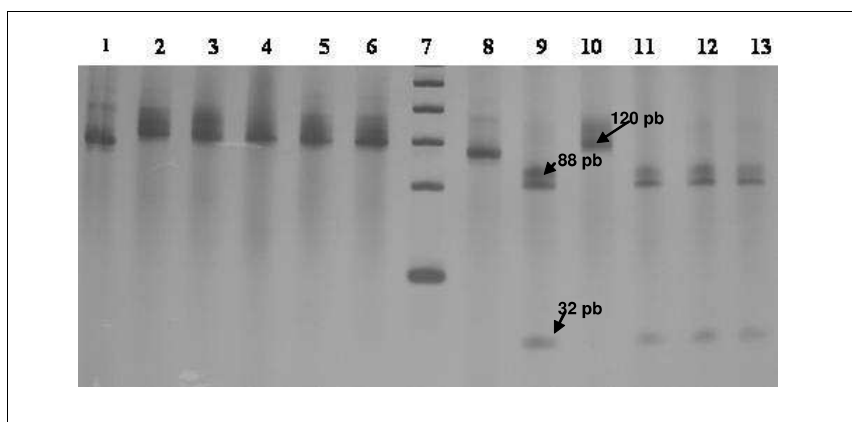


Figura 16: PCR-RFLP utilizando a enzima *Apa* LI para identificação das espécies nas amostras positivas para *Leishmania* sp. coletadas dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste, entre junho 2006 a junho 2007, em Belo Horizonte, MG. Canaletas 1 a 6: DNA amplificado na PCR genérica (Rodgers *et al.*, 1990; Degraeve *et al.*, 1994) não –digerido; 7: Marcador de Peso Molecular de 25 pb, menor peso 50 pb, maior 250 pb; 8 a 13: mesmas amostras porém digeridas com *Apa* LI (Volpini *et al.*, 2004); 1 e 8: DNA *L. amazonensis* (IFLA/BR/67PH8); 2 e 9: DNA de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75M2903); 3 e 10: DNA de *L. i. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); 4 e 11, 5 e 12, 6 e 13 DNA compatível com *L. braziliensis* extraído de diferentes tecidos , respectivamente, baço, pele de cauda e de orelha do mesmo espécime de *Mus musculus*.

3.2.2. Hibridização

As amostras positivas, na PCR genérica, também foram submetidas à hibridização com sondas complexos específicas (Passos *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001). As mesmas 42 amostras que apresentaram perfil condizente com *L. (V.) braziliensis* na PCR-RFLP, hibridizaram com a sonda para *L. (Viannia)* (figura 16) e não hibridizaram com a sonda para *L. donovani* (dados não mostrados). Logo, os dois testes foram 100% concordantes e em ambos foi descartada a possibilidade de infecção mista. As demais (cinco amostras) não identificadas através da PCR-RFLP também não hibridizaram com nenhuma das duas sondas estando, até o momento, indefinida sua posição taxonômica.

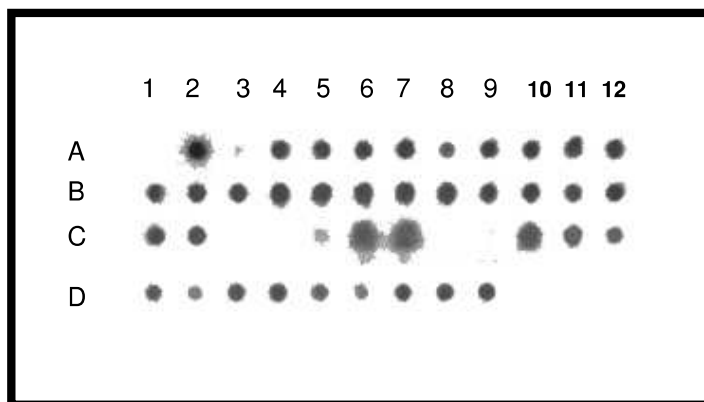


Figura 17: Reação de hibridização (dot-blot) com a sonda para o complexo *L. braziliensis*. Caracterização das amostras positivas coletadas dos pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste, entre junho 2006 a junho 2007, em Belo Horizonte, MG. Canaletas: 1A, 2A e 3A cepas referência, *L. amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (M2903) e *L. i. chagasi* (PP75) respectivamente; a partir de 4A: amostras de diferentes tecidos provenientes dos pequenos mamíferos coletados. Amostras negativas na hibridização: 1A (*L. amazonensis*) e 3A (*L. chagasi*); 3C (amostra L), 4C e 5C são referentes ao mesmo espécime de *D. albiventris* de 3C; 8C medula de *R. rattus* e 9C pele de cauda de *R. norvegicus*.

Discussão

1. Situação da doença e dados sobre a transmissão na área

A região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) é uma área urbanizada e densamente habitada, considerada endêmica para as leishmanioses tegumentar e visceral há vários anos (Genaro *et al.*, 1990; Passos *et al.*, 1990). Belo Horizonte é um município sem área rural característica e a transmissão ocorre em praticamente todos os bairros da cidade inclusive nos centrais, caracterizando um caráter urbano de transmissão que vem sendo ressaltado por vários autores (Passos *et al.*, 1993; Profeta da Luz *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). Este município foi alvo de intensa migração a partir dos anos 70 e os primeiros casos de leishmaniose começaram no final dos anos 80. Sabe-se que a migração é um dos principais fatores de risco para a emergência ou reemergência de parasitoses tipicamente rurais. Isto se dá em função da maior probabilidade de contato do parasito com uma população sem imunidade que, no caso de uma área urbana é em grande número.

Neste município, inquéritos detectaram elevada incidência da doença humana bem como altos índices de cães infectados por *L. (L.) infantum chagasi* (Silva *et al.*, 2001), tendo sido verificada correlação positiva entre leishmaniose visceral humana e canina (Oliveira *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). Margonari e colaboradores (2005) observaram alta densidade do principal vetor de LVA, *Lu. longipalpis*, embora não tenha sido encontrado nenhum exemplar positivo para *Leishmania*. Medidas de controle baseadas no tratamento dos casos humanos, eliminação de cães soropositivos e combate ao vetor vêm sendo aplicadas sem, contudo, obter sucesso na diminuição do número de LV. Nos anos de 2003 a 2006, o número de casos humanos foi o maior desde que a doença começou a ser notificada nesta cidade. Somente nos dois últimos anos deste período, a Secretaria de Saúde registrou 225 casos com 20 óbitos (www.pbh.gov.br).

É difícil estimar os casos de leishmaniose tegumentar uma vez que, por se tratar de agravo não letal, são subnotificados. Os primeiros casos de LTA na RMBH foram registrados em 1987 na cidade de Sabará (Passos *et al.*, 1990). Um estudo epidemiológico mais aprofundado encontrou nesta área uma alta densidade de *Lu. whitmani*, potencial vetor de *L. braziliensis* mas apenas um cão (Passos *et al.*, 1993) e um gato (Passos *et al.*, 1996) possivelmente infectados com este parasito. Foram encontradas crianças, mulheres e homens sem qualquer vínculo ocupacional com a mata, infectados ou com história prévia de infecção, concluindo se tratar de transmissão peridomiciliar ou domiciliar (Passos *et al.*, 1993).

A área deste estudo, Regional Nordeste do município de Belo Horizonte é limítrofe ao município de Sabará e apresentou o maior número acumulado de casos de LV no período compreendido entre 94 a 2006. Somente nesta área, que corresponde a cerca de 10% da área total do município, o número de casos humanos da doença vem atingindo uma média de 17 casos/ano e no período deste estudo (junho/2006 a junho de 2007) foram registrados 33 casos de LT.

Estes dados sugerem que a epidemiologia das leishmanioses em Belo Horizonte, apresenta um quadro mais complexo do que o classicamente descrito com possível ocorrência de transmissão secundária, peridoméstica, envolvendo outros hospedeiros/reservatórios. Neste município não há qualquer estudo prévio para busca ativa de possíveis reservatórios silvestres e sinantrópicos de *Leishmania*. Diante da necessidade de se investigar a presença de outros hospedeiros de *Leishmania* que pudessem participar do ciclo de transmissão nesta área formulou-se a seguinte hipótese de estudo: “Existem outros mamíferos participando da cadeia de transmissão de *Leishmania* sp. na área de estudo?”.

2. Pequenos mamíferos, roedores e marsupiais, como hospedeiros de *Leishmania* (*Viannia*) na área em estudo

O direcionamento das capturas para os pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) se baseou em estudos anteriores que apontam espécies destes grupos como possíveis reservatórios de *Leishmania* sp. (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

O papel do cão como principal reservatório de *L. (L.) infantum chagasi* em áreas periurbanas e urbanas é incontestável (Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Gontijo & Melo, 2004). Porém, os achados deste parasito em outros animais e as dificuldades no controle apesar do maciço sacrifício canino, vêm levantando a hipótese de transmissão secundária através de outros animais. Neste sentido, os gambás são os principais candidatos a reservatórios, em função de já haverem sido encontrados infectados por este parasito por diversas vezes (Sherlock *et al.*, 1984; Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1998 b; Cabrera *et al.*, 2003; Schallig *et al.*, 2007). Além disso, servem de fonte de infecção para *Lu. longipalpis* (Travi *et al.*, 1998 b) que se alimenta nesta espécie com uma certa frequência (Sherlock *et al.*, 1984).

Neste estudo não foi possível detectar a presença de *L. (L.) infantum chagasi* em nenhum animal silvestre ou sinantrópico. Nenhuma das amostras positivas, seja através de isolamento em cultura ou detecção de DNA demonstrou estar infectada por parasitos pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, contrariando os achados de Schallig e colaboradores (2007) nesta mesma área.

Em relação às leishmânias dermatóricas, há vários anos, pesquisadores cogitam a hipótese de animais silvestres serem os principais reservatórios. A exemplo do que ocorre no Velho Mundo onde, por exemplo, *Rhombomys opimus* é o principal reservatório de *L. major* acreditou-se que os roedores deveriam ter papel fundamental na transmissão no Novo Mundo. De fato, vários achados comprovaram esta hipótese e hoje se crê que os principais reservatórios de *L. amazonensis* sejam os roedores do gênero *Proechymis*. Já os reservatórios principais de *L. guyanensis* são edentados como o tamanduá e a preguiça (Lainson *et al.*, 1981; Shaw, 1988). Além dos achados destes animais infectados, vários aspectos eco-epidemiológicos foram analisados para que se chegasse a estas conclusões. Os hábitos destes animais são compatíveis com o dos flebotomíneos vetores, bem como a transmissão para humanos é um evento relativamente comum nos ecossistemas onde ocorrem, ou seja, principalmente na região amazônica.

No entanto, os reservatórios de *L. braziliensis* permanecem indefinidos. A eco-epidemiologia da transmissão desta espécie é extremamente complexa em função dos vários ecótopos onde este parasito é prevalente. Em microambientes diferentes, a transmissão envolve diversas espécies de flebotomíneos ou ainda a mesma espécie apresentando hábitos modificados e diferentes espécies de mamíferos, em uma imensidão territorial que se estende por toda a América do Sul até a América Central. Provavelmente, os reservatórios deste parasito devem ser vários, dependendo do ecótopo e das circunstâncias de transmissão.

Na área em estudo, o número de animais positivos, nos testes moleculares, para *Leishmania* subgênero *Viannia* foi bastante significativo (28/96) e pela primeira vez, foi detectada a infecção natural em *D. aurita* (marsupial), *Galictis sp.* (carnívoro), *Mus musculus* e *R. norvegicus* (roedores sinantrópicos).

Antes da coleta das amostras foi realizado o exame clínico dos animais. Não foi observado, em nenhum deles, lesão leishmaniótica clássica como aquelas, glabras e descamativas, nas extremidades da cauda, classicamente descritas por Nery-Guimarães *et al.* (1968). Este fato não foi surpreendente uma vez que a literatura é farta em citar ausência de lesões leishmanióticas em animais positivos em algum teste posterior (Forattini, 1960). Nos animais silvestres são freqüentes as infecções inaparentes sem lesões ou com lesões pouco

graves o que é um dado importante para que uma espécie seja considerada um bom reservatório (Nery-Guimarães *et al.*, 1968). O homem, ao contrário, tende a reagir mais intensamente à invasão do parasito, caracterizando uma relação anômala e recente, em termos de evolução, o que determina um comportamento mais agressivo da doença no ser humano (Forattini, 1960).

3. Presença de parasitos flagelados em material obtido em cultura a partir de medula de *D. albiventris* (gambás)

Mesmo na ausência de lesões, tentou-se o isolamento de *Leishmania* em meio NNN enriquecido com LIT baseado no fato de que não necessariamente o animal parasitado precisa apresentar lesão (Herrer, 1949). No entanto, apesar do cultivo primário de *Leishmania* sp. em meio NNN ser um método bastante sensível, apresenta alto grau de contaminação (Herrer, 1949; Forattini *et al.*, 1972; Dias *et al.*, 1977) especialmente quando se trata de amostras de coletadas em campo. Além disso, o parasito *L. braziliensis*, principal agente causal da LTA em Minas Gerais (Passos *et al.*, 1999) e, portanto, o parasito que mais provavelmente seria encontrado, tem um crescimento difícil e lento em cultura quando comparado à *L. amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972; Forattini *et al.*, 1973; Passos *et al.*, 1999).

O DNA do parasito isolado na Amostra L, foi amplificado pelos iniciadores que amplificam a região conservada do kDNA de *Leishmania*. Mas uma análise microscópica mais detalhada, testes isoenzimáticos e moleculares posteriores descartaram a possibilidade de ser uma das três espécies de conhecida importância epidemiológica na área *L.(L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) infantum chagasi*. Permanece a dúvida se este parasito seria uma espécie que ocorre naturalmente entre animais silvestres como *L. (L.) hertigi* ou *L. (L.) deanei* ocorrem e que alguns autores denominam como Paraleishmania (Cupolillo *et al.*, 2000). O fato dessa amostra não ter hibridizado com as sondas pode ser devida ao fato de não haver hibridização cruzada de algumas espécies com os DNAs utilizados como sonda, conforme observado por Oliveira e colaboradores (2005). *L. (L.) infantum chagasi*, cujo DNA foi utilizado como sonda para o subgênero *Leishmania*, pertence ao complexo *L. donovani*, enquanto *L. (L.) hertigi* e *L. (L.) deanei* por exemplo, pertencem ao complexo *L. mexicana* para o qual, nenhuma sonda mais específica foi testada.

Foi possível, entretanto, encontrar um espécime de *D. albiventris* parasitado por *T. cruzi* tipo I e *T. rangeli* caracterizando uma infecção mista. Este achado caracterizou o primeiro isolamento de *T. rangeli* em Belo Horizonte e também o primeiro isolamento deste parasito a partir de medula de um animal naturalmente infectado. O *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) causa uma infecção assintomática conhecida como tripanossomíase rangeli, tendo como principal vetor o gênero *Rhodnius* que habita palmeiras. Este parasito, apesar de não causar doença no homem, possui importância epidemiológica pois, ocorre simpatricamente e possui vetores e hospedeiros em comum, bem como similaridade antigênica ao *T. cruzi*, podendo ser confundido com este nos testes sorológicos (Dias *et al.*, 2007). Isso pode ocasionar verdadeiras tragédias humanas, por diagnóstico falso positivo para doença de Chagas além de tratamentos e custos sociais e econômicos desnecessários.

Além disso, Belo Horizonte não é área endêmica para doença de Chagas, no entanto por este achado, fica comprovado que o agente etiológico circula entre animais sinantrópicos que vivem em proximidade ao homem. A destruição dessas ilhas de mata verde onde o parasito circula no ambiente silvestre pode aproximá-lo do ambiente antrópico e de triatomíneos capazes de colonizar a casa como o *Panstrongylus* sp. e aumentar o risco de doença. Epidemiologicamente, o achado é muito coerente pois, o gambá, hospedeiro conhecido destes parasitos (Deane *et al.*, 1984; Ramirez *et al.*, 2002; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004), foi coletado na área verde onde existem muitas palmeiras, ecótopo natural dos triatomíneos da tribo Rhodinií da qual o gênero *Rhodnius* faz parte.

O achado de *T. rangeli* foi confirmado até o momento através de PCR utilizando primers, que amplificam uma região do mini-exon, específicos para esta espécie (Grisard *et al.*, 1999). A morfologia das formas epimastigotas não é conclusiva, mas a população mais fina e comprida observada (figura 7), mostra-se compatível, com as formas epimastigotas desta espécie. Para um diagnóstico mais conclusivo pretende-se fazer xenodiagnóstico utilizando triatomíneos do gênero *Rhodnius* e observar se haverá desenvolvimento na hemocele e parasitos na glândula salivar.

4. Aspectos relacionados à detecção de DNA de *Leishmania* (*Viannia*)

Em relação aos testes moleculares voltados para detecção de *Leishmania* sp., os tecidos que apresentaram os maiores índices de positividade foram o fígado e a pele (figura

13), sendo o último o local a partir do qual os flebotomíneos podem se infectar. A pele da cauda foi eficiente para todas as espécies e embora não seja significativa a diferença, foi mais positiva que a pele da orelha para o grupo dos marsupiais (figura 14). Este fato era esperado uma vez que a orelha dos gambás é muito pobre em tecido subcutâneo. No entanto, por ser muito vascularizada, deve ser excelente fonte de infecção para o vetor.

Não foi detectado DNA de *Leishmania* nas amostras de sangue, isto pode se dever a vários fatores dos quais podem ser citados, a escassez de parasitos no sangue periférico, o tipo de coleta, ou seja, em papel de filtro, ou ainda à inibição da reação pela presença de hemoglobina.

Há várias razões para se considerar a PCR como um dos melhores métodos para detectar *Leishmania* sp. em amostras biológicas. Consiste em técnica pouco invasiva que possibilita a detecção do parasito no sangue periférico (LV) ou diretamente no material da lesão (LTA). Embora o diagnóstico parasitológico persista como o padrão ouro em função da sua especificidade, a sua sensibilidade é baixa (Reithinger & Dujardin, 2007). Em cultura, por exemplo, as amostras coletadas em campo estão sujeitas, freqüentemente, à contaminação por fungos (Herrer, 1949; Forattini *et al.*, 1972; Dias *et al.*, 1977) e apesar de relativamente simples e baratas, estas técnicas exigem a presença de profissional minimamente qualificado (Singh, 1997). A PCR, em relação aos métodos sorológicos, apresenta como vantagem a especificidade, principalmente quando se trabalha com animais de campo, reservatórios de outros protozoários como é o caso do *Didelphis/Trypanosoma cruzi*. Além disso, em se tratando de um inquérito epidemiológico para o qual, o que interessa é a presença de infecção atual e não passada, a PCR seria o método mais indicado uma vez que o DNA, ao contrário da imunidade celular ou humoral, persiste apenas por algumas horas após a morte do parasito (Disch *et al.*, 2004; Prina *et al.*, 2007). O teste de Montenegro, por exemplo, utilizado como ferramenta diagnóstica quando há suspeita de LTA, não discrimina entre infecções presentes e passadas (Melo *et al.*, 1977), sendo apenas acessório ao diagnóstico clínico.

Além disso, a PCR cujo alvo é o DNA do cinetoplasto é muito sensível, pois o kDNA ocorre numa frequência em torno de dez mil cópias para cada célula (Reithinger & Dujardin, 2007). Quaresma (2007) encontrou sensibilidade semelhante, aos dados da literatura (Rodgers *et al.*, 1990) da ordem de 0,1 fg/ μ L, utilizando iniciadores que amplificam a região conservada, ou seja, um centésimo de kDNA de uma leishmânia.

Esta característica da PCR é especialmente interessante quando a epidemiologia é condizente com a presença de *L. (V.) braziliensis*. Este agente se caracteriza pela presença de poucos parasitos nas lesões e poucos anticorpos circulantes o que torna o diagnóstico

parasitológico e sorológico pouco sensíveis. Brandão-Filho (2003), encontrou uma sensibilidade para o exame parasitológico direto, a partir de tecidos coletados em animais positivos na PCR para *L. braziliensis*, cerca de quatro vezes menor que a detecção do DNA nestes mesmos tecidos. De maneira geral, para as diferentes formas de LTA, a PCR costuma ser o teste mais sensível mantendo alta especificidade e ainda possibilitando a identificação do parasito, ao menos ao nível de subgênero, sem necessidade de isolamento (Oliveira *et al.*, 2003; Bensoussan *et al.*, 2006).

Os cuidados referentes à contaminação com produtos pré-amplificados (amplicons) foram preocupação constante no decorrer deste trabalho, principalmente pela natureza multicópias do DNA alvo. Logo, foram realizadas rotineiramente provas controle do processo de extração e do processo de amplificação do DNA.

Em inquéritos epidemiológicos nos quais não se parte de uma suspeita clínica ou teste diagnóstico prévio, a PCR é também muito útil pois, além de ser muito sensível, pode ser realizada para qualquer tipo de amostra clínica. Neste tipo de inquérito, em área de ocorrência simultânea de mais de uma espécie de *Leishmania*, é importante que, além de detectar o gênero, se defina qual espécie é a causadora da infecção. Neste estudo, a metodologia de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (Volpini, 2003) e a hibridização com sondas (Passos *et al.*, 1999) (dot-blot) foram utilizadas com sucesso na identificação do *Leishmania* subgênero *Viannia*. Há que se ressaltar que a concordância entre ambos os testes foi de 100% pois, como seria esperado, as amostras não digeridas pela *Apa* LI não hibridizaram com a sonda para *L. braziliensis*. Por outro lado, as amostras não identificadas como *Leishmania* subgênero *Viannia* também não hibridizaram com a sonda para *L. (L.) infantum chagasi* permanecendo, até o momento, a origem do DNA não esclarecida, o que talvez possa ser resolvido através do seu sequenciamento.

Assim, em todos os animais positivos a espécie que pode ser identificada foi *Leishmania (Viannia)* (figuras 15 e 16) sendo que em Minas Gerais a única espécie deste subgênero que já foi encontrada infectando flebotomíneos (Gontijo *et al.*, 2005), hospedeiros humanos (Passos *et al.*, 1999; Gontijo *et al.*, 2002) e extra-humanos (Magalhães-Rocha *et al.*, 1988; Passos *et al.*, 1996; Gontijo *et al.*, 2002) é *L. braziliensis*. Portanto, evidências eco-epidemiológicas e moleculares levam a crer se tratar desta espécie, embora não tenha sido possível isolar o parasito para uma caracterização isoenzimática. Em humanos, esta espécie geralmente está restrita ao tecido cutâneo mas alguns relatos descrevem a presença deste parasito em vísceras de roedores (Forattini *et al.*, 1972; Dias *et al.*, 1977). A dispersão do

parasito por vários órgãos pelo corpo demonstra sua adaptabilidade ao organismo hospedeiro denotando alta valência ecológica.

As técnicas moleculares utilizadas neste trabalho não são capazes de discernir todas as espécies de *Leishmania*, são capazes de diferenciar até subgênero (Passos *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Volpini *et al.*, 2004; De Andrade *et al.*, 2006). Recentemente, técnicas de PCR-RFLPs que utilizam fragmentos do DNA de *Leishmania* diferentes do DNA do minicírculo têm sido padronizadas e demonstraram ser eficientes na discriminação espécie-específica. (Rotureau *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007). Uma vez testadas para um número maior de amostras, poderão ser muito úteis nos inquéritos epidemiológicos no Brasil onde das seis espécies reconhecidamente causadoras de LTA, cinco são *Leishmania* (*Viannia*).

5. Importância de roedores e marsupiais na transmissão de *Leishmania* (*Viannia*) na área em estudo – aspectos eco-epidemiológicos envolvidos

Há que se considerar que a transmissão é um evento ocasional, o qual afeta a minoria dos indivíduos expostos, sendo assim, quando acontece, acontece por força numérica (Ashford, 1996) seja por causa de uma alta carga parasitária nos hospedeiros, da persistência da infecção por longo período em uma dada população ou por causa de grande número de indivíduos infectados (Chaves *et al.*, 2007).

Um reservatório eficiente de *Leishmania* sp. é aquele hospedeiro capaz de servir como fonte de infecção para o flebotomíneo vetor, sob determinadas condições ecológicas de tempo e espaço, de maneira sustentada e sem a necessidade de outro hospedeiro.

Não existe, um protocolo pelo qual se possa apontar um hospedeiro como reservatório, apesar das tentativas de se estabelecer modelos matemáticos para quantificar esta relação (Chaves *et al.*, 2007). Para Ashford (1996) alguns critérios podem ser propostos e juntos serem validados visando estabelecer um modelo qualitativo para este sistema. No entendimento deste autor, para ser considerada reservatória, a espécie animal deve ser abundante, representar grande proporção da biomassa de mamíferos e freqüentemente ser uma espécie gregária. Além disso, um reservatório eficiente deve ter uma expectativa de vida longa e sobreviver durante a estação de não-transmissão. Nos sistemas de transmissão conhecidos, uma grande proporção de indivíduos se torna infectada, permanece um longo período nesta condição, porém sem sinais da doença, denotando uma relação antiga e estável

entre o parasito e o hospedeiro. Os parasitos são encontrados na pele e circulação, onde podem servir de fonte de infecção para os flebotomíneos vetores desde que estes coabitem o mesmo espaço, tenham hábitos compatíveis e sejam atraídos por eles.

Em relação ao número e diversidade de exemplares capturados neste estudo não foi observada variação significativa entre as campanhas. Apesar de não significativa a diferença, na primeira campanha foram capturados 32% do total de animais analisados e em relação à espécie *Mus musculus* foi verificada uma tendência linear com diminuição gradativa do número de exemplares capturados ao longo do tempo. Entretanto, a metodologia de captura utilizada foi definida com a finalidade de se investigar a presença de hospedeiros de *Leishmania* em área com transmissão ativa, não sendo a mais adequada para estudos de dinâmica de populações.

No entanto, a porcentagem de animais positivos em cada campanha sofreu grande variação. A maior porcentagem de animais positivos (76%) foi observada na quarta campanha coincidindo com o final do verão e com as últimas chuvas. Logo, durante toda a estação quente e úmida onde a densidade flebotomínica está alta estes animais, a maioria nascidos no início da temporada de acasalamento e, portanto, não-ímmunes, estiveram expostos à infecção. Nesta campanha, foram coletados quase todos os espécimes positivos de *D. albiventris*, todos adultos ou adultos jovens. Na campanha subsequente não foi detectado nenhum animal positivo, o que pode ser consequência dessa prévia retirada conforme sugerido por Nery-Guimarães *et al.* (1968).

Um levantamento em paralelo, visando investigar a fauna e a infecção flebotomínica na mesma área e período de estudo, capturou, principalmente *Lu. whitmani* (74% do total de flebotomíneos capturados). Esta espécie foi coletada em grande proporção durante todo o ano, principalmente nas áreas verdes (Saraiva *et al.*, 2007, dados não publicados).

Lu whitmani é apontada como vetora de *L. braziliensis* em várias áreas no Brasil em especial na Região Sudeste (Costa *et al.*, 2007). Na Região Metropolitana de Belo Horizonte, esta espécie tem sido a mais freqüentemente capturada, devendo ser a mais importante nesta área (Passos *et al.*, 1993; Margonari *et al.*, 2004). Estes últimos autores observaram uma alta incidência desta espécie (16%) coletada praticamente nas mesmas proporções dentro e fora de casa, no peridomicílio. Nas áreas verdes esta proporção subia para 61% do total de espécies capturadas, dados condizentes com os achados de Saraiva *et al.* (2007, dados não publicados).

As espécies *D. aurita* (1/1) e *Galictis* sp. (2/2) apresentaram 100% de positividade na PCR, porém foram capturados poucos exemplares. *Galictis* sp. é um carnívoro como a raposa, espécie reservatária silvestre de *L. (L.) infantum chagasi*. Em função do número reduzido de

exemplares capturados dar-se-á menor ênfase a estas espécies. Assim, colocados à parte estes exemplares, os maiores percentuais de positividade, foram encontradas nas espécies de roedores tanto silvestres quanto sinantrópicos.

Os roedores comensais *Mus musculus* (8/22 ou 36%) e *Rattus rattus* (5/19 ou 26%) apresentaram altas taxas de positividade (tabela 3). É interessante notar que desta última espécie já foi isolada amostra identificada como *L. braziliensis* em área endêmica para LTA no nordeste brasileiro (Brandão-Filho *et al.*, 2003).

Estas espécies foram, em conjunto, as mais freqüentemente capturadas, 43% (41/96) do total de capturas, sendo 74% (29/39) dos animais capturados no peridomicílio pertencentes a uma destas duas espécies (tabela 2). Isto demonstra o quanto estas espécies são freqüentes e altamente adaptadas ao ambiente modificado. Normalmente se reproduzem no interior das residências, ou em seus anexos, onde vivem normalmente em colônias com vários outros animais por cerca de 12 a 18 meses. A pele foi o tecido mais comumente encontrado positivo para *R. rattus* e o segundo em importância para *M. musculus* (tabela 4).

Diante destes dados eco-epidemiológicos, estas espécies de roedores sinantrópicos preenchem vários dos critérios, mencionados anteriormente, que podem levar à incriminação de uma espécie como reservatório. Logo, elas devem desempenhar nesta área, onde no período deste estudo (junho/2006 a junho/2007), como já foi dito, o número de casos humanos notificados de LTA foi 33, um papel importante como fonte de infecção para espécies de flebotomíneos bem adaptados ao peridomicílio como o *Lu. whitmani* (Quadro 3).

É interessante observar que dentre os 12 animais positivos capturados na área peridomiciliar cinco (42%), todos da espécie *Mus musculus*, foram encontrados na mesma casa, onde há criação de frangos para abate e cães (figura 11 ponto CC). Esta casa encontra-se em área densamente habitada, distante alguns quilômetros de qualquer área verde. Nas suas imediações e no período deste estudo foram registrados pelo menos dois casos de LTA (dados do ambulatório do CPqRR). *Mus musculus* possui raio de ação curto, cerca de 3 metros, logo, ele deve ter se infectado no próprio peridomicílio. Os frangos, embora refratários à infecção por *Leishmania* são reconhecidamente atrativos para os flebotomíneos (Alexander *et al.*, 2002) e *Lu. whitmani* pode criar-se em galinheiros (Brazil & Gomes Brazil, 2003). Os cães segundo alguns autores podem ter participação importante no ciclo de transmissão de LTA (Falqueto *et al.*, 2003). Os outros sete, foram capturados em três outras casas, todas bastante próximas, de um total de 20 casas pesquisadas (figura 11).

No entanto, a espécie que apresentou individualmente o maior índice de positividade foi *Oryzomys* grupo *subflavus* (2/5 ou 40%). Este fato é digno de nota uma vez que existem

vários relatos na literatura do encontro desta espécie infectada em focos ativos de transmissão de LTA (Lainson & Shaw, 1968; Lainson & Shaw, 1970; Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005). A mesma atenção deve ser dada a *Bolomys lasiurus* que também apresentou alta taxa de infecção (1/4 ou 25%) e da qual também já foi isolada *L. braziliensis* no nordeste brasileiro (Brandão-Filho *et al.*, 2003). Ambas são espécies bem adaptadas ao ambiente humano habitando plantações e capinzais. Neste sentido são coabitantes com espécies propriamente comensais como o *Rattus rattus*. Mesmo não tendo sido capturadas no peridomicílio devem ter importância epidemiológica como elos de ligação entre os dois ciclos.

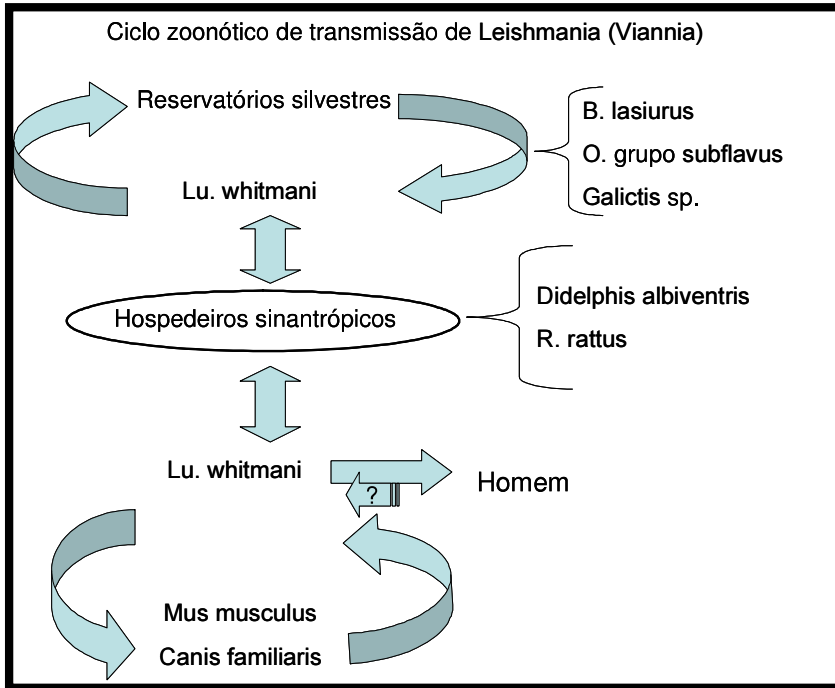
Os gambás da espécie *D. albiventris*, também foram frequentemente capturados (34,4%) e apresentaram alto índice de positividade (21%), todos os animais positivos encontravam-se na área verde embora tenham sido capturados alguns exemplares no peridomicílio. Tendo em vista sua dieta onívora e sua habilidade para viver na floresta tão bem como em ambientes alterados pelo homem, viver no alto das árvores como buscar comida pelo chão, os gambás provavelmente devem servir de fonte de infecção para diferentes populações de flebotomíneos que habitam cada um destes microambientes (Cabrera *et al.*, 2003). Além disso, os gambás são animais de movimentos lentos especialmente quando estão saciados, são relativamente corpulentos e carregam seus filhotes junto ao corpo (Monteiro-Filho & Cáceres, 2006). Apresentam hábitos noturnos, coincidindo com a maior atividade flebotomínica. Todos estes fatores os tornam alvos fáceis para o inseto vetor

Detectar infecção natural por *Leishmania* sp. em um mamífero, significa que é um hospedeiro mas não é suficiente para incriminá-lo como reservatório. Para isto, extensivos estudos ecológicos são necessários para demonstrar que o parasito que circula nos hospedeiros extra-humanos e humanos é indistinguível daquele encontrado no vetor. Neste sentido, isolar o parasito torna-se imprescindível (Brandão-Filho & Shaw, 2006; Castro *et al.*, 2007) e isto não foi possível neste trabalho. Assim, estes resultados permitem concluir apenas que a transmissão na área alcança várias espécies e estas estão em contato próximo ao homem bem como transitam na área verde. Os dados obtidos corroboram os de outros trabalhos cujos resultados parasitológicos e ou moleculares apontam para a incriminação dos roedores como os principais reservatórios de *L. braziliensis* (Forattini *et al.*, 1972; Magalhães Rocha *et al.*, 1988; Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

Além disso, a detecção de altas taxas de animais infectados, sendo estes, bem adaptados ao ambiente antrópico como *M. musculus*, *R. rattus* e *D. albiventris* em área intensamente urbanizada como é Belo Horizonte, indica que a transmissão nas áreas urbanas

pode ser extremamente eficiente. Porém, mais pesquisas são necessárias nesta e em outras áreas, cujas metodologias permitam responder questões complementares e associadas acerca do real papel destes animais na cadeia epidemiológica de transmissão de LTA em áreas urbanizadas. Sugere-se, por exemplo, estudos de quantificação de carga parasitária e ensaios para xenodiagnóstico.

Quadro 3: Ciclo hipotético de transmissão de *Leishmania (Viannia)* provavelmente *L. (V.) braziliensis* proposto para a área estudada:



6. Perspectivas para o controle de LTA em Belo Horizonte

O Ministério da Saúde do Brasil (2003) preconiza que o controle da leishmaniose visceral deve ser direcionado para os três elementos da cadeia epidemiológica: o vetor, o cão e o homem. Assim, as ações de controle devem incluir borrifação, sacrifício de cães positivos e tratamento dos casos humanos, além de ações de manejo ambiental em algumas áreas. Embora com algumas deficiências, como por exemplo, o suprimento irregular dos kits de sorologia para detecção da infecção canina, em Belo Horizonte estas ações têm sido colocadas em prática. No entanto, a soropositividade canina tem se mantido constantemente elevada, em torno dos 5% e a doença humana supera 100 casos/ano desde 2003. Este fato sugere que o controle não está abrangendo todas as variáveis como, por exemplo, a existência de outras fontes de infecção. Estas fontes podem ser animais sinantrópicos ou outros animais domésticos bem como, conforme sugerido por alguns autores, o próprio indivíduo humano principalmente o assintomático (Costa *et al.*, 2000; Rotureau, 2006). Alguns autores acreditam na possibilidade de que, no decorrer de um processo que se inicia com a sinantropização do ciclo, a zoonose possa evoluir para uma antroponose onde o homem serve de fonte de infecção para flebotomíneos vetores bem adaptados ao ambiente antrópico (Rotureau, 2006). Um trabalho complementar a este vem sendo desenvolvido na área para busca ativa do parasito em outros animais domésticos (Ferreira *et al.*, 2008 dados não publicados).

Não há um protocolo de controle de LTA instituído. O primeiro ponto de intervenção deve ser o incremento da notificação pois, sem esta, não é possível dimensionar a gravidade do problema e nem intervir adequadamente (Da-Cruz & Pirmez, 2005). De todas as ações preconizadas para LV, aquelas direcionadas para o controle do vetor podem ter resultados positivos também para a doença na sua forma tegumentar. Os resultados deste trabalho sugerem que especificamente o manejo ambiental deverá trazer bons resultados por diminuir também a população de roedores comensais e assim, possíveis fontes de infecção (FNS, 2005). De fato, foi observado que o peridomicílio das casas onde foram colocadas armadilhas, em áreas onde houve casos humanos, estava bem desorganizado com grande quantidade de entulhos e sombreamento, o que favorece a proliferação tanto do vetor como dos hospedeiros sinantrópicos (figura 3). No entanto, a perspectiva mais desejável para o controle da doença seria o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

O sacrifício canino pode ter ações contraditórias uma vez que não se sabe o real papel representado por estes animais como reservatórios de *L. braziliensis*. Embora alguns autores

acreditem no seu potencial como reservatórios do parasito (Falqueto *et al.*, 1991; 2003), não há qualquer estudo conclusivo nesta área. Se sua contribuição for apenas circunstancial, o sacrifício pode até aumentar os casos de doença por diminuir o número de alvos possíveis de alimentação para o flebotomíneo que habita o peridomicílio (Chaves *et al.*, 2007). Ao contrário, a prevenção da infecção destes animais pode, isto sim, diminuir o número de casos humanos o que pode ser feito com o uso de coleiras repelentes, controle de migração canina e de cães errantes, além do desenvolvimento de uma vacina canina eficaz.

Conclusão

Leishmania (Viannia), provavelmente *L. (V.) braziliensis*, por ser a única espécie prevalente na área estudada, foi encontrada infectando parcela significativa dos pequenos mamíferos capturados.

Destaca-se, pela primeira vez, o achado de *Leishmania (Viannia)* em *D. aurita* (marsupial), *Galictis* sp. (carnívoro), *M. musculus* e *R. norvegicus* (roedores sinantrópicos).

Foram isolados tripanosomatídeos a partir de material coletado de medula de *D. albiventris* (gambá). Em um destes animais, identificou-se, pela primeira vez em Belo Horizonte, infecção mista por *T. cruzi* (PCR e isoenzimas) e *T. rangeli* (PCR). Aparentemente, uma vez que não foram encontrados dados na literatura, trata-se do primeiro registro de *T. rangeli* isolado a partir de medula de animais naturalmente infectados. Ainda não pôde ser totalmente esclarecida a espécie no outro isolado, até então, identificada como *Leishmania (Leishmania)* através de isoenzimas e testes moleculares.

O fígado e a pele foram os tecidos que apresentaram os maiores percentuais de positividade sendo a diferença estatística significativa ($p < 0,05$), o que não foi observado em relação às espécies ou ambiente de coleta.

Assim, é possível concluir que espécies das ordens Carnivora, Marsupialia e Rodentia, são hospedeiros de *Leishmania (Viannia)* e podem ter alguma importância como fonte de infecção para flebotomíneos vetores, especialmente *Lu. whitmani*, nesta área. Outros dados, são necessários para que se defina o verdadeiro papel destes mamíferos como fonte de infecção para o vetor.

Referências bibliográficas

1. Alencar JE, Pessoa EP, Fontenele ZF. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado do Ceará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1960; 2 (6): 347-348.
2. Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Tropica 1998; 69: 41-50.
3. Alexander B, Carvalho RL, McCallum Hamish, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis 2002; 8: 1480-1485.
4. Alvar J, Yactyo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology 2006; 22(12): 552-557.
5. Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, Melo MN. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. Acta Tropica 2001; 78: 261-267.
6. Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(4): 481-487.
7. Aragão HB. Transmissão de leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. Bras Med 1922; 36: 129-130.
8. Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1981;76 (3): 279-286.
9. Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75 (4): 537-5.
10. Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging Infectious Diseases 1996; 2 (2): 145-146.

11. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 523-532.
12. Ashford RW. When is a reservoir not a reservoir? *Emerging infectious diseases* 2003; 9 (11): 1495-1496.
13. Avila-Pires FD. Ecologia das Zoonoses. Em: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Vol. 1. Guanabara Koogan; 2005. Cap 5: 53-63.
14. Barata RA, França-Silva JC, Fortes-Dias CL, Costa RT, Silva JC, Vieira EP, Prata A, Michalsky EM, Dias ES. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 481-487.
15. Barrett TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today* 1989; 5: 255-257.
16. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 1435-1439.
17. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. 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.
18. Brandão-Filho SP, Shaw JJ. Molecular tools parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends in Parasitology* 2006; 22(11): 500-501.
19. Brazil RP, Gomes Brazil B. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Em: Rangel EF & Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. Cap 4: 257-274.
20. Brazil RP, Nascimento MDSB, Macau RP. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 145.

21. Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 828-831.
22. Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45: 79-83.
23. Camargo-Neves VL, Gomes AC, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 299-306.
24. Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Experimental Parasitology*, 2007 in press.
25. Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 2007; 23(7), 311-316.
26. Costa CHN, Gomes RBB, Silva MRB, Garcez LM, Ramos PKS, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 182: 997-1000.
27. Costa LMC. Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas da biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores de coleção do Museu Nacional [dissertação]. Rio Janeiro (RJ): UFRJ; 1998. 70 p.
28. Costa LP, Patton JL. Diversidade e limites geográficos e sistemáticos de marsupiais brasileiros. Em: Cáceres NC & Monteiro-Filho ELA. Os marsupiais do Brasil – biologia, ecologia e evolução. Campo Grande: Ed. UFMS; 2006. Cap. 22, p. 321-341.
29. Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal* 2007; 174(3): 636-643.

30. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla, M Paláu MT. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colômbia, South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 195.
31. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s. l.– specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 12-17.
32. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimald Jr. G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today* 2000; 16 (4): 142-144.
33. Da Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s. l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(2): 149-153.
34. Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. Em: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan; 2005. Vol. 1, cap 52: 697-712.
35. De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2006; 140 (3-4), 231-238.
36. 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; XLV (4): 45-47.
37. Deane LM, Deane MP, 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. *O Hospital*, XLVIII (1): 79-97.
38. Deane LM, Grimaldi Jr. G. Leishmaniasis in Brazil. In: Chang & Bray eds. *Leishmaniasis*. BV (Biomedical Division); 1985. P. 247-281.

39. Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*. Vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host: the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 513-515.
40. De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica 1992; 52: 45-58.
41. Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 463-469.
42. De Lima H, De Guglielmo Z, Rodríguez A, Convit J, Rodriguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara state, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(2): 169-174.
43. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 239-243.
44. De Souza Rocha L, Falqueto A, Santos CB, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 2006; 559-565.
45. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Michalsky EM, Paula KM, Gonçalves CM, Barata RA. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2007; 40(1): 49-52.
46. Dias FBS, Diotaiuti L, Romanha AJ, Bezerra CM, Machado EMM. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(5): 643-645.
47. Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM, Araújo FG, Coelho MV, Williams P. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar

- americana. I – Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. Rev Inst Med Trop São Paulo 1977; 19 (6): 403-410.
48. Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. Acta Tropica 2004; 92: 279-283.
49. Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends in Parasitology 2006; 22(1), 4-6.
50. Eresh S, McCallum M, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitology 1994; 109: 423-433.
51. Falqueto, A, Ferreira AL. Reservatórios extra-humanos do complexo *Leishmania* e dinâmica de transmissão da infecção ao homem. Em: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan; 2005. Vol. 1, cap 55: 739-752.
52. Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Jr G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8): 1003-1010.
53. Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86(4): 499-500.
54. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Veterinary Parasitology 2007; 146: 235-241.
55. Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar Americana. Rev Inst Med Trop São Paulo 1960; 2(4):195-203.
56. Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Púb S Paulo 1972; 6: 255-261.

57. Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pùb S Paulo 1973; 7: 181-184.
58. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde; 2005. 132p.
59. Garcia AL, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin J-C. Epidemiological monitoring of american tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolívia. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007; 101: 1208-1213.
60. Genaro O, Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte, MG. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1990; 23(2): 121.
61. Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop 2002; 81: 143-150.
62. Gontijo CMF, da Silva ES, Pacheco RS, Dias ES, Oliveira FS, Michalsky EM, Margonari C. Epidemiologia molecular da leishmaniose tegumentar no município de Araçuaí, Minas Gerais Brasil. Sociedad Iberoamericana de Informacón Científica (SIIC). www.siicsalud.com/des/de04305623013.htm
63. Gontijo CMF, Melo MN. Visceral Leishmaniases in Brazil: current status, challenges and prospects. Rev Bras Epidemiologia 2004; 7(3): 338-349.
64. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control (Invited review). Int J Parasitol 2005; 35:1169-1180.
65. Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology 1999; 118: 375-382
66. Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba Cuba CA. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the federal district of Brazil. Rev Inst Med Trop S. Paulo 2004; 46(6): 323-330.

67. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases* 2002; 8 (12): 1468-1473.
68. Herrero A. Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Peru. V. Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utógenas. *Revista de Medicina Experimental* 1949; 87-117.
69. Killick-Kendrick R. Studies and criteria for the incrimination of vector and reservoir hosts of the leishmaniasis. In: *Proceeding of the International Workshop on Control Strategies for the leishmaniasis*. Ottawa: International Development Research Center, 1988. P. 272-280.
70. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 77 (5): 569-596.
71. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62 (3): 385-395.
72. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: III. Cutaneous leishmaniasis in an opossum, *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63 (6): 738-740.
73. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970; 64 (5): 654-667.
74. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Brit Med Bull* 1972; 28: 44-48.
75. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol 1, Academic Press Inc. London; 1987. P. 1-120.
76. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Dwakelin. *Topley & Wilson's: Microbiology and Microbial Infections*. London, Sydney, Auckland: S Arnold; 1998. P. 241-266.

77. Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63 (6): 741-745.
78. Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agente of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4) :530-536.
79. Lopes UG, Momem 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.
80. Lorenzi, H. Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa (SP) : Instituto Plantarum ; 2002.
81. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira AS, Figueiredo FB, Confort EM, Quintella LP, Marzochi MCA. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res* 2005; 97: 73-76.
82. Magalhães - Rocha NM, Melo MN, Babá EH, Dias M, Michalick MSM, Da Costa, CA, Williams P, Mayrink W. *Leishmania braziliensis braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides*, captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 69.
83. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, Gringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2004; 125: 251-262.
84. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 31-38.

85. Margonari C de S, Pessanha JE, Barata RA, Michalsky EM, Costa DC, Dias ES. Study of Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 99:795-803.
86. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*, short communication. Veterinary Parasitology 2007; 145: 357-360
87. Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 1956; 8 (4), 577-581.
88. Marzochi MCA, Teixeira PC, Marzochi KBF, Conceição NF, Coutinho W, Brito DB. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. Rev Inst Med Trop São Paulo 1993; 35 (3): 301-303.
89. Melo MN, Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Willians P, Araújo FG, Coelho MV, Batista SM. Padronização do antígeno de Montenegro. Rev Inst Med Trop São Paulo 1977; 19: 161-164.
90. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFE, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44: 255-259.
91. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Editora MS, Brasília, 2003.
92. Monbrison F, Mihoubi I, Picot S. Real-time PCR assay for the identification of cutaneous *Leishmania* parasite species in Constantine region of Algeria. Acta Tropica 2007; 102: 79-83.
93. Monteiro-Filho ELA, Cáceres NC. Biologia reprodutiva de fêmeas de marsupiais didelfídeos. Em: Cáceres NC & Monteiro-Filho ELA. Os marsupiais do Brasil – biologia, ecologia e evolução. Campo Grande: Ed. UFMS; 2006. cap. 8, p. 99-110.
94. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. <http://infection.thelancet.com> 2005; vol. 366: 1561-1577.

95. Nery-Guimarães F, Damasceno R, Azevedo M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1968; 66 (2): 151-168.
96. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1666-1669.
97. Oliveira CGC, Lacerda HG, Martins DRM, Barbosa JDA, Monteiro GR, Queiroz JW, Sousa JMA, Ximenes MFFM, Jerônimo SMB. Changing epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Tropica* 2004; 90: 155-162.
98. Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CBF, Correa T, Freitas LAR, Nascimento E, Costa JM, Barral A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37: 149-153.
99. Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17(5): 1231-1239.
100. 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.
101. Orsini O. Aspectos epidemiológicos e clínicos da leishmaniose tegumentar americana no estado de Minas Gerais. Anais da 1ª. Reunião anual dos dermatos-sifilógrafos brasileiros 1940; 12-26.
102. Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi Jr. G, Momem H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: Riou, J.A. *Leishmania Taxonomy et Phylogenese Applications Eco-epidemilogiques*. IMEEE, Montpellier; 1986. P. 57-65.
103. Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernández MM, Malchiodi EL, Basombrío MA. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Veterinary Parasitology* 2002; 110: 1-10.

104. Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MCBF, Oliveira GGS, Santos WLC, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Tropica* 1998; 69: 75-83.
105. Passos VMA, Falcão AL, Katz N. Urban american cutaneous leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85 (2): 243-244.
106. Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban área of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88 (1): 103-110.
107. Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degrave W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica*, 1999; 251-258.
108. Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degrave W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(1): 19-20.
109. Pennisi MG. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1:363-6.
110. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection* 2007; 9: 1307-1315.
111. Profeta da Luz ZM, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001; 34(3): 249-254.

112. Quaresma PF. Diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina e Quantificação da Carga Parasitária através da reação em cadeia da polimerase (dissertação). Belo Horizonte: CPqRR, Fiocruz; 2007. 118 p.
113. Ramirez LE, Lages-Silva Eliane, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic área of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Tropica* 2002; 84: 189-198.
114. Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 61(4): 530-541.
115. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 21-25.
116. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. <http://infection.thelancet.com>, 2007; vol. 7: 581-596.
117. Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay 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* 2003; 1486-1493.
118. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 1990; 71: 267-275.
119. Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 2004; 90: 1150-1154.
120. Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 2005; 12: 183-186.
121. Rotureau B. Are new world leishmaniasis becoming anthroponoses? *Medical Hypotheses* 2006; 67(5): 1235-1241.

122. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pralong F, Nacher M, Dedet JP, Carne B. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(2): 459-467.
123. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplifications of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science, New Series* 1988; 239(4839): 487-491.
124. Savani ES, de Oliveira Camargo MC, De Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, San Paul State, Brazil. *Vet Parasit* 2004; 120: 229-233.
125. Schallig HDFH, Silva ES, Van der Meide WF, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potencial reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2007; 7(3): 387-393.
126. Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 486-490.
127. Shaw JJ. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In: Burger JF. *Contributions to the knowledge of Diptera*. Ed. Associated Publishers Florida, USA; 1999. P. 503-517.
128. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5): 577-579.
129. Shaw JJ. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(5): 541-547.
130. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. G. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 515.

131. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(3): 285-291.
132. Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 2000; 147, 421-422.
133. Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications* 2006; 30: 637-643.
134. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology* 1997; 27(10): 1135-1145.
135. Solano-Galleno, L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology, Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39, n. 2: 560-563.
136. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996; 83: 141-152.
137. Souza AI. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 128(1-2): 41-5.
138. Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Flietakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 102(1): 46-53.
139. Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolívia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(1): 5-6.

140. Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 275-278. (a)
141. Travi BL, Osorio Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Experimental parasitology* 1998; 88: 73-75. (b)
142. Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, Sallenave SM, Valim C, David JR, Lopes UG. The identify of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50 (2): 158-164.
143. Volpini A. PCR-RFLP mkDNA no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil [Tese]. Rio de Janeiro(RJ): Fiocruz; 2003. 81p.
144. Volpini AC, Passos, VM, Oliveira GC, Romana AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 2004; 90: 31-37.

Referências eletrônicas:

<http://www.ibge.gov.br>

<http://www.pbh.gov.br>

<http://www.who.int/diseases/leish/diseaseinfo.htm>

