



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CARLOS EDUARDO RIBEIRO COUTINHO

Avaliação da variabilidade fenotípica de amostras de
Leishmania (Leishmania) chagasi isoladas de cães
oriundos de duas áreas endêmicas de leishmaniose
visceral no Brasil

Rio de Janeiro
2010

Avaliação da variabilidade fenotípica de amostras de
Leishmania (Leishmania) chagasi isoladas de cães
oriundos de duas áreas endêmicas de leishmaniose
visceral no Brasil

CARLOS EDUARDO RIBEIRO COUTINHO

Dissertação apresentada ao curso de
pós-graduação em pesquisa clínica em
doenças infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Dr^a Maria de Fátima Madeira
Co-orientador: Dr^a Dilvani Oliveira Santos

Rio de Janeiro

2010

CARLOS EDUARDO RIBEIRO COUTINHO

Avaliação da variabilidade fenotípica de amostras de
Leishmania (Leishmania) chagasi isoladas de cães
oriundos de duas áreas endêmicas de leishmaniose
visceral no Brasil

Dissertação apresentada ao curso de
pós-graduação em pesquisa clínica em
doenças infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador (es): Dr^a Maria de Fátima Madeira
Dr^a Dilvani Oliveira Santos

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi (presidente)
IPEC/FIOCRUZ

Dr^a.Raquel da Silva Pacheco
IOC/FIOCRUZ

Dr. Fabiano Borges Figueiredo
IPEC/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida e força em toda a minha jornada.

À minha orientadora Dr.^a Maria de Fátima Madeira por toda a ajuda e paciência na elaboração deste trabalho, sem as quais este não teria sido realizado.

À minha co-orientadora Dr.^a. Dilvani Oliveira Santos pela sua orientação e ajuda nesta empreitada.

Ao Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi, por sua atenção e orientação durante o curso e na elaboração desta dissertação.

À Dr.^a Raquel da Silva Pacheco, por disponibilizar seu conhecimento e tempo na elaboração e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, por serem um exemplo de vida em todos os momentos.

À minha família, por todo apoio e incentivo durante toda minha vida.

À minha noiva Elisângela, por sua paciência, me compreendendo nos momentos de estresse e por me ajudar em todos os momentos em que eu precisei.

A todos os amigos do Vigileish, Alessandra, Cíntia Cristiane, Cíntia, Cibele, Andressa, Fernanda, Andréia, Eduardo, Sidnei, Tatiana, Juliana e principalmente à Célia, pois sem sua ajuda as dificuldades na realização deste trabalho seriam multiplicadas.

Aos meus colegas de curso, pela ajuda e por todas as horas que passamos juntos.

À todos os amigos que me ajudaram nesta jornada e a todos os professores, pelo conhecimento transmitido.

Obrigado a todos.

“Os covardes nunca tentaram,
os fracos ficaram no caminho,
só os fortes conseguiram”

(autor desconhecido)

Coutinho, C.E.R. **Avaliação da variabilidade fenotípica de amostras de *Leishmania (Leishmania) chagasi* isoladas de cães oriundos de duas áreas endêmicas de leishmaniose visceral no Brasil.** Rio de Janeiro, 2010 XX f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Entre as doenças causadas por protozoários, as leishmanioses possuem um papel de destaque devido à sua ampla distribuição geográfica, severidade das manifestações clínicas e grande incidência. Na leishmaniose visceral (LV), os cães domésticos são os reservatórios mais importantes e, talvez, os responsáveis pela mudança no perfil epidemiológico da doença em diferentes regiões do Brasil, principalmente pelo constante movimento migratório, facilitando a expansão da doença para áreas consideradas indenes. A possível variabilidade genética de subpopulações de *Leishmania (Leishmania) chagasi* que circulam em diferentes ciclos naturais ainda é muito pouco explorada no Brasil, sendo tal conhecimento de grande importância em vários aspectos, principalmente no contexto epidemiológico e clínico. O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade fenotípica de amostras de *Leishmania chagasi* isoladas de cães oriundos do município do Rio de Janeiro e de Belo Horizonte. Foram selecionadas cem (100) amostras, de ambas as localidades, criopreservadas no banco de amostras biológicas do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas ([Lab-Vigileish](#)) e analisadas por eletroforese de isoenzimas (MLEE) empregando nove sistemas enzimáticos (6PG, GPI, NH₁ e NH₂, G6P, PGM MDH, ME, IDHNADP ~~colocar todos entre parênteses~~). Das 200 amostras previamente selecionadas, 153 foram analisadas, das quais 96 foram obtidas de Belo Horizonte e 57 do Rio de Janeiro, tendo todas, apresentado perfil eletroforético idêntico entre si e com a amostra de referência de *Leishmania chagasi* ([MHOM/BR/74/PP75](#)). A análise fenética demonstrou índice de similaridade igual a um para todas as 153 amostras estudadas, revelando dessa forma, um compartilhamento comum de 100% dos caracteres avaliados. Como conclusão deste estudo, podemos afirmar que a população de *Leishmania chagasi* que está circulando em cães do Rio de Janeiro e Belo Horizonte possuem características fenotípicas iguais entre si, sendo agrupadas em um único zimodema. Não foi possível correlacionar qualquer agrupamento geográfico de subpopulações ou com o status clínico do animal.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, Isoenzimas, Zimodema, Leishmaniose visceral, cães

Coutinho, C.E.R. **Phenotypic variability evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* samples isolated from dogs in two endemic areas of visceral leishmaniasis in Brazil.** Rio de Janeiro, 2010 XX f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Among the diseases caused by protozoa, all the leishmaniasis have an important role due to their wide geographic distribution, severity of clinical manifestations and high incidence. In visceral leishmaniasis (VL), domestic dogs are the most important reservoirs, and perhaps, responsible for the shift on the epidemiologic profile of the disease in different regions of Brazil, especially by the constant migratory flow, facilitating the spread of the disease to areas considered unaffected. The genetic variability of sub-populations of *Leishmania (Leishmania) chagasi* that circulate in different natural cycles is still very little explored in Brazil, this knowledge is of great importance in many aspects, especially in the epidemiological and clinical context. The aim of this study was to evaluate the phenotypic variability of samples of *Leishmania chagasi* isolated from dogs in the city of Rio de Janeiro and Belo Horizonte. We selected one hundred (100) samples from each of the two sites, cryopreserved in the bank of biological samples from the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance in the Clinical Research Institute Evandro Chagas (Lab-Vigileish) and analyzed by isoenzymes electrophoresis (MLEE) using nine enzymatic systems (6PG, GPI, NH₁ and NH₂, G6P, PGM, MDH, ME, IDHNADP). Of the 200 samples previously selected, 153 were analyzed, of which 96 were from Belo Horizonte and 57 from Rio de Janeiro, and all presented the same electrophoretic profile among themselves and with the reference sample of *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74 / PP75). Phenetic analysis showed similarity index equal to one for all 153 samples studied, thereby revealing a common share of 100% of the evaluated traits. In conclusion of this study, we can state that the population of *Leishmania chagasi* that is circulating in dogs in Rio de Janeiro and Belo Horizonte have phenotypic characteristics identical to each other and are grouped into a single zymodeme. It was not possible to correlate any geographical grouping of subpopulations or with the clinical status of the animal.

Keywords: *Leishmania chagasi*, Isoenzymes, Zymodeme, visceral leishmaniasis, dogs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** Mapa apresentando os Estados brasileiros com registro de casos de Leishmaniose Visceral. **8**
- FIGURA 2** Esquema representando as etapas para obtenção das massas parasitárias **34**
- FIGURA 3** Perfil enzimático do sistema 6-fosfogluconato desidrogenase - 6PGDH (A); Perfil enzimático do sistema fosfoglucoose isomerase – GPI (B); Perfil enzimático do sistema nucleotidase – NH1 e NH2 (C). Números de 1 a 10 amostras provenientes do Rio de Janeiro (1-1084; 2-70; 3-343; 4-392; 5-42; 6-880; 7-702; 8-618; 9-1136 e 10-1160), números de 11 a 13 amostras de referência (11-*Leishmania (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75; 12-*Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8; 13-*Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903), Números de 14 a 23 Amostras provenientes de Belo Horizonte (14-710BH; 15-745BH; 16-763BH; 17-651BH; 18-622BH; 19-623BH; 20-448BH; 21-533BH; 22-592BH; 23-599BH) **44**
- FIGURA 4** Perfil enzimático do sistema Glucose-6 Fosfato desidrogenase - G6PDH (A); Perfil enzimático do sistema fosfoglucomutase – PGM (B); Perfil enzimático do sistema Malato Desidrogenase - MDH (C). Números de 1 a 10 amostras provenientes do Rio de Janeiro (1-264; 2-350; 3-412; 4-366; 5-1197; 6-919; 7-1068; 8-1079; 9-1195 e 10-1349), números de 11 a **45**

13 amostras de referência (11-*Leishmania (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75; 12-*Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8; 13-*Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903), Números de 14 a 23 amostras Provenientes de Belo Horizonte (14-788BH; 15-786BH; 16-782BH; 17-792BH; 18-779BH; 19-699BH; 20-700BH; 21-701BH; 22-724BH; 23-726BH)

FIGURA 5 Perfil enzimático do sistema Enzima Málica ME (A); **46**
Perfil enzimático do sistema Isocitrato Desidrogenase - IDHNADP (B). Números de 1 a 10 amostras provenientes do Rio de Janeiro (1-342; 2-266; 3-421; 4-362; 5-1149; 6-898; 7-1111; 8-1072; 9-1343 e 10-807), números de 11 a 13 amostras de referência (11-*Leishmania (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75; 12-*Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8; 13-*Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903), Números de 14 a 23 amostras Provenientes de Belo Horizonte (14-611BH; 15-609BH; 16-612BH; 17-631BH; 18-639BH; 19-607BH; 20-580BH; 21-581BH; 22-595BH; 23-579BH)

FIGURA 6 Dendrograma utilizando o Coeficiente de Jaccard, **47**
baseado no perfil fenético obtido por eletroforese de isoenzimas com 96 amostras isoladas de cães oriundos de Belo Horizonte e 57 amostras obtidas de cães do Rio de Janeiro. Os dados das amostras,

assim como das cepas de referência estudadas podem ser obtidas nas tabelas 1 e 2.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Dados gerais das amostras selecionadas para o estudo	29
Quadro 1	Dados das amostras de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) utilizadas nas análises isoenzimáticas.	32
Quadro 2	Soluções tampão utilizados na preparação dos géis e nas corridas eletroforéticas	35
Quadro 3	Solução corante utilizada na corrida eletroforética de isoenzimas	37
Quadro 4	<u>Protocolos</u> utilizados no processo de revelação das enzimas estudadas, indicando substratos, coenzimas, ativadores, enzimas de ligação específica para cada sistema enzimático e os métodos de visualização empregados.	38
Tabela 2	Relação das 28 amostras, isoladas de animais do Rio de Janeiro, selecionadas para o estudo, nas quais não foi possível a recuperação após a criopreservação	41
Tabela 3	Número de amostras analisadas pela eletroforese de isoenzimas de acordo com a condição clínica do animal e origem geográfica	42
Tabela 4	Posição dos eletromorfos das 153 amostras estudadas e das amostras de referência empregadas no estudo em nove sistemas enzimáticos.	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
RAPD	Amplificação Randômica de Polimorfismo de DNA
NaCl	Cloreto de sódio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
MLEE	Eletroforese de Multilocus Enzimáticos
ME	enzima málica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
PGM	fosfoglucomutase
GPI	fosfogluose isomerase
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G6PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
IFI	Imunofluorescência indireta
IPEC	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
IDHNADP	isocitrato desidrogenase
LC	Leishmaniose cutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MDH	malato desidrogenase
MS	Mato Grosso do Sul
ug/mL	Microgramas/mililitros
ul	Microlitros
MG	Minas Gerais
N ₂	Nitrogênio líquido
NNN	Novy McNeal; Nicolle
NH	nucleosideo hidrolase
OMS	Organização Mundial da Saúde
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SFB	Soro fetal bovino
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

Sumário

1. INTRODUÇÃO	xiv
1.1. AS LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS	XIV
1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	XXII
1.3. CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS DO GÊNERO LEISHMANIA: CONCEITOS E APLICABILIDADE	XXVI
1.4. IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM LEISHMANIA	XXXV
2. OBJETIVOS.....	xxxviii
2.1. OBJETIVO GERAL	XXXVIII
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	XXXVIII
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	xxxix
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	XXXIX
3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	XXXIX
3.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	XL
3.4. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS	XLII
3.5. OBTENÇÃO DAS MASSAS PARASITÁRIAS.....	XLV
3.5.1 <i>Recuperação das amostras criopreservadas</i>	<i>xlvi</i>
3.5.2 <i>Expansão das culturas</i>	<i>xlvi</i>
3.6. ELETROFORESE DE ENZIMAS – MLEE	XLVII
3.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	LI
4. RESULTADOS.....	liii
4.1. CRESCIMENTO IN VITRO DAS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O ESTUDO	LIII
4.2. RELAÇÃO DAS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O ESTUDO COM A CONDIÇÃO CLÍNICA DO ANIMAL.....	LIV
4.3. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	LV
5. DISCUSSÃO	lxi
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	lxxii
7. CONCLUSÕES	lxxiii
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	lxxiv

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As Leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* - Kinetoplastida: Trypanosomatidae (Ross, 1903) no qual estão incluídos os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Lainson; Shaw, 1987). A doença é um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo ocorrendo em cerca de 88 países, onde 12 milhões de pessoas se encontram infectadas e há uma incidência anual de 2 milhões de casos (OMS, 2008). São classificadas clinicamente como Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) e dependendo da espécie de *Leishmania* em questão e de outros fatores, como a imunidade do hospedeiro, ambas as doenças podem apresentar espectro clínico bem variado.

Tanto a LV como a LT ocorrem de forma endêmica em países dos continentes Americano, Africano, Asiático e Europeu (OMS, 2008), sendo apontada como a segunda mais importante doença causada por protozoários, do ponto de vista sócio-econômico e sanitário, depois da malária.

O ciclo biológico compreende formas promastigotas e paramastigotas flageladas que se desenvolvem no trato alimentar dos insetos vetores (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), que infectam os hospedeiros durante seu repasto sanguíneo, e formas amastigotas, sem flagelo livre, que parasitam células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (Hoare; Wallace, 1966), multiplicando-se por divisão binária em ambos os hospedeiros, invertebrado e vertebrado, embora atualmente alguns autores acreditem na possibilidade de raros eventos de reprodução similar à sexuada ou algum tipo de troca de material genético nos vetores (Rougeron et al. 2009).

Nas Américas, as espécies de *Leishmania* encontram-se amplamente distribuídas, desde o sudeste dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina (Marzochi; Marzochi, 1994). As que ocorrem nesta região e que pertencem ao subgênero *Leishmania* são *L. (L) mexicana*, implicada como causadora da forma cutânea e ainda, as pertencentes ao complexo *L. amazonensis* [*L. (L.) amazonensis*, *L. (L) garnhami* e *L. (L.) aristides*], que são responsáveis pela forma cutânea. O subgênero *Viannia* ocorre exclusivamente no novo mundo e as espécies pertencentes a ele são responsáveis pela forma tegumentar. Neste subgênero encontramos o complexo *L. braziliensis* (*L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) peruviana*), o complexo *L. guyanensis* (*L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) shawi*), *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni*, além destas espécies, têm sido descritas na América do Sul *L. equatoriensis*, *L. colombiensis* e *L. venezuelensis* (Grimaldi Jr. ; Tesh, 1993; Schonian et al. 2008) e mais recentemente *L. lindenbergi* no Pará. No Brasil as leishmanioses ocorrem em todos os estados e as regiões nordeste e amazônica são as que apresentam maior número de casos. Dentre as espécies de *Leishmania* que ocorrem no País, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie de maior distribuição ocorrendo

desde o nordeste até o sul do país, causando lesões cutâneas e mucosas, estando associada à animais domésticos como os cães, sendo relatada também em eqüinos (Barbosa-Santos et al. 1994). Os vetores relacionados a este agente são o *Psychodopigus wellcomei* na região norte, *Lutzomyia whitmani* na região nordeste, central e nordeste de Minas Gerais e *Lu. intermedia* nas regiões sudeste e sul, sendo estas duas espécies encontradas em maior quantidade em áreas de desmatamento. Fora da região amazônica *L. (V.) braziliensis* pode não fazer parte do ciclo enzoótico silvestre, porém, pode estar sendo introduzida por meio de animais domésticos, sinantrópicos e até o próprio homem, em associação à atividade humana que promove alterações ambientais e que facilita a disseminação dos reservatórios e vetores, bem como a migração das populações. Isto pode ser comprovado pelo aumento da incidência de casos de LT em diversos Estados, coincidindo com os períodos de migração de trabalhadores para a Amazônia e o seu retorno aos seus Estados de origem, como é o caso da região sudeste, e ainda pela semelhança genética entre as amostras isoladas nestas diferentes regiões (Grimaldi Jr.; Tesh, 1993; Marzochi; Marzochi, 1994, Cupolillo et al. 2003; Falqueto et al. 2003).

L. (V.) guyanensis é uma espécie restrita à região amazônica, é responsável por causar predominantemente lesões cutâneas ulcerativas, tem como hospedeiros animais silvestres como o gambá (*Didelphis marsupialis*) e a preguiça (*Choloepus didactylus*) e como vetores as espécies *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (Marzochi; Marzochi, 1994).

Três espécies são restritas à região amazônica: *L. (V.) lansonii*, que é causadora de lesões cutâneas ulcerativas, com raros casos humanos, está mais associada ao ciclo silvestre e a roedores como a paca (*Agouti paca*), já que o vetor

incriminado (*Lu. ubiquitous*), não possui hábitos antropofílicos; *L. (V.) naiffi*, raramente causa lesões cutâneas ulcerativas em humanos, está associada a tatus (*Dasybus novencictus*) e tem como vetores *Lu. isquamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozai* e ainda, *L. (V.) shawi* que causa lesões cutâneas isoladas e está associada a alguns primatas (*Cebus* e *Chiropotes*), edentatas (*Choloepus* e *Bradypus*) e carnívoros (*Nisua*) e tem como vetor *Lu. whitmani* (Grimaldi Jr. ; Tesh, 1993; Marzochi; Marzochi, 1994; Gomes et al. 1995; Noyes et al. 1997; Passos et al. 1999; Ishikawa et al. 2002).

L. (L.) chagasi é o único agente que determina a forma visceral da leishmaniose no Brasil, com focos mais freqüentes no nordeste, porém, nos últimos anos, a doença se espalhou para diversas áreas do país. É uma antropozoonose com características rurais, periurbanas e atualmente urbana que tem o cão como principal reservatório e fonte de infecção nesses ambientes. *Lu. longipalpis* é o vetor associado nas áreas rural e de floresta, além disso, raposas do gênero *Lycalopex* e marsupiais (*Didelphis*) também estão envolvidos no ciclo. No caso desta doença, a distribuição dos vetores e das fontes de infecção para áreas indenes tem papel fundamental no estabelecimento da endemia. Sugere-se que esta espécie possa ter sido introduzida no país durante a colonização européia, devido às semelhanças genéticas, bioquímicas e de comportamento clínico entre as cepas isoladas de diversas regiões do país e as isoladas no Mediterrâneo, neste caso a *L. (L.) infantum* (Grimaldi Jr. ; Tesh 1993; Marzochi; Marzochi, 1994; Maurício et al, 2000; Pratlong et al. 2004; Botilde et al. 2006; Lukes et al. 2007).

As Leishmanioses, epidemiologicamente, apresentam padrões distintos em variados aspectos, provocados principalmente pela multiplicidade de espécies do parasita, de insetos vetores, de diferentes reservatórios acometidos e dos diferentes

fatores ambientais que interferem no ciclo natural (Lainson; Shaw, 1987; Marzochi; Marzochi, 1994). A distribuição geográfica está associada às regiões tropicais e subtropicais, onde existe uma maior densidade de espécies vetoradas, dos gêneros *Phlebotomus*, responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Nos últimos anos, as leishmanioses têm sido incriminadas, junto com outras doenças também transmitidas por artrópodes, como uma doença emergente e reemergente, principalmente nos países da Europa e América do Sul, onde está associada à co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Alvar et al. 1997).

Os parasitas e vetores da leishmaniose podem se adaptar a mudanças ambientais, ocasionadas por desmatamentos ou ocupação desordenada de áreas de floresta passando então do ciclo silvestre para o urbano e sua distribuição para áreas indenes tem grande importância no estabelecimento da endemia (Passos et al. 1999; Cupolillo et al. 2003). Devido às mudanças das características epidemiológicas dessa doença é necessário sempre o desenvolvimento de novas ferramentas de identificação das espécies para que se possa monitorar sua distribuição e adaptar as medidas de controle (Botilde et al. 2006).

Admite-se que nas Américas, a forma tegumentar da leishmaniose seja autóctone, sendo denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e no Brasil, é encontrada em todo o território nacional causada por sete espécies de *Leishmania* (Grimaldi Jr. et al. 1989). É uma doença de grande espectro clínico e constitui uma das afecções dermatológicas que merece grande atenção por parte do serviço público de saúde, principalmente pela magnitude e potencial endêmico. De acordo com Marzochi e Marzochi (1994), as manifestações clínicas produzidas no homem podem ser classificadas em diferentes tipos:

a) leishmaniose cutânea inaparente - onde não há presença de lesões, podendo ocorrer o desenvolvimento da doença clínica caso haja uma queda na imunidade do hospedeiro;

b) leishmaniose cutânea – presença de lesões ulceradas localizadas ou disseminadas com as formas localizada, difusa e disseminada;

c) leishmaniose mucosa - pode apresentar lesões múltiplas na mucosa interna associada à leishmaniose cutânea quando se tratar da forma tardia, ou lesões únicas na mucosa externa no caso da forma primária sem lesões cutâneas;

d) leishmaniose mucocutânea - associada às lesões cutâneas e mucosas que ocorrem de forma simultânea, podendo ocorrer lesões distantes ou contíguas.

A Leishmaniose Visceral (LV) foi descrita na Grécia em 1835, mas, foi na Índia que ficou popularmente conhecida como calazar (febre negra), pelos sintomas de febre e escurecimento da pele dos indivíduos acometidos. É causada por três espécies de parasitas do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* nas Américas, embora, haja relatos desta espécie também como agente da LC em alguns países como Venezuela, Honduras, Nicarágua e Costa Rica e também no Brasil (Oliveira-Neto et al. 1986; Grimaldi et al. 1989; Noyes et al. 1997; De Lima et al. 2009). Dos milhares de casos de LV descritos anualmente em todo o mundo, 90% concentram-se em Bangladesh, nordeste da Índia, Nepal e Sudão (Velho Mundo) e nordeste do Brasil (Novo Mundo) (Herwaldt, 1999). No Brasil, a LV é descrita desde 1913, sendo atualmente registrada em 20 das 27 Unidades da Federação, com cerca de 1600 municípios das regiões Centro-Oeste, Norte, Sudeste, Nordeste e Sul, nos seguintes Estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio

Grande do Norte, Roraima, Sergipe, São Paulo, Tocantins (Diniz et al. 2008) e no Rio Grande do Sul apresentando transmissão autóctone em cães (Ministério da Saúde, 2006; Souza et al. 2009). Recentemente, foram descritos casos autóctones da doença em cães no município de São Borja (RS), demonstrando a expansão da LV para a região sul do país. É uma doença de difícil controle, ocorrendo atualmente em centros urbanos como Araçatuba (SP), Corumbá (MS), Rio de Janeiro (RJ) e Belo Horizonte (MG) cujo ciclo é mantido principalmente pela presença dos hospedeiros e vetores adaptados a estes ambientes (Marzochi et al 2009; Evans et al. 1992; Santa Rosa; Oliveira, 1997; Silva et al. 2001; Palatnik-De-Sousa et al. 2001; Ministério da Saúde, 2006). A doença manifesta-se normalmente em caráter endêmico, sendo considerada crônica e de alta letalidade em indivíduos não tratados, cuja severidade depende normalmente do seu tempo de evolução, com período de incubação que pode variar de meses a anos. O ciclo de transmissão envolve os cães domésticos, vetores flebotomíneos como *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, além de algumas espécies silvestres como raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais como o *Didelphis albiventris* (Evans et al. 1992; Marzochi; Marzochi, 1994; Santa Rosa; Oliveira, 1997; Palatnik-De-Sousa et al. 2001; Silva et al. 2001).



Figura 1. Mapa apresentando os Estados brasileiros com registro de casos de Leishmaniose Visceral.

Pela severidade da leishmaniose visceral no homem, as ações sanitárias direcionadas para esta forma da doença são mais rigorosas que aquelas direcionadas à leishmaniose tegumentar. Assim, programas de controle são implantados nas áreas endêmicas, objetivando interromper o ciclo de transmissão. Tais programas assumem três pontos principais: detecção e tratamento dos casos humanos; borrifação de inseticidas no domicílio e peridomicílio e monitoramento de cães domésticos, removendo e eliminando os sorreatores. No Brasil, estes programas iniciaram-se por volta da década de 50, durante um surto ocorrido no Estado do Ceará, estendendo-se mais tarde para outras regiões do país onde permanecem até os dias de hoje (Ministério da Saúde, 2006).

1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

O cão doméstico pela grande proximidade com o homem não só está exposto aos agentes causadores da doença humana, como também expõem o homem aos seus parasitas, sendo considerado um importante elo de certas zoonoses. Nas Leishmanioses esse animal tem sido encontrado naturalmente infectado em diferentes focos registrados no mundo, com relatos de que a enzootia canina possa preceder o aparecimento de casos humanos (Deane; Deane, 1955; Marzochi; Marzochi, 1994; Paranhos-Silva et al. 1998; Palatnik-De-Sousa, 2001). No caso da infecção canina causada por *L. (V.) braziliensis* geralmente não há comprometimento do estado geral do animal e a doença manifesta-se com lesões cutâneas localizadas preferencialmente na bolsa escrotal, pavilhão auricular e focinho, que são locais de poucos pêlos, preferidos pelo inseto vetor (Aragão, 1927) e ainda não se conhece totalmente o potencial do cão doméstico como reservatório (Reithinger; Davies, 1999).

Diferentemente do que ocorre no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar, na leishmaniose visceral, esse animal possui um papel já bem sedimentado, sendo considerado um importante reservatório doméstico. No Brasil, apesar do primeiro caso canino ter sido descrito em 1938, foi a partir dos relatos de Deane e Deane (1955), que constataram a presença de formas amastigotas na pele de cães infectados, facilitando a infestação pelos vetores, que se passou a incriminá-los como um dos prováveis elos no ciclo de transmissão no ambiente doméstico. Desde então, a notificação de cães infectados em áreas endêmicas, associado ao aparecimento dos casos humanos, tem sugerido que o cão infectado

possa manter e amplificar ciclos instalados no peridomicílio principalmente através de sua migração para determinadas áreas (Marzochi et al. 1985a; Paranhos-Silva et al. 1998; Costa et al. 2007; Costa et al. 2008; Diniz et al. 2008), levando os órgãos sanitários competentes a adotarem medidas objetivando a interrupção desse ciclo de transmissão, através da detecção e eliminação dos cães suspeitos (OMS, 2008; Ministério da Saúde, 2006; Dantas Torres, 2009; Marzochi et al. 2009).

No cão a doença é de evolução lenta, mas com início insidioso. Classicamente a LVC pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas a imunocompetência individual do animal e também à virulência do parasito, como por exemplo, lesões cutâneas, descamação, eczema, em particular no espelho nasal e orelha, e pequenas úlceras rasas, localizadas mais freqüentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande freqüência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, anemia, apatia, diarréia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção ocorre, em geral, a paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, em alguns cães, a doença pode permanecer latente, levando até a cura espontânea (Marzochi et al. 1985b; Colmenares et al. 2002; Crescente et al. 2009).

A forma assintomática da doença é predominante e tem sido relatada em proporções que podem representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva (Dantas-Torres, 2009; Queiroz et al. 2009). De acordo com o manual de controle da Leishmaniose Visceral (Ministério da Saúde, 2006), devem ser realizados inquéritos sorológicos (amostrais ou censitários) na população canina para avaliação da soroprevalência, empregando para isto a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno

Sorbent Assay) para triagem e a imunofluorescência indireta (IFI) para confirmação dos casos. Para o diagnóstico parasitológico, os espécimes clínicos coletados de cães podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado, linfonodos e em alguns casos de biópsias de pele íntegra, lesão ou vísceras (Barrouin-Melo et al 2006; Madeira et al, 2006a). No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão de fragmentos de orelha, por este ser considerado por alguns autores o sítio com maior densidade de parasitos, (Travi et al. 2001). Este é então corado pela técnica de Giemsa ou Leishman. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso, a partir de tecidos do sistema monocítico fagocitário e na pele aparentemente sã, em meios de cultivo apropriados como, por exemplo, NNN acrescido de meio Schneider enriquecido com soro fetal bovino, sendo este o método usado para o diagnóstico (Marzochi et al. 1985b).

No Brasil a doença no cão coexiste com a doença humana em todos os focos conhecidos, sendo mais prevalente e precedendo a doença no homem e, do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é mais importante, pois além de ser mais prevalente, também apresenta um grande número de portadores assintomáticos, bem como doentes, que são fontes de infecção para os vetores, mais até que o homem doente (Marzochi et al. 1985a). Em relação ao envolvimento da sintomatologia clínica na transmissão da doença Travi et al. (2001), estudando a infectividade de cães na Colômbia, observaram que cães sintomáticos e oligossintomáticos apresentaram maior infectividade para os flebotomíneos do que os assintomáticos, sugerindo uma maior carga parasitária na pele destes animais, o que foi confirmado nos relatos de Giuncheti et al. (2006) e Reis et al. (2006). O mesmo foi visto por Michalsky et al. (2007) e Verçosa et al. (2008) em seus estudos

no Brasil. Além disso, no cão o tratamento é pouco eficiente e está proibido pelas autoridades de saúde. Outro fator relacionado ao grande número de cães infectados é a possibilidade de transmissão intercanina, sem a participação do vetor, que poderia, por exemplo, ocorrer através da mordedura, coito, por via transplacentária e provavelmente por ingestão de carrapatos ou pulgas que se alimentam do sangue de cães doentes (Marzochi et al. 1985b; Coutinho et al. 2005; Coutinho; Linardi, 2007; Pita-Pereira et al. 2008; Pangrazio et al. 2009; Savani et al. 2009).

No Município do Rio de Janeiro, a área afetada pela leishmaniose visceral canina compreende diversos bairros como Realengo, Bangu, Senador Camará, Campo Grande e Jacarepaguá, que são localidades periurbanas e que ainda apresentam determinadas características rurais com população de baixa renda e habitações precárias (Mazochi et al. 2009). Em cães, esta doença no Rio de Janeiro parece não diferir clinicamente da observada em outras regiões do país, porém há relatos de diferenças entre casos de LV ocorridos no nordeste (Almeida et al. 2005). O mesmo ocorre no caso da doença humana quando os aspectos clínicos são comparados entres casos da África e do Novo Mundo (Berman, 2006).

Alguns outros fatores como sexo, idade, comprimento do pelo e raça podem estar relacionados à ocorrência da doença, como visto por França-Silva et al. (2003), que encontraram maior prevalência de soropositividade nos machos, em animais de pelo curto e em cães das raças boxer e cocker spaniel. Curiosamente a primeira raça está relacionada a uma maior susceptibilidade a neoplasias podendo haver uma relação entre estes dois fatores.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS DO GÊNERO LEISHMANIA: CONCEITOS E APLICABILIDADE

A classificação correta de qualquer organismo é fundamental para que se possam inferir, sobre os organismos estudados, informações essenciais no nível do conhecimento taxonômico, mas também para o controle das doenças causadas por eles.

Até aproximadamente meados dos anos 70, os estudos sobre as leishmanioses baseavam-se em aspectos clínicos e epidemiológicos. As metodologias voltadas para a classificação dos parasitas desse gênero visavam principalmente características extrínsecas ao parasita, fazendo referência a características biológicas como: comportamento em meio de cultura; desenvolvimento no inseto vetor, em animais de laboratório ou mesmo, as manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos acometidos. Atualmente são inúmeras as ferramentas aplicadas nesse contexto, principalmente pelo avanço da biologia molecular, cujo conhecimento é aplicado nos estudos genéticos das amostras isoladas. A introdução destas técnicas na rotina dos laboratórios de pesquisa tem contribuído para o conhecimento desses parasitas enfocando desta vez características intrínsecas dos mesmos. (Momen, 1984; Pacheco et al, 1986; Pacheco et al. 1999).

A técnica da eletroforese utilizada para determinar os pesos moleculares das proteínas foi desenvolvida por Tiselius em 1937. Esta técnica visa determinar as variações entre proteínas mediante a migração diferencial destas quando

submetidas a uma corrente elétrica. Através das diferenças na mobilidade eletroforética das proteínas, que podem ocorrer em função da carga elétrica, forma estrutural ou peso molecular é possível distinguir os organismos. Contudo, devido ao perfil complexo de bandas que são obtidas na análise eletroforética de proteínas, há uma dificuldade da interpretação dos resultados. Na tentativa de melhor resolução, passou-se a utilizar para diferentes estudos, proteínas de ação enzimática, uma vez que as enzimas podem ser facilmente identificadas pela especificidade dos seus substratos. As enzimas compõem um grupo de moléculas protéicas responsáveis por catalisar reações metabólicas, admitindo-se para uma mesma função sutis alterações estruturais na enzima. Um grupo de enzimas que possui tal característica é denominado de isoenzimas. As isoenzimas podem ocorrer devido a diversos fatores tais como: presença de mais de um locus que codifica para enzima; presença de mais de um alelo para o locus codificador da enzima; modificações ou alterações pós-traducionais na cadeia polipeptídica formada e enzimas poliméricas cujos componentes são de alelos ou locos diferentes. Para que os resultados sejam satisfatórios é necessário que sejam determinados o meio suporte onde serão aplicadas as amostras, a solução tampão com que será feita a corrida e os sistemas reveladores para a enzima que se deseja estudar (Cupolillo et al. 1994). A eletroforese de isoenzimas permite o estudo simultâneo de várias cepas e caracteres, permitindo a rápida identificação de organismos e facilitando a visualização de possíveis diferenças entre indivíduos de uma mesma população (Romanha, 1982). Assim, uma banda no perfil eletroforético (denominada eletromorfo) é um marcador molecular que representa o alelo de um determinado locus. Desse modo, pela técnica de isoenzimas, podem ser ensaiados vários loci na identificação parasitária.

A difusão do uso das isoenzimas ocorreu através do desenvolvimento de métodos eficientes para a visualização do produto enzimático e da aplicabilidade imediata encontrada em várias áreas da biologia. A utilização da eletroforese de isoenzimas permite determinar as similaridades e diferenças entre os organismos, possibilitando a identificação e classificação taxonômica de diversos parasitas (Momen, 1984).

Segundo conceito proposto por Godfrey et al. (1979), um zimodema consiste no agrupamento de organismos com exatamente o mesmo perfil para todas as enzimas com as quais foi realizada a análise. Dentro de uma mesma espécie podem-se encontrar diferentes zimodemas, que representa o conjunto de amostras que apresentam o mesmo perfil enzimático. Um determinado zimodema pode ser o produto de diferenças enzimáticas simples ou um conjunto de diferenças que se estabelecem entre grupos populacionais de organismos. Esta técnica foi estabelecida como padrão-ouro na identificação de espécies de *Leishmania* (Schonian et al. 2008). Mesmo sendo considerada uma técnica de caráter fenotípico, na prática, cada variante enzimática corresponde a um genótipo e os eletromorfos correspondem a alelos.

O uso de eletroforese de isoenzimas em estudos taxonômicos de *Leishmania* teve início na década de 80 e atualmente é um dos métodos mais utilizado para caracterização das espécies deste parasita (OMS, 1990; Lopes et al. 1984; Pacheco et al, 1986; Cupolillo et al. 1998; Pratlong et al. 2004; Maurício et al. 2006; Kuhls et al. 2008). Além da caracterização, esta técnica fornece resultados que podem ser interpretados por análises numéricas, proporcionando numerosas informações nos estudos taxonômicos das populações destes parasitas. Os resultados obtidos com esta metodologia demonstraram que certas enzimas servem para o diagnóstico de

determinadas espécies, enquanto outras não são capazes de permitir a diferenciação de organismos distintos (Cupolillo et al. 1995). Assim, todas as espécies de *Leishmania* descritas até o momento, apresentam diferenças quanto ao perfil de mobilidade eletroforética de isoenzimas em poucos ou até mesmo em apenas um único locus enzimático. Dentro do complexo *L. donovani*, a eletroforese de enzimas suporta o status taxonômico de *L. donovani* e *L. (L.) infantum*, mas não suportam diferenças entre *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* que parecem representar um único zimodema destas espécies (Mauricio et al. 1999, Maurício et al. 2000; Campos-Ponce et al. 2005).

As variações podem ser diretamente atribuídas às diferenças genéticas e os perfis eletroforéticos encontrados, considerados como expressão fenotípica do organismo. A similaridade entre os organismos será maior quanto maior forem os caracteres idênticos entre eles. Entretanto, a eletroforese de enzimas nem sempre é capaz de distinguir todos os alelos presentes em uma espécie ou população, logo, alguns fenótipos que parecem idênticos podem representar genótipos diferentes. Apesar dessa limitação, a eletroforese de isoenzimas é considerada bastante sensível em diversos aspectos e tem apresentado resultados satisfatórios em diversos estudos (Pacheco et al. 1999; Gonzalez et al. 2007, Michalsky et al. 2007).

Cada região pode apresentar uma ou mais espécies endêmicas e dentro destas espécies, diversos subtipos (ou variantes) diferentes, que podem ser identificados pelo seu zimodema. No Velho Mundo, por exemplo, foram classificados para isolados de *L. (L.) infantum* cerca de 31 zimodemas (Kuhls et al. 2008), sendo MON-1 o mais prevalente entre eles e a nomenclatura MON-1 tem sido relacionada ao perfil eletroforético no qual estão agrupadas amostras de *L. (L.) infantum* do Velho Mundo (Toledo et al. 2002; Campino et al. 2006; Kallel et al. 2008; Amro et al.

2009) e que estão presentes em diferentes países (Sanchez et al. 2004; Botilde et al. 2006). Na França, um estudo com 712 amostras de *L. (L.) infantum* isoladas de fontes humanas, animais e vetores revelaram a presença de sete zimodemas, também com predominância do perfil MON-1 (Pratlong et al. 2004). Além da Europa e Mediterrâneo, este zimodema já foi isolado no Novo Mundo, mais precisamente na Venezuela (Zerpa et al. 2001). Há ainda uma tendência à associação de alguns zimodemas a determinados fatores como formas clínicas da doença, como MON-1 que pode estar relacionado aos casos de LV e LC enquanto outros zimodemas estão mais relacionados somente aos casos de LC, porém, há exceções como MON-24, que já foi implicado como causador da LC, LV e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (Sanchez et al. 2004; Kallel et al. 2008; Amro et al. 2009). Também há uma associação ao tipo de hospedeiro ou vetor, onde MON-1 foi isolado predominantemente de cães e indivíduos imunocompetentes, porém, com prevalência baixa nos vetores, e ainda há o caso de alguns zimodemas que estão restritos a indivíduos portadores de HIV ou a determinadas regiões geográficas (Pratlong et al. 2004; Sanchez et al. 2004; Alvar et al. 2008; Schonian et al. 2008).

No Brasil, o agente da LV (humana e canina) foi denominado *Leishmania (L.) chagasi* por Cunha e Chagas (1937). A identidade deste agente tem sido causa de alguns debates (Lainson et al. 1983; Momen et al. 1993; Mauricio et al. 1999; Mauricio et al. 2000; Dantas-Torres, 2006). Por muito tempo, este agente foi considerado autóctone das Américas, tendo os cães atuado como amplificadores da doença do ciclo silvestre para o urbano, e apesar das semelhanças observadas nos aspectos epidemiológicos, taxonômico e clínicos *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* foram por muito tempo considerado espécies distintas (Costa et al. 2007; Costa et al. 2008; Diniz et al. 2008). Entretanto, alguns autores consideram que este agente

tenha sido introduzido nas Américas por colonizadores europeus, escravos africanos ou, até mesmo pelos cães domésticos e que se adaptou a novos vetores e hospedeiros. Dados bioquímicos e moleculares suportam tal hipótese já que *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* possuem inúmeras características comuns entre si e atualmente, admite-se que *L. (L.) chagasi* seja uma variante de *L. (L.) infantum* que se adaptou a novos hospedeiros (Mauricio et al. 1999; Mauricio et al. 2000; Shaw, 2002). Baseado nesse conceito, alguns autores já utilizam a denominação de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Lainson; Rangel, 2005 Crescente et al. 2009; Silveira et al. 2009).

Estudos realizados com amostras de *L. (L.) chagasi*, isoladas de casos humanos e animais domésticos obtidos de diferentes regiões geográficas das Américas revelaram grande semelhança com *L. (L.) infantum* (Momen; Grimaldi Jr, 1989). Dados da literatura demonstram que *L. (L.) chagasi* não apresenta polimorfismo enzimático, sendo seu perfil idêntico ao da cepa de referência de *L. (L.) infantum* (Kreutzer et al. 1987; Momen; Grimaldi, 1989). No entanto, é interessante lembrar que embora MON-1 seja o mais prevalente em diversas regiões do Velho Mundo, existe um grande polimorfismo enzimático em populações naturais que circulam em diferentes regiões geográficas (Alvar et al. 2004; Kuhls et al. 2008).

Já relacionada à forma tegumentar, o espectro de desordens observadas na LTA, principalmente causada por *L. (Viannia) braziliensis* sugere uma variabilidade genética entre parasitas desta espécie que foi observada por alguns autores (Cupolillo et al. 1997; Pacheco et al. 1999; Ishikawa et al. 2002). Entretanto, estudos realizados no Rio de Janeiro utilizando outras técnicas, demonstraram que a maioria das cepas de *L. (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes com diferentes apresentações clínicas apresentam o mesmo genótipo (Baptista et al. 2009).

Outras técnicas moleculares, como Amplificação Randômica de Polimorfismo de DNA (RAPD) e Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP) do kDNA também podem ser empregadas na caracterização de parasitas do gênero *Leishmania*., as quais também tem sido utilizadas no entendimento de aspectos relacionados à falhas terapêuticas, resistência à drogas, diferenciação de re-infecção e reativação e a correlação entre a diversidade genética e a eco-geografia dos parasitas (Saravia et al. 1990; Pacheco et al. 1995). Estas técnicas têm apresentado boa correlação com os resultados obtidos por MLEE em diferentes estudos (Passos et al. 1999; Botilde et al. 2006). No entanto, há relatos de autores que verificaram diversidade genotípica em amostras de *Leishmania* quando submetidas ao RAPD e Fingerprinting em comparação a MLEE onde esta não foi observada (Gomes et al. 1995). Ishikawa et al. (2002) ao utilizar o RAPD em seus estudos, verificaram que esta técnica distinguiu adequadamente as populações de amostras amazônicas e que coincidiam com as espécies conhecidas desta região. Já Lopes et al. (1984), ao utilizar endonucleases em seu estudo visando identificar amostras de *Leishmania*, observaram variações ao comparar os resultados com os obtidos por isoenzimas. Para *L. (V.) braziliensis*, por exemplo, foram encontrados, dentre 15 Zimodemas, 41 genótipos diferentes, a maioria restrita a áreas geográficas específicas (Cupolillo et al. 2003). Apesar da grande aplicabilidade, estas técnicas esbarram em dificuldades como alto custo e necessidade de equipamentos mais sofisticados (Passos et al. 1999; Botilde et al. 2006). Ao analisar amostras de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* por RAPD, Ishikawa et al. (2002), em seus estudos no Brasil, verificaram que as diversas espécies de *Leishmania* analisadas, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, apresentaram uma grande variabilidade de zimodemas e genótipos. Porém, o mesmo não ocorre com *L. (L.)*

chagasi, única espécie causadora da doença visceral. Embora poucos estudos tenham sido realizados, a variação de *L. (L.) chagasi* é muito reduzida, sendo relatadas somente pequenas diferenças em algumas amostras, estando mais próxima geneticamente de *L. (L.) infantum* do que das outras espécies existentes (Noyes et al. 1997). Beverley et al (1987) utilizaram análises dos perfis de restrição do DNA nuclear; Grimaldi et al (1991) empregaram análises por anticorpos monoclonais e eletroforese de isoenzimas, Momen et al (1993) utilizaram análises por diferentes loci enzimáticos, em todos esses estudos, *L. chagasi* e *L. infantum* apresentaram perfis genéticos semelhantes, sendo consideradas a mesma espécie (Momen et al., 1993; Mauricio et al, 1999; Shaw, 2002; Lukes et al, 2007). Em relação à reprodução dos parasitos, há relatos de heterozigose fixa entre amostras de *Leishmania*, demonstrando a existência de uma estrutura clonal na população, sendo mais provável a hipótese de uma reprodução assexuada. Porém, acredita-se que a variabilidade genética destes parasitas seja devida a trocas de material genético entre eles por uma eventual reprodução sexuada ou outros mecanismos que possam ocorrer entre as populações (Tibayrenc, 1998; Tibayrenc; Ayala, 2002; Miles et al. 2009), no entanto, ainda não há comprovação científica de tal fato, embora haja relatos de fusão de células *in vitro* e achados de células que possuem uma maior quantidade de material genético do que outras, a troca de informação genética entre parasitas pode ocorrer ainda em casos de infecções mistas (Cupolillo et al. 1998; Pratlong et al. 2004; Sanchez et al. 2004; Maurício et al. 2006, Chargui et al. 2009). As outras hipóteses seriam a expressão simultânea de dois ou mais genes em uma família multigênica, uma modificação pós-transcricional ou mutação em uma população clonal (Pratlong et al. 2004; Maurício et al. 2006). Há também autores que atribuem esta variação a fatores como a diversidade de hospedeiros,

vetores e variações climáticas, pois foi visto que em áreas onde a diversidade de hospedeiros e vetores é menor, a variabilidade genética do parasita também é menor, ocorrendo também o contrário, uma variabilidade genética maior quando a diversidade é maior (Gomes et al. 1995; Cupolillo et al. 1998; Pratloug et al. 2004; Sanchez et al. 2004).

Mesmo com os avanços das técnicas moleculares ainda é difícil associar os resultados às características epidemiológicas nas diferentes regiões (Ishikawa et al. 2002). Como as medidas de controle destas doenças estão baseadas principalmente em tratamento dos doentes, controle de vetores e reservatórios, é importante o conhecimento da variabilidade genética da *Leishmania* e o entendimento das características relacionadas a ela, através de técnicas enzimáticas, moleculares ou a associação de ambas, bem como a investigação da existência de novos hospedeiros e o entendimento da ecologia dos já descritos, para uma melhor implantação das medidas de controle (Ishikawa et al. 2002; Cupolillo et al. 2003), pois essa heterogeneidade, que produz diferentes fenótipos e pode influenciar na virulência do agente, pode estar associada às diferentes manifestações clínicas e epidemiológicas em associação à resposta imune do hospedeiro e às suas próprias características genéticas (Peacock et al. 2001; Almeida et al. 2005; Baptista-Fernandes et al. 2007; Ettinger et al. 2009). Como é visto no caso da *L. infantum*, onde determinados zimodemas se apresentam restritos a certas formas clínicas da doença. O zimodema MON-1, por exemplo, que é o mais prevalente, está associado tanto à forma cutânea como a visceral em humanos (Campino et al, 2006, Kallel et al, 2008, Toledo et al, 2002, Amro et al, 2009). O MON-24 causa a forma cutânea em indivíduos imunocompetentes, porém, a forma visceral determinada por este zimodema, só ocorre em indivíduos imunodeprimidos

(Kallel et al. 2008), o mesmo ocorrendo com alguns outros zimodemas, como o MON-29 e MON-80 que são encontrados associados ao HIV (Campino et al. 2006).

1.4. IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM LEISHMANIA

Epidemiologicamente as leishmanioses apresentam padrões distintos em variados aspectos, provocados principalmente pela multiplicidade de espécies de *Leishmania*, de insetos vetores, de diferentes reservatórios acometidos e dos diferentes fatores ambientais que afetam essa cadeia epidemiológica (Lainson; Shaw, 1987; Marzochi; Marzochi, 1994). Na Leishmaniose Visceral (LV), os cães domésticos são os reservatórios mais importantes e, talvez, os responsáveis pela mudança no perfil epidemiológico da doença em diferentes regiões do Brasil, principalmente pelo constante movimento migratório, facilitando a expansão da doença para áreas consideradas indenes. Atualmente, é reconhecido que as manifestações clínicas da doença e a resposta ao tratamento estejam parcialmente relacionadas a espécie de *Leishmania* envolvida (Grogl et al. 1992; Belli et al. 1998). Entretanto, o grau de variabilidade genética dentro de uma mesma espécie, pode também ter importância nesse contexto.

A eletroforese de multilocos enzimáticos (MLEE) é considerada uma ferramenta padrão ouro na identificação de parasitas do gênero *Leishmania* (Rioux et al. 1990). Embora, amplamente utilizada na caracterização taxonômica desses organismos, possui aplicações com inúmeras abordagens epidemiológicas (Pacheco et al. 1984; Pacheco et al. 1995; Thomaz-Soccol et al. 1993). O conceito de zimodema, que é definido pelo conjunto de amostras que apresentam o mesmo

padrão eletroforético surgiu a partir das variações enzimáticas encontradas entre isolados de uma mesma espécie. Outra grande aplicabilidade da técnica de isoenzimas é a possibilidade da utilização de determinados sistemas enzimáticos para o diagnóstico diferencial de espécies ou grupos de parasitas (Cupolillo et al. 1997).

No município do Rio de Janeiro tanto a forma tegumentar como visceral ocorrem simultaneamente em diversas áreas, acometendo o homem e cães domésticos. Neste município, sugere-se que apenas um zimodema (Z 27) de *L. (V.) braziliensis* esteja envolvido na forma tegumentar da doença humana e animal (Cupolillo et al. 1997), entretanto, pouco se sabe sobre a variabilidade fenotípica de *L. (L.) chagasi*, única espécie responsável pela doença visceral nas Américas. Estudos avaliando a variabilidade de diferentes isolados de *Leishmania* empregando a eletroforese de enzimas têm indicado, de um modo geral, baixo nível de variação genética entre amostras de *L. (L.) chagasi* (Momen; Grimaldi Jr. 1989) ao passo que amostras de *L. (V.) braziliensis* apresentam grande polimorfismo (Cupolillo et al. 1997). *Leishmania (L.) chagasi* é uma espécie pertencente ao subgênero *Leishmania*, considerada como uma variante originada a partir da *L. (L.) infantum* (Momen et al. 1993), espécie responsável pela doença visceral nos países do Mediterrâneo, que acredita-se ter sido introduzida nas Américas na época da colonização espanhola (Shaw, 2007), sendo o único agente envolvido no ciclo epidemiológico, urbano e silvestre, da LV no Brasil.

As amostras isoladas, a partir do diagnóstico indireto são de grande importância para diversos estudos, principalmente àqueles que envolvem a vigilância epidemiológica, possibilitando, através da caracterização dos parasitas isolados, o mapeamento das espécies e variantes de *Leishmania* que circulam entre

os hospedeiros humanos e animais envolvidos no ciclo de transmissão da doença, bem como um melhor entendimento dos fatores que podem estar relacionados a essas variações fenotípicas como, por exemplo, características clínicas, resistência a drogas, predileção por determinados hospedeiros, associação a determinadas doenças como o HIV e virulência do parasita. O Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/IPEC/Fiocruz possui um banco de amostras de *Leishmania* que são obtidas na rotina diagnóstica humana e animal. Dessa forma, considerando a importância da LV no contexto de saúde pública e a carência de dados sobre o polimorfismo dos parasitas envolvidos no ciclo epidemiológico da doença no Brasil, nos propomos avaliar, pela técnica de eletroforese de enzimas, o nível de variação fenotípica entre um grupo de amostras de *L. (L.) chagasi* isoladas de cães domésticos oriundos do município do Rio de Janeiro e da região metropolitana de Belo Horizonte.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade fenotípica de amostras de *Leishmania (Leishmania) chagasi* isoladas de cães oriundos do município do Rio de Janeiro e de Belo Horizonte empregando a técnica de eletroforese de enzimas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar fenotípicamente 200 isolados de *L. (L.) chagasi*, sendo 100 obtidos de cães do município do Rio de Janeiro e 100 do município de Belo Horizonte;
- ✓ Comparar o perfil eletroforético de ambos os grupos estudados a partir da utilização de nove sistemas enzimáticos;
- ✓ Avaliar a similaridade entre os isolados estudados;
- ✓ Correlacionar os resultados obtidos neste estudo com dados clínicos e epidemiológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo constitui um desdobramento de outros projetos já aprovados e licenciados pelo Comitê de Usuários de Animais (CEUA-FIOCRUZ), onde foram obtidas as amostras de *Leishmania* que foram estudadas.

- Protocolo CEUA N° 195/03 – “Avaliação Parasitológica nas Leishmanioses Caninas” sob responsabilidade de Maria de Fátima Madeira;
- Protocolo SMS N° P0298-06 – “*Leishmania (L.) chagasi* em cães domésticos (*Canis familiaris*) soronegativos em área endêmica na cidade do Rio de Janeiro” sob responsabilidade de Fabiano Borges de Figueiredo.

3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo laboratorial visando avaliar a variabilidade fenotípica de amostras de *Leishmania (Leishmania) chagasi* empregando a técnica de

eletroforese de multilocos enzimáticos, comparando amostras obtidas de duas áreas endêmicas de leishmaniose visceral no Brasil.

3.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras estudadas encontram-se criopreservadas e constituem um acervo do Banco de amostras biológicas do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses – VigiLeish/IPEC/FIOCRUZ, RJ e foram obtidas de cães durante estudo diagnóstico das Leishmanioses caninas realizado no município do Rio de Janeiro e na cidade metropolitana de Belo Horizonte.

No município do Rio de Janeiro, a captação dos animais envolveu a Secretaria Municipal de Saúde (RJ) que diagnosticou os cães pela sorologia (IFI) sendo os positivos para LeishmanioseLeishmania sp. encaminhados para o Laboratório de Dermatozoonoses em Pesquisa Clínica em Animais Domésticos – (LABCLINDERMOZOO) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para eutanásia e coleta de material clínico para confirmação do diagnóstico. Na cidade metropolitana de Belo Horizonte, a captação dos animais foi realizada em colaboração com o Centro de Controle de Zoonoses onde os animais sororeatores para *Leishmania* sp. foram eutanasiados para coleta de amostras biológicas. A eutanásia, em todos os casos, foi realizada por overdose de tiopental de acordo com protocolos aprovados pelo CEUA ~~como citado anteriormente~~. Durante ambos os estudos, foram preenchidas fichas contendo informações sobre o status clínico de

todos os animais eutanasiados. Os animais foram classificados como sintomáticos, assintomáticos e oligossintomáticos (Manciante et al. 1988). Considerou-se como assintomáticos os animais que apresentavam ausência de qualquer sinal ou sintomas sugestivos da infecção; como sintomáticos, os animais que apresentaram sinais tais como: alterações cutâneas como eczema, descamação, úlceras rasas, onicogribose, hiperqueratose, caquexiaemagrecimento, esplenomegalia, ceratoconjuntivite, coriza, vômito, diarreia, edemas de membros e paresia dos membros posteriores e como oligossintomáticos os que apresentaram sinais como adenopatia linfóide, pequena perda de peso e/ou pêlo opaco. ~~Ver se é isso mesmo!~~

Dos animais estudados, a amostra de pele integra, ~~foi~~ obtida do pavilhão auricular, escápula ou de outros locais, não identificados nos prontuários do animal, após tricotomia, limpeza com água e sabão e anti-sepsia com álcool a 70%. Foi coletado um fragmento de cerca de 4mm o qual foi acondicionado em solução salina estéril, contendo 50ug de 5'fluorocytocine; 1000 unidades de penicilina G potássica e 200ug de estreptomicina, onde permaneceu por 24 horas a temperatura de 4°C. Após este período, os fragmentos foram transferidos, de forma asséptica, para tubos contendo meio NNN (Novy McNeal; Nicolle, 1908) acrescido de meio Schneider (Sigma) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB-Cultilab) contendo antibióticos associados (penicilina G potássica: 200 unidades/mL e estreptomicina: 100 unidades/mL). Os tubos foram mantidos em estufa incubadora B.O.D. com temperatura de 26-28°C durante 30 dias e em períodos semanais eram examinados, coletando-se amostras para exame à fresco por microscopia óptica. Nos casos positivos, a amostra foi criopreservada em nitrogênio líquido (N₂).

3.4. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Das amostras isoladas dos animais eutanasiados por suspeita de leishmaniose visceral, foram selecionadas somente amostras obtidas de pele íntegra, as quais foram previamente identificadas por isoenzimas, como *L. (L.) chagasi* utilizando o sistema enzimático nucleotidase (NH)~~(1 e 2~~. Foram selecionadas aleatoriamente ~~X~~ 100 amostras do Rio de Janeiro e ~~X~~ 100 amostras de Belo Horizonte. A Tabela 1 apresenta dados das amostras estudadas, indicando o código da amostra no VigiLeish, sítio de pele e a data de isolamento assim como, a procedência e status clínico ~~dos animais e condição clínica de animal~~ e o Quadro 1 apresenta os dados das amostras de referência utilizadas no estudo que foram, obtidas junto ao Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses do Instituto de Oswaldo Cruz.ELISA

Tabela 1: Dados gerais das amostras selecionadas para o estudo

Amostras BH					Amostras RJ				
Nº	Código	Data	Sítio de	Clínica	Nº	Código	Data	Sítio de	Clinica
1	403 BH	6/11/06	Orelha	O	101	21	12/07/04	PI	A
2	448 BH	13/11/06	Orelha	A	102	44	01/09/04	PI	A
3	481 BH	21/11/06	Orelha	A	103	53	17/09/04	Escápula	A
4	484 BH	21/11/06	Orelha	A	104	70	08/11/04	Escápula	A
5	533 BH	29/11/06	Orelha	A	105	85	25/11/04	Escápula	A
6	572 BH	02/05/07	Orelha	A	106	264	27/10/05	Escápula	*
7	574 BH	02/05/07	Escápula	A	107	266	27/10/05	PI	*
8	579 BH	02/05/07	Orelha	O	108	342	05/04/06	Orelha	*
9	580 BH	02/05/07	Orelha	O	109	343	05/04/06	Orelha	*
10	581 BH	02/05/07	Escápula	A	110	350	07/04/06	Orelha	*
11	582 BH	03/05/07	Orelha	A	111	352	11/04/06	Orelha	*
12	585 BH	03/05/07	Orelha	A	112	362	25/04/06	Orelha	*
13	586 BH	03/05/07	Orelha	O	113	366	27/04/06	Escápula	*
14	587 BH	03/05/07	Orelha	A	114	375	12/05/06	Orelha	A

15	589 BH	12/06/07	Orelha	A	115	392	08/06/06	Orelha	A
16	592 BH	07/05/07	Orelha	A	116	402	05/07/06	Orelha	*
17	593 BH	07/05/07	Orelha	A	117	412	13/07/06	Orelha	*
18	595 BH	07/05/07	Escápula	A	118	421	11/08/06	Orelha	*
19	597 BH	07/05/07	Orelha	O	119	428	21/09/06	Orelha	*
20	599 BH	07/05/07	Escápula	A	120	430	21/09/06	Escápula	*
21	600 BH	07/05/07	Escápula	A	121	432	21/09/06	Escápula	A
22	601 BH	07/05/07	Orelha	A	122	433	21/09/06	Orelha	A
23	602 BH	08/05/07	Orelha	A	123	434	21/09/06	Orelha	A
24	603 BH	08/05/07	Orelha	A	124	449	23/10/06	Orelha	A
25	605 BH	08/05/07	Orelha	A	125	450	23/10/06	Escápula	A
26	606 BH	08/05/07	Orelha	A	126	451	20/10/06	Orelha	A
27	607 BH	08/05/07	Orelha	A	127	534	18/04/07	PI	*
28	608 BH	08/05/07	Orelha	A	128	576	10/07/00	PI	S
29	609 BH	08/05/07	Orelha	A	129	585	10/07/00	PI	A
30	611 BH	08/05/07	Orelha	A	130	586	10/07/00	PI	A
31	612 BH	09/05/07	Orelha	A	131	593	24/10/03	Escápula	S
32	615 BH	09/05/07	Orelha	A	132	601	06/08/01	PI	S
33	617 BH	09/05/07	Orelha	O	133	602	19/09/01	PI	S
34	618 BH	09/05/07	Orelha	A	134	613	12/09/00	PI	S
35	620 BH	09/05/07	Orelha	A	135	618	19/09/01	PI	A
36	622 BH	09/05/07	Escápula	O	136	641	19/09/01	PI	S
37	623 BH	10/05/07	Orelha	A	137	650	18/07/00	PI	S
38	625 BH	10/05/07	Orelha	A	138	658	18/07/00	PI	A
39	628 BH	10/05/07	Escápula	A	139	660	03/05/99	PI	A
40	631 BH	10/05/07	Escápula	A	140	662	10/07/00	PI	A
41	633 BH	14/05/07	Orelha	A	141	665	03/05/99	PI	A
42	638 BH	14/05/07	Orelha	A	142	668	11/05/99	PI	S
43	639 BH	14/05/07	Orelha	A	143	673	19/10/01	Orelha	S
44	640 BH	14/05/07	Orelha	A	144	697	19/10/01	PI	A
45	648 BH	15/05/07	Orelha	A	145	702	19/10/01	PI	*
46	649 BH	15/05/07	Orelha	O	146	781	02/12/02	Orelha	S
47	651 BH	16/05/07	Orelha	S	147	785	03/02/03	PI	S
48	652 BH	16/05/07	Orelha	A	148	802	14/02/03	Orelha	A
49	653 BH	16/05/07	Orelha	A	149	807	17/02/03	Orelha	S
50	654 BH	16/05/07	Orelha	O	150	831	20/06/03	PI	S
51	656 BH	16/05/07	Orelha	A	151	832	20/06/03	PI	S
52	657 BH	16/05/07	Orelha	A	152	840	14/07/03	Escápula	S
53	658 BH	16/05/07	Orelha	A	153	850	20/07/03	Escápula	S
54	659 BH	16/05/07	Orelha	A	154	864	15/08/03	Escápula	A
55	660 BH	16/05/07	Orelha	A	155	866	15/08/03	PI	A
56	661 BH	17/05/07	Escápula	A	156	874	25/08/03	Escápula	S
57	662 BH	17/05/07	Orelha	A	157	880	25/08/03	Escápula	S
58	663 BH	17/05/07	Orelha	A	158	898	27/08/03	Escápula	A
59	667 BH	17/05/07	Orelha	A	159	904	02/09/03	Escápula	A
60	670 BH	17/05/07	Orelha	O	160	919	10/09/03	PI	S
61	672 BH	21/05/07	Orelha	A	161	924	10/09/03	Escápula	S
62	673 BH	21/05/07	Orelha	A	162	939	27/10/03	Escápula	S

63	675 BH	21/05/07	Escápula	A	163	962	17/11/03	Escápula	S
64	677 BH	21/05/07	Orelha	A	164	974	22/12/03	Escápula	S
65	679 BH	21/05/07	Orelha	A	165	989	13/04/04	PI	S
66	680 BH	21/05/07	Escápula	O	166	1000	09/06/04	PI	S
67	682 BH	22/05/07	Escápula	A	167	1021	08/03/07	Orelha	*
68	683 BH	22/05/07	Orelha	S	168	1022	20/07/07	PI	S
69	685 BH	22/05/07	Orelha	S	169	1024	20/07/07	Orelha	S
70	691 BH	22/05/07	Orelha	A	170	1025	30/03/07	Orelha	*
71	692 BH	23/05/07	Orelha	A	171	1026	20/07/07	PI	A
72	696 BH	23/05/07	Orelha	A	172	1035	27/04/07	Orelha	*
73	699 BH	23/05/07	Orelha	O	173	1041	01/08/07	PI	A
74	700 BH	23/05/07	Orelha	A	174	1057	11/10/07	Orelha	*
75	701 BH	23/05/07	Orelha	A	175	1064	13/11/07	PI	*
76	703 BH	24/05/07	Orelha	A	176	1065	13/11/07	PI	*
77	706 BH	24/05/07	Orelha	A	177	1068	28/11/07	PI	O
78	707 BH	24/05/07	Orelha	A	178	1072	28/11/07	Escápula	*
79	710 BH	24/05/07	Orelha	A	179	1079	15/01/08	Orelha	*
80	712 BH	28/05/07	Orelha	A	180	1084	23/01/08	Escápula	*
81	724 BH	29/05/07	Orelha	A	181	1095	19/02/08	Escápula	*
82	726 BH	29/05/07	Orelha	A	182	1099	28/03/08	Escápula	*
83	745 BH	31/05/07	Orelha	O	183	1111	06/08/01	PI	O
84	753 BH	04/06/07	Orelha	A	184	1114	25/04/08	Escápula	*
85	755 BH	04/06/07	Orelha	O	185	1120	25/06/08	PI	*
86	757 BH	04/06/07	Orelha	S	186	1124	26/06/08	Escápula	O
87	759 BH	04/06/07	Orelha	A	187	1129	30/06/09	Escápula	*
88	760 BH	04/06/07	Orelha	S	188	1136	29/07/08	Escápula	O
89	761 BH	04/06/07	Orelha	A	189	1147	08/08/08	Escápula	S
90	763 BH	05/06/07	Orelha	A	190	1148	08/08/08	PI	O
91	772 BH	05/06/07	Orelha	A	191	1149	08/08/08	Escápula	*
92	774 BH	11/06/07	Orelha	A	192	1160	19/08/08	Escápula	A
93	779 BH	11/06/07	Orelha	A	193	1166	12/09/08	Escápula	O
94	782 BH	11/06/07	Orelha	A	194	1168	12/09/08	Escápula	O
95	786 BH	12/06/07	Orelha	A	195	1182	12/09/08	Escápula	O
96	787 BH	12/06/07	Escápula	S	196	1194	19/04/08	Escápula	A
97	788 BH	12/06/07	Orelha	A	197	1195	20/09/08	Escápula	S
98	792 BH	12/06/07	Orelha	A	198	1197	26/09/08	PI	S
99	793 BH	12/06/07	Escápula	A	199	1343	16/09/09	Escápula	*
100	794 BH	12/06/07	Orelha	A	200	1349	19/09/09	Escápula	*

A=Assintomático;S=Sintomático;O=Oligossintomático

PI=Pele íntegra sem identificação do local

Obs: Nas amostras assinaladas com (*), não foi possível a recuperação das informações nos prontuários dos animais.

~~Carlos, complete esta tabela~~

Quadro 1: Dados das amostras de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) utilizadas nas análises isoenzimáticas.

Espécie	Nomenclatura Internacional	Outros dados
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903	Isolada de caso de leishmaniose tegumentar humana, na serra dos Carajás, Pará
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	Isolada de infecção natural de flebotomíneo capturado na região de Utinga, Pará
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	MHOM/BR/74/PP75 Ver se não é a M2682	Isolada de caso humano de leishmaniose visceral na cidade de Ituaçu, Bahia

3.5. OBTENÇÃO DAS MASSAS PARASITÁRIAS

3.5.1 Recuperação das amostras criopreservadas

As amostras foram retiradas do nitrogênio (N₂) em lotes de 10 amostras. Inicialmente, após descongelamento em temperatura ambiente, realizou-se exame a fresco para observação da motilidade das formas promastigotas, sendo o conteúdo (cerca de 1 mL) semeado em dois tubos contendo o meio NNN (Novy McNeal; Nicolle, 1908) acrescido de meio Schneider (Sigma) suplementados com 10% de SFB (Cultilab) contendo antibióticos associados (penicilina G potássica: 200 unidades/mL e estreptomicina: ~~100 unidades~~200ug/mL) ~~o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento citado no item 4.3.~~ Os tubos foram examinados semanalmente por meio de exames a fresco em microscópio óptico e quando

positivos observado crescimento satisfatório as amostras foram repicadas para obtenção da massa parasitária. Foram retiradas novas alíquotas do N₂ e repetido o processo descrito anteriormente para as amostras que não apresentaram crescimento.

3.5.2 Expansão das culturas

Para obtenção da massa parasitária, empregada na técnica de isoenzimas, é necessário um número de parasitas na ordem de 10⁹. Para tal, as amostras crescidas em tubos, foram transferidas, com inóculo aproximado de 10%, para garrafas de cultivo celular (TPP – 75cm²) contendo meio bifásico (NNN/Schenider) acrescido de SFB (Cultilab) e antibióticos na mesma proporção citado para o isolamento. O crescimento foi acompanhado em microscópio invertido, adicionando-se meio Schneider completo em volumes e intervalos de acordo com o crescimento da amostra, até obtenção de um volume de cultura com cerca de 60-80mL. Em fase exponencial, a cultura foi transferida para tubos tipo FALCON de 50 mL e centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante as culturas foram submetidas a duas lavagens utilizando solução tampão de lavagem (NaCl 0,85% adicionada de 0,01M de EDTA, pH 8,0). Na última etapa, o pellet foi ressuspenso em dois mL do tampão de lavagem e transferido para criotubos e submetido à nova centrifugação. Após, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos devidamente identificados, foram estocados em N₂ até o momento da utilização na técnica de isoenzimas.

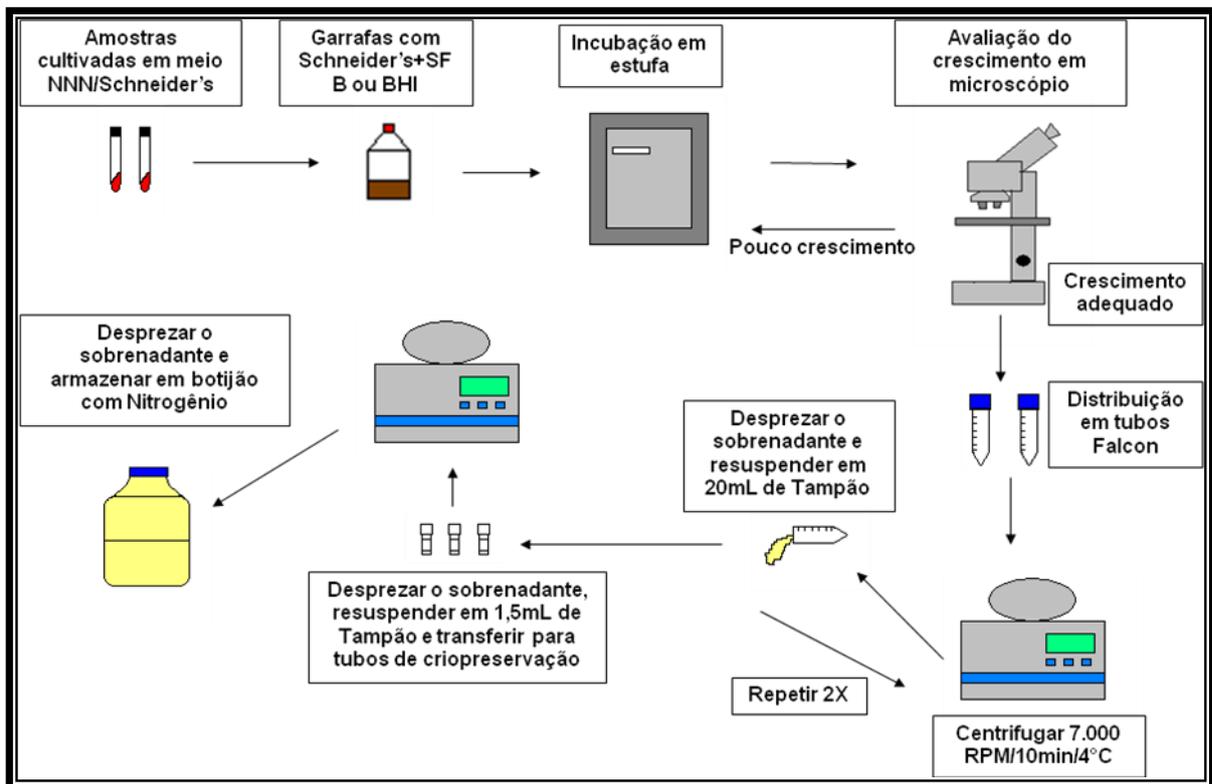


Figura 2. Esquema representando as etapas para obtenção das massas parasitárias.

3.6. ELETROFORESE DE ENZIMAS – MLEE

O estudo isoenzimático das amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose, seguindo protocolos descritos por Pacheco et al. (1995) e Cupolillo et al. (1994). Foram utilizados nove sistemas emzimáticos:

1. 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase, EC.1.1.1.43)
2. GPI (fosfoglucoase isomerase, EC.5.3.1.9)
3. NH₁ e NH₂ (nucleosídeo hidrolase, 2 loci, EC. 3.2.2.1)

4. G6PDH (Glucose-6-fosfato desidrogenase, EC.1.1.1.49)
5. PGM (fosfoglucomutase, EC. 1.4.1.9)
6. MDH (malato desidrogenase, EC.1.1.1.37)
7. ME (enzima málica, EC.1.1.1.40)
8. IDHNADP (isocitrato desidrogenase, EC.1.1.1.42)

A preparação do gel de agarose foi realizada na concentração de 1% em diluição de 1:1 de água destilada e solução tampão de reação. O tipo de tampão utilizado foi escolhido segundo a enzima a ser testada, sendo o mesmo tampão utilizado nas corridas eletroforéticas (Quadro 2).

Quadro 2: Soluções tampão utilizados na preparação dos géis e nas corridas eletroforéticas.

Solução Tampão	Reagentes e preparo
1. Tampão Tris Maleico, pH 7,4	Tris base (24,22g), Acido maleico (10,0), MgCl ₂ (0,19g), EDTA (0,74g). H ₂) q.s.p 2 litros. Dissolver todos os reagentes e acertar o pH para 7,4. Estocar a 4°C
2. Tampão Fosfato, pH 8,0	Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (solução A - estoque 1M), NaH ₂ PO ₄ (solução B- estoque 1M). Mistura 13,6 mL da solução A e 186,4 mL da solução B e completa para 1litro com H ₂ O destilada. Estocar a temperatura ambiente

1. Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: 6PGDH, GPI, PGM, NH, MDH
2. Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: G6PDH, ME, IDHNADP

A agarose utilizada foi a do Tipo V (Sigma) e uma vez pesada a quantidade necessária foi adicionado o tampão (maleico ou fosfato) e a água e, levou-se ao microondas para ser dissolvida. A dissolução completa da agarose foi obtida

aquecendo até que a mistura tornou-se transparente e sem precipitados. Utilizou-se a potência alta por cerca de 5 minutos. Com a agarose completamente dissolvida e ainda quente, a solução (cerca de 50 mL) foi derramada sobre um suporte de poliestireno (Filme Gelbond®, GE Healthcare), o qual era apoiado sobre uma placa de vidro devidamente nivelada, garantindo um espalhamento uniforme da agarose. Após ~~o endurecimento~~ a solidificação natural da agarose a temperatura ambiente, o gel foi estocado em ~~câ~~ amara úmida (~~escura~~ escura) a 4°C no prazo máximo de 24 horas. No momento do uso, a umidade dos géis ~~era~~ foi absorvida utilizando-se um papel de filtro que era posicionado e levemente pressionado contra o gel.

Para aplicação das amostras a serem testadas, ~~foi~~ colocados colocada sobre o gel uma fita plástica contendo 24 retângulos vazados e equidistantes que eram numeradas de 1 a 24 de acordo com a ordem das amostras aplicadas, as quais eram identificadas em formulário próprio. Inicialmente, aplicou-se cerca de 5ul da solução corante (Quadro 3) nas ranhuras das extremidades do gel, objetivando gerar um marcador, facilitar facilitando a visualização da corrida eletroforética. Uma vez absorvidos os corantes, prosseguia-se com a aplicação da amostras e das referências sobre o gel, inclusive nos quadrículos em que os mesmos foram aplicados.

As amostras eram retiradas do N₂ e mantidas em gelo. No momento do uso, eram homogeneizadas e quando necessário, acrescentava-se um pouco de tampão de lavagem. Empregando um pipetador automático, cerca de 10ul de cada amostra foi aplicado em cada um dos quadrículos da fita. Essas amostras eram absorvidas pelo gel e quando completamente secas a fita plástica era retirada. O gel então, foi transferido para uma cuba de eletroforese horizontal (Pharmacia Biotech LKB — modelo Multiphor II XXX) acoplada a um banho Maria com circulação constante de

água, que mantinha a refrigeração das cubas em torno de 4°C. O tampão (maleico ou fosfato, dependendo do sistema enzimático) foi colocado nas laterais da cuba previamente niveladas e foi ~~feito~~ feita uma ponte para condução de energia entre os eletrodos (polo positivo e pólo negativo) e o gel. Esse procedimento foi realizado por meio de esponjas, cuja uma das laterais foi mergulhada no tampão e a outra bem alinhada sobre as laterais do gel. Após, foi colocada a tampa da cuba e, aplicou-se uma corrente elétrica de 40 volts para as corridas realizadas em tampão fosfato e de 60 volts para as corridas em tampão maleico. O término da corrida foi determinado quando os corantes alcançavam a extremidade do gel com o primeiro ou segundo marcador dependendo do sistema enzimático a ser revelado. A revelação da atividade enzimática foi feita acondicionando os géis em recipientes plásticos e colocando-se diretamente sobre ele uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada sistema enzimático estudado, apresentados na Quadro 4. Visando facilitar a revelação, os géis foram colocados ~~em~~ no escuro em estufa a 37°C e assim que as bandas eram visualizadas no gel, a reação foi interrompida, colocando-se sobre o gel uma solução de ácido acético a 5%, sendo tal solução trocada quantas vezes fosse necessário até que o excesso de corante do sistema revelador fosse completamente eliminado do gel, deixando-os apenas com as bandas eletroforéticas marcadas. Após esse processo, os géis ~~são~~ foram deixados à temperatura ambiente até secarem completamente.

Quadro 3: Solução corante utilizada na corrida eletroforética de isoenzimas.

Corante	Quantidade	Modo de preparo
Azul de bromofenol	34 mg	Pesar as quantidades de cada corante e

Xilencianol	28 mg	dissolver em 10 mL de H ₂ O destilada. Estocar a 4°C
-------------	-------	--

Quadro 4: ~~Condições-Protocolos~~ utilizadas no processo de revelação das enzimas estudadas, indicando substratos, coenzimas, ativadores, enzimas de ligação específica para cada sistema enzimático e os métodos de visualização empregados.

<u>Enzima</u>	<u>Tampão TRIS HCl 0,05M</u>	<u>H₂O</u>	<u>Substrato 200mg/10mL</u>	<u>Coenzima 40mg/10mL</u>	<u>Ativadores 4g/20mL</u>	<u>Enzima de Ligação</u>	<u>Visualização</u>	<u>Agarose</u>
<u>GPI</u>	<u>4mL pH 8,0</u>	<u>1mL</u>	<u>1mL F-6-P</u>	<u>1mL NADP</u>	<u>200µL MgCl₂</u>	<u>2U G6PDH</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>G6PDH</u>	<u>4mL pH 7,4</u>	<u>-</u>	<u>1mL G-6-P</u>	<u>2mL NADP</u>	<u>300µL MgCl₂</u>	<u>-</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>IDH</u>	<u>4mL pH 8,0</u>	<u>-</u>	<u>2mL isocitrate</u>	<u>1mL NADP</u>	<u>200µL MgCl₂</u>	<u>-</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>MDH</u>	<u>4mL pH 8,0</u>	<u>-</u>	<u>1mL 1M Na Malate 1,78g/10mL</u>	<u>2mL NAD</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>ME</u>	<u>4mL pH 7,4</u>	<u>1mL</u>	<u>1mL 1M Na Malate</u>	<u>1mL NADP</u>	<u>200µL MgCl₂</u>	<u>-</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>NH</u>	<u>4mL pH 7,4</u>	<u>3mL</u>	<u>30mg Inosine</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>2U xantine oxidase</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>PGM</u>	<u>4mL pH 7,4</u>	<u>-</u>	<u>2mL G-1-P</u>	<u>1mL NADP</u>	<u>200µL MgCl₂</u>	<u>2U G6PDH</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>
<u>6PGDH</u>	<u>4mL pH 8,0</u>	<u>-</u>	<u>2mL 6-P-G</u>	<u>1mL NADP</u>	<u>500µL MgCl₂</u>	<u>-</u>	<u>2mL MTT 1mL PMS</u>	<u>10mL</u>

Carlos, coloque aquela tabela, mas só com as enzimas que utilizamos

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide)
PMS (Phenazine Methosulfate)
MgCl₂ (Magnesium Chloride)
F-6-P (Fructose-6-Phosphate)
G-1-P (Glucose-1-Phosphate)
G-6-P (Glucose-6-Phosphate)

3.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os eletromorfos, que são as bandas visualizadas no gel, foram inicialmente comparadas com o padrão das amostras de referência utilizadas no estudo. As bandas foram numeradas de acordo com a sua motilidade eletroforética, utilizando

os protocolos descritos por Cupolillo et al. (1994), onde o mais próximo do catodo (ponto de aplicação das amostras) ~~foi~~ foi denominado eletromorfo 1, a banda imediatamente superior, como eletromorfo 2 e assim por diante. Após tal análise, foi construída uma tabela indicando os eletromorfos observados em cada uma das amostras e os respectivos sistemas enzimáticos.

A partir dos valores obtidos foi construída uma matriz indicando ausência e presença de cada eletromorfo que foram analisadas com auxílio de programas de computador (NTSYS-pc software" Versão 1.70, Exeter Software) e utilizando o Coeficiente de Jaccard (Sj) e foi estabelecida uma matriz de similaridade entre os isolados e transformada em um dendrograma (fenograma) pelo método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA), comparando as amostras obtidas de cães dos municípios do Rio de Janeiro, Belo Horizonte e com as amostras de referência utilizadas.

4. RESULTADOS

4.1. CRESCIMENTO IN VITRO DAS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O ESTUDO

Avaliaram-se amostras isoladas de cães oriundos dos municípios do Rio de Janeiro e Belo Horizonte. Todos os animais eram sororeatores e foram eutanasiados por suspeita de leishmaniose visceral. Das 200 amostras inicialmente selecionadas para o estudo, não foi possível a recuperação do N₂ de 28 amostras obtidas de animais do Rio de Janeiro, mesmo depois de repetido o processo de descongelamento de outras ampolas estocadas no N₂ (Tabela 2). As demais amostras mostraram-se capazes de crescer nos meio empregados, sendo preparadas massas parasitárias para as análises sem dificuldades.

Tabela 2: Relação das 28 amostras, isoladas de animais do Rio de Janeiro, selecionadas para o estudo, nas quais não foi possível a recuperação após a criopreservação

Código da amostra	Data de isolamento	Sítio de isolamento	Código da amostra	Data de isolamento	Sítio de isolamento
44	01/09/04	PI	613	12/09/00	PI
85	25/11/04	Escápula	660	03/05/99	PI
352	11/04/06	Orelha	662	10/07/00	PI
375	12/05/06	Orelha	665	03/05/99	PI
428	21/09/06	Orelha	668	11/05/99	PI
430	13/03/07	Escápula	781	02/12/02	Orelha
432	21/09/06	Escápula	802	14/02/03	Orelha
433	21/09/06	Orelha	840	14/07//03	Escápula
434	21/09/06	Orelha	850	20/07/03	Escápula
449	23/10/06	Orelha	864	15/08/03	Escápula
450	23/10/06	Escápula	866	15/08/03	PI
451	20/10/06	Orelha	904	02/09/03	Escápula
585	10/07/00	PI	935	24/10/03	Escápula
602	19/09/01	PI	962	17/11/03	Escápula

PI = pele íntegra sem identificação do local

4.2. RELAÇÃO DAS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA O ESTUDO COM A CONDIÇÃO CLÍNICA DO ANIMAL

Visando obter dados relacionados à condição clínica dos animais, dos quais as amostras foram selecionadas para o estudo, as fichas preenchidas no momento da eutanásia dos animais de ambas as regiões foram consultadas. Os animais eram de várias raças e idades e encontravam-se em diferentes condições clínicas. Das amostras obtidas de cães do Rio de Janeiro e de Belo Horizonte, 30 e 80 amostras foram obtidas de cães assintomáticos, 30 e 06 de sintomáticos e 08 e 14 de oligossintomáticos, respectivamente. Abaixo, apresentamos a Tabela 3 onde estão identificadas tais informações.

Tabela 3. Número de amostras analisadas pela eletroforese de isoenzimas de acordo com a condição clínica do animal e origem geográfica

Região	Animais assintomáticos	Animais sintomáticos	Animais oligossintomáticos
Rio de Janeiro	30	30	08
Belo Horizonte	80	06	14
Total	110	36	22

Obs: em 32 animais do Rio de Janeiro não foi possível a recuperação das informações relativas à condição clínica.

4.3. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

Das 200 amostras selecionadas para o estudo, 96 obtidas de cães de Belo Horizonte e 57 de cães do Rio de Janeiro foram analisadas na totalidade pelos nove sistemas enzimáticos propostos, todas demonstrando padrão eletroforético idêntico entre si e ao observado na cepa de *L. (L.) chagasi* utilizada como referência, cuja posição dos eletromorfos são apresentados na Tabela 4.

Para cada um dos sistemas enzimáticos estudado, as bandas que apresentaram posição idêntica no gel foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. O padrão revelado para cada sistema enzimático se mostrou semelhante entre as amostras das duas regiões quando comparadas entre si e com a amostra de referência de *L. (L.) chagasi* utilizada nos ensaios. Também não foi observada variação quanto ao sítio de isolamento (pele da orelha, pela da região da escápula ou outro local de pele) e ao status clínico do animal.

Quatro amostras da região de Belo Horizonte (BH) e 15 do Rio de Janeiro (RJ), embora tenham sido recuperadas do nitrogênio líquido e preparadas massas parasitárias, não puderam ser analisadas na totalidade com os nove sistemas enzimáticos. As quatro amostras de BH não apresentaram revelação de eletromorfos na enzima PGM, no entanto, nos demais sistemas não foi observado qualquer variação, apresentando padrão idêntico a cepa de referência de *L. (L.) chagasi* em oito dos nove sistemas analisados, já nas 15 amostras deste grupo, obtidas do RJ, não foi possível análise por todos os sistemas propostos, sendo todas retiradas do estudo.

Tabela 4: Posição dos eletromorfos das 153 amostras estudadas e das amostras de referência empregadas no estudo em nove sistemas enzimáticos.

Sistemas enzimáticos	Eletromorfos			
	Amostras (BH e RJ)	<i>L.(L.) chagasi</i> *	<i>L. (L.)amazonensis</i> *	<i>L. (V.)braziliensis</i> *
G6PDH	6,4	6,4	2,5	7
PGM	3	3	3	4
NH ₁ e NH ₂	2,1	2,1	1,0	4,3
6PGDH	8	8	9	4
MDH	3,4	3,4	5	1
IDHNADP	4	4	6	5
GPI	9	9	4	6
ME	5	5	5	4

- amostras de referência

Devido a uniformidade dos resultados obtidos entre as 153 amostras estudadas, foram selecionadas 10 amostras obtidas de cães do Rio de Janeiro e 10 de cães de Belo Horizonte para representar os sistemas enzimáticos estudados que estão apresentados nas Figuras 3,4 e 5.

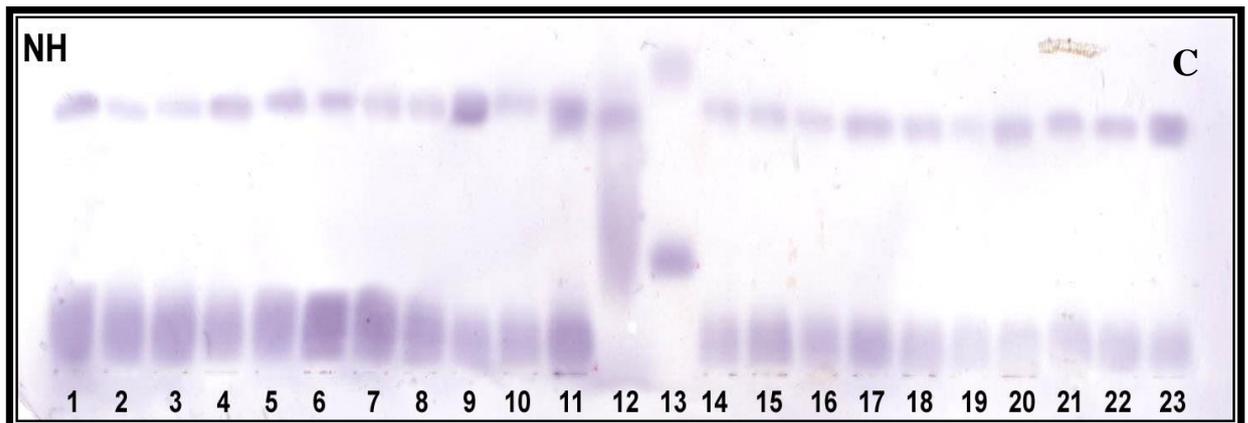
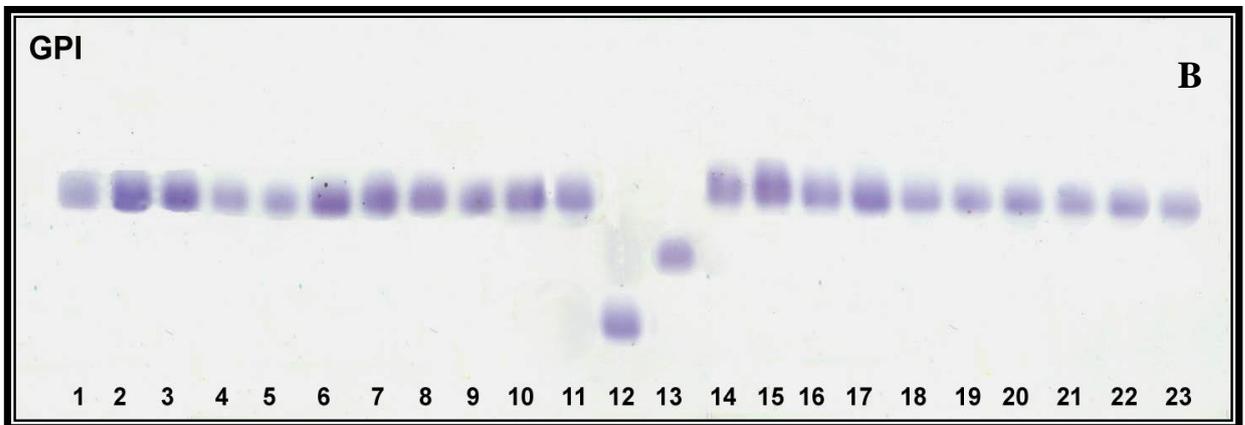
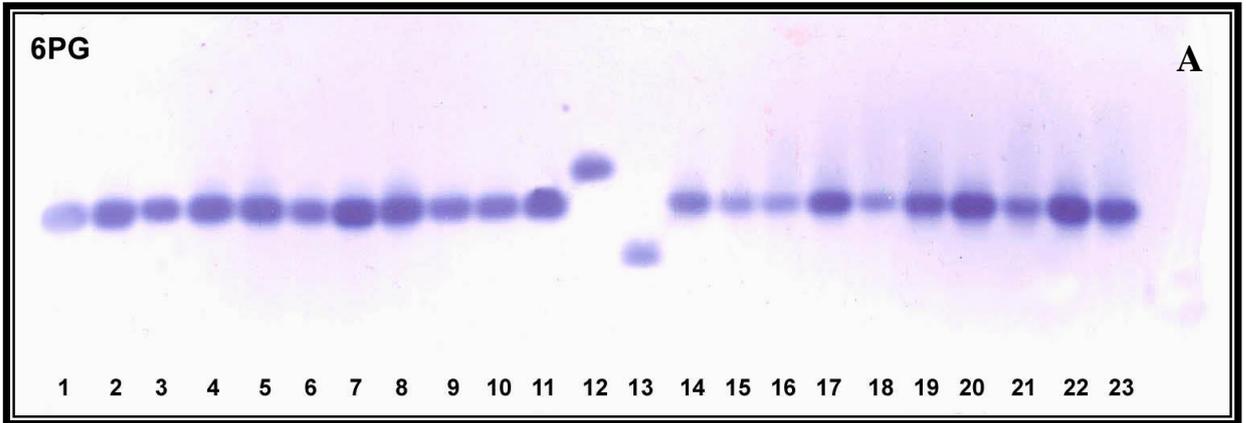
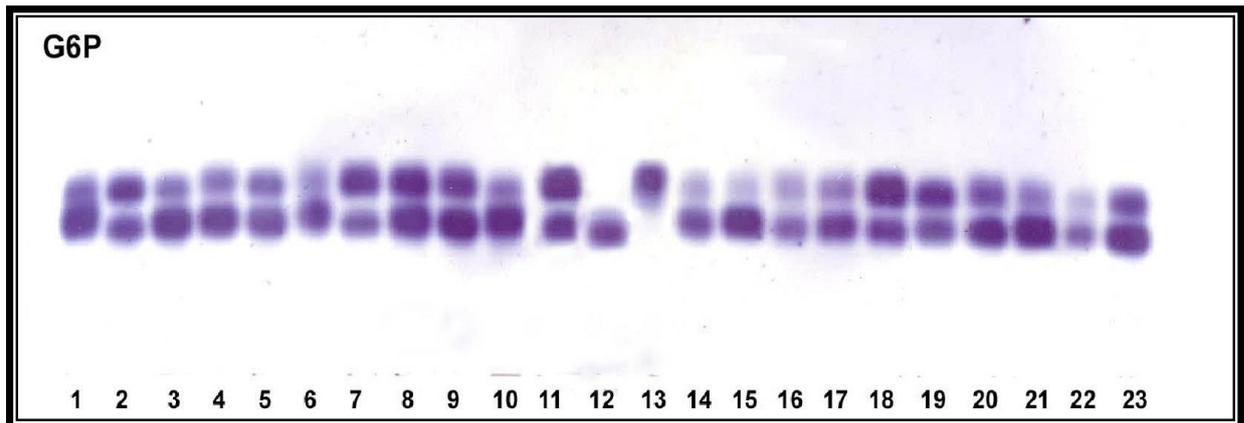
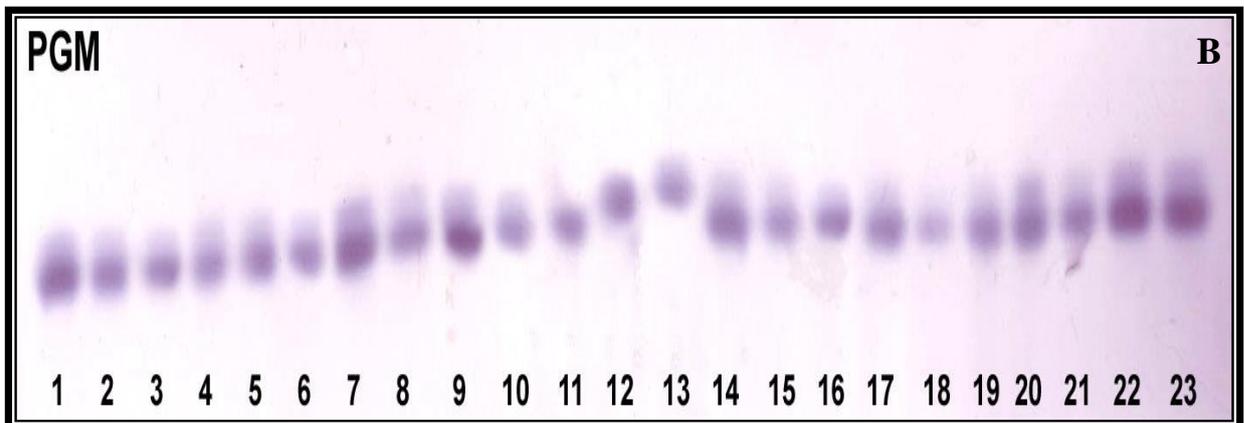


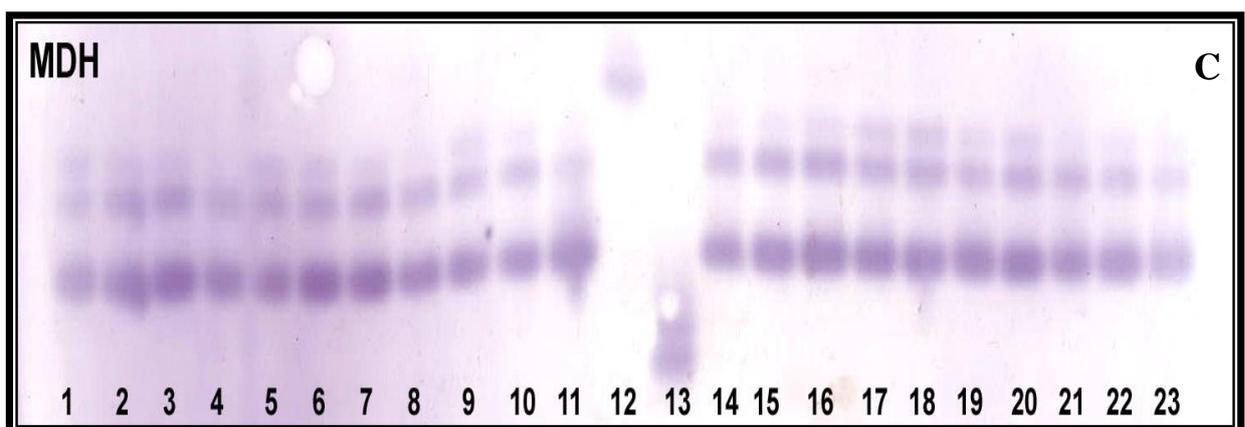
Figura 3. Perfil enzimático do sistema 6-fosfogluconato desidrogenase - 6PGDH (A); Perfil enzimático do sistema fosfoglucose isomerase – GPI (B); Perfil enzimático do sistema nucleotidase – NH1 e NH2 (C). Números de 1 a 10 amostras provenientes do Rio de Janeiro (1-1084; 2-70; 3-343; 4-392; 5-42; 6-880; 7-702; 8-618; 9-1136 e 10-1160), números de 11 a 13 amostras de referência (11-*Leishmania (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75; 12-*Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8; 13-*Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903), Números de 14 a 23 Amostras provenientes de Belo Horizonte (14-710BH; 15-745BH; 16-763BH; 17-651BH; 18-622BH; 19-623BH; 20-448BH; 21-533BH; 22-592BH; 23-599BH)



A



B



C

Figura 4. Perfil enzimático do sistema Glucose-6 Fosfato desidrogenase - G6PDH (A); Perfil enzimático do sistema fosfoglucomutase - PGM (B); Perfil enzimático do sistema Malato Desidrogenase - MDH (C). Números de 1 a 10 amostras provenientes do Rio de Janeiro (1-264; 2-350; 3-412; 4-366; 5-1197; 6-919; 7-1068; 8-1079; 9-1195 e 10-1349), números de 11 a 13 amostras de referência (11- *Leishmania (L.) chagasi* - (A) MHOM/BR/74/PP75; 12-*Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8; 13-*Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903), Números de 14 a 23 amostras Provenientes de Belo Horizonte (14-788BH; 15-786BH; 16-782BH; 17-792BH; 18-779BH; 19-699BH; 20-700BH; 21-701BH; 22-724BH; 23-726BH)

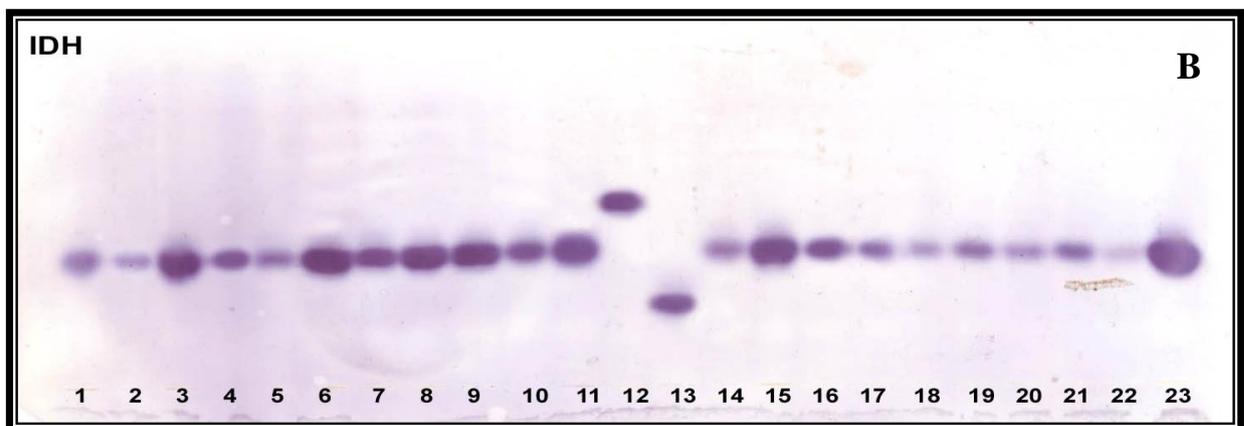
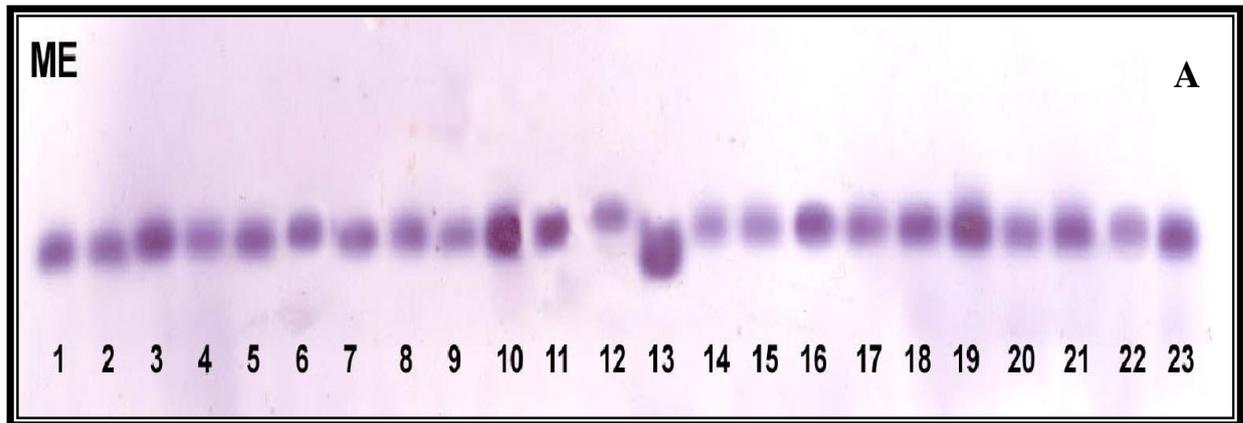


Figura 5. Perfil enzimático do sistema Enzima Málica ME (A); Perfil enzimático do sistema Isocitrato Desidrogenase - IDHNADP (B). Números de 1 a 10 amostras provenientes do Rio de Janeiro (1-342; 2-266; 3-421; 4-362; 5-1149; 6-898; 7-1111; 8-1072; 9-1343 e 10-807), números de 11 a 13 amostras de referência (11-*Leishmania (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75; 12-*Leishmania (L.) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8; 13-*Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903), Números de 14 a 23 amostras Provenientes de Belo Horizonte (14-611BH; 15-609BH; 16-612BH; 17-631BH; 18-639BH; 19-607BH; 20-580BH; 21-581BH; 22-595BH; 23-579BH)

A partir da construção de uma matriz relacionada com a presença ou ausência de bandas obtidas nos diferentes sistemas enzimáticos, os resultados foram analisados no programa NTSYS, a partir do qual foi possível a construção de um dendrograma, agrupando as amostras de *Leishmania (L.) chagasi* isoladas de casos caninos nos municípios do Rio de Janeiro e Belo Horizonte em um único perfil

enzimático. A partir desta análise, observamos que as amostras do RJ e BH compõem um grupo bem homogêneo, com índice de similaridade igual a um, ou seja, todas as amostras compartilham de características idênticas em seu fenótipo (Figura 6).

:

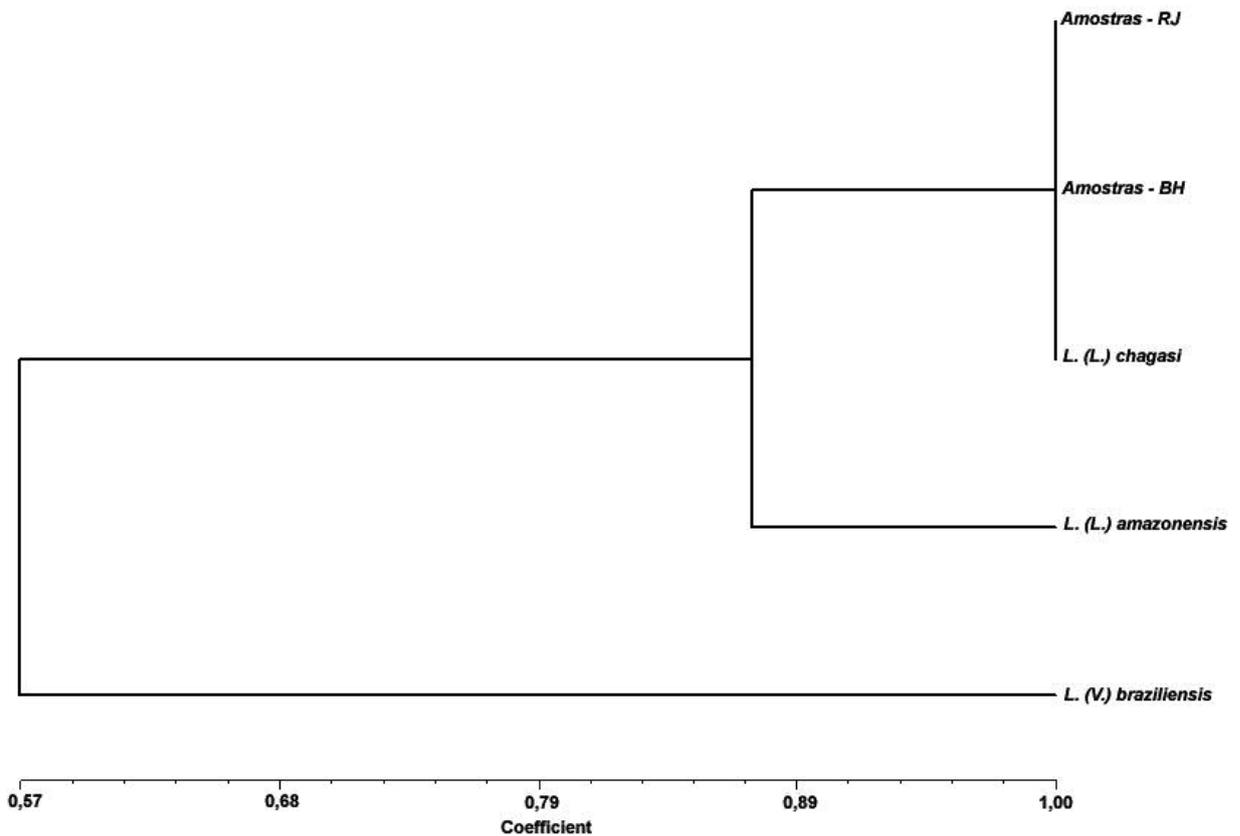


Figura 6: Dendrograma utilizando o Coeficiente de Jaccard, baseado no perfil fenético obtido por eletroforese de isoenzimas com 96 amostras isoladas de cães oriundos de Belo Horizonte e 57 amostras obtidas de cães do Rio de Janeiro. Os dados das amostras, assim como das cepas de referência estudadas podem ser obtidas na tabela 1 e quadro 1.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, as leishmanioses constituem um sério problema de saúde pública, sobretudo a forma visceral da doença, que se encontra amplamente distribuída no país. A ocorrência de surtos em áreas urbanas é um fato conhecido, indicando a mudança do perfil epidemiológico da leishmaniose visceral (LV), cujo ciclo é mantido por cães domésticos (Marzochi et al. 1985b; Ministério da Saúde, 2006; Dantas-torres, 2009; Marzochi et al. 2009).

Considerando a importância da LV em saúde pública e o papel do cão doméstico nesse contexto, estudos envolvendo a variabilidade genética de isolados desse hospedeiro são extremamente importantes, entretanto, são escassos na literatura, sendo a proposta deste estudo, avaliar e comparar características fenotípicas de amostras de *Leishmania* isoladas de cães oriundos de duas áreas endêmicas do Brasil.

No município do Rio de Janeiro embora não sejam ultimamente descritos casos humanos de LV, casos caninos são frequentemente notificados (Marzochi et al. 1985b; Cabrera et al. 2003; Madeira et al. 2009). Atualmente são relatados índices de soroprevalência canina de 0,4% (Marzochi et al. 2009) com casos autóctones descritos em diferentes municípios do estado (Madeira et al. 2006b; De Paula et al. 2009). Já na região de Belo Horizonte, a partir do primeiro caso humano descrito no ano de 1959 (Rezende; Bastos, 1959) o número de casos humanos e caninos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, inclusive com

relatos de óbitos. Índices de soroprevalência canina, em Belo Horizonte, variam de 5 a 64% dependendo da região estudada (Silva et al; 2001; França-Silva et al. 2003; Michalsky et al. 2007). A variação destes valores, para mais ou para menos, pode estar relacionada aos métodos utilizados para o diagnóstico, fatores ecológicos, sociais ou até mesmo pela possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com outros parasitas, gerando alguns erros no diagnóstico (Dantas-Torres, 2009; Marzochi et al, 2009; Queiroz et al. 2009).

Inquéritos caninos são aplicados em ambas as regiões visando identificar os animais positivos e interromper o ciclo de transmissão, através do recolhimento e eutanásia desses animais. Todas as amostras analisadas neste estudo foram obtidas de cães sororeatores, de ambas as áreas, identificados nos inquéritos no momento da eutanásia.

O aspecto clínico da leishmaniose visceral canina (LVC) observado nos animais provenientes das duas regiões (BH e RJ) foi similar aos citados na literatura, onde animais seguramente infectados (com isolamento parasitário) exibiram diferentes condições clínicas (França-Silva et al. 2003). Segundo alguns autores, de um modo geral, a forma assintomática da LVC é predominante (Dantas-Torres, 2009; Queiroz et al. 2009), semelhante ao que ocorre na LV humana (Crescente et al. 2009, Silveira et al. 2009) e esta pode estar relacionada a uma resposta celular por parte do sistema imunológico dos hospedeiro, que de certa forma controla o aparecimento dos sintomas (Almeida et al. 2005), à virulência do agente ou a fatores genéticos do hospedeiro (Peacock et al, 2001; Baptista-Fernandes et al, 2007; Ettinger et al. 2009). Neste estudo, o percentual de amostras obtidas de cães assintomáticos foi maior do que em animais sintomáticos ou oligossintomáticos, em

ambas as regiões, demonstrando importância desses animais no ciclo epidemiológico.

A presença do parasita nos mais diferentes tecidos e órgãos provocam reações características da LVC, entre as quais a ativação policlonal de células B, produzindo elevados níveis séricos de imunoglobulinas, que, se por um lado não possui significado de proteção, por outro, facilita o diagnóstico laboratorial através de testes sorológicos.

Embora a cultura seja considerada padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses, a tentativa de isolamento parasitário em cães sororeatores não é feita na rotina investigatória dos casos de LVC, devido ao grande volume de trabalho que é gerado com esta atividade, no entanto, o isolamento e identificação etiológica é extremamente importante para a comprovação da circulação da *L. (L.) chagasi*, para que ações específicas no controle sejam desencadeadas. Recentemente, no estado do Rio Grande do Sul, região considerada até então indene para LV, foi comprovada a presença de *L. (L.) chagasi* em cães sororeatores no município de São Borja (Souza et al. 2009).

O parasitismo de pele íntegra, descrito de forma pioneira na década de 50 (Deane; Deane, 1955), é uma das características que fazem do cão um elemento de importância no ciclo de transmissão e um aspecto interessante que devemos ressaltar foi o isolamento parasitário desse sítio em todos os animais avaliados neste estudo. A disseminação de *L. (L.) chagasi* para os diferentes sítios do hospedeiro pode estar associado a inúmeros fatores (Colmenares et al. 2002), entretanto, o parasitismo de pele tem sido apontado como um evento tardio no curso da infecção canina (Tafari et al. 2001; Travi et al. 2001) estando fortemente

associado às manifestações clínicas comuns da LVC (Solano-Gallego et al. 2004; Giunchetti et al. 2006; Reis et al. 2006).

A biopsia de pele íntegra de cães suspeitos de LVC, como ferramenta na confirmação diagnóstica de cães sororretores, tem sido utilizada pelo grupo de pesquisadores do IPEC com grande sucesso (De Paula et al. 2009; Madeira et al. 2009). A partir dessa atividade, constituiu-se um banco de amostras isoladas de diferentes áreas geográficas do Brasil, que estão depositadas no VigiLeish/IPEC/Fiocruz, dentre as quais, amostras obtidas das áreas do Rio de Janeiro e Belo Horizonte foram selecionadas para compor este estudo.

Apesar da sorologia seja determinante nos casos de LVC, estudos também têm demonstrado o isolamento parasitário em pele íntegra de animais soronegativos (Barrouin-Mello et al. 2006; dos-Santos et al. 2008, Figueiredo et al. 2010), indicando que diferentes parâmetros devem ser avaliados no momento do diagnóstico desses animais. Embora a pele constitua um sítio de investigação parasitológica, não se conhece a distribuição da *L. (L.) chagasi* neste órgão nos cães afetados. O encontro do parasita poderia estar relacionado às áreas de maior irrigação sanguínea como observado por Travi et al. (2001) que destacou o maior potencial infectivo da pele da orelha para flebótomos comparada à pele do abdômen. Outros autores investigando diferentes locais de pele de cães infectados não conseguiram demonstrar diferenças com relação à densidade parasitária desse órgão (Saridomechelakis et al. 2007). No estudo realizado por Madeira et al. (2009) que investigaram simultaneamente a pele da orelha e da região escapular em um grupo de 247 cães, não foram observadas diferenças estatísticas para o isolamento de *L. (L.) chagasi*. No presente estudo, das 153 amostras estudadas na totalidade, 95 foram obtidas da pele da orelha, 35 da escápula e 23 de outros sítios de pele, apontando este sítio como um excelente alvo

na confirmação parasitológica da LVC, corroborando os estudos acima mencionados.

A distribuição geográfica da LV no município do Rio de Janeiro se sobrepõe em diversas áreas de ocorrência da LT, principalmente nos bairros de Jacarepaguá, Campo Grande, Barra de Guaratiba, Realengo, Bangu e Barra da Tijuca. Este fato por si só já representa um fator complicador para o diagnóstico dos cães, uma vez que a sorologia não tem poder discriminatório entre ambas as doenças. Em recente estudo, realizado com 66 cães, em diferentes condições clínicas e sorológicas, observou-se, após a eutanásia e exame parasitológico pela cultura de diferentes sítios anatômicos, que 59% estavam parasitados por *L. (L.) chagasi*, todos com título a partir de 1:80; 18% por *L. (V.) braziliensis* e 3% estavam co-infectados por ambos agentes. Desse total, apenas seis cães possuíam título de 1:40, sendo isolado *L. (V.) braziliensis* em dois animais, sendo os demais negativos (Madeira et al. 2006b). Embora a retirada e eliminação de cães sororretores das áreas endêmicas, seja uma recomendação do Ministério da Saúde, ainda é um assunto polêmico. Os resultados, acima mencionados, demonstram a importância da identificação etiológica em animais suspeitos de LVC, principalmente em áreas de sobreposição.

Os meios de cultura foram desenvolvidos baseados principalmente em dois propósitos básicos: necessidade da confirmação definitiva do diagnóstico clínico através do isolamento do agente etiológico e preservação contínua da espécie isolada para utilização em outros estudos (Taylor; Baker, 1968). O meio de cultura empregado neste estudo (NNN acrescido de meio Schneider suplementado com 10% de SFB) para o isolamento parasitário e expansão das amostras foi considerado eficiente. Inicialmente tentamos a expansão em meio BHI (Brain Heart Infusion) por representar menor custo ao estudo, devido ao volume de culturas

trabalhadas (200 amostras), entretanto, algumas amostras retiradas do N₂ não evoluíram nessa condição, explicando talvez a perda de 25 amostras selecionadas para o estudo. A contaminação ocasional, fato que ocorreu em duas das amostras estudadas, também foi um fator que contribuiu. Em outros casos, alguns isolados apresentaram um bom crescimento inicial e em repiques subseqüentes entraram em queda, havendo mortalidade dos parasitos com perda da amostra sem uma causa específica, como foi visto por Zerpa et al. (2001) em seus estudos, demonstrando que a composição do meio e determinados componentes incorporados ao mesmo (aminoácidos, vitaminas, carboidratos, sangue ou derivados) são elementos essenciais na manutenção e crescimento de protozoários tripanosomatídeos. Por outro lado, amostras criopreservadas devem ser periodicamente avaliadas. A criopreservação é um método de congelamento a baixas temperaturas (-196°C) utilizando nitrogênio líquido (N₂) visando manter parasitos congelados e viáveis (vivos) por longos períodos. Tal método foi aprimorado, principalmente com o propósito de diminuir a rotina de repiques, bem como preservar a infectividade das amostras isoladas. Das 28 amostras não recuperadas, 18 estavam estocadas no N₂ por período maior que 5 anos sem qualquer avaliação, o que também pode ter sido um fator que contribuiu para a perda.

Devido ao tempo reduzido para a realização dos experimentos, não foi possível a retirada de novas ampolas do N₂ para uma terceira tentativa de crescimento além da que foi realizada. Mesmo apresentando algumas dificuldades de recuperação de cultivos, a armazenagem em N₂ é a técnica mais adequada para estoque de amostras de *Leishmania* e é utilizada na maioria das instituições que trabalham com este parasito.

A identidade do agente etiológico da LV nas Américas tem sido causa de inúmeras discussões (Lainson et al, 1983; Momem et al, 1993; Shaw, 2002). Por muito tempo considerou-se como agente autóctone no Novo Mundo, entretanto atualmente, admite-se-se que *L. (L.) chagasi* tenha sido introduzida neste continente durante a colonização europeia, através de cães infectados por *L. (L.) infantum*, espécie predominante em países do Mediterrâneo, e aqui tenha se adaptado a novos vetores e hospedeiros (Shaw, 2002).

Tal hipótese direcionou estudos na comparação genética de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* envolvendo isolados obtidos de diferentes hospedeiros com diferentes abordagens metodológicas. Beverley et al. (1987) utilizaram análises dos perfis de restrição do DNA nuclear; Grimaldi et al (1991) empregaram análises por anticorpos monoclonais e eletroforese de isoenzimas. Momem et al (1993) e Momem e Grimaldi (1989) utilizaram análises por diferentes loci enzimáticos. Em todos os estudos citados, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* apresentaram perfis genéticos semelhantes, sendo considerada a mesma espécie (Momen et al. 1993; Mauricio et al, 1999; Shaw, 2002; Lukes et al. 2007).

As amostras isoladas, a partir do diagnóstico parasitológico indireto são de grande importância para diversos estudos, principalmente àqueles que envolvem a vigilância epidemiológica, possibilitando, através da caracterização dos parasitas isolados, o mapeamento das espécies e/ou variantes de *Leishmania* que circulam entre os hospedeiros humanos, vetores e animais envolvidos no ciclo de transmissão natural.

Com o avanço da biologia molecular, uma variedade de métodos tem sido empregados na busca de marcadores taxonômicos analisando características genéticas, imunológicas e bioquímicas/moleculares, podendo-se destacar nesse

contexto a eletroforese de isoenzimas (Rioux et al. 1990; Thomaz-Soccol et al. 1993).

A eletroforese de isoenzimas (MLEE) além de constituir um método muito eficaz na identificação de amostras de *Leishmania* permite aplicações com diferentes abordagens (Rioux, 1990). Um dos inconvenientes desta técnica é a necessidade do isolamento prévio do parasita, para obtenção posterior de um grande volume de cultura, o que tem contribuído para incorporação de métodos baseados na PCR nestes estudos (Ikonomopoulos et al. 2003; Gonzalez et al. 2007 Baptista et al. 2009; Lima Junior et al. 2009; Oliveira et al. 2009), entretanto, a variabilidade de parasitas do gênero *Leishmania* tem sido amplamente estudada por MLEE (Momem et al. 1993; Pacheco et al. 1986).

Sabe-se que alguns sistemas enzimáticos são mais informativos que outros (Kreutzer et al, 1987), sendo a enzima nucleotidase (NH) excelente marcador na separação dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Por essa razão, todas as amostras selecionadas para o estudo foram previamente analisadas por esse sistema enzimático já que somente *L. (V.) braziliensis* (subgênero *Viannia*) e *L. (L.) chagasi* (subgênero *Leishmania*) tem sido descritas em cães domésticos nas regiões de BH e RJ. Por outro lado, empregamos somente amostras isoladas de pele íntegra, um sítio do qual *L. (L.) chagasi* tem sido isolada comumente (Madeira et al. 2006a; Madeira et al. 2009). *L. (V.) braziliensis* tem sido detectada principalmente a partir de lesões, embora haja relatos da detecção de DNA desta espécie em pele íntegra de cães naturalmente infectados (Oliveira et al. 2009). Esta espécie também já foi encontrada em associação com *L. (L.) chagasi*, o que reforça a necessidade de coleta de vários tipos de materiais para o diagnóstico. Em nosso estudo nenhuma

das amostras isoladas de pele íntegra foi identificada como *L. (V.) braziliensis*, concordando com os dados citados anteriormente.

Neste estudo analisamos por nove sistemas enzimáticos 153 amostras de *L. (L.) chagasi*, todas demonstrando padrões eletroforéticos idênticos entre as amostras estudadas das duas regiões e a amostra de *L. (L.) chagasi* utilizada como referência no estudo (MHOM/BR/74/PP75). Dezenove amostras foram retiradas desta análise por não termos completado os nove sistemas, embora, todas tenham apresentado resultados idênticos com as demais amostras. Os resultados apresentados aqui, revelam que as amostras originárias de duas regiões endêmicas não apresentaram qualquer diferença que possa estar relacionada à área geográfica ou ao status do hospedeiro, demonstrando total homogeneidade desta espécie, fato já mencionado por outros autores que revelaram ausência de polimorfismo enzimático em amostras de *L. (L.) chagasi* (Momem et al. 1993; Lopes et al. 1984; Pacheco et al. 1986; Kreutzer et al. 1987; Silva et al. 2001; Madeira et al. 2004).

Um fato interessante a ser lembrado é a grande heterogeneidade apresentada por *L. (L.) infantum*, com inúmeros zimodemas descritos que circulam naturalmente em diferentes regiões do Velho Mundo (Kuhls et al. 2008). O zimodema MON-1 é o mais prevalente e está associado tanto à forma cutânea como a visceral humana (Toledo et al. 2002; Campino et al. 2006, Kallel et al. 2008; Amro et al. 2009). Apesar de ocorrer normalmente no Mediterrâneo, este zimodema foi isolado de humanos e cães na Venezuela (Zerpa et al. 2001). MON-1 é o único zimodema descrito para *L. (L.) infantum* que mostra identidade com *L. (L.) chagasi* nas Américas. Este fato pode sugerir que a introdução dessa espécie no continente americano possa ter sido feita em um único momento, a partir deste zimodema ou, que apenas este zimodema possa ter encontrado condições de adaptação e

propagação, fato que poderia também, explicar a homogeneidade de *L. (L.) chagasi* encontrada em nosso continente. No entanto, MON-1 apresenta certo grau de variabilidade, observada com cepas consideradas virulentas (Baptista-Fernandes et al. 2007). Kulhs et al. (2008), empregando técnicas moleculares, evidenciaram três populações distintas dentro deste zimodema.

Embora a técnica de isoenzimas seja considerada uma ferramenta de pouca aplicabilidade nos estudos de polimorfismos genéticos de populações, estudos empregando tal metodologia com isolados de *L. (V.) braziliensis* demonstraram elevada variabilidade para esta espécie (Cupolillo et al 1997; Pacheco et al. 1999; Ishikawa et al. 2002), o que pode ser um reflexo da capacidade adaptativa desta espécie a novas situações ecológicas envolvendo diferentes vetores flebotomíneos e animais reservatórios. No entanto, com o uso de outras metodologias, tal heterogeneidade não foi relacionada a determinados padrões clínicos para seus hospedeiros (Baptista et al. 2009).

A homogeneidade observada para *L. (L.) chagasi* pode estar relacionada a pouca diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados nos ciclos de transmissão, fato contrário do que ocorre com *L. (V.) braziliensis*. No Brasil, *L. (L.) chagasi* é mantida principalmente por canídeos (silvestres e domésticos) e *Lutzomyia longipalpis* (Lainson; Rangel, 2005). Um fator que também pode ter contribuído para a homogeneidade observada entre os isolados estudados pode ser o fato de todas as amostras terem sido obtidas de um único sítio do animal (pele integra), uniformizando, de certa forma subpopulações que possam possuir tropismo por este sítio. Em estudos envolvendo a leishmaniose tegumentar canina, causada por *L. (V.) braziliensis*, tem-se demonstrado características de tropismo tissular por populações geneticamente distintas observadas e diferentes sítios desses animais

(Oliveira et al. 2009). Embora, nos trabalhos publicados por Momem e Grimaldi (1989) que analisaram isolados de *L. (L.) chagasi* de diferentes hospedeiros, também não foram encontradas diferenças populacionais por isoenzimas.

Alguns autores mencionam que se o número de sistemas enzimáticos utilizado em um dado estudo for ampliado, a chance de encontrar diferenças e/ou variabilidade entre os isolados aumenta também. Entretanto, no estudo de Cupolillo et al. (1993) foi observado que a capacidade discriminatória da eletroforese de isoenzimas não variou quando o set de enzimas foi ampliado de 11 para 18 sistemas. Esta observação reforça que determinados sistemas sejam mais informativos do que outros, e que a escolha desses sistemas, em dado estudo, devem considerar essa característica e objetivo do mesmo. Em nosso estudo, apesar de termos utilizado somente nove sistemas enzimáticos na análise de 153 amostras, empregamos sistemas, os quais já demonstraram potencial discriminativo entre diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* (Pacheco et al. 1999). É sabido que cepas mantidas *in vitro* por muitos anos podem sofrer seleção de clones adaptados às condições de cultivo a que são expostas e, que variações isoenzimáticas podem ser encontradas entre as diferentes formas evolutivas e fases de crescimento do parasita (Grimaldi et al. 1982).

Momem e Grimaldi (1989) estudaram mais de 100 amostras de *L. (L.) chagasi* isoladas de diferentes hospedeiros e demonstraram que esta espécie não apresenta polimorfismos enzimáticos e os dados deste estudo, corroboram tal informação. Todas as amostras estudadas apresentaram o mesmo perfil e não observamos agrupamento geográfico de subpopulações como foi sugerido por Cupolillo et al. (2003) com amostras de *L. (V.) braziliensis* obtidas de diferentes regiões.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leishmanioses são doenças negligenciadas mundialmente que afetam em sua grande maioria populações mais vulneráveis ou carentes. Isto vem a ser um reflexo de circunstâncias epidemiológicas, mas também do envolvimento de políticas de saúde no controle dessa endemia.

Os resultados obtidos nesta dissertação reforçam a baixa variabilidade de *Leishmania (L.) chagasi*, como já foi referenciado em outros estudos, no entanto, destacamos a importância da incorporação de amostras obtidas de outras regiões geográficas do Brasil, assim como de outros hospedeiros e reservatórios. Apesar da grande utilidade da eletroforese de isoenzimas para as conclusões obtidas neste estudo, a aplicação de ferramentas com maior potencial discriminatório na avaliação da variabilidade genética desses parasitas deve ser considerada. Nesse sentido, estamos selecionando isolados estocados em nosso banco de amostras, obtidos de diferentes cidades brasileiras (Baurú, Brasília, Fortaleza, Cuiabá, Belém e Porto Alegre) que serão futuramente avaliadas pela técnica de isoenzimas e por outras técnicas moleculares visando rastrear possíveis subpopulações de *L. (L.) chagasi* que possam estar circulando entre os cães domésticos e, contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia em diversas áreas endêmicas do Brasil.

7. CONCLUSÕES

- 1) A população de *Leishmania (L.) chagasi* que está circulando em cães do Rio de Janeiro e Belo Horizonte apresenta características fenotípicas iguais entre si.
- 2) Não foi possível correlacionar subpopulações com o agrupamento geográfico ou com o status clínico dos animais;
- 3) Todas as amostras apresentaram perfil eletroforético idêntico entre si e com a amostra de referência de *L. (L.) chagasi*, demonstrando pertencerem ao mesmo zimodema;
- 4) A análise fenética demonstra um índice de similaridade igual a um para todas as amostras estudadas, revelando que estas compartilham 100% de características em comum.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 2005; 127: 227-32.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(2): 334-59.

Alvar J, Cañavate C, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10: 289-319.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57: 1-88.

Amro A, Schonian G, Al-Sharabati MB, Azmi K, Nasereddin A, Abdeen Z, et al. Population genetics of *Leishmania infantum* in Israel and Palestinian Authority through microsatellite analysis. *Microbes Infect* 2009; 11: 484-92.

Aragão HB. Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos flebotomos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1927; 20: 129-30.

Baptista-Fernandes T, Marques C, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immun Microbiol Infec Dis* 2007; 30: 41-53.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009; 121(4): 317-22.

Barbosa-Santos EGO, Marzochi MCA, Urtado W, Queirós F, Chicarino J; Pacheco RS. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus*

cabalus) immunotherapy and chemotherapy assays. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(2): 217-20.

Barroiu-Melo SM, Larangeira DF, Andrade Filho FA, Trigo J, Julião FS, Franke CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. The Vet J 2006; 171: 331-9.

Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 102-9.

Berman J. Visceral leishmaniosis in the New World & Africa. Indian J Med Res 2006; 123: 289-94.

Beverley SM, Ismach RD, McMahon-Pratt D. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. Proc Natl Acad Sci 1987; 84: 484-88.

Botilde Y, Laurent T, Tiantaya WQ, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, et al. Comparison of molecular markers for satrain typing of *Leishmania infantum*. Infect Genet Evol 2006; 6: 440-6.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Ver Inst Med Trop S Paulo 2003; 45(2): 79-83.

Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. Trop Med Int Health 2006; 2(2): 1708-14.

Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RDC. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. Exp Parasitol 2005; 109: 209-19.

Chargui N, Amro A, Haouas N, Schonian G, Babba H, Schimidt S, et al. Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. Int J Parasitol 2009; 39(7): 801-11.

Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K., McMahon-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(1): S3-S7.

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(4): 415-9.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24(12): 2959-63.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128: 149-55.

Coutinho MTZ; Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol* 2007; 147: 320-5.

Crescente JAB, Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(12):1250-6.

Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*. *Hospital* 1937, Rio de Janeiro, 11(2): 148-52.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3126-32.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(3): 296-311.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. Discriminatory ability of typing systems in *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 116-7.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89(1): 17-23.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91(6): 617-26.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(5): 663-8.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South América. *Parasit Vectors* 2009; 2(sup1):1-8.

Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev Saúde Pública* 2006; 40(3): 537-41.

De Lima H, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Barrios MA, Sosa A, Agrela I, et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/Le. Infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 721-6.

De Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. *Ver Soc Bras Med Trop* 2009; 42(1): 77-8.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hosp* 1955; 47: 75-87.

Diniz SA, Silva FL, Neta AVC, Bueno R, Guerra RMSNC, Abreu-Silva A, et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries* 2008; 2(1): 24-33.

Dos-Santos WLC, Jesus EE, Paranhos-Silva M, Pereira AM, Santos JC, Baleeiro CO, ET AL. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vety Immun and Immunopathol* 2008; 123(3-4): 251-9.

Ettinger NA, Duggal P, Braz RFS, Nascimento ET, Beaty TH, Jeronimo SMB, et al. Genetic admixture in brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. *Ann Hum Genet* 2009; 73(Pt3): 304-13.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Souza AD, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Inf Dis* 1992; 166: 1124-32.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM, et al. 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):1003-10.

Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, Pires MQ, Furtado MC, et al. Efficacy of a indirect immunofluorescence test in the diagnostic of canine leishmaniasis. *Vet J* 2010 (in Press).

França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 111: 161-73.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Path* 2006; 135: 100-7.

Godfrey DC. The zymodemes of trypanosomes: problems in the identification of parasites and their vectors. *Symp Brit Soc Parasitol* 1979; 17: 31-53.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SDJ, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol* 1995; 80: 681-7.

González IR, Marín C, Longoni SS, Mateo H, Alunda JM, Manaya G, et al. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 267: 9-16.

Grimaldi G Jr, McMahon-Pratt D. Leishmaniasis and its etiological agents in the New World: a overview. In: Tsieh Sun (ed). *Progress in Clinical Parasitology*; 1991: 73-118.

Grimaldi G Jr, Momen H, Soares MJ, Moriearty PL.. Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania mexicana mexicana*. Int J Parasitol 1982; 12(2-3): 185-9.

Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. Am J Trop Med Hyg 1989; 88-400: 687-725.

Grimaldi Jr. G, Tesh RB. Leishmaniasis in the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 1993; 6(3):230-50.

Grögl M, Thomason T, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am J Trop Med Hyg 1992; 47: 117-26.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354(9185): 1191-9.

Hoare CA, Wallace PG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology 1966. Nature; 212: 1385-6.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet Parasitol 2003; 113: 99-113.

Ishikawa EAY, Silveira FT, Magalhães ALP, Guerra Jr RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(supl 1): 111-21.

Kallel K, Pratlong F, Haouas N, Kaouech E, Belhadj S, Anane S, et al. Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. Acta Tropica 2008; 106: 132-6.

Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, et al. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. Neg Trop Dis 2008; 2(7): 1-18.

Kreutzer DR, Souraty N, Semko ME. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. Am J Trop Med Hyg 1987; 36(1): 22-32.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(8): 811-27.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Petres W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in biology and medicine. Vol I. London: Academic Press Inc; 1987: 1-120.

Lainson R. The American Leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 569-596.

Lima Junior MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identificação das espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da Reação em cadeia da polimerase. Ver Soc Bras Med Trop 2009; 42(3): 303-8.

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

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex: a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(22): 9375-80.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? Res Vet Sci 2009; 87: 260-2.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006a; 100: 442-45.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Inf Dis 2004; 8(6): 440-4.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006b; 138(3-4): 366-70.

Marzochi MAC, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* 1994; 10: 359-375.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Souza PP, Toledo LM, et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pub* 1985a; 1: 442-6.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Toledo LM, Grimaldi G, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Int Oswaldo Cruz* 1985b; 80: 349-57.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Ver Soc Bras Med Trop* 2009; 42(5): 570-80.

Maurício IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 1999 set; 119(pt3): 237-46.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16: 188-9.

Maurício IL, Yeo M, Baghaci M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol* 2006; 36: 757-69.

Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 2007; 147: 67-76.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitol* 2009; 136: 1509-28.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF: 2006.

Momen H. 1984. Parasite characterization by zymodeme analysis. In: Genes and Antigens of Parasites. A laboratory Manual. Rio de Janeiro: Morel CM UNDP/World Bank/WHO-FINEP-CNPq-FIOCRUZ. p. 111-120.

Momen H, Grimaldi Jr G. Enzyme electrophoretic evidence for the importation of *L. infantum* into the New World. In: Leishmaniasis: Hart DT ed;1989. p. 911-6.

Momen H, Pacheco RS, Cupolillo E, Grimaldi Jr G. Molecular evidence for the importation of old world *Leishmania* into the Americas. Biol Research 1993; 26: 249-55.

Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. Exp Parasitol 1997; 85: 264-73.

Oliveira GM, Madeira MF, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco RS. Leishmaniose tegumentar canina: disseminação parasitária e tropismo tissular por populações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* geneticamente distintas. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42(1) 220.

Oliveira Neto MP, Grimaldi Jr G, Momen H, Pacheco RS, Marzochi MCA, Macmahon-Pratt D. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81(3): 303-9.

Organização Mundial da Saúde [homepage na internet]. Magnitude of the problem.[acesso em 16 jun 2008]. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html

Organização Mundial da Saúde. Control of leishmaniasis: report of a WHO expert committee. Geneva. World Health Organization; 1990.

Pacheco RS, Barbosa-Santos EGO, Brito CMM, Pires MQ, Marzochi MCA. Epidemiological and genotypical mapping of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraguay. J Protozool Res 1999; 9: 76-87

Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi G Jr, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania Taxonomy et Phylogenese. Applications Eco-epidemiologiques*. Montpellier: Rioux JA ed; 1986. p.57-65.

Pacheco RS, Momen H, Grimaldi Jr G, Lopes UG, Marzochi MCA, Morel C.. Biochemical characterization of the aetiological agent in two different foci of American cutaneous leishmaniasis. *Arq Biol Tecnol* 1984; 27(2): 101.

Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, Momen H.. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 69: 197-209.

Palatinik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatinik M, et al. Impacto f canine controle n the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 510-7.

Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol* 2009; 165: 327-31.

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MCBF, Oliveira GGS, Santos WLC, Pontes-de-Carvalho LC, et al. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop* 1998; 69: 75-89.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop* 1999; 72: 251-8.

Peacock CS, Collins A, Shaw MA, Silveira F, Costa J, Coste CH, et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Genet Epidemiol* 2001; 20: 383-96.

Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae:

Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in a endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Tropica* 2008; 107: 66-9.

Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Gambarelli FF, Dereure J, Lanotte G, et al. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 2004 set; 42(9): 4077-82.

Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Queiroz JW et al. Canine visceral leishmaniosis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 2009; 86: 267-73.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2006; 81(1): 68-75.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Med Hyg* 1999; 61: 530-41.

Rezende CL, Bastos O. Calazar infantil. Relato de um caso ocorrido em Belo Horizonte. *Jornal de Pediatria* 1959; 24(7): 323-31.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania* using isoenzymes suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65: 111-25.

Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosma cruzi*. Belo Horizonte. Tese [Doutorado]- UFMG/Instituto de Ciências Biológicas; 1982.

Rougeron V, Meeûs T, Hide M, Waleckx E, Bermudez H, Arevalo J, et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(25): 10224-9.

Sanchez JM, Gramiccia M, Di Muccio T, Ludovisi A, Marquez FM. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 228-32.

Santa-Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clinica Veterinária* 1997; 2: 24-8.

Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA, Goncalves A. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection? *Lancet*. 1990; 336(8712): 398-402.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Olivry T, Dunston SM, Farmaki R, Koutinas CK et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Vet Dermatol* 2007; 18(4): 227-33.

Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almeiroi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. In a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 160: 18-24.

Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* 2008; 24(3): 136-42.

Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In Farrel: *World Class Parasites: Leishmania*, 4 Kluwer Academic Publishe Boston; 2002. p. 11-31.

Shaw JJ. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 541-7.

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: 285-91.

Silveira FT, Lainson R, De Souza AAA, Campos MB, Carneiro LA, Lima LVR, et al. Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil. *Parasitol Res* 2009; 106: 377-86.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Path* 2004; 130(1): 7-12.

Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)

(Diptera:Psychodidae:Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(8): 1181-2.

Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet Parasitol 2001; 96(3): 203-12.

Taylor AER, Baker JR. The cultivation of parasites "*in vitro*". Oxford & Edinburgh: Blackwell Sc. Publ; 1968.

Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania. Ann Parasitol Hum Comp 1993; 68(2):104-6.

Tibayrenc M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. Parasitol Today 1998; 14: 323-8.

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol 2002; 18: 405-10.

Toledo A, Martín-Sánchez J, Pesson B, Sanchiz-Marin C, Morillas-Márquez F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. Mol Biochem Parasitol 2002; 119: 257-64.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osório Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia. Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 119-24.

Verçosa BLA, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SMMS, Carvalho SM, Goto H, et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitismo f symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. BMC Vet Res 2008; 4(45): 1-7.

Zerpa O, Pratlong F, Ulrich M, Convit J. Isolation of *Leishmania infantum*, zimodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 97(7): 901-2.