

LIGIA MARIA CANTARINO DA COSTA

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:
USO DE TÉCNICAS DA BIOLOGIA MOLECULAR
(PCR) NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO EM
ROEDORES DE COLEÇÃO DO
MUSEU NACIONAL - UFRJ

Rio de Janeiro / RJ
1998

LIGIA MARIA CANTARINO DA COSTA

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:
USO DE TÉCNICAS DA BIOLOGIA MOLECULAR (PCR) NO
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO EM ROEDORES DE
COLEÇÃO DO MUSEU NACIONAL - UFRJ

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências da Saúde Pública -
área de concentração em Ambiente, Saúde
e Sociedade - da Escola Nacional de Saúde
Pública, FIOCRUZ/RJ.

Orientadores:
ADAUTO JOSÉ GONÇALVES DE ARAÚJO
CLAUDE PIRMEZ

Co-Orientador:
PAULO CHAGASTELLES SABROZA

Rio de Janeiro / RJ
1998

CANTARINO, Ligia Maria

Leishmaniose Tegumentar Americana: Uso de Técnicas da Biologia Molecular (PCR) no Diagnóstico de Infecção em Roedores de Coleção do Museu Nacional – UFRJ.

Rio de Janeiro, ENSP-FIOCRUZ, 1998.

ix, f. 70

Tese: Mestrado em Ciências da Saúde Pública
(Saúde, Ambiente e Sociedade)

1. Leishmaniose tegumentar 2. Roedores 3. PCR 4.

Coleção de Museu

I. Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz

II. Título

à memória de minha mãe *Lygia*

AGRADECIMENTOS

Aos professores, orientadores e amigos Aduino José Gonçalves de Araújo e Paulo Chagastelles Sabroza, pelo incentivo constante desde o ingresso no Mestrado.

A Claude Pirmez, minha “pesquisadora-madrinha”, por ter comprado a idéia dessa pesquisa e ter me orientado com amizade e extrema paciência de ensinar.

A Octávio Fernandes, do Instituto de Medicina Tropical, por sua importante colaboração.

Ao Professor Luis Fernando Ferreira, pelo entusiasmo contagiante.

Ao Professor Celso Arcoverde de Freitas, pela inesquecível aula de Saúde Pública e de vivências de trabalho de campo de um sanitarista.

Aos Professores João A. de Oliveira e Luiz Flamarion B. de Oliveira e à Stella Franco, responsáveis pelo acervo de roedores do Setor de Mastozoologia do Museu Nacional da Quinta da Boa Vista, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela permissão, interesse e ajuda na pesquisa.

Aos irmãos Caetano, taxidermistas do Museu Nacional, pela presteza na ajuda com o modelo experimental.

Aos Professores Carlos Osanaí e Hélia Kawa, pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de turma do Mestrado, Márcia Guimarães, Kátia Affonso, Nádia Dupré, Rui Arantes e Maurício Leite, pela convivência e incentivo no primeiro ano do curso.

A Otílio Bastos, pelas referências bibliográficas gentilmente cedidas.

Ao pessoal do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/Fiocruz, Fátima Conceição-Silva, Glória Este, Antônio Silva-Gonçalves, Márcia Oliveira, Thereza Andrade, Carla Gouvêa, Rosimar Soares e, em especial, às minhas monitoras

permanentes, Valéria Trajano e Patrícia Câmera, que me “adotaram”, pela compreensão e estímulo no decorrer de todo o trabalho laboratorial.

Ao Marcos Paulo Catanho e Adeilton Brandão, do Laboratório de Biologia Molecular e Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/Fiocruz, pela colaboração técnica.

A Antônio Rodrigues da Costa, meu pai, por ter ensinado o caminho do estudo e trabalho.

Aos meus irmãos Noélia, José Geraldo e Maria Auxiliadora Cantarino da Costa, pelo apoio nas mais diferentes situações.

A José Renato Junqueira Borges, pelo seu grande companheirismo na vida.

A Laura Costa Borges, minha filha, por ter permitido dividir o seu tempo com o Mestrado e por querer sempre saber quanto tempo faltava para acabar a tese. Acabei! (Ou comecei?).

ABREVIATURAS

BLOTTO: bovine lactato technique optimizer

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: 2-desoxinucleosídeo-5-trifosfato (A, T, G e C)

EDTA: ácido etileno diaminotetracético

kDNA: DNA do cinetoplasto

LTA: leishmaniose tegumentar americana

NFM: non fat milk (leite desnatado)

pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction (reação da polimerase em cadeia)

SDS: sódio duodecilsulfato

SSC: citrato de sódio + cloreto de sódio

TBE: Tris-borato/EDTA

TE: Tris/EDTA 10:1

UV: ultravioleta

RESUMO

Durante os anos 50, houve uma epidemia de peste bubônica no Brasil. Em busca do reservatório, cerca de 60.000 roedores foram coletados, examinados e taxidermizados. Todos os animais foram arquivados no Museu Nacional do Rio de Janeiro. Como muitos roedores eram de áreas onde a leishmaniose e a peste eram concomitantes, decidimos investigar se esses animais poderiam ser reservatório de *Leishmania*. Examinamos um total de 20 animais de Baturité, Ceará, e 19 da Ilha Grande, Rio de Janeiro. Essas duas áreas foram escolhidas por terem história de leishmaniose epidemiologicamente bem estudada. Fragmentos de pele de 1mm³ foram coletados de orelha, cauda e pés de cada animal. Fragmentos de lesão cutânea, presente em três roedores, também foram coletados. O DNA genômico foi isolado, usando-se um kit para isolamento de DNA tecidual. Oligonucleotídeos que se associam à origem de replicação das duas fitas das moléculas de minicírculo foram usados em *hot start* PCR, amplificando a região conservada do minicírculo de kDNA. Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio e visualizados sob luz UV. Todos os produtos foram aplicados em membrana de nylon usando-se aparelho de *dot blot* e hibridizados com sonda de *L. braziliensis* M2903 e *L. amazonensis* L575. Pela PCR, *Leishmania amazonensis* foi encontrada na orelha de dois animais, um *Oryzomys subflavus* e um *Thrichomys apereoides*. A hibridação com sonda de *L. braziliensis* foi negativa em todos os casos. Ambos os roedores positivos eram de Baturité. A infecção por *L. amazonensis* é, primariamente, uma zoonose, e pode ser encontrada em grande variedade de hospedeiros entre animais silvestres, inclusive roedores, marsupiais e raposas. Este estudo indica a viabilidade de reconstruir a história das leishmanioses pela PCR, o que pode favorecer o entendimento dos eventos históricos que influenciaram a leishmaniose tegumentar americana no Brasil.

ABSTRACT

During the fifties there was an epidemics of plague in Brazil. Seeking for reservoirs, around 60000 rodents were collected, examined and taxidermized. All animals were stored in the archives of the Nacional Museum of Rio de Janeiro, Brazil. Since many of the rodents were from areas where leishmaniasis was concomitant, we decided to investigate if these animals would be a reservoir for *Leishmania*. We examined 20 animals from Baturité, Ceará, and 19 from Ilha Grande, Rio de Janeiro. These two areas were chosen because there had been a previous epidemiological study of leishmaniasis. Skin fragments of 1 mm³ from the ear, tail and foot from each animal were collected. In addition, a fragment from a cutaneous lesion, present in three of the animals, was also collected. Genomic DNA was isolated by using the QIAmp tissue kit. Oligonucleotides that anneal to the origin of replication of both strands of the minicircle molecules were used in a hot start PCR, amplifying the conserved region of the minicircle kDNA. The amplified products were analysed by agarose gel eletrophoresis, ethidium bromide staining, and were visualized under UV light. All products were applied to a nylon membrane using a dot-blot apparatus and hybridized with a preamplified product of *L. braziliensis* M2903 strain or *L. amazonensis* L575 as probe. *Leishmania amazonensis* was found by PCR in the ear of two animals, one *Oryzomys subflavus* and one *Thrichomys apereoides*. Hybridization with the *L. braziliensis* probe was negative in all cases. Both animals were from Baturité. *L. amazonensis* infection is primarily a zoonosis, found in a wide range of hosts among wild animals, including rodents, marsupials and foxes. The results of this study indicate that it is likely to reconstruct the history of leishmaniasis by PCR and that it might be possible to understand the historical events that have influenced American leishmaniasis in Brazil.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO _____	1
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	2
QUADRO 1. ESPÉCIES DE LEISHMANIA E RESPECTIVOS VETORES.	9
1.2. Agente Etiológico.....	10
QUADRO 2. SUBGÊNEROS E ESPÉCIES DE LEISHMANIA	12
1.3. Distribuição e Perfis de Transmissão.....	13
1.4. Reservatórios.....	17
1.5. Técnicas de Diagnóstico.....	19
1.6. Coleções de Museus e Estudo de ancient DNA.....	22
1.7. A Coleção de Roedores do Museu Nacional	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS _____	26
2.1 Modelo Experimental.....	26
2.2. Técnica de Taxidermia.....	27
2.3. Obtenção das Amostras dos Roedores do Museu Nacional.....	28
2.4. Seleção das Amostras	29
Quadro 3. RELAÇÃO DOS ROEDORES EXAMINADOS	31
2.5. Preparo das Amostras	32
2.6. Isolamento do DNA.....	33
2.7. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	34
Quadro 4. CICLOS TÉRMICOS DA PCR.....	35
Quadro 5. COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DO PCR.....	36
2.8. Eletroforese em Gel de Agarose.....	36
2.9. Transferência do DNA do Gel para Membrana de Nylon	38
2.10. Dot Blots	38
2.11 Hibridação do DNA das Membranas de Nylon	39
3. RESULTADOS _____	41
3.1. Modelo Experimental.....	41
QUADRO 6. MODELO EXPERIMENTAL.	41
Figura 1. HIBRIDAÇÃO COM SONDA DE <i>L.(L.) amazonensis</i>	42
3.2. Roedores do Museu Nacional	43
Figura 2. GEL DE AGAROSE DE AMOSTRAS DE ILHA GRANDE E BATURITÉ	44
Figura 3. FICHAS CATALOGRÁFICAS	45
Figura 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS LOCALIDADES ESTUDADAS.....	46
4. DISCUSSÃO _____	47
5. PERSPECTIVAS _____	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	57

1. INTRODUÇÃO

O passado, talvez tanto quanto o futuro, sempre desperta interesse e curiosidade no homem. Os estudos que se envolvem com o passado - os "paleoestudos" - como a Paleoparasitologia, Arqueologia, Paleontologia, Paleopatologia, Paleoecologia vêm se tornando, a cada ano, mais numerosos e os pesquisadores contam, a cada dia, com um maior poder de comunicação e investigação. O conhecimento das doenças em populações do passado propicia uma perspectiva histórica do desenvolvimento das atuais endemias, apontando novas orientações no estudo de suas dinâmicas, com reflexos, na estratégias de controle (FERREIRA *et al.*, 1988).

Como uma epidemiologia que se refere à ocorrência de doenças ou agravos à saúde em tempos remotos, a Paleoepidemiologia vem se delineando como ciência. Como em tantas outras áreas, a abordagem multidisciplinar se faz necessária para vencer as lacunas formadas no processo de produção do conhecimento.

Para o estudo das doenças de tempos antigos, duas linhas de pesquisas são observadas: uma, da adaptação de técnicas de diagnóstico com a utilização de procedimentos e recursos modernos para detectar doenças passadas - por exemplo, o emprego das técnicas bastante sensíveis da biologia molecular, como as sondas de DNA e RNA; e uma linha de estudo onde se buscam, em documentos, relatos e descrições que possam levar ao estabelecimento de padrões de comportamento de doenças em determinado tempo e lugar, conhecida como epidemiologia histórica.

Grmek (1995) discute o conceito de patocenose, segundo o qual o conjunto das enfermidades presentes de uma população num determinado tempo e lugar indica que a frequência de uma doença numa população em dado momento depende de diversos fatores

endógenos e ecológicos, bem como da frequência de todas as outras doenças presentes nesta mesma população.

Assim, de forma sistemática, a introdução e aceitação do conceito de ecossistema no estudo da adaptabilidade facilitaram a integração da abordagem social e biológica. Este conceito, formado a partir do estudo da ecologia biológica, considera todos os organismos partes de sistemas ecológicos e sujeitos às mesmas leis físicas (MORAN, 1994).

“Os variados estilos de vida e as mudanças ocorridas ao longo do tempo, quer nas populações humanas, quer nos patógenos, levam a mudanças significativas dos quadros patocenóticos por diferentes razões, entre as quais podem ser lembradas as transformações do ambiente, as novas exposições patogênicas, as modificações das condições de vida, as mudanças nas relações parasito-hospedeiro, ou no balanço dos sinergismos e antagonismos nas doenças de significado coletivo” (MENDONÇA DE SOUZA, 1996).

Deste modo, o estudo de parasitos em material arqueológico demonstra sua potencialidade de informações para a História da Medicina, a História e Pré-História, e para a Biologia Parasitária principalmente como ponte entre o conhecimento biológico e social (ARAÚJO & FERREIRA, 1992). Neste contexto, torna-se importante a integração da informação arqueológica na investigação de doenças como os variados aspectos que se estendem sobre discussões de evolução, ecologia humana e padrões de atividade (BUIKSTRA & COOK, 1992).

1.1. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose com distribuição mundial, que tem por agente etiológico um protozoário do gênero *Leishmania*. As manifestações patológicas diferem muito em sua gravidade e efeito sobre a saúde e seu controle é dificultado pela existência de vetores de várias espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, para as quais mais de cem espécies de animais podem atuar como reservatório (OMS, 1990).

A LTA está associada a diferentes e múltiplos agentes causais, sendo que *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* são as principais espécies que causam a doença no Brasil (LAINSON & SHAW, 1972; GRIMALDI & TESH, 1993).

Conhecida por diferentes denominações, pode ser designada como leishmaniose tegumentar, leishmaniose ulcerosa, leishmaniose americana. Pessoa e Barreto (1948) listam, ainda, uma série de nomes dados de acordo com suas formas clínicas: leishmaniose cancerosa, pé vegetante, verrucoso, papilomatoso ou musgoso, leishmaniose cavitária. Outros nomes regionais também podem ser encontrados para designar a doença, como úlcera ou botão de Baurú, botão do Oriente, ferida brava, nariz de tapir. Em outras línguas, como o espanhol, podemos achar as denominações de "uta", "espúndia", "úlceras de los chicleros". Em inglês, recebe o nome de "forest yaws", "mossy foot", "ear ulcer of chicleros". Em francês, "pian-bois". Em holandês "boshyaws" ou "boessie-yassi", e "buba" ou "buba brasileira" em italiano.

Na história das leishmanioses, a documentação possivelmente mais antiga remonta à época dos Incas, no Peru. Achados arqueológicos de cerâmica pré-colombiana - os huacos - mostram deformidades que se assemelham a lesões destrutivas de narinas e lábios. Estudados à luz dos conhecimentos atuais, sugerem fortemente natureza leishmaniótica (AZULAY, 1952). Assim, não ficam dúvidas de que a leishmaniose tegumentar é autóctone do continente americano (PESSOA & BARRETO, 1948 e AZULAY, 1952).

No Brasil, a primeira referência à leishmaniose tegumentar pode ser deduzida de um relato de viagem de Frei Don Hypolito Sanchez Rangel de Farias y Quiros, desde Tabatinga, no Amazonas, até o Pará, realizada antes de 1827, e está registrada no Pastoral Religioso Político Geográfico, citado no livro "Antigüedad de la syphillis en el Perú" (*apud*

RABELLO, 1925 e PESSOA & BARRETO, 1948). As palavras do Frei tornam clara a evidência da ocorrência de leishmaniose e sua associação aos vetores, pois:

“...de los mosquitos y otras muchas especies de moscardones y de sus picaduras o mordeduras de estos, salem las llagas asquerosas y muchas de una consecuencia fatal... es comum en todas estas tierras a la par de su fertilidad e humedades, la lepra e el quedar-se siu narices, sino se vive com precaución...; porque ... los mosquitos y demás insetos, son si no se tiene euydado, un poderoso fomento de las llagas profundas y fetidas en piernas y brazos, herdor de boca, galico...”.

Sobre o relato do Frei Hypolito, Azulay (1952) destaca o fato de, apesar de a doença ser ainda desconhecida, essa é a primeira vez que se faz referência quanto à transmissão da leishmaniose por picadas de “mosquitos” .

Existem duas correntes para explicar a existência da doença no Brasil. Uma segue pelo incremento de incursões em regiões de fronteiras norte e noroeste, confinantes do Perú e Bolívia - onde já existiria a doença desde a época pré-colombiana - com o aumento do trânsito de trabalhadores na região; e outra que sustenta a hipótese de importação da doença por intermédio de imigrantes de países do Oriente, principalmente pelos sírios. Azulay (1952) acredita nas duas hipóteses, concomitantemente.

Alguns trabalhos demonstram a possível presença da enfermidade no Brasil nos anos de 1882, 1884 e 1885: Rabello (1925), estudando modelos de cera do Museu da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro verificou que, desde 1882, já havia casos com invasão de mucosa, sendo o diagnóstico das peças, geralmente, o de “lupus vulgar”. Em 1895, Breda, de Pádua na Itália (*apud* AZULAY, 1952 e PESSOA & BARRETO, 1948), observou a doença em italianos que haviam regressado de São Paulo e, em um de seus doentes, a moléstia datava

de 1884. A ocorrência de leishmaniose em São Paulo, em 1885, refere-se a um caso descrito no "Atlas de Doenças Raras da Pele" que em 1912 teve seu diagnóstico confirmado por Lutz (1913).

Em 1903, na Índia, Leishman e Donovan descreveram um protozoário como causador do Kal-azar indiano e então, com a descoberta do agente etiológico, foram agrupadas muitas dermatoses que em geral tomavam nomes locais, das regiões endêmicas. Porém, só em 1909 é que Adolfo Lindenberg comunica ter achado parasito semelhante em úlcera de Baurú, fato confirmado por Carini e Paranhos. Assim, a descoberta do agente permitiu o estudo da presença e extensão da endemia em todo o território brasileiro.

Em 1911, Wenyon lançou a teoria da transmissão da doença por um mosquito - o *Phlebotomus* - a julgar pelo aparecimento de lesões em geral em áreas descobertas do corpo e pela variação sazonal. A importância dos flebotomos quando se comparava a distribuição de leishmaniose com a de diversos artrópodes foi comprovada experimentalmente por Sergent, Parrot, Donatier e Beguet em 1921 (AZULAY, 1952; SABROZA, 1981).

Gaspar Vianna, em 1911, caracteriza a *L. braziliensis* como agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana e, em 1912, introduz o uso do tártaro emético na terapêutica da LTA permanecendo os antimonialis como drogas de eleição para o tratamento das leishmanioses até os dias atuais.

Apesar de o homem ter sido considerado por muito tempo, a principal fonte de infecção da leishmaniose, a possibilidade da ocorrência da infecção em outros mamíferos havia sido levantada por Brumpt e Pedroso em 1913, "uma vez que o homem a contrai nas florestas, até então inabitadas, é de se supor que ela exista em determinadas partes dessa floresta, sob a forma endêmica, ou em

certos mamíferos selvagens ou no corpo de insetos sugadores, que a inoculam acidentalmente ao homem ou aos animais”.

Pavlovsky (1963), trabalhando na União Soviética e na Ásia Central em 1937/39, verificou a presença de *L. tropica* em 67% dos roedores estudados e provou que 38% dos flebótomos capturados nos esconderijos destes roedores apresentavam, em seu tubo digestivo, formas flageladas tipo leptomonas. Posteriormente, autores russos conseguiram reproduzir a doença no homem a partir de material desses roedores.

Com a descoberta de reservatórios animais de leishmaniose (GUIMARÃES *et al.*, 1968) evidencia-se sua característica zoonótica, desenvolve-se a hipótese de foco natural da doença e aumenta, então, a importância do estudo dos reservatórios silvestres da doença e do papel dos animais domésticos e peridomésticos na disseminação do parasito nas populações humanas.

O primeiro trabalho que evidenciou a importância dos roedores na epidemiologia da leishmaniose foi feito em 1957, por Hertige, no Panamá, onde se detectou *Leishmania braziliensis* a partir de hemocultura em 10% dos 110 exemplares de “ratos de espinho” (*Proechimys semispinosus* e *Hoplomys gymminurus*) sem nenhuma lesão aparente. Forattini *et al.* (1960, 1972, 1973) conseguiram demonstrar infecção de roedores por isolamento do parasito em cultura de sangue e pele. Forattini (1960) levanta a hipótese de que espécies de *Leishmania* em seu hábitat florestal primitivo teriam se adaptado ou estariam se adaptando a animais ali existentes, inclusive ao homem e animais domésticos, e que o tipo da lesão pode funcionar como índice desta adaptação do parasito ao hospedeiro, de modo que, quanto maior fosse a adaptação, menor a gravidade da lesão, podendo atingir um estado de equilíbrio em que estas não se manifestariam mais, de tal maneira que estes hospedeiros podem passar a desempenhar a função

de reservatório do parasita. Lainson e Shaw (1992) reforçam que, entre animais silvestres, a infecção tende a ser benigna e inaparente, sugestiva de uma relação equilibrada resultante de uma antiga associação entre hospedeiro - parasita.

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a maioria das zonas de endemia está intimamente relacionada a áreas florestais, via de regra de pouca densidade populacional, sugerindo que a moléstia não deva ser primariamente humana, mas, sim, de alguma ou algumas espécies de animais silvestres (FALQUETO, 1986). Nery Guimarães *et al* (1968) observam que:

“dizimada e afugentada a fauna de roedores silvestres com o desbravamento de zonas desérticas e com o povoamento, estabelecem-se focos leishmanióticos endêmicos rurais (e mais tarde suburbanos e até mesmo, excepcionalmente, urbanos), com a participação de flebótomos peridomiciliários e tendo como reservatório (secundário) o cão e talvez até o próprio homem”.

Mudanças ambientais devidas à utilização de terras florestais para desenvolvimento e exploração de novos recursos naturais e agricultura modificam a epidemiologia da doença e novas áreas endêmicas são relatadas. Felinto de Brito *et al.* (1993) registram uma variante de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ocorrida no Estado de Pernambuco, Brasil, onde a geografia física e ecologia da região é similar às já descritas para outras áreas endêmicas de LTA (leishmaniose tegumentar americana), nas quais o ambiente florestal original vem sendo alterado. Mostram que a LTA pode ocorrer em comunidades antigas e bem estabelecidas, em áreas não florestais, nas quais a manutenção do ciclo parece envolver, como reservatórios, animais domésticos e flebótomos com hábitos peridomiciliares e que a descrição dessa variante sugere um foco enzoótico. Os autores registram, ainda, que roedores silvestres capturados na área estavam infectados com *Leishmania* (resultados não publicados).

Os mamíferos domésticos ou selvagens infectados por *Leishmania* podem apresentar ou não sinais evidentes de infecção; com frequência, as amastigotas presentes na pele ou vísceras são relativamente poucas e a resposta do hospedeiro é mínima ou nula. Muitos reservatórios primários são animais que vivem em colônia, cujos hábitos fornecem condições para os flebótomos vetores picarem posteriormente a outro indivíduo, perpetuando, assim, o parasita naquela população.

Um grande número de espécies de flebotomíneos está envolvido na transmissão das leishmanioses. Estes insetos possuem peculiaridades em seu ciclo biológico que garantem a preservação e reprodução do parasita em questão.

Estão envolvidos na transmissão flebótomos do subgênero *Lutzomyia*, *Nyssomyia* e do gênero *Psychodopygus*. Alguns autores sinalizam o perigo da adaptação de insetos silvestres no hábitat peridoméstico e doméstico. Esta capacidade de adaptação depende, diretamente, da similaridade do hábitat humano com o nicho ecológico natural do flebótomo.

O vetor *Lutzomyia flaviscutellata* é fortemente atraído pelos roedores, sendo considerado na Amazônia como o maior vetor de *L. amazonensis*. De hábitos essencialmente noturnos, não é muito atraído pelo homem, que pode desenvolver uma forma de leishmaniose difusa (ou anérgica) (SILVEIRA *et al.*, 1991).

Conforme estudo de Lainson e Shaw (1987), existem espécies de vetores intimamente ligadas à transmissão de uma determinada espécie de leishmania (espécie-específica):

QUADRO 1. Espécies de *Leishmania* e respectivos vetores.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Vetor
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>
<i>L. (L.) deanei</i>	<i>Lu. furcata</i>
<i>L. (L.) braziliensis</i>	<i>Ps. welcomei</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>Ps. ayrozai, Ps. paraensis, Ps. squamiventris</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitous</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i>
<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>Lu. longipalpis</i>

As diferentes espécies de flebotomíneos possuem habitats preferenciais. Algumas vivem nas partes altas das árvores, com ecologia arbórea definida. Outras espécies estão mais presentes ao nível do solo, demonstrando uma ecologia própria. Evidentemente, em cada um desses níveis temos faunas diferentes que vão servir como fonte alimentar do inseto.

A especulação/provocação feita por Lainson e Shaw (1987), acerca dos efeitos do desmatamento na ecologia das leishmanioses, está relacionada à forma de adaptação dos flebotomos ao ambiente modificado e a presença de animais - fontes alimentares. Os insetos de hábitos arbóreos teriam maior dificuldade de adaptação, assim como os animais que ali vivem. Já os vetores cujos criadouros naturais se encontram ao nível do chão teriam, assim como os animais reservatórios, uma adaptação facilitada por maior oferta de alimento e abrigo. Desta forma, essas espécies estariam mais envolvidas com a transmissão periurbana ou peridomiciliar.

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO

O gênero *Leishmania* possui apenas duas formas evolutivas em seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros: forma amastigota, nos organismos vertebrados, e promastigota, nos invertebrados. A forma promastigota multiplica-se por divisão binária longitudinal dentro do tubo digestivo do inseto vetor (flebótomo). Possui estrutura alongada, com um único núcleo, com flagelo livre e cinetoplasto anterior ao núcleo. As formas promastigotas são introduzidas no hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor e invadem o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. No momento em que as fêmeas de flebotomíneos fazem o repasto sanguíneo, tem início a fase de desenvolvimento intracelular do parasita que se transforma em forma amastigota. As amastigotas são formas ovaladas, de núcleo único, com cinetoplasto e um flagelo não exteriorizado, com multiplicação no interior dos macrófagos. Quando um flebótomo não infectado ingere células parasitadas no repasto sanguíneo, as células se rompem no interior de seu intestino e liberam as formas amastigotas, que se transformam em promastigotas (HOARE & WALLACE, 1966).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam em seu citoplasma, como característica da Ordem Kinetoplastidae, o cinetoplasto, que é uma mitocôndria que contém DNA composto de maxi e minicírculos (SIMPSON, 1987).

O gênero *Leishmania* possui muitas espécies, e a classificação taxonômica baseia-se no aspecto clínico e epidemiológico das doenças que produzem no homem e nas características do parasito nos animais de laboratório e nos insetos vetores. O sistema de classificação é suplementado com uma variedade de métodos bioquímicos e imunológicos. As técnicas moleculares definem características próprias intrínsecas do parasito e que não podem ser modificadas ou mascaradas por fatores do hospedeiro ou do meio ambiente (GRIMALDI *et al.*, 1989).

Em 1972, com base nos estudos sobre o comportamento das leishmanias em animais experimentais, em meios de cultura e no tubo digestivo de flebotomíneos, Lainson & Shaw introduzem a idéia dos dois complexos ou grupos de *Leishmania* do Novo Mundo: *braziliensis* e *mexicana*. Em 1987, a classificação foi modificada pela inclusão dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1972, 1987; SHAW, 1994).

As principais espécies causadoras de doença tegumentar humana no Brasil estão classificadas da seguinte maneira: 1- Subgênero *Viannia*, compreendendo o complexo *Leishmania braziliensis* com as espécies *L. braziliensis* e *L. peruviana* e o complexo *Leishmania guyanensis* com as espécies *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni* e *L. naifii*; 2- Subgênero *Leishmania*, com as espécies viscerotrópicas agrupadas no complexo *Leishmania donovani*, os representantes dermatrópicos do Velho Mundo alocados em complexos como *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e as espécies do Novo Mundo *L. amazonensis* e *L. mexicana* formando um único complexo, o *Leishmania mexicana* com a espécie *L. amazonensis* (RIOUX *et al.*, 1990; GRIMALDI & TESH, 1993).

Os parasitos do complexo *braziliensis* são menores e raros nas lesões e o crescimento em meio de cultura é difícil. Quando inoculado em hamster produzem pequenos nódulos de evolução lenta, sem disseminação metastática.

As leishmanias do complexo *mexicana* são maiores, e as lesões são ricas em formas amastigotas, disseminam-se por metástases e crescem bem em meios de cultura.

Shaw (1994) lista 30 espécies de *Leishmania*, das quais 10 ocorrem no Velho Mundo e 20 no Novo Mundo. Todas as espécies do Velho Mundo pertencem ao subgênero *Leishmania* e sete infectam o homem. Dentro deste mesmo subgênero, existem 11 espécies no Novo

Mundo e apenas cinco não foram encontradas no homem. Parasitos do subgênero *Viannia* ocorrem apenas no Novo Mundo e de nove espécies, oito foram encontradas infectando o homem (Quadro 2).

QUADRO 2. Listagem das espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* em ordem cronológica do ano em que foram descritas, local de ocorrência (V= Velho Mundo e N= Novo Mundo) e se infecta o homem (=H) (SHAW, 1994).

Subgênero <i>Leishmania</i>				Subgênero <i>Viannia</i>			
<i>L. (L.) donovani</i>	V	H	1903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	N	H	1911
<i>L. (L.) tropica</i>	V	H	1906	<i>L. (V.) peruviana</i>	N	H	1913
<i>L. (L.) infantum</i>	V	H	1909	<i>L. (V.) peruviana</i>	N	H	1913
<i>L. (L.) major</i>	V	H	1914	<i>L. (V.) guyanensis</i>	N	H	1954
<i>L. (L.) archibaldi</i>	V	H	1919	<i>L. (V.) panamensis</i>	N	H	1972
<i>L. (L.) chagasi</i>	N	H	1937	<i>L. (V.) lainsoni</i>	N	H	1987
<i>L. (L.) enriettii</i>	N	-	1948	<i>L. (V.) naiffi</i>	N	H	1989
<i>L. (L.) mexicana</i>	N	H	1953	<i>L. (V.) shawi</i>	N	H	1989
<i>L. (L.) pifanoi</i>	N	H	1959	<i>L. (V.) colombiensis</i>	N	H	1991
<i>L. (L.) gerbilli</i>	V	-	1964	<i>L. (V.) equatorensis</i>	N	-	1992
<i>L. (L.) hertigi</i>	N	-	1971				
<i>L. (L.) amazonensis</i>	N	H	1972				
<i>L. (L.) aetiopica</i>	V	H	1973				
<i>L. (L.) deanei</i>	N	-	1977				
<i>L. (L.) garnahmi</i>	N	H	1979				
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	N	H	1980				
<i>L. (L.) killicki</i>	V	H	1986				
<i>L. (L.) arabica</i>	V	-	1987				
<i>L. (L.) aristedesii</i>	N	-	1987				
<i>L. (L.) turanica</i>	V	-	1990				
<i>L. (L.) forattinii</i>	N	-	1993				

1.3. DISTRIBUIÇÃO E PERFIS DE TRANSMISSÃO

Classicamente descrita como zoonose de animais silvestres, a LTA teve bem estabelecida a associação entre a doença e as florestas da região neotropical mesmo antes de ser conhecido o seu modo de transmissão pelos flebótomos (BRUMPT & PEDROSO, 1913).

Com ampla distribuição nas Américas (do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina), no Brasil a enfermidade tem sido descrita em quase todos os Estados e está estreitamente relacionada com a forma de ocupação e exploração do território. De acordo com a "colonização", esta produz determinadas alterações ambientais que podem ou não favorecer a transmissão da doença.

Deste modo, foi verificada desde o início do século, a doença acompanhando o desmatamento das florestas e a instalação de novos núcleos de colonização principalmente em São Paulo, Bahia e Minas Gerais.

"Talvez a principal constatação em relação às perspectivas da leishmaniose tegumentar como problema de saúde pública tenha sido sua vinculação à derrubada das florestas tropicais primárias" (SABROZA, 1981). Chegou-se a acreditar que com a derrubada das florestas primitivas, a doença tenderia a diminuir ou a se extinguir ou ainda poderia se tornar limitada a pequenos focos florestais (PESSOA & BARRETO, 1948; SAMPAIO, 1951; SILVEIRA, 1919 *apud* SABROZA, 1981).

Entretanto, o que se observa é um aumento do problema, com relatos de casos novos em áreas desmatadas há muito tempo e também em áreas periurbanas, mostrando uma adaptação tanto dos prováveis reservatórios como dos flebótomos vetores, inclusive com importantes modificações na biologia desses insetos, com mudanças seja no seu hábitat original, nas suas preferências de fontes alimentares e até mesmo em seus horários de atividade. Assim, demonstram um quadro epidemiológico diverso, não mais associado à derrubada das matas, mas a indivíduos que se infectam em locais de desmatamento antigos (SAF'JANOVA, 1971; LAINSON & SHAW, 1987; FELINTO DE BRITO, 1993).

Três padrões epidemiológicos foram definidos por Herrer & Christensen (1976 a, b) para a LTA :

- 1) surto epidêmico entre colonizadores, cujas características principais são o envolvimento de pessoas de qualquer idade ou sexo e com o desaparecimento da doença após a modificação do ambiente natural;
- 2) aparecimento esporádico da infecção entre pessoas adultas que periodicamente freqüentam a floresta;
- 3) persistência da infecção em uma comunidade por longos períodos, com maior ocorrência em crianças.

Sabroza (1981) propõe um quarto padrão: a persistência da infecção em uma comunidade por longo período, com ocorrência de casos em todas as faixas etárias, nos dois sexos, sem se poder notar uma predominância clara em crianças, sendo que os casos tendem a se aglomerar por domicílio.

Apesar de controverso, atualmente podem-se distinguir, de acordo com a ocupação do espaço, paisagem e padrão de transmissão, três tipos de focos no Brasil, sendo dois básicos (ciclos zoonótico e silvestre) e um de características intermediárias.

Diversos autores que vêm trabalhando nessas áreas consideram que o local de transmissão é o domicílio e peridomicílio. Este novo ciclo seria devido a uma adaptação do parasito aos ambientes modificados pelo homem (SAF'JANOVA, 1971):

“a chegada de populações humanas suscetíveis num foco natural resulta em transformações que ocasionam diminuição ou aumento de algumas espécies integrantes do ciclo zoonótico. Isto leva ou ao desaparecimento das doenças ou às epidemias. Eventualmente o ciclo natural pode encontrar uma nova forma de equilíbrio, passando a ocorrer casos humanos mais ou menos esporádicos, onde os agentes e vetores podem se adaptar a novos hospedeiros como animais domésticos ou ao próprio homem, tornando a transmissão independente do ciclo silvestre”

Um novo perfil epidemiológico da leishmaniose cutânea tem sido observado em decorrência das alterações do meio ambiente. Tem-se observado um conjunto de características bem distintas das que foram estabelecidas no início dos estudos da doença.

Com as mudanças ambientais causadas pelos desmatamentos associadas a problemas sociais, o homem passa a ter contato mais permanente com as espécies vetoras e com a infecção de animais domésticos no peridomicílio. A devastação de florestas causa profunda alteração na situação ecológica primitiva e, como conseqüência, algumas espécies de reservatórios silvestres invadem a área do peridomicílio em busca de alimento ou abrigo, onde flebótomos com hábitos alimentares ecléticos podem ser encontrados e, desta forma, se tornar responsáveis pela transmissão do parasita aos animais domésticos, que podem, então, passar a desempenhar papel de reservatório.

Em áreas devastadas de florestas neotropicais no Brasil, o homem contribui para o estabelecimento de um novo foco de leishmaniose tegumentar. Contrariando, desta forma, a expectativa inicial de que a destruição dessas áreas levaria à diminuição desse problema de saúde. Existem três fatores importantes responsáveis pelo incremento de casos da doença em determinadas áreas: a destruição das florestas, as profundas alterações do meio ambiente e a situação sócio-econômica com significativo aumento no número de pessoas carentes (RANGEL, 1995).

A presença humana sobre os focos naturais, nos locais onde a pobreza e o subemprego são constantes, o corte de árvores para carvão ou lenha e a destruição de aves e pequenos mamíferos predadores resulta em desequilíbrio e favorece a proliferação de roedores. Outro ponto importante é que a precariedade das habitações determina acúmulo de material orgânico (oriundo de resíduos de criação de animais como suínos e aves) em suas proximidades, o que contribui para o desenvolvimento de algumas espécies capazes de se adaptarem a esse novo ambiente, como é o caso dos vetores *Lutzomyia intermedia* e alguns mamíferos silvestres (roedores, preguiças, etc). Nessas localidades, a doença tem comportamento endêmico e, em determinado momento, pode adquirir caráter epidêmico.

Na década de 50, o Departamento Nacional de Endemias Rurais desenvolveu trabalho de controle da leishmaniose (com ênfase na forma visceral), principalmente no Estado do Ceará, onde o registro de casos era grande. À medida em que foi dada maior atenção à doença, verificou-se sua atual distribuição, que abrange praticamente todas as unidades da Federação. Por suas características zoonóticas, sua distribuição deve poder correlacionar-se com a distribuição dos reservatórios naturais. Os programas de leishmaniose, entretanto, mesmo classificando os roedores como reservatórios, não contam com um controle efetivo de tais animais e medidas profiláticas em ambiente natural são impraticáveis.

1.4. RESERVATÓRIOS

No estudo dos reservatórios animais de leishmaniose, os roedores têm grande importância. Em seu clássico trabalho, Samuel Pessoa (PESSOA & BARRETO, 1948) cita que Adelheim, em 1924, verificou, com relação ao calazar, que camundongos são adquiriram a infecção após serem conservados por cinco meses com um animal infectado.

A ecologia e epidemiologia da *Leishmania amazonensis* está bem estudada na região Norte do Brasil. Foram descritas 13 espécies de mamíferos silvestres albergando o parasito, sendo a mais importante o "rato de espinho" (*Proechimys*), que raramente desenvolve a doença (LAINSON, 1988).

Em 1968, Lainson e Shaw isolaram *L. mexicana amazonensis* de tecido de orelha de *Proechimys guyanensis* sem nenhuma lesão aparente. Em 1973, concluíram que o tipo mais comum de infecção é assintomático, com a presença de parasitas em pele aparentemente normal, pois de 166 *Proechimys* examinados, 26 estavam infectados, sendo que apenas cinco apresentavam lesão de pele. E de 64 *Oryzomys capito*, sete estavam infectados e a pele desses roedores era perfeitamente normal (LAINSON & SHAW, 1979).

Barbosa *et al.* (1970), examinando lesões de roedores capturados em foco natural de peste no Rio de Janeiro, encontraram cinco *Oryzomys eliurus* infectados com *Leishmania sp.*

No estudo de surto de LTA feito por Bastos (1978) no Vale do Ribeira, São Paulo, demonstrou-se que o aumento da população de roedores, em virtude da sobra de alimentos, parece ter sido fator importante para o desencadeamento do surto epidêmico.

O possível envolvimento de roedores domésticos (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*) na transmissão de leishmaniose visceral em Jacobina, na Bahia, foi levantado por Sherlock (1969) e Sherlock e Miranda (1993). De vinte espécimes de *Rattus rattus*

examinados, nove foram encontrados infectados, e em 42 espécimes de *Mus musculus*, 19.7% apresentavam-se infectados.

Em estudo sobre a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro, Araújo Filho (1978) capturou 203 mamíferos das ordens *Marsupialia*, *Chiroptera* e *Rodentia*. Dos 203 animais coletados, 15 apresentavam alterações do tegumento e em três roedores foram observadas amastigotas do gênero *Leishmania sp.* Destes infectados, dois pertenciam à espécie *Proechimys dimidiatus* e apresentavam áreas de hipocromia na extremidade distal das orelhas; um era *Rattus norvegicus norvegicus*, com lesão ulcerada no dorso direito. Nos 15 roedores com alteração de tegumento foram encontradas 17 lesões, com predominância na cauda e na orelha.

Sabe-se que as leishmanias do complexo *L. braziliensis*, parasitos dermatotrópicos, podem se localizar na pele sadia de roedores silvestres, de edentados (*L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*) e de cão doméstico (*L. peruviana*) (GRIMALDI, 1982).

Nos reservatórios naturais os parasitas induzem lesões discretas, com nódulos cutâneos de tamanho reduzido, placas ou ulcerações nas extremidades, principalmente na cauda (GRIMALDI, 1982).

Em trabalho de campo realizado em Baturité, no Ceará - área endêmica de LTA - foram isoladas *L. braziliensis* de humanos e cães. Todas as amostras isoladas foram identificadas como *L. braziliensis* pela técnica de eletroforese de enzimas, com confirmação pela hibridação com sonda específica de kDNA (SALLENAVE *et al.*, 1990 e VASCONCELOS *et al.*, 1994).

Vasconcelos *et al.* (1994) ressaltam que, embora muitos dos estudos que identificam roedores infectados sejam baseados na observação de amastigotas nos tecidos sem posterior caracterização da espécie de *Leishmania*, esses achados sugerem que os roedores

participam do ciclo de transmissão doméstico/peridoméstico da LTA, juntamente com os cães e, infelizmente, não se faz captura e investigação de roedores em áreas de leishmaniose tegumentar.

Deduz-se que os roedores devem ter importância no ciclo enzoótico da leishmaniose, mas a participação desses mamíferos na circulação dos parasitos precisa ser melhor esclarecida. Pode existir um grande reservatório de leishmanioses entre as populações de roedores silvestres, cuja importância na difusão da doença, entretanto, continua sendo questionada.

1.5. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Durante os últimos dez anos, o diagnóstico dos agentes de doenças infecciosas tem começado a incluir o uso de tecnologias com base no ácido nucléico. O diagnóstico de organismos parasitários é o último campo da microbiologia clínica a incorporar estas técnicas, e irão ter um papel na epidemiologia, prevenção e tratamento das doenças parasitárias. A prova com base no ácido nucléico para detecção dos agentes parasitários consiste em usar uma molécula repórter de DNA para detectar seqüências específicas de DNA ou RNA do parasito. O parasito no espécime em estudo é lisado, o ácido nucléico é liberado e então denaturado. A seqüência-alvo é detectada pela molécula informante, seguindo-se a hibridação (WEISS, 1995).

Normalmente, a detecção e diagnóstico de infecções por parasitos repousam em diversos métodos em adição a sintomas clínicos, história clínica, história de viagem e localização geográfica do paciente.

Cada método diagnóstico tem vantagens e desvantagens inerentes. As maiores vantagens das técnicas de detecção baseadas no ácido nucléico são: sua sensibilidade para detecção de patógenos; a velocidade com a qual podem identificar um organismo; o

processamento de um grande número de espécimes com um ensaio automatizado; serem independentes de se conhecer a imunocompetência ou história clínica prévia; permitir distinguir entre organismos que são morfologicamente similares; e permitir evidenciar organismos, mesmo os que não são viáveis ou cultiváveis (ULIANA, 1991 e PIARROUX *et al.*, 1993).

Têm sido descritos ensaios de reação da polimerase em cadeia (PCR) que apresentam boa especificidade e sensibilidade para a detecção de *Leishmania sp.*, usando métodos simples e eficientes de preparo de amostras e detecção. De 63 biopsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas e mucocutâneas analisadas em estudo de campo no Perú, a PCR resultou em mais amostras positivas que os métodos diagnósticos convencionais (WEISS, 1995).

A reação da polimerase em cadeia (PCR), desenvolvida por SAIKI *et al.* (1985), baseia-se na replicação *in vitro* da molécula em dupla-fita do DNA. É usada para amplificar um segmento de DNA posicionado entre duas regiões de seqüência conhecida. Dois oligonucleotídeos são usados como *primers* (iniciadores) para uma série de reações catalizadas pela DNA polimerase.

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é um polímero linear de nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster, e possui 4 diferentes tipos de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto de um grupo fosfato, um açúcar (pentose) e uma base nitrogenada - purínica e pirimidínica - adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T). O açúcar faz a ligação entre a base e o grupo fosfato. A base liga-se ao Carbono 1 da pentose, e um ou até três grupos fosfato ligam-se ao Carbono 5'. Em uma fita de DNA, numa das extremidades há um grupo fosfato ligado ao 5C (Carbono 5') do açúcar (extremidade 5') e na outra há uma hidroxila ligada ao 3C (Carbono 3') do açúcar (extremidade 3'). A seqüência nucleotídica é da esquerda para a direita, no sentido 5' →

3'. A cadeia polinucleotídica possui individualidade determinada pela seqüência de suas bases (ROSSETTI, 1996; SCHRANK, 1996).

As moléculas de DNA são formadas por duas fitas antiparalelas, ou seja, que possuem direção/orientação opostas. A replicação ocorre em ambas as fitas simultaneamente. A polimerização enzimática ocorre somente no sentido 5' → 3'.

A reação da polimerase em cadeia envolve a síntese de milhões de cópias de um segmento específico do DNA onde para cada base purínica ou pirimidínica de uma fita, existe na outra fita uma base purínica ou pirimidínica complementar, cuja especificidade é determinada pela regra de pareamento de pares de bases. As duas fitas são mantidas unidas por pontes de hidrogênio entre as bases purínicas e pirimidínicas das respectivas moléculas lineares. Este pareamento específico dos nucleotídeos é dependente da ligação de hidrogênio entre adenina com timina, e guanina com citosina. Quando cada fita de DNA se separa de seu complemento, durante a replicação, cada uma delas pode servir como molde que será usado pela DNA polimerase, sobre o qual uma nova fita complementar poderá ser sintetizada.

A denaturação do DNA (separação da fita dupla) pode ser conseguida por substâncias químicas ou pelo calor. Após a denaturação, cada oligonucleotídeo *primer* ou iniciador se liga à seqüência alvo. Assim, cada *primer* hibridiza para cada uma das duas fitas separadas, de forma que a extensão terminal 3' é diretamente direcionada à outra. Depois do anelamento, ocorre extensão do *primer* sobre a fita molde através da DNA polimerase.

A PCR se dá em repetidos ciclos de denaturação, anelamento e extensão do *primer*. Cada ciclo de PCR é composto de uma denaturação do DNA que ocorre a temperatura de 94⁰C, ligação do primer entre 37⁰C e 65⁰C; e síntese de DNA a 72⁰C. Desta forma, ao final de uma

sucessão de ciclos teremos, a partir de uma única cópia, uma amplificação de milhões de vezes desse segmento de DNA.

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, são unicelulares dimórficos e apresentam como característica uma organela celular denominada cinetoplasto, que é composta, basicamente, por moléculas de DNA agrupadas. O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa a informação genética mitocondrial desses parasitos. É constituído por maxicírculos e minicírculos, moléculas que se concatenam formando uma rede compacta. Os minicírculos representam 95% da massa de kDNA. As moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pares de base, razoavelmente homogênea entre os representantes de um mesmo gênero. Os minicírculos são bons substratos para sondas moleculares (SIMPSON *et al.*, 1980; DEGRAVE *et al.*, 1994).

1.6. COLEÇÕES DE MUSEUS E ESTUDO DE ANCIENT DNA

O termo “*ancient DNA*” (aDNA) engloba qualquer massa ou traço de DNA originado de um organismo morto, ou de parte deste. Entretanto, qualquer DNA que tenha sido submetido a processos de autólise ou qualquer tipo de fixação é considerado aDNA (HERRMANN & HUMMEL, 1994).

Assim definido, podemos considerar que o DNA recuperável em organismos taxidermizados, ou preparados por técnicas especiais de conservação nos museus, é aDNA, podendo ser possível de recuperação, análise e identificação pelas técnicas empregadas para os demais estudos antropológicos.

Muitos estudos de tais coleções podem complementar o trabalho de pesquisa biomédica convencional, da mesma forma que estudos morfológicos podem sugerir relações filogenéticas para um teste

molecular, ou estudos arqueológicos e datação de espécimes pelo carbono fornecem importante arcabouço temporal e espacial para estudos de *ancient* DNA. A reação da polimerase em cadeia está resgastando o interesse científico de coleções de museu, pelo aumento da quantidade de informações que podem ser obtidos de tais acervos (COOPER, 1994).

Este método abre um novo campo de investigação da Paleopatologia. Durante a reação, um curto fragmento de DNA, mesmo de uma quantidade reduzida de material pode ser amplificado. Por ser extremamente sensível, é possível analisar um aDNA, mesmo danificado, extraído de grande variedade de achados arqueológicos.

Estudos de *ancient* DNA consistem na análise molecular de DNA de organismos antigos preservados natural ou artificialmente. Tais estudos causam impacto em todas as subdisciplinas da Biologia moderna, incluindo evolução, conservação biológica, biologia animal e vegetal, Antropologia e saúde humana, particularmente no que se refere às doenças infecciosas (HERRMANN & HUMMEL, 1994).

A partir de uma pequena e única molécula de DNA, podem-se gerar literalmente bilhões de cópias. Uma única molécula ou um pequeno número de moléculas intactas num tecido antigo podem ser amplificadas pela PCR, e, mesmo havendo moléculas danificadas presentes, este fato não implica prejuízo do experimento (PÄÄBO, 1993).

Desde a metade dos anos 80, a evolução das técnicas moleculares expandiu seu campo de investigação para o passado. O desenvolvimento da PCR tornou possível o estudo e determinação das relações filogenéticas de animais e plantas extintas, possibilitando o surgimento de uma Arqueologia Molecular (HÖSS, 1995).

Muitos estudos vêm sendo realizados, desde então, utilizando exemplares de museu para seqüenciamento de DNA. Os trabalhos de Higuchi *et al.* (1984) que extraíram e seqüenciaram DNA de um espécime de museu de um *quagga* (ancestral africano da família do cavalo) e de e Pääbo (1985) de múmia humana são marcos importantes neste novo universo de pesquisa.

Nos Estados Unidos, Persing *et al.* (1990) desenvolveram com êxito, pesquisa de *Borrelia burgdorferi* (agente etiológico da Doença de Lyme) em carrapatos de coleção de museu utilizando o método de PCR.

1.7. A COLEÇÃO DE ROEDORES DO MUSEU NACIONAL

No programa de controle da peste bubônica nos anos 50, foram estudadas 971 localidades-foco disseminadas, abrangendo 198 municípios dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FREITAS, 1988).

O Serviço Nacional da Peste efetuou um levantamento da fauna de roedores silvestres e de pequenos mamíferos, com o preenchimento de ficha individual do animal, constando o seu nome popular, medidas anatômicas, sexo, idade, peso, número de fetos no útero, alimento encontrado no estômago, registro de ectoparasitos, local de captura, além de dados ecológicos da área, como tipo de cultivos agrícolas, flora, época de chuvas, temperatura máxima e mínima anual. Os roedores estão taxidermizados pela técnica descrita por Moojen, em 1943, e no preparo e conservação da carcaça toda a superfície interna da pele foi pulverizada com o preservativo de arsênico-alume em pó. O Museu Nacional, conta, hoje com uma coleção de cerca de 60 mil exemplares de roedores oriundos de todo o Brasil, principalmente da região Nordeste.

Em levantamento preliminar dos roedores pertencentes ao acervo do Museu Nacional da Quinta da Boa Vista, constatou-se dentro da coleção que abrange quase todos os estados brasileiros, um grande número de exemplares oriundos dos Estados de Pernambuco e Ceará, coletados durante o programa de combate à Peste.

Esta coleção constitui importante testemunho da fauna silvestre de diferentes regiões endêmicas de leishmaniose, cujo estudo poderá trazer interessantes contribuições ao conhecimento dos reservatórios naturais desta doença no Brasil.

Este trabalho teve como finalidade investigar a infecção natural da leishmaniose tegumentar americana, em roedores taxidermizados da coleção do Museu Nacional, pela técnica da reação da polimerase em cadeia.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	2
QUADRO 1. Espécies de <i>Leishmania</i> e respectivos vetores.	9
1.2. Agente Etiológico	10
QUADRO 2. Listagem das espécies dos subgêneros <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i> em ordem cronológica do ano em que foram descritas, local de ocorrência (V= Velho Mundo e N= Novo Mundo) e se infecta o homem (=H) (SHAW, 1994).	12
1.3. Distribuição e Perfis de Transmissão	12
1.4. Reservatórios	17
1.5. Técnicas de Diagnóstico	19
1.6. Coleções de Museus e Estudo de ancient DNA	22
1.7. A Coleção de Roedores do Museu Nacional	24

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para testar a técnica e padronizar procedimentos, foi efetuado ensaio experimental, tal como feito por Bastos *et al.* (1996), que utilizou PCR para identificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em tecido de camundongo dessecado.

Num segundo momento, após confirmação da sua eficácia, a técnica foi aplicada aos animais selecionados para o presente estudo entre aqueles do acervo museográfico.

2.1 MODELO EXPERIMENTAL

Camundongos inoculados com *Leishmania amazonensis* foram sacrificados e taxidermizados. Em seguida, foram feitas as extrações do DNA das amostras e a reação de polimerase em cadeia (PCR) e eletroforese em gel de agarose, de modo a testar, previamente ao estudo do acervo, a conservação do DNA de *Leishmania* após os processos de taxidermização.

A padronização do ensaio foi realizada com onze camundongos jovens, de linhagem *inbred* e raça Balb/c e CBA, fêmeas e com peso em torno de 18 gramas, solicitados ao Infectório do Departamento de Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ. Desses roedores, oito estavam infectados, experimentalmente, com dose de 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* por mililitro, sendo o local de infecção o coxim plantar de membro posterior direito.

Os animais foram sacrificados e taxidermizados no Setor de Taxidermia do Museu Nacional da Quinta da Boa Vista - Universidade Federal do Rio de Janeiro, seguindo-se rigorosamente a técnica descrita por Moojen (1943).

Cabe ressaltar que na técnica de taxidermização há utilização de arsênico-alume em pó para maior conservação dos exemplares. Um dos camundongos inoculados foi taxidermizado sem o arsênico. Um grupo controle negativo foi mantido com dois camundongos saudáveis e taxidermizados, um com arsênico e um sem arsênico.

Após dois meses, efetuou-se a retirada de fragmentos de aproximadamente 25 micro-grama dos camundongos taxidermizados para a verificação da técnica. Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, com a utilização de luvas descartáveis e de uma lâmina nova de bisturi para a retirada de cada fragmento para evitar contaminação. Os fragmentos retirados foram colocados em tubos Eppendorf estéreis.

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Para este procedimento foi utilizado o Kit QIAGEN – QIAamp Tissue Kit, da Pharmacia. Após o isolamento, as amostras de DNA ficaram estocadas em freezer à temperatura de -20°C e encaminhadas novamente ao Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz .

A reação da polimerase em cadeia foi precedida da precipitação das amostras de DNA, segundo orientação de Sambrook *et al.* (1989) e protocolo do fabricante do kit.

2.2. TÉCNICA DE TAXIDERMIA

No processo de taxidermização de pequenos mamíferos, descrito por Moojen (1943), devem ser observadas as fases de limpeza do espécime, escaldamento, envenenamento, montagem e secagem.

Com o animal em decúbito dorsal, faz-se uma incisão mediana da extremidade posterior do esterno até quase os órgãos genitais. Com uma pinça ou espátula descola-se a pele e aplica-se fubá de milho, para facilitar a manipulação a seco e impedir que o sangue manche o pêlo dos exemplares. Após o descolamento de toda a pele do corpo, descola-se a pele do pescoço e cabeça. Todos os movimentos devem ser delicados, para não romper as estruturas.

Depois da pele retirada, pulveriza-se uniformemente toda a superfície interna do couro com o preservativo (arsênico-alume).

A montagem dos animais é feita com fios de arame para sustentar a cauda e os membros. A pele é recheada com um chumaço de algodão e com alguns pontos fecha-se a incisão ventral. Com alfinetes mantêm-se o animal na posição desejável para secagem: as extremidades anteriores puxadas para frente, junto ao pescoço e as posteriores distendidas para trás. A secagem é feita à sombra em local seco e ventilado.

2.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DOS ROEDORES DO MUSEU NACIONAL

Foram utilizados roedores taxidermizados, pertencentes à "Coleção da Peste" do Museu Nacional da Quinta da Boa Vista, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esses animais estão preparados para conservação em museu segundo a técnica descrita por Moojen (1943), encontrando-se hoje no acervo quase 60 mil espécimes de roedores capturados em diferentes estados brasileiros no período de 1941 a 1975.

Sua coleta foi feita para a campanha da Peste, não havendo, à época, nenhum estudo de leishmaniose naqueles animais, exceto relato de Barbosa *et al.* (1970) de roedores capturados em foco de peste com infecção natural por *Leishmania* sp.

Para realizar este trabalho foi necessária permissão dos responsáveis por este acervo de roedores do Setor de Mastozoologia do Departamento de Vertebrados do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Professores Dr. João A. Oliveira e Dr. Luiz Flamarion B. de Oliveira, que, cientes desta pesquisa firmaram acordo de cooperação entre aquele Setor e o Departamento de Endemias da ENSP/FIOCRUZ, para a realização da mesma.

2.4. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Dada a sua natureza, constituição geográfica e cronologia - sobrepondo-se áreas das endemias (Peste e Leishmaniose) - a coleção poderia apresentar animais naturalmente infectados por *Leishmania sp.*

Sendo uma coleção de grande tamanho, o estudo obedeceu a uma seleção amostral, com base nos seguintes critérios:

1. Local de captura

Foram escolhidos, preferencialmente, animais oriundos de locais onde havia relato de leishmaniose, no período representado pela captura dos animais, de acordo com os registros sanitários disponíveis.

2. Espécie do roedor

Foram analisadas, preferencialmente, espécies de roedores com maior ocorrência referida no peridomicílio e bem representada na coleção como: *Rattus rattus rattus*, *Rattus rattus alexandrinus*, *Rattus rattus frugivorus*, *Rattus norvegicus*, *Bolomys lasiurus*, *Bolomys pixuna*, *Thrichomys apereoides*.

3. Presença de lesão nos animais

Foram selecionados, quando possível, os espécimes portadores de lesão cutânea que, por hipótese, pudesse ser de leishmaniose.

4. Localização dos roedores no acervo

A coleção de roedores encontra-se muito bem documentada, com fichas individuais arquivadas de acordo com local e data de captura, nas quais constam o número de campo e a numeração do tombamento museográfico. Já os animais estão guardados em grandes gavetas segundo a espécie, o que dificulta um pouco a localização no acervo do roedor selecionado.

Um achado interessante foi a existência de exemplares de roedores da Ilha Grande em Angra dos Reis, capturados em 1976 por Nelson Antunes de Araújo Filho, por ocasião de seu trabalho de Dissertação de Mestrado no qual relatou ter encontrado *Leishmania* em lesões dérmicas de dois exemplares de *Proechimys dimidiatus* e um *Rattus norvegicus norvegicus* (ARAÚJO FILHO, 1978).

Com base nos critérios descritos acima, optou-se por analisar os roedores de Baturité-CE e os da Ilha Grande-RJ. Foram encontrados cerca de 500 exemplares procedentes de Baturité, capturados entre os anos de 1939 e 1945, e 200 da Ilha Grande. Dentre esses animais, foram selecionados 39 roedores sendo 20 de Baturité e 19 da Ilha Grande (Quadro 3).

Conforme descrito por Falqueto (1984) e Grimaldi (1982), nos reservatórios silvestres os locais mais prováveis de se encontrar ulcerações leishmanióticas, mesmo que discretas, são as extremidades, principalmente cauda e orelhas. Portanto, para padronizar, de cada exemplar foram retirados fragmentos de três pontos: membro posterior direito, extremidade de pavilhão auricular direito e base da cauda. Nos roedores que apresentavam lesão em outro local do corpo, além desses três pontos foram coletados, também, fragmentos da lesão.

QUADRO 3. Relação dos roedores examinados do acervo museográfico com número de tombamento, espécie e local, região e data da captura

Nº TOMB.	ESPÉCIE	LOCAL	REGIÃO	DATA
Bt 6	<i>Oryzomys. eliurus</i>	St. Labirinto	Baturité	6/3/53
20.700	<i>Oryzomys subflavus</i>	Lc. Baturité	Baturité	9/3/53
20.704	<i>Oryzomys subflavus</i>	Lc. Baturité	Baturité	9/3/53
20.705	<i>Oryzomys subflavus</i>	St. Coió	Baturité	13/3/53
20.701	<i>Oryzomys subflavus</i>	Lc. Baturité	Baturité	24/3/53
26.697	<i>Keradon rupestris</i>	St. Oiticica de Cima	Baturité	20/10/54
21.880	<i>Thrichomys apereoides</i>	St. Irapuru	Baturité	26/2/53
21.881	<i>Thrichomys apereoides</i>	St. Labirinto	Baturité	27/2/53
35.764	<i>Galea spix</i>	Lc. Baturité	Baturité	30/3/53
35.763	<i>Galea spix</i>	Lc. Baturité	Baturité	20/4/53
20.744	<i>Zigodontomys pixuna</i>	St S ^{ta} Cecília	Baturité	13/3/53
Bt. 17	<i>Zigodontomys pixuna</i>	Lc. Baturité	Baturité	20/3/53
20.746	<i>Zigodontomys pixuna</i>	St S ^{ta} Cecília	Baturité	17/3/53
20.736	<i>Zigodontomys pixuna</i>	St. Santana dos Nóbregas	Pacoti	4/5/53
Bt. 52	<i>Oryzomys subflavus</i>	St. S ^{ta} Roza	Pacoti	sem data
20.701	<i>Oryzomys subflavus</i>	St. Santana dos Nóbregas	Pacoti	sem data
20.703	<i>Oryzomys subflavus</i>	Lc. Baturité	Baturité	sem data
Bt. 140	<i>Oryzomys subflavus</i>	St. Ouro	Pacoti	sem data
20.708	<i>Oryzomys subflavus</i>	St. Ouro	Pacoti	sem data
Bt. 199	<i>Oryzomys subflavus</i>	St. Santana dos Nóbregas	Pacoti	sem data
24.371	<i>Rattus n. norvergicus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	28/11/76
24.388	<i>Rattus n. norvergicus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	6/11/76
24.366	<i>Rattus n. norvergicus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	29/7/76
24.376	<i>Rattus n. norvergicus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	10/12/76
24.373	<i>Oryzomys lamia</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	25/6/76
24.074	<i>Oryzomys lamia</i>	sem registro	Ilha Grande	29/6/76
24.370	<i>Oryzomys lamia</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	26/11/76
24.075	<i>Oryzomys lamia</i>	sem registro	Ilha Grande	27/11/76
24.374	<i>Oryzomys lamia</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	23/6/76
24.390	<i>Oryzomys lamia</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	30/3/76
24.382	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	24/10/76
24.381	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	26/8/76
24.383	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	24/9/76
24.385	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	18/9/76
24.386	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	22/7/76
24.384	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	24/8/76
22.785	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	30/3/76
24.387	<i>Proechimys dimidiatus</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	21/8/76
31.562	<i>Phyllomys sp</i>	Praia Vermelha	Ilha Grande	27/6/76

Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz.

2.5. PREPARO DAS AMOSTRAS

Para evitar a contaminação das amostras de tecidos dos roedores da coleção do Museu com DNA contemporâneo, ao material "ancestral" foi dedicada atenção especial na manipulação. Este tipo de material pode apresentar contaminação em função do manuseio durante a captura dos animais, no processo de taxidermização, classificação e armazenamento ou, ainda, durante as fases de processamento laboratorial de extração e amplificação.

Os fragmentos de tecido dos roedores foram coletados no próprio Museu, com utilização de um par de luvas descartáveis na manipulação de cada exemplar, assim como lâminas de bisturi estéreis (novas) para a retirada de cada fragmento, que era colocado em tubos plásticos estéreis (frascos Eppendorf).

No fluxo laminar do laboratório, essas amostras eram colocadas individualmente, em placa de Petri também estéril para a retirada, com novas lâminas de bisturi, de fragmentos menores com peso de 25-30 mg para o processamento. Parte restante do fragmento foi mantida em separado no laboratório.

Adaptando procedimento descrito por Santos (1996), esses fragmentos na placa de Petri sofreram irradiação com lâmpada de luz ultravioleta (254 nm) por cinco minutos. Após a irradiação, esses pequenos fragmentos foram transferidos para novo tubo Eppendorf e guardados, em caixa de isopor apropriada, até o momento do isolamento do DNA.

2.6. ISOLAMENTO DO DNA

O isolamento e purificação do DNA total foi realizado com o kit comercial QIAamp Tissue Kit (QUIAGEN, CA, EUA) seguindo protocolo adaptado para extração de DNA de tecido parafinado.

O isolamento feito no fluxo laminar - após irradiação com lâmpada UV ao menos por 30 minutos - respeitava, como quantidade de amostras, de quatro até na máximo seis amostras para isolamento do DNA por vez, para diminuir o risco de contaminação durante a manipulação das amostras.

A cada fragmento de tecido do roedor no tubo Eppendorf eram adicionados 180 μ l de tampão ATL (*Tissue Lysis Buffer*) e 20 μ l de proteinase-K (25 mg/1,4 ml) para a lise completa do tecido. Após misturar no Vortex, era feita incubação a 55⁰C por 12 horas.

Após a incubação, eram adicionados 200 μ l do reagente AL (fornecido pelo kit) à solução que era misturada no Vortex. Procedia-se a uma nova incubação a 70⁰C por 10 minutos e, após, eram adicionados 210 μ l de Etanol a 100% seguindo homogeneização.

Toda a mistura era transferida para a coluna que deveria estar colocada em tubo de 2 ml (tubo e coluna do kit), para centrifugação a 1000 rpm por dois minutos (centrífuga Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). A coluna era transferida para novo tubo de 2 ml e o filtrado, descartado. Com essas etapas, todo o DNA do tecido ficava retido na coluna.

Para proceder à lavagem do DNA, por duas vezes na coluna eram adicionados 500 μ l do tampão de lavagem AW (Wash Buffer); centrifugação a 1000 rpm por dois minutos era efetuada e o filtrado, descartado.

Para eluir o DNA, eram adicionados à coluna 200 µl de água destilada ou 10 mM de Tris-HCl pH 9.0 pré-aquecidos a 70°C e observava-se uma incubação de cinco minutos a 70°C. A eluição era feita em duas vezes, centrifugando-se a 1000 rpm por dois minutos.

Em seguida, o DNA eluído era precipitado com 40 µl de acetato de sódio a 3 M e 880 µl de etanol a 100%, por 12 horas, à temperatura de -20°C. Após esse período de tempo, era realizada uma centrifugação com velocidade máxima de 14000 rpm, durante 30 minutos. Descartado o sobrenadante, o *pellet* era lavado duas vezes com 500 µl de etanol a 70% gelado, centrifugando-se por 10 minutos em velocidade máxima (14000 rpm). Depois de seco, o *pellet* era "ressuspendido" em 20 µl de TE (Tris-Edta) 10/1. As amostras de DNA eram estocadas a -20°C.

2.7. REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é usada para amplificar um segmento de DNA entre duas regiões de seqüência conhecida. Para isso, dois oligonucleotídeos (com seqüências diferentes e complementares) são usados como *primers* numa série de reações catalisadas pela DNA polimerase (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Na PCR *hot start* foram utilizados oligonucleotídeos (*primer A*: 5' (G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCCAACCCC e *primer B*: 5' GGGGTAGGGGCGTTCGCGAA) que anelam nas origens de replicação de ambas as fitas da molécula de DNA do minicírculo do cinetoplasto, amplificando a região conservada comum a todas as leishmanias, cuja seqüência é de, aproximadamente, 120 pares de base (pb) (FERNANDES *et al.*, 1996).

Usou-se na reação a *Taq* DNA polimerase uma enzima termoestável extraída da *Thermus aquaticus*, bactéria termofílica que cresce em água à temperatura de 70-75°C. Essa propriedade permite

sua atividade na temperatura de denaturação do DNA (94-95⁰C), o que simplificou a execução da PCR, já que, antes, o uso de *klenow* de *E. coli* exigia que, a cada ciclo de denaturação, mais enzima fosse adicionada (GELFAND, 1989; OSTE, 1989; SAMBROOK *et al.*, 1989).

A PCR foi realizada em local destinado exclusivamente para essa finalidade e em equipamento termociclador automático (Perkin Elmer - Gene Amp PCR System 2400; PE, Roche, Branchburg, NJ, EUA), obedecendo ao seguintes ciclos térmicos:

QUADRO 4. Ciclos térmicos da PCR

Temperatura	Tempo	Número
94° C	4 min	1 ciclo
94° C	30 seg	30 ciclos
50° C	30 seg	
72° C	30 seg	
72° C	7 min	1 ciclo

As misturas das soluções eram feitas em "capela" (MJ. Research, Inc.) após irradiação com luz ultravioleta por 30 minutos. Os conjuntos de pipetas eram exclusivos e não saíam de dentro da capela. As ponteiros com barreira e os tubos, obrigatoriamente, eram novos e autoclavados.

As soluções necessárias para cada reação eram preparadas em duas etapas, a primeira contendo 2,5 µl de tampão PE (PCR buffer-Perkin Elmer-PE, Branchburg, NJ, EUA), constituído por 10 mM de Tris-HCl, pH 8.3 e 50 mM de MgCl₂, 2,5 µl de dNTP (Pharmacia, Upsalla, Suécia) a 2 mM, 200 ng de *primers* e 16 µl de água. Após a mistura, os 24 µl dessa solução eram distribuídos nos tubos de PCR, aos quais se adicionava uma pérola de cera (Ampli-Wax[®] Perkin Elmer, Branchburg, NJ, EUA). Os tubos eram, então, submetidos à temperatura de 80° C por 5 minutos e a 4° C por mais cinco minutos, para dissolver e em

seguida solidificar a pérola de parafina, de maneira a criar dois compartimentos separados no tubo. Finalizada essa etapa, adicionava-se à parte superior do tubo a segunda mistura, agora contendo 2 µl de DNA, 2,5 µl de tampão PE, 2,5 µl de dNTP, 18,5 µl de água e 0,5 µl de Taq polimerase Perkin-Elmer. A reação era realizada em aparelho termociclador Perkin-Elmer 2.400. Após todos os ciclos, os produtos amplificados eram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma, St. Louis, IL, EUA) a 2% e corados pelo brometo de etídio (Sigma, St. Louis, IL, EUA), para visualização sob luz UV.

Em cada reação de PCR, além das amostras era feito também um tubo controle negativo, que continha a mesma mistura da reação, menos o DNA, que era substituído por 2 µl de água tri-destilada e um tubo controle positivo no qual era adicionado DNA de *Leishmania braziliensis* (IOC L566 MHOM/BR/75/M2903).

QUADRO 5. Componentes das soluções do PCR

Componentes	Solução 1	Solução 2
Tampão PE	2,5µl	2,5µl
dNTP (2mM)	2,5µl	2,5µl
<i>primer</i>	3µl	-
Taq polimerase	-	0,5µl
H ₂ O	16µl	18,5µl

2.8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Eletroforese através de gel de agarose é um método padrão usado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A concentração de agarose determina a densidade do gel e a formação de uma "malha" que influi, diretamente, na capacidade de migração das moléculas de DNA através do gel. A mobilidade

eletroforética do DNA também é afetada pela composição e força iônica do tampão utilizado, pela voltagem aplicada e pela temperatura da corrida.

Após a reação da polimerase em cadeia, 10 μ l dos produtos amplificados eram submetidos à eletroforese horizontal em minigel de agarose a 2%, com voltagem constante (70 V), à temperatura ambiente.

O gel era preparado com 1g de agarose (Sigma, St. Louis, IL, EUA), em 50 ml de Tris-borato (TBE 0,5 X, pH 8,0), aquecido em microondas até dissolução da agarose. A solução era, então, despejada na cuba, onde eram colocados os "pentos" para a marcação dos poços com capacidade de 12 μ l, até o endurecimento da matriz.

O tampão de eletroforese, preparado de acordo com Sambrook *et al.* (1989), era composto de 5,4g de Tris-base; 2,75 g de ácido bórico; 2,0 ml de EDTA 0,5M (pH 8) e água tridestilada para completar 1000 ml.

Adicionavam-se 10 μ l do produto da PCR a 2 μ l de corante (*tracking dye* tipo II constituído por 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol FF e 15% de Ficoll 400, Pharmacia Biotech, EUA) para a visualização da corrida. Essa mistura era pingada no gel. Cada corrida de eletroforese continha, além dos produtos de PCR (com controles positivo e negativo), um padrão marcador de peso molecular (50 Base-Pair Ladder, 1 μ g/ μ l, Pharmacia Biotech, EUA). À cuba era, então, aplicada corrente elétrica constante (70V), para a migração das moléculas de DNA através do gel.

Após a corrida o gel era corado com solução de brometo de etídio (Sigma, St. Louis, IL, EUA) numa concentração de 0,5 μ g/ml. O brometo de etídio é um corante fluorescente que se intercala entre as bases do DNA e, sob radiação ultravioleta permite a visualização e a

fotografia digital do DNA em aparelho UVP GDS 7.500 (Gel Documentation System, Califórnia, EUA).

2.9. TRANSFERÊNCIA DO DNA DO GEL PARA MEMBRANA DE NYLON

A transferência do DNA do gel de agarose para um suporte sólido (filtro de nitrocelulose ou membrana de nylon), descrita por Southern (1975), foi realizada pelo método de capilaridade seguindo protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989).

Os fragmentos de DNA eram carregados do gel através do fluxo do líquido de transferência (NaOH a 0,4N) em papel de filtro (Whatman 3MM) e depositados na superfície da membrana de nylon (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra). A transferência era realizada à temperatura ambiente, por 12 horas. Após secar, a membrana era submetida a uma radiação de UV (*crosslink* no aparelho Stratalinker[®] da Stratagene, EUA), para fixação do DNA.

2.10. DOT BLOTS

A técnica de *dot blot* consiste na imobilização do DNA na membrana de nylon em forma de ponto.

O DNA liga-se à membrana por interação eletrostática. Como o DNA possui, superficialmente, carga negativa, usa-se membrana de carga elétrica positiva. A completa imobilização dos ácidos nucleicos, após a transferência a vácuo dos produtos amplificados para a membrana de nylon, foi realizada utilizando-se radiação de UV (*crosslink* no aparelho Stratalinker[®] da Stratagene, EUA), para fixação do DNA.

Os produtos da PCR eram pingados diretamente sobre a membrana de nylon. A membrana, cortada do mesmo tamanho do

aparelho de *dot blot*, era pré-umedecida em água destilada, colocada sobre um papel de filtro do mesmo tamanho dentro do aparelho de *Dot Blot* ("Bio-Dot"- Bio-Rad Laboratories).

A preparação do produto da PCR para o *dot blot* consistia de uma denaturação: em 10 µl de cada produto amplificado, foram acrescentados 90 µl de água destilada. Esta solução, após fervura, era imediatamente transferida para o gelo e a ela era aplicada a solução denaturante de 0,4N de NaOH e 25 mM de EDTA.

A mistura denaturada dos produtos da PCR (100 µl) era colocada em cada *dot* sobre a membrana e a bomba de vácuo ligada. A membrana era lavada com 100 µl da solução denaturante, utilizando-se pipeta multicanal e aplicando-se um vácuo suave. Após seca em papel de filtro e exposta à UV, a membrana estava pronta para a hibridação com sondas de marcadores radioativos.

2.11 HIBRIDAÇÃO DO DNA DAS MEMBRANAS DE NYLON

A técnica de hibridação é importante para a confirmação dos resultados visualizados sob luz UV do gel de agarose corado pelo brometo de etídio e, também por aumentar o sinal dos produtos amplificados em cerca de 100 vezes (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As membranas eram colocadas em solução de BLOTTO a 60°C, por duas horas, para pré-hibridação. A solução de BLOTTO (Bovine lacto transfer technique optimizer) é composta de SSC 1,5 X (SSC 20X: citrato de sódio 0,3 M, cloreto de sódio 3,0 M), SDS 1% (lauril sulfato de sódio), NFM 0,5% (non fat milk - agente bloqueador).

A sonda (1 µl) usada era de minicírculo clonado de *Leishmania braziliensis* (IOC L566 MHOM/BR/75/M2903, RS, BR, PA Serra dos Carajás CL-27) e de *Leishmania amazonensis* (IOC L575 ISLA/BR/67/PH8,RS BRR, PA Utinga-27) (BOZZA *et al.*,

1995; FERNANDES *et al.*, 1996) marcadas com fósforo radioativo (α ^{32}P - dATP -800Ci/mmol) com um *primer* randômico (1 μl) e (7 μl) de água destilada, (3 μl) de DNTP 0,5 mM, (2 μl) de *buffer* 10X *Klenow* e 5U (1 μl) de *klenow* DNA polimerase (enzima DNA polimerase I de *Escherichia coli* "Large Fragment"). Após o preparo da sonda, ela era submetida a 95⁰C por cinco minutos (denaturação) e em seguida era imediatamente colocada em gelo. A sonda era, então, adicionada à solução de BLOTTO onde estavam as membranas. A hibridação se dava durante incubação a 60⁰C, durante 12 horas.

Após a hibridação, as membranas eram lavadas com uma solução de lavagem (SSC 1X, SDS 0,5% e água destilada), por duas vezes, em temperatura ambiente, e uma vez, a 60⁰C, por 30 minutos em banho-maria com agitação. Após as lavagens, a radiação era verificada com contador Geiger para se avaliar a necessidade ou não de outras lavagens.

As membranas, depois de secarem um pouco, eram envoltas em filme plástico e colocadas em chassi próprio para sensibilizar filme de Raio-X (Kodak-X-OMat[®]). A exposição era de, no mínimo, 12 horas, à temperatura de -70⁰C. Procedia-se à revelação manual do filme de RX em sala escura e verificação do sinal da hibridação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Modelo Experimental	26
2.2. Técnica de Taxidermia	27
2.3. Obtenção das Amostras dos Roedores do Museu Nacional	28
2.4. Seleção das Amostras	29
1. Local de captura.....	29
2. Espécie do roedor.....	29
3. Presença de lesão nos animais.....	29
4. Localização dos roedores no acervo.....	30
QUADRO 3. Relação dos roedores examinados do acervo museográfico com número de tombamento, espécie e local, região e data da captura.....	31
ESPÉCIE	31
REGIÃO	31
2.5. Preparo das Amostras	32
2.6. Isolamento do DNA	33
2.7. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	34
QUADRO 4. Ciclos térmicos da PCR.....	35
QUADRO 5. Componentes das soluções do PCR.....	36
2.8. Eletroforese em Gel de Agarose	36
2.9. Transferência do DNA do Gel para Membrana de Nylon	38
2.10. Dot Blots	38
2.11 Hibridação do DNA das Membranas de Nylon	39

3. RESULTADOS

3.1. MODELO EXPERIMENTAL

Para avaliar a eficiência da técnica de PCR em animais taxidermizados, foi montado um protocolo experimental com camundongos inoculados com *L. amazonensis*. Dos fragmentos de tecido retirados do local de inoculação foi feita extração do DNA e, após PCR e eletroforese em gel de agarose, foram visualizadas bandas de DNA do tamanho esperado, 120 pb, independente de o processo de taxidermização ter sido feito com ou sem o arsênico. A PCR foi também positiva em amostra retirada de local diferente da inoculação (orelha). O DNA extraído de pele de camundongos controles (não infectados com *Leishmania*), taxidermizados, com ou sem arsênico, foram negativos. Esses resultados são resumidos no Quadro 6. A hibridação com sonda de *L. amazonensis* confirmou a natureza das bandas observadas ao gel de agarose e o controle negativo da reação, representado pela ausência de DNA (Figura 1).

QUADRO 6. Resultados da PCR dos camundongos taxidermizados com ou sem arsênico utilizados no modelo experimental.

Camundongo	Presença (+) ou ausência (-) de Arsênico	PCR
1 - infectado	+	Positivo
2 - infectado	+	Positivo
3 - infectado	+	Positivo
4 - infectado	+	Positivo
5 - infectado	+	Positivo
6 - infectado	+	Positivo
7 - infectado	+	Positivo
8 - infectado	+	Positivo
9 - infectado	-	Positivo
9 - infectado, área não inoculada	+	Positivo
10- sadio	+	Negativo
11- sadio	-	Negativo

3.2. ROEDORES DO MUSEU NACIONAL

Trinta e nove animais foram selecionados dentro do acervo do Museu Nacional. Dos 20 animais examinados procedentes de Baturité, apenas um *Oryzomys subflavus* apresentava alteração de tegumento, enquanto um *Oryzomys lamia* e um *Proechimys dimidiatus*, da Ilha Grande, apresentavam lesão de pele.

Um total de 117 fragmentos de pele foram retirados dos 39 animais, sendo processados 105, correspondentes a pelo menos um fragmento de cada animal, para extração do DNA e realização da PCR.

Todas as amostras oriundas da Praia Vermelha (Ilha Grande, Angra dos Reis) foram negativas ao PCR e à hibridação, seja com sonda de *L. (V.) braziliensis* ou de *L. (L.) amazonensis* (Figura 2a e b).

No caso de Baturité, verificou-se, em fragmentos de pavilhão auricular de dois roedores (um *Thrichomys apereoides* -MN.21.880- e um *Oryzomys subflavus* -Bt.6), a presença de bandas fracas no gel de agarose. A hibridação identificou o DNA como sendo *L. (L.) amazonensis*. Em nenhuma amostra houve hibridação com sonda de *L. braziliensis*.

O *Thrichomys apereoides* (MN.21.880) foi capturado em Uirapurú, em 26/2/53, e o *Oryzomys subflavus* (Bt.6), foi capturado em 6/3/53, na localidade de Labirinto. Ambos os roedores são de áreas de pedreira na serra de Baturité, como pode ser visto nas fichas de captura (Figura 3) e no mapa detalhado do município (Figura 4).

**FIGURA 2.**

A) Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR de amostras de Ilha Grande (painel esquerdo, 1-8) e Baturité (painel direito, 1-8). CN: controle negativo (ausência de DNA) e CP: controle positivo (L566-*L. braziliensis*).

B) Hibridação em *dot blot* com sonda de *L. amazonensis* dos produtos do painel superior direito (amostras de Baturité).

3. RESULTADOS	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
3.1. Modelo Experimental	41
QUADRO 6. Resultados da PCR dos camundongos taxidermizados com ou sem arsênico utilizados no modelo experimental.	41
FIGURA 1. Hibridação com sonda de <i>L.(.) amazonensis</i>	412
3.2. Roedores do Museu Nacional	43
FIGURA 2. Gel de agarose de amostras de Ilha Grande e Baturité	414
FIGURA 3. Fichas catalográficas	415
FIGURA 4. Representação esquemática das localidades estudadas	416

4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, através da PCR, a presença de DNA de *L. amazonensis* em dois espécimes de museu de roedores (*Thrichomys apereoides* e *Oryzomys subflavus*) que foram coletados em 1953, na região da serra de Baturité, no Estado do Ceará. O encontro de *L. amazonensis* em roedores não é propriamente um fato inusitado. Muitos autores como Lainson & Shaw (1968, 1973) e Tolezano *et al.* (1988) já haviam demonstrado. No entanto, essa é a primeira vez que se caracteriza *L. amazonensis* em roedores de coleção museográfica e amplia o potencial da reação da polimerase em cadeia para o estudo de espécimes de museu.

A PCR como teste de diagnóstico na leishmaniose possui alta sensibilidade e especificidade (BARKER *et al.*, 1991; DEGRAVE *et al.*, 1994). A reação é capaz de detectar menos que 10 fentogramas de DNA do cinetoplasto de um único parasito (BRUIJN & BARKER, 1992; RODGERS *et al.*, 1990) e, portanto, com resultados muito superiores às técnicas convencionais (LOPEZ *et al.*, 1993; MEREDITH *et al.*, 1993; ANDRESEN *et al.*, 1996). Como os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho amplificam a região conservada do minicírculo do gênero *Leishmania*, a identificação da espécie necessitou da hibridação como técnica adicional. Os resultados mostraram que os produtos amplificados não hibridaram com sonda que identificaria o subgênero *Viannia*, mas apenas com sonda de *L. amazonensis*. A técnica de hibridação, portanto, foi importante para a confirmação e a identificação da natureza dos produtos amplificados pela PCR.

Os cuidados referentes à contaminação com produtos pré-amplificados no desenvolvimento do método foram preocupação constante nesta pesquisa, principalmente pela natureza do material utilizado que poderia contaminar-se, durante o processamento de extração, com DNA contemporâneo (HUMMEL & HUMMEL, 1994;

HAUSWIRTH, 1994; PÄÄBO, *et al.*, 1989). Para se obter então, a garantia de que o produto amplificado era realmente procedente do animal, utilizamos radiação ultravioleta nos fragmentos de tecido taxidermizado antes de seu processamento (SANTOS, 1996). Além disso, todos os isolamentos foram realizados num único local, em sala destinada para este fim, durante um período em que apenas este material foi trabalhado.

Foram observados os critérios de segurança e autenticidade de *ancient DNA* sugeridos por Handt *et al.* (1994) que incluem: 1) a separação física no laboratório para se extrair e amplificar *ancient DNA*; 2) medidas preventivas de controle da contaminação originada do investigador ou de produtos pré-amplificados, como uso de roupas apropriadas, equipamentos e reagentes utilizados exclusivamente para a extração, radiação diária de luz ultravioleta, limpeza das bancadas e equipamentos com solução de hipoclorito de sódio a 5%, uso de água esterilizada e sistema de ventilação apropriado; 3) controles para monitorar contaminação como extração e amplificação de duas amostras, uma sem inclusão de material com DNA - controle negativo - e outra com DNA conhecido para ser controle positivo da reação. 4) Ao menos duas extrações por amostras devem ser realizadas em diferentes momentos e, preferencialmente, de duas partes diferentes da amostra, o que deve levar a resultados idênticos.

Uma das maiores críticas que se pode fazer ao método da PCR como diagnóstico de uma infecção é se a mera presença de DNA implicaria na presença do parasito *per se*. Essa questão surge sobretudo nos casos onde o parasito é difícil de ser detectado, seja pela rareza dos parasitas nas lesões, seja pela dificuldade de isolamento em meios de cultivo, dados que são particularmente marcantes na leishmaniose causada por espécies do subgênero *Viannia*. Exatamente por isso é que se tem lançado mão da PCR para o diagnóstico. Os trabalhos que utilizaram a PCR como técnica diagnóstica têm

encontrado excelente correlação com os resultados obtidos pelas técnicas convencionais de visualização do parasito (RODRIGUEZ *et al.*, 1994; WINCKER *et al.*, 1994 a,b).

Em trabalhos que tentaram avaliar a cura parasitológica da leishmaniose após terapêutica com antimoniais, verificou-se a presença de DNA parasitário em 70% de cicatrizes, algumas de até oito anos de evolução, sem reativação ou desenvolvimento de forma mucosa. O isolamento do parasito em cultura de duas dessas cicatrizes indica que a detecção do DNA parasitário pela PCR deve refletir a presença real do parasito na lesão, e não apenas fragmentos de DNA parasitário (HADDAD, 1997; SCHUBACH *et al.*, 1997).

Assumindo-se que os resultados positivos pela PCR neste trabalho indicam a presença do parasito vivo nas lesões, surge outra pergunta: esses roedores representariam um reservatório de *L. (L.) amazonensis* na área?

Considera-se como reservatório qualquer ser humano, animal, artrópode, planta, solo ou matéria, ou uma combinação desses, onde um agente infeccioso vive e se multiplica, do qual dependa a sua sobrevivência, e onde se reproduza de maneira que possa ser transmitido a um hospedeiro suscetível (OMS, 1986).

A incriminação de um determinado reservatório de *Leishmania* exige a demonstração de que a população parasitária precisa daquele mamífero em particular para a manutenção da infecção. Cinco são os critérios que caracterizam um reservatório primário: 1) superposição da distribuição geográfica e temporal dos reservatórios e vetores; 2) sobrevivência do hospedeiro reservatório suficientemente longa para garantir a transmissão; 3) prevalência da infecção entre os reservatórios em níveis superiores a 20%; 4) manutenção do parasito na pele ou sangue em quantidades suficientes para infectar facilmente o vetor e 5) a espécie de parasito encontrada no reservatório e no

homem ser a mesma (CHABLE-SANTOS *et al.*, 1995). Por outro lado, de acordo com Shaw (1988), os hospedeiros podem ser classificados em três tipos: 1) reservatório primário, onde o hospedeiro é responsável pela manutenção do ciclo do parasito em natureza; 2) reservatório secundário, em que o hospedeiro infectado serve como fonte de infecção para o vetor mas não é capaz de manter o ciclo indefinidamente e 3) hospedeiro acidental, aquele que se infecta mas não representa fonte de infecção.

Para que um parasito se mantenha na natureza, a taxa de reposição da população de suscetíveis, principalmente no período epidêmico, teria que ser suficientemente rápida e a taxa de reprodução do parasito não pode ser menor que 1. A taxa básica de reprodução da doença é crucial não apenas na determinação da condição da persistência da doença (portanto também da erradicação da doença) mas também na determinação de aspectos da epidemiologia no período interepidêmico (SMITH, 1983).

A prevalência da leishmaniose está relacionada a certos aspectos ecológicos de seus transmissores e reservatórios silvestres (FALQUETO, 1986). A infecção natural com *Leishmania* é comum entre marsupiais, edentados, roedores, alguns carnívoros e primatas, incluindo o homem (LAINSON & SHAW, 1992; LAINSON, 1983). Entre 43 espécies de mamíferos encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania*, 27 pertencem à ordem Rodentia (LAINSON & SHAW, 1979; BARBOSA, 1985).

A *L. amazonensis* possui ciclo predominantemente silvestre, que se estabelece em roedores, acometendo o homem em raras ocasiões já que seu vetor, *Lutzomyia flaviscutellata*, tem baixa antropofilia (LAINSON, 1983; MARSDEN, 1994), vôo baixo, hábitos noturnos e pode ser encontrado tanto em floresta tropical primária quanto em floresta

secundária densa de árvores baixas, que surge após o desmatamento (SHAW & LAINSON, 1987).

Embora seja raro em humanos, e com característica focal com áreas descritas no Pará, Bahia, Ceará e Goiás, a *L. amazonensis* é capaz de produzir largo espectro de manifestações clínicas em humanos incluindo leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa, mucocutânea ou mesmo visceral (BARRAL *et al.*, 1991; SILVEIRA *et al.*, 1991). Além de poder apresentar quadro clínico polimórfico, pode também estar associada a outras espécies de *Leishmania* o que traduz a dificuldade de se diferenciar os parasitos com base apenas nos sinais clínicos (BARRAL *et al.*, 1986).

Duas foram as espécies de roedores positivos para *L. amazonensis* neste estudo: *Oryzomys subflavus* e *Thrichomys apereoides*. O *Oryzomys subflavus* é um pequeno roedor cujo tamanho varia entre 93-203 mm, com comprimento de cauda entre 75-251 mm e peso normalmente entre 40-80 g. Conhecido vulgarmente como rato-de-arroz, pode viver em grande variedade de habitats incluindo florestas, pântanos, capinzais, em partes úmidas das florestas. No nordeste brasileiro é essencialmente comensal e sua distribuição acompanha a cana-de-açúcar. Já o gênero *Thrichomys*, com sua única espécie *T. apereoides*, ocorre no nordeste do Brasil e no Paraguai. Conhecido como Punaré, habita áreas rochosas e de vegetação densa, vive em fendas ou debaixo de rochas ou sob plantas suculentas como cactus. Seu tamanho pode alcançar 200-290 mm, com comprimento de cauda de 180-220 mm e pesar de 300-450 g (NOWAK, 1991).

Esses roedores positivos foram capturados em 1953, em áreas de pedreira na região serrana de Baturité-CE, nas localidades de Uirapurú e Labirinto que, no estudo de Valim (1993), foram consideradas áreas

de floresta com notificação de 14 casos de leishmaniose no período de 1977-1980 e um caso em Labirinto entre 1985-1987.

Embora em 1993, Vasconcelos *et al.* tenham caracterizado em investigação de campo em Baturité, *L. braziliensis* em roedores, cães e flebótomos, vale a pena assinalar que este mesmo autor (VASCONCELOS *et al.*, 1988), em estudo clínico e epidemiológico, já teria relatado um caso humano causado por *L. amazonensis* em Maranguape, outro município cearense que está situado entre Baturité e Fortaleza.

O Ceará é um dos estados que tem contribuído com a maior parte dos casos de leishmaniose tegumentar no Brasil. Possui provavelmente peculiaridades de características paisagísticas e de ocupação do espaço que favorece a transmissão da doença. Dentre os municípios cearenses, o que mais produz casos de LTA é Baturité. O primeiro caso de LTA no município de Baturité foi diagnosticado em 1939 pelo Serviço Sanitário do Estado (VALIM, 1993).

A ocupação do Estado do Ceará, intimamente ligada à história econômica, se inicia com a cultura do açúcar no litoral do nordeste no período colonial, com expansão em direção ao interior em busca de ouro, aldeamento de índios e pecuária extensiva para abastecer os engenhos de açúcar do litoral formando uma cultura de subsistência nas franjas da agricultura açucareira e nas cidades do litoral. Com o declínio do açúcar, e o surgimento do ciclo do ouro em Minas Gerais, cresce a pecuária cearense (indústria de charque) e o importante aumento dos alimentos de subsistência particularmente em áreas de pés-de-serra e chapada onde as condições de agricultura são mais favoráveis. No final do século XVIII há um grande fluxo migratório para outras regiões dado o crescimento da indústria de carne do sul do país, até a implantação no século XIX da cultura do algodão, cuja decadência determina novo refluxo para a produção de subsistência. A partir de

1930, com agravamento em 1950 começa a crise econômica do Estado agravada pela intensa seca (TOLEDO, 1996).

Essas mudanças econômicas produzem profundos reflexos na modificação da paisagem produzindo impactos ambientais perfeitamente capazes de alterar o perfil epidemiológico e a distribuição de doenças que sofram influências do ambiente ou de características zoonóticas.

Essa variação da paisagem com múltiplos habitats permite o desenvolvimento e interação de numerosas populações de animais, inclusive de parasitos, multiplicando a possibilidade de infecções eventuais e adaptação dos parasitos a novos hospedeiros (ROSICKY, 1967).

A persistência da endemia em região com população assentada e cobertura vegetal muito modificada pelo trabalho humano autoriza a hipótese de existir um ou mais ciclos de transmissão de leishmaniose tegumentar distintos dos descritos nas frentes agrícolas pioneiras (SABROZA, 1983).

Baturité é um município cearense situado a 105 km de Fortaleza em região de serra onde a temperatura média anual é de 27°C, com grande plantação de bananas. Pelas peculiaridades da região e forma de ocupação do espaço, o município possui grande variabilidade paisagística.

A LTA sofre influências diretas do ambiente (físico, social e biológico) sobre seu potencial de transmissibilidade. Assim, podemos dizer que mesmo em regiões geográficas diferentes, caso ocorra convergência de fatores ambientais, pode levar a formação de um micro-foco ideal que garanta a permanência da transmissão.

Valim (1993) indica que diversos fatores sugerem que os roedores são os reservatórios responsáveis pelo ciclo peridomiciliar. Um deles

seria o ciclo temporal que aparentemente ocorre tanto com leishmaniose humana, quanto com as populações de flebotomíneos. Um aumento ou decréscimo da população de flebótomos, como relatado por Gomes e Galati (1987) provavelmente deve estar associado a um aumento paralelo de fontes alimentares.

Neste estudo não obtivemos resultado positivo nos animais oriundos da Ilha Grande, área onde a transmissão de leishmaniose é bastante conhecida. A Praia Vermelha no distrito de Araçatiba em Ilha Grande, fica distante 17 km da sede do município de Angra dos Reis no Estado do Rio de Janeiro. De clima quente e úmido, registra índice pluviométrico anual maior a 2000 mm. ARAÚJO FILHO (1978) detectou nesta localidade, roedores positivos para *Leishmania sp*, no entanto, os roedores capturados nessa área e utilizados neste estudo foram todos negativos na PCR e hibridação mas, é possível que ao se continuar a investigação, aumentando a amostra, chegar-se-á a um resultado positivo já que a área é de alta endemicidade.

A aplicação das técnicas da Biologia Molecular tem trazido relevantes informações para o estudo das relações filogenéticas e distribuição dos agentes etiológicos a ponto dos novos recursos metodológicos servirem de ferramenta na constituição de uma "Epidemiologia Molecular" como visto por exemplo nos trabalhos desenvolvidos por Bonfante-Garrido *et al.* (1992), Felinto de Brito *et al.* (1993) e Momen *et al.*(1993).

São grandes as suas possibilidades de emprego no campo da Epidemiologia Histórica. Muitos pesquisadores vêm adaptando e empregando essas técnicas em seus trabalhos de reconstrução da história das doenças. Como exemplo, podemos citar o trabalho de Persing (1990) que permitiu a demonstração de *Borrelia* em espécimes de carrapatos de museu permitindo assegurar a presença de espiroquetas no passado, 30 anos antes da artrite de Lyme ser

identificada como uma doença clinicamente distinta nos residentes de Lyme, Connecticut nos Estados Unidos.

Numa perspectiva histórica também poderá ser estudado os mecanismos que exercem influência na emergência de doenças.

Os resultados deste trabalho fortalecem a possibilidade da aplicação desta técnica de diagnóstico em material antigo ampliando um leque de novas possibilidades de estudos epidemiológicos de distribuição espaço e tempo e de associações hospedeiro-parasito enriquecendo a Paleoepidemiologia no rumo da Paleoepidemiologia Molecular.

5. PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a presença de DNA de *L. amazonensis* em dois espécimes de museu de roedores (*Thrichomys apereoides* e *Oryzomys subflavus*).

Esse resultado reforça o potencial da reação da polimerase em cadeia para o estudo de espécimes de museu, que pode vir a favorecer não somente a reconstrução histórica de doenças mas também sua aplicação em estudos retrospectivos.

Além disso, a amplificação de DNA a partir de amostras preservadas em museus acena para a possibilidade de comparar variações genéticas de coleções zoológicas e arqueológicas com as populações atuais.

No caso particular da LTA, nosso achado estimula a continuação da busca, por exemplo, dos reservatórios primários da *L. braziliensis*, uma vez que esses, apesar das muitas tentativas de vários pesquisadores, ainda permanecem desconhecidos.

4 DISCUSSÃO.....	47
5. PERSPECTIVAS	56

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRESEN, K., GAAFAR, A., EL-HASSAN, A. M., ISMAIL, A., DAFALLA, M., THEANDER, T.G. & KARAZMI, A., 1996. Evaluation of the polymerase chain reaction in diagnosis of cutaneous leishmaniasis due *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90: 133-135.
- ARAÚJO FILHO, N.A., 1978. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro - estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro: ENSP.
- ARAÚJO, A.J.G. & FERREIRA, L.F., 1992. Paleopatologia e Paleoparasitologia - Estudos multidisciplinares. Rio de Janeiro: Panorama.
- AZULAY, R.D., 1952. Leishmaniose Tegumentar. Tese de Livre-Docência da Clínica Dermatológica e Sifiligráfica da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Distrito Federal. Rio de Janeiro.
- BARBOSA, F.S., MELLO, D., COURA, J.R., 1970. Nota sobre a infecção natural de roedores por *Leishmania sp* nos limites dos municípios Teresópolis-Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, IV (2): 113-115.
- BARBOSA, M.D.M. S., 1985. Roedores da região neotropical e patógenos de importância para o homem. São Carlos: UFSCar.
- BARKER D., BRUIJN, M., ERESH, S., SMYTH, A., 1991. Diagnosis of leishmaniasis using PCR on parasite DNA extracted from human biopsy samples, aspirates, sandflies and culture. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 86 (Suppl I):73-74.
- BARRAL, A. BADARÓ, R., BARRAL-NETO, M., GRIMALDI JR., G., MOMEN, H., CARVALHO, E.M., 1986. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case

of american visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35(4): 732-734.

BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JR., G., MOMEN, H., McMAHON-PRATT, D., JESUS, A.R., ALMEIDA, R., BADARÓ, R., BARRAL-NETO, M., CARVALHO, E. M., JOHNSON JR., W.D., 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 44(5): 536-546.

BASTOS, J.M., 1978. Observações à margem de surto epidêmico de leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira (São Paulo, 1978). Boletim da Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária, XXXVII - 1/4: 73 - 86.

BASTOS, O.M., ARAÚJO, A., FERREIRA, L.F., SANTORO, A., WINCKER, P., MOREL, C.M., 1996. Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanossoma cruzi* DNA in desiccated mouse tissue. Paleopathology Newsletter (pré-print), p.5-8.

BONFANTE-GARRIDO, R., MELENDEZ, E., BARROETA, S., DEALEJOS, M. A.M., MOMEN, H., CUPOLILLO, E., McMAHON-PRATT, D., GRIMALDI, G., 1992. Cutaneous leishmaniasis in westerns Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene: 86: 141-148.

BOZZA, M., FERNANDES, O., DEGRAVE, W., LOPES, U., 1995. Characterization of "Old World" *Leishmanias* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene: 89, 333-334.

BRUIJN, M.H.L., BARKER, D.C., 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica, 52: 45-58.

- BRUMPT, E. & PEDROSO, A., 1913. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo (Brasil). Anuário Paulista de Medicina e Cirurgia, 1: 97 - 136.
- BUIKSTRA, J., COOK, D.C., 1992. Paleoparasitologia. *In: Paleopatologia e Paleoepidemiologia - Estudos multidisciplinares* (ARAÚJO, A. J. G., FERREIRA, L. F., org.). Rio de Janeiro: Panorama, p. 41- 70.
- CHABLE-SANTOS, J.B., WYNSBERGHE, N.R.V., CANTO-LARA, S.B., ANDRADE-NARVAEZ, F.J., 1995. Isolation of *Leishmania (L.) mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 53(2): 141-145.
- COOPER, A. 1994. DNA from museum specimens. *In: Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens* (HERRMANN, B., HUMMEL, S., ed.), p.149-165, New York: Springer Verlag.
- DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U., 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 89(3): 463-469.
- FALQUETO, A., 1984. Leishmaniose tegumentar em Viana, Estado do Espírito Santo: investigação sobre a infecção natural em animais e sua relação com a ocorrência da doença humana. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 135p.
- FALQUETO, A., COURA, J. R., BARROS, G. C., GRIMALDI, G., SESSA, P.A., JESUS, A.C., ALENCAR, J.T.A., 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de

Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 81(2): 155-163.

FELINTO DE BRITO, M.E., BRANDÃO, S.P., SALLES, N.R., CUPOLILLO, E., GRIMALDI JÚNIOR, G., MOMEN, H., 1993. Human cutaneous leishmaniasis due to new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 88(4): 633-634.

FERNANDES, O., BOZZA, M., PASCALE, J., MIRANDA, A., LOPES, U., DEGRAVE, W., 1996. An oligonucleotide probe from kDNA Minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 91(3): 279-284.

FERREIRA, L.F.; ARAÚJO, A. & CONFALONIERI, U., 1988. Paleoparasitologia no Brasil. PEC/ENSP, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FORATTINI, O.P., 1960. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, 2(4): 195-203.

FORATTINI, O.P., PATTOLI, D.B.G., RABELLO, E.X., FERREIRA, C.A., 1972. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, 6: 255-261.

FORATTINI, O.P., PATTOLI, D.B.G., RABELLO, E.X., FERREIRA, C.A., 1973. Nota sobre a infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, 7: 181-184.

FREITAS, C.A., 1988. Histórias da peste e de outras endemias. Rio de Janeiro: PEC/ENSP.

GELFAND, D.H., 1989. *Taq* DNA Polimerase. In: PCR technology. Principles and applicatios for DNA amplification. (Henry A. Erlich, ed.), p. 17-22, New York: Stockton Press.

- GOMES, A.C., & GALATI, E.A.B., 1987. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana: 5- Estratificação da atividade espacial e estacional de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultivo agrícola da região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 82: 467-473.
- GRIMADI, G. & TESH, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiological Review, 6: 230-250.
- GRIMALDI, G.Jr., 1982. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 77(2): 195 - 215.
- GRIMALDI, G., TESH, R.B., MACMAHON-PRATT, D., 1989. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 41(6): 687-725.
- GRMEK, M.D., 1995. Declin et emergence des maladies. História, ciências e saúde - Manguinhos, II (2): 9-32.
- GUIMARÃES, F.N., AZEVEDO, M., DAMASCENO, R., 1968. Leishmaniose tegumentar - zoonose de roedores silvestres na Amazônia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 66(2): 151-168.
- HADDAD, F., 1997. Detecção de DNA de *Leishmania* através da técnica de reação polimerásica em cadeia (PCR) em biopsias de pacientes antes e após tratamento específico. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.
- HANDT, O., HÖSS, M., KRINGS, M., PÄÄBO, S., 1994. Ancient DNA: methodological challenges. Experientia, 50:524-529.
- HAUSWIRTH, W.W., 1994. Ancient DNA: an introduction. Experientia, 50: 521-523.

- HERRER, A., CHRISTENSEN, H.A., 1976(a). Epidemiological patterns of mucocutaneous leishmaniasis in Panama. I. Epidemics among small groups of settlers. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 70: 59-65.
- HERRER, A., CHRISTENSEN, H.A., 1976(b). Epidemiological patterns of mucocutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 25: 54-58.
- HERRMANN, B., HUMMEL, S., 1994. Introduction. *In: Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens* (HERRMANN, B., HUMMEL, S., ed.), p. 1-12, New York: Springer Verlag.
- HERTIG, M., FAIRCHILD, J.B., JOHNSON, C.M., 1967. *Leishmania* transmission: reservoir project. Ann. Rep. Gorgas Mem. Lab., p. 9-11.
- HIGUCHI, R., BOWMAN, B., FREIBERGER, B., RYDER, O.A., WILSON, A.C., 1984. DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. Nature, 312: 282-284.
- HOARE, C.A., WALLACE, F.C., 1966. Developmental stages of typanosomatid flagellates: a new terminology. Nature, 212: 1358-1386.
- HÖSS, M., 1995. Ancient DNA. Hormonal Research 43: 118-120.
- HUMMEL, S. & HUMMEL, B., 1994. General aspects of sample preparation. *In: Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens* (HERRMANN, B., HUMMEL, S., ed.), p.59-68, New York: Springer Verlag.
- LAINSON, R., & SHAW, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *In: The Leishmaniasis in Biology and*

Medicine. (PETERS & KILLICK-KENDRICK, eds.), p. 1-119. London: Academic Press.

LAINSON, R., 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77: 569-596.

LAINSON, R., 1988. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the american leishmaniasis. *In*: Demography and vector-borne disease. (Ed. M.W. Service). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., p.85-106.

LAINSON, R., SHAW, J.J., 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for Advancement of Science), 44(2/3).

LAINSON, R., SHAW, J.J., 1972. Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. British Medical Bulletin, 28: 44-48.

LAINSON, R., SHAW, J.J., 1973. Leishmaniasis and leishmanias of the New World, with particular reference to Brazil. Bulletin of the PanAmerican Health Organization, 7:1-19.

LAINSON, R., SHAW, J.J., 1979. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. *In*: Biology of the Kinetoplastida (LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A., eds.), p. 1-116. London: Academic Press.

LAINSON, R., SHAW, J.J., 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of disease in Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 89(3): 435-443.

LAINSON, R., SHAW, J.J., 1968. Leishmaniasis in Brazil. II. Observations on enzootic leishmaniasis in the lower Amazon Region – The feeding habits of the vector *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 62: 396-405.

- LOPEZ, M., INGA, R., CANGALAYA, M., ECHEVARRIA, J., LLANOS-CUENTAS, A., ORREGO, C., & AREVALO, J., 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 49(3): 348-356.
- LUTZ, A., 1913. Discussão na Sociedade Brasileira de Dermatologia. Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia. 1: 27.
- MARSDEN, P.D., 1994. Endemic leishmaniasis in Brazil: future implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 89(3): 425-426.
- MENDONÇA DE SOUZA, S.M.F., 1996. Anemia e adaptabilidade em um grupo costeiro pré-histórico: uma hipótese patocenótica. Simpósio Salud y Enfermedad de las poblaciones Aborígenes y Cosmopolitas de América, IV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología, Buenos Aires.
- MEREDITH, S.E.O., ZIJLSTRA, E.E., SCHOONE, G.J., KROON, C.C. M., VAN-EYS, G.J.J.M., SCHAEFFER, K.U., EL-HASSAN, A.M., LAWYER, P.G., 1993. Development and application of polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. Archives of the Institute Pasteur Tunis, 70(3-4): 419-431.
- MOMEN, H., PACHECO, R. S., CUPOLILLO, E., GRIMALDI, G.Jr., 1993. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. Biological Research, 26: 249-255.
- MOOJEN, J., 1943. Captura e preparação de pequenos mamíferos para coleções de estudo. [Manuais do Museu Nacional, série A, n. 1]. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.
- MORAN, E.F., 1994. Adaptabilidade Humana: Uma Introdução à Antropologia Ecológica. São Paulo: Edusp.

- NOWAK, R.M., 1991. Walke's Mammals of the World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, fifth edition, vol.II.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD, 1990. Lucha contra las leishmaniasis. [Serie Informes Tecnicos, 793]. Ginebra: OMS.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1986. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Publicación científica 503. Segunda edicion. Washington: OPS/OMS.
- OSTE, C., 1989. PCR automation. *In: PCR technology . Principes and applicatios for DNA amplification*. (Henry A. Erlich, ed.), p. 23-30, New York: Stockton Press.
- PÄÄBO, S., 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. Nature, 314: 644-645.
- PÄÄBO, S., 1993. Ancient DNA. Genetic information that had seemed lost forever turns out to linger in the remains of long-dead plants and animals. Evolutionary change can at last be observed directly. Scientific American, p. 60 - 66.
- PÄÄBO, S., HIGUCHI, R.G., WILSON, A.C., 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. The Journal of Biological Chemistry, 264(17): 9709-9712.
- PAVLOVSKY, Y.N., 1963. Human diseases with natural foci. Moscow: Foreing language publishing house.
- PERSING, D.H., TELFORD III, S.R., RYS, P.N., DODGE, D.E., WHITE, T.J., MALAWISTA, S.E., SPIELMAN, A., 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Museum Specimens of *Ixodides dammini* Ticks. Science, 249: 1420-1423.
- PESSOA, S.B. & BARRETO, M. P., 1948. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Educação e Saúde. 527p.

- PIARROUX, R. AZAIEZ, R., LOSSI, A. M., REYNIER, P., MUSCATELLI, F., FONTES, M., DUMON, H., QUILICI, M., 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 49(3): 364-369.
- RABELLO, E., 1925. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil .I - Origens, históricos, sinonímia. Anuário Brasileiro de Dermatologia e Sifigrafia. 1:3-29.
- RANGEL, E.F., 1995. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Tropical diseases, society and the environment. Proceedings from reserch seminary. Conference reports, Sarec documentation.
- RIOUX, J.A., LANOIIE, G., SERRES, F., PRAILONG, F., BASTIAN, P., PERIERES, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Annals of Parasitological and Human Compendium, 65: 111-125.
- RODGERS, M.R., STEPHEN, J. POPPER, WIRTH, D., 1990. Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Experimental Parasitology, 71: 267-275.
- RODRÍGUEZ, N., GUZMAN, B., RODAS, A., TARIFF, H., BLOOM, B.R., CONVIT, J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 32(9): 2246-2252.
- ROSICKY, B., 1967. Natural foci of diseases. *In*: Infectious diseases: their evolution and erradication (Cockburn, A., ed.), p.108-126, Charles N. Thomas Publishers.
- ROSSETTI, M.L.R., 1996. Célula e seus constituintes moleculares. *In*: Biologia Molecular Básica . (Arnaldo Zaha, coord.) , Porto Alegre: Mercado Aberto.

- SABROZA, P.C., 1981. O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, município do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: ENSP.
- SABROZA, P.C., 1983. Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana no Rio de Janeiro. Relatório de Pesquisa, Ministério da Saúde.
- SAF'JANOVA, V.M., 1971. Leishmaniasis control. Bulletin of the World Health Organization, 44: 561-566.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLINS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230: 1350-1354.
- SALLENAVE, S.L., VALIM, C., *et.al.*, 1990. Specific kinetoplast DNA probes in the detection of *Leishmania* in vertebrate and invertebrate hosts. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Suppl. I, 85, p. 29.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning - a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second edition.
- SAMPAIO, L.F., 1951. O aparecimento, a expansão e o fim da leishmaniose na Estado de São Paulo. Revista Brasileira de Medicina, 8: 717-721.
- SANTOS, A.K.C.R., 1996. Diversidade de linhagens do DNA mitocondrial de Ameríndios da Amazônia: populações contemporâneas e ancestrais. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.
- SCHRANK, A., 1996. Estrutura dos ácidos nucleicos. *In*: Biologia Molecular Básica. (Arnaldo Zaha, coord.), Porto Alegre: Mercado Aberto.

- SCHUBACH, A., MARZOCHI, M.C.A., CUZZI-MAYA, T., OLIVEIRA, A.V., ARAÚJO, M.L., COUTINHO, S.G. , MARZOCHI, K.B.F., 1997. Cutaneous scars in American tegumentar leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability 11 years after antimonial therapy and clinical cure. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, no prelo.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R., 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London. Academic Press.
- SHAW, J.J., 1988. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situation and their importance in the epidemiology of the disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 83: 486-490.
- SHAW, J.J., 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol.89(3): 471-478.
- SHERLOCK, I.A. & MIRANDA, J.C., 1993. Ecology of the visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. In: Research and control of leishmaniasis in Brazil: proceedings of a National Workshop (Sinval P. Brandão-Filho, ed), p.133-149, Recife, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.
- SHERLOCK, I.A., 1969. Observações sobre calazar em Jacobina - I - Histórico e dados preliminares. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. XXI (1): 523 - 548, jan - mar.
- SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., SHAW, J.J., DE SOUZA, A.A., ISHIKAWA, E.A., BRAGA, R.R., 1991. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 85, 735-738.

- SIMPSON, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annual Review in Microbiology, 41:363-82.
- SIMPSON, L., MOREL, C. & SIMPSON, A.M., 1980. Biological role of extrachromosomal DNA. *In: Modern Genetic Concepts and Techniques in the Study of Parasites*. Ed. Frank Michal, Tropical Disease Research Series, 4: 65 - 82.
- SMITH, A. D.M., 1983. Epidemiological patterns in directly transmitted human infections. *In: Human ecology and infectious diseases* (Croll, N.A. & Cross, J.H., ed.), Academic Press, pp. 333-353.
- SOUTHERN, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98: 503.
- TOLEDO, L.M., 1996. O espaço do cólera: determinantes sociais e regulação ambiental dos caminhos de uma epidemia. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ.
- TOLEZANO, J.E., ARAÚJO, M.F.L., BALANCO, J.M.F; VALENTIM, A.M.; BARCA, M. L., 1988. *Leishmania sp* isolated from blood heart of *Akodon sp*. (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape City, São Paulo State, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 83: 38.
- ULIANA, S.R.B., AFFONSO, M.H.T., CAMARGO, E.P., FLOETER-WINTER, L.M., 1991. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. Experimental Parasitology 72:157-163, 1991.
- VALIM, C., 1993. Transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Ceará. Características da transmissão em diferentes formações paisagísticas com particular referência ao local de transmissão para o homem. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro: ENSP.

- VASCONCELOS, I.A.B., VASCONCELOS, A.W., FE FILHO, N.M., QUEIROZ, R.G., SANTANA, E.W., BOZZA, M., SALLENAVE, S.M., VALIM, C., DAVID, J.R., LOPES, U.G., 1994. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturité, northeastern Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 50 (2): 158-164.
- VASCONCELOS, I.A.B., VASCONCELOS, A.W., MOMEN, H., GRIMALDI JR.G., ALENCAR, J.E., 1988. Epidemiological studies on leishmaniasis in Ceará state, Brazil. Molecular characterization of the *Leishmania* isolates. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 82, 6: 547-554.
- VIANNA, G., 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). Brasil Médico, 25: 411.
- VIANNA, G., 1912. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia, 1: 36-38.
- WEISS, J.B., 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clinical Microbiological Review, 8(1): 113-130.
- WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.B.; CARDOSO, M.A.; OELEMANN, W.; MOREL, C.M., 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 51:771-777.
- WINCKER, P.; BOSSENO, M.F.; BRITTO, C.; YAKSIC, N.; CARDOSO, M. A.; MOREL, C.M.; BRENIÈRE, S.F., 1994. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiological Letters, 124: 419-423.