

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

José Ferreira Marinho Júnior

INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania* spp. EM PEQUENOS  
MAMÍFEROS SILVESTRES E SINANTRÓPICOS ENVOLVIDOS NA  
MANUTENÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM  
ÁREA ENDÊMICA DA ZONA DA MATA NORTE DE PERNAMBUCO,  
BRASIL

RECIFE

2010

**JOSÉ FERREIRA MARINHO JÚNIOR**

**INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania* spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS  
SILVESTRES E SINANTRÓPICOS ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA ENDÊMICA DA ZONA  
DA MATA NORTE DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública  
do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,  
para obtenção do grau de mestre em  
Ciências.**

**Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho**

**Co-orientador: Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues**

**RECIFE**

**2010**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

M338i Marinho Júnior, José Ferreira.

Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil. /José Ferreira Marinho Júnior. — Recife: J. F. Marinho Júnior, 2010.

77 f.: fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho, co-orientador: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

1. Leishmaniose Cutânea – prevenção & controle. 2. *Leishmania braziliensis* - parasitologia. 3. Reservatórios de doenças. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Rodrigues, Eduardo Henrique Gomes. III. Título.

---

CDU 616.993.161

**JOSÉ FERREIRA MARINHO JÚNIOR**

**INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania* spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS  
SILVESTRES E SINANTRÓPICOS ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA ENDÊMICA DA ZONA  
DA MATA NORTE DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública  
do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,  
para obtenção do grau de mestre em  
Ciências.**

**Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Sinval Pinto Brandão Filho**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

---

**Dra. Zulma Maria Medeiros**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

---

**Dr. Lêucio Câmara Alves**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*A minha mãe, Sônia Oliveira Cavalcanti, exemplo de vida, honestidade, dedicação, sinceridade, amor... a base de todas as minhas vitórias. Tenho muito orgulho de ser seu filho.*

*As minhas irmãs Sônia Maria (Soninha) e Juliana, que sempre me deram apoio e carinho.*

*A minha namorada Juliane Marcele, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos.*

*Em especial, a Alcides Ferraz Cavalcanti e Primitiva de Oliveira Cavalcanti (avós maternos - in memoriam) por serem exemplos de vida que norteiam meus passos até hoje.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos e conduzir minhas vitórias e conquistas.

Ao Dr. Sinval Brandão Filho, meu orientador, pela amizade, ensinamentos, competência e pelo apoio incondicional, desde minha iniciação científica até a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Rodrigues, meu amigo e co-orientador, pelos ensinamentos, dedicação e empenho na realização desta dissertação.

A minha amiga, Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. Edileuza Brito, que me acompanha desde a iniciação científica, pelos ensinamentos e valiosas considerações.

A Dr<sup>a</sup>. Milena Paiva, pelo apoio e amizade, sempre disposta a ajudar.

A Francisco Gomes, pelo empenho e dedicação no trabalho de campo.

A todos os pesquisadores do Departamento de Imunologia que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte deste curso.

Ao Dr. Eduardo Freese, e a todos que compõem a direção do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

A George Diniz, pelo apoio na análise estatística.

A Isabele e Waléria pelo total apoio no processamento dos roedores.

A Aílton e Assis, por todo o suporte no biotério e na eutanásia dos animais.

A Amílton e os demais técnicos envolvidos nas capturas de animais.

A Fábria, Éricka, Inês, Bruna, Vanessa, Pietra, Suênia, Sandra, Sílvia, Fernando, Hélio e demais integrantes da equipe de Leishmanioses pelo apoio direto e indireto na realização deste trabalho.

A Prefeitura de Jabotão dos Guararapes que me concedeu licença para realização deste estudo.

A amiga e colega da turma de mestrado Mylena Melo, por seu apoio e contribuições na extração de DNA das amostras.

A Marina, Romero, Louisiana, Júlio, Orlando, Andréia e todos os colegas de mestrado, pela amizade e convívio ao longo do curso.

A Mégine Silva, Adagilson Silva e demais funcionários da Biblioteca do CPqAM.

A população de Vicência, em especial, da localidade de Imbú, pelo acolhimento na realização deste trabalho.

A Prefeitura Municipal de Vicência, pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia – LIMP: Mineo, Priscilla, Izaura, Virgínia, Adriene, Suellen, Conceição e demais técnicos pelo convívio e apoio, durante as atividades no laboratório.

MARINHO JÚNIOR, José Ferreira. **Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da Leishmaniose Tegumentar Americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil.** 2010. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

## RESUMO

As leishmanioses representam um complexo de doenças com diversidade epidemiológica, onde participam dos ciclos de transmissão, diversos agentes etiológicos, vetores e hospedeiros. Em Pernambuco, 60% dos casos de LTA originam-se na Zona da Mata, sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis* o principal agente etiológico envolvido. Vicência, município localizado na Zona da Mata Norte de Pernambuco, vem apresentando elevada incidência de casos de LTA. Este estudo objetivou identificar roedores silvestres e sinantrópicos envolvidos na transmissão e manutenção da LTA em Vicência. Entre março/2008 e agosto/2009 foram capturados 195 animais, nos ecótopos referentes ao intra, peri e extradomicílio, na localidade de Imbú, Vicência. Destes, foram analisados 174 animais pertencentes a seis espécies. *Nectomys squamipes* (98/51,3%) e *Rattus rattus* (49/25,1%) predominaram nas capturas. *R. rattus* foi a única espécie capturada no intra (3/195) e peridomicílio (7/195). Nenhum isolamento foi obtido. Através da PCR foi detectado *L.* subgênero *Viannia* em 71 amostras, sendo: 45/170 pele (25,6%), 21/174 baço (12,1%) e 5/173 fígado (2,9%). A pesquisa direta apresentou positividade em imprint's: 9,52% (2/21) de pele, e, 4,65% (2/43) de baço; e, 2,32% (1/43) em esfregaço. Todos os animais positivos na pesquisa direta foram positivos na PCR. A infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. foi verificada em 62 animais: 35/98 *N. squamipes*, 20/49 *R. rattus*, 2/12 *Necromys lasiurus*, 4/9 *Holochilus sciureus* e 1/3 *Galea spixii*. Este é o primeiro relato de infecção natural desta espécie por *Leishmania (Viannia)* spp. Não houve diferença comparando a infecção entre as espécies ( $p>0,05$ ). Houve diferença significativa na comparação entre infecção em pele e local de captura ( $p<0,05$ ). A concentração de casos na área estudada sugere *L. (V.) braziliensis* como provável agente etiológico e reforça a hipótese da atuação de roedores silvestres e sinantrópicos no ciclo de transmissão de LTA no município de Vicência.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea – prevenção & controle. *Leishmania braziliensis* - parasitologia. Reservatórios de doenças.



MARINHO JÚNIOR, José Ferreira. **Natural infection by *Leishmania* spp. in small wild and synanthropic mammals involved in the maintenance of Cutaneous American Leishmaniasis in endemic area of Zona da Mata Norte de Pernambuco State, Brazil.** 2010. Dissertation (Academic Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

#### ABSTRACT

Leishmaniasis represent a complex disease with diverse epidemiological, where different etiologic agents, vectors and hosts participate of the cycles of transmission. In Pernambuco, 60% of ATL cases originate in the Zona da Mata, and *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main species involved. Vicência, a municipality located in the Zona da Mata Norte, Pernambuco State, has been showing high incidence of ATL. This study aimed to identify reservoir hosts involved in maintenance of ATL in Vicência. Between March/2008 and August/2009 a total of 195 animals were captured in ecotopes for the intra, peri and outside the home, in the locality of Imbú, municipality of Vicência. Of those, 174 animals belonging to six species were analyzed. *Nectomys squamipes* (98/51, 3%) and *Rattus rattus* (49/25,1%) predominated in catches. *R. rattus* was the only species captured in intra (3 / 195) and outdoors (7 / 195). No isolation was obtained. In PCR, subgenus *Viannia* was detected in 71 samples, as follows: skin 45/170 (25.6%), spleen 21/174 (12.1%) and 5 / 173 liver (2.9%). Direct analysis was positive in imprints: 9.52% (2 / 21) skin, and 4.65% (2 / 43) of the spleen and, 2.32% (1 / 43) in blood smear. All positive animals in parasitological direct analysis were positive in PCR. Infection with *Leishmania (Viannia) spp.* was found in 62 animals: 35/98 *N. squamipes*, 20/49 *R. rattus*, 2/12 *Nectomys lasiurus*, 4/9 *Holochilus sciureus* and 1/3 *Galea spixii*. This is the first report of natural infection of this species by *Leishmania (Viannia) spp.* There was no difference comparing the infection between the six species ( $p > 0,05$ ). There was a significant difference between infection in skin and places of capture ( $p < 0,05$ ). The concentration of cases in the study area suggests *L. (V.) braziliensis* is the probable etiologic agent, and reinforces the hypothesis of the role of wild and synanthropic rodents in the transmission cycle of leishmaniasis in the municipality of Vicência.

Key-words: Cutaneous Leishmaniasis – prevention & control. *Leishmania braziliensis* - parasitology. Disease reservoirs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	29
Figura 2 -	Localização da área de estudo, no Estado de Pernambuco.	36
Figura 3 -	Domicílio na área rural de Vicência, Imbú.	37
Figura 4 -	Vista panorâmica da localidade de Imbú, Vicência-PE.	37
Figura 5 -	Armadilha tipo Tomarrawk.	38
Figura 6 -	Distribuição das armadilhas.	38
Figura 7 -	Retirada de ectoparasitas	39
Figura 8 -	Acondicionamento dos roedores em microisoladores	39
Figura 9 -	Isoladores para acondicionamento dos roedores	40
Figura 10 -	Câmara de CO <sub>2</sub> .	40
Figura 11 -	Processamento de fragmento de baço para inóculo em meio de cultivo NNN modificado.	41
Figura 12 -	Esfregaço para pesquisa direta	41
Figura 13 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de pele de animais silvestres e sinantrópicos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i> .	48
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de baço de animais silvestres e sinantrópicos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i> .	49
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de fígado de animais	50

silvestres e sinantrópicos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.

Figura 16 - Roedor silvestre <i>Nectomys squamipes</i>	52
Figura 17 - Roedor sinantrópico <i>Rattus rattus</i> .	52
Figura 18 - Roedor silvestre <i>Necromys lasiurus</i> .	53
Figura 19 - Roedor silvestre <i>Holochillus sciureus</i> .	53
Figura 20 - Roedor silvestre <i>Galea spixii</i> .	54

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Número de casos de LTA registrados no Brasil durante o período de 2001-2009.	17
Gráfico 2 -	Distribuição por região dos casos de LTA notificados no Brasil, entre os anos de 2001 a 2009.	17
Gráfico 3 -	Casos de LTA notificados em Pernambuco durante o período de 2001-2009.	18
Gráfico 4 -	Casos de LTA notificados em Vicência - PE durante o período de 2001 a 2009.	19

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animais silvestres e sinantrópicos capturados por ambiente de captura na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	46
Tabela 2 - Roedores silvestres e sinantrópicos, discriminados por sexo, utilizados para pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp., capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	47
Tabela 3 - Resultados de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. através da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores B1/B2 a partir de amostras de pele de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	48
Tabela 4 - Resultados de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. através da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores B1/B2 a partir de amostras de baço de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	49
Tabela 5 - Resultados de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. através da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores B1/B2 a partir de amostras de fígado de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	50
Tabela 6 - Resultados da infecção natural por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp., através de PCR, em roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	51
Tabela 7 - Resultados de PCR para infecção natural por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp., através de PCR, considerando os diferentes tecidos de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência - PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	54
Tabela 8 - Comparação entre a infecção por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp. dos diferentes tecidos em relação ao ambiente de captura, de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência - PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	55
Tabela 9 - Comparação entre a infecção por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp. e o sexo dos roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência - PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

OMS - Organização Mundial da Saúde

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação

LC - Leishmaniose Cutânea

WHO - World Health Organization

PCR - Polymerase Chain Reaction

kDNA - Kinetoplastic Deoxyribonucleic Acid

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

MS - Ministério da Saúde

S – South

W – West

NBA - Nível Biossegurança Animal

DNA - Deoxyribonucleic Acid

TE - Tris EDTA

HCl - Ácido Clorídrico

KCl - Cloreto de Potássio

MgCl<sub>2</sub>- Cloreto de Magnésio

pb - Pares de base

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>1.1 Aspectos gerais das leishmanioses</b>	16
<b>1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana: história e epidemiologia no Brasil</b>	19
<b>1.3 Agente etiológico</b>	22
<b>1.4 Vetores</b>	24
<b>1.5 Reservatórios</b>	25
<b>1.6 Ciclo Biológico</b>	28
<b>1.7 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana</b>	29
<b>1.8 Tratamento</b>	31
<b>1.9 Critérios de Cura</b>	32
<b>1.10 Medidas de Controle</b>	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>3 OBJETIVOS</b>	35
<b>3.1 Geral</b>	35
<b>3.2 Específicos</b>	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
<b>4.1 Área de estudo</b>	36
<b>4.2 Captura de animais</b>	38
<b>4.3 Eutanásia</b>	40
<b>4.4 Diagnóstico</b>	41
<u>4.4.1 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta</u>	41
<u>4.4.2 Abordagens moleculares</u>	42

4.4.2.1 <i>Extração e purificação de DNA</i>	42
4.4.2.2 <i>Amplificação do DNA através de PCR</i>	42
4.4.2.3 <i>PCR específica para o subgênero Viannia</i>	43
4.4.2.4 <i>Análise dos produtos da PCR</i>	43
<b>4.5 Análise Estatística</b>	44
<b>5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	45
<b>6 RESULTADOS</b>	46
<b>6.1 Capturas de Animais</b>	46
<b>6.2 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta</b>	47
<b>6.3 Diagnóstico molecular: PCR específica para o subgênero <i>Viannia</i></b>	47
<u>6.3.1 Amostras de pele dos roedores silvestres e sinantrópicos</u>	48
<u>6.3.2 Amostras de baço dos roedores silvestres e sinantrópicos</u>	49
<u>6.3.1 Amostras de fígado dos roedores silvestres e sinantrópicos</u>	50
<b>7 DISCUSSÃO</b>	56
<b>8 CONCLUSÕES</b>	62
<b>REFERÊNCIAS</b>	63
<b>ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais</b>	73
<b>ANEXO B – Termo Aditivo do Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais</b>	74
<b>ANEXO C - Autorização para atividades com finalidade científica</b>	75



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, são antropozoonoses, consideradas como um importante problema de saúde pública no mundo, pois representam um complexo de doenças com diversidade epidemiológica, onde participam, nos ciclos de transmissão, diversos agentes etiológicos, vetores e hospedeiros. Apresentam-se sob duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT), com acometimento de pele, cartilagens e/ou mucosa, e, Leishmaniose Visceral (LV), que acomete vísceras, principalmente, baço e fígado. Nas Américas, essas formas clínicas são denominadas como: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (LAINSON; SHAW, 1998).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que 350 milhões estão sob o risco de infecção. Esta afecção apresenta uma incidência anual de dois milhões de casos das diferentes formas clínicas, sendo 1,5 milhão de casos de LT e 0,5 milhão de casos de LV que representa a forma mais grave da doença com aproximadamente 59 mil óbitos ao ano, sendo, dentre as doenças parasitárias, a segunda em número de óbitos, perdendo apenas para a malária (ALVAR et al., 2006).

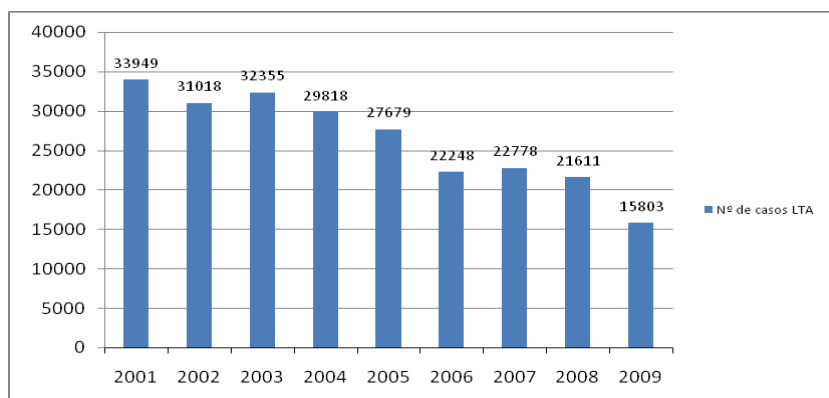
As leishmanioses estão incluídas na relação de doenças prioritárias pela OMS, consideradas negligenciadas, e no seu programa especial de pesquisa e de treinamento em doenças tropicais (REMME et al., 2002), estão distribuídas em 88 países de todos os continentes, exceto a Oceania. Dos casos notificados de LT, 90% da forma cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, e, 90% da forma mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A LTA é uma doença que merece especial atenção devido às limitações terapêuticas existentes e à severidade representada pela forma mucosa da doença, sendo considerada uma doença negligenciada (BRANDÃO-FILHO, 2001). No Nordeste, assim como na maior parte do país, a espécie predominante envolvida com a LTA é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, verificada em todos os Estados (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; BRITO et al., 2009). O aumento do número de casos e a persistência da transmissão no Estado de Pernambuco têm

revelado distintos padrões de transmissão, tornando-se um importante problema de saúde pública (BRANDÃO-FILHO et al., 1999).

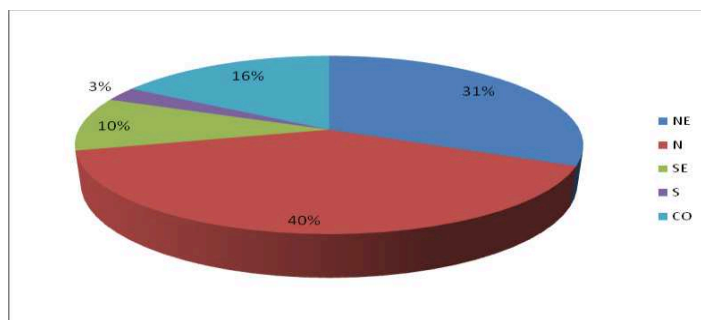
A incidência da LTA na região Nordeste é verificada tanto nas áreas com resquícios de floresta de Mata Atlântica, nas quais se verifica vegetação abundante, como em áreas com predominância de mata secundária e diversos tipos de plantações, propícias à colonização dos flebotomíneos e mamíferos silvestres e sinantrópicos, mas também em regiões desmatadas, com adaptação de vetores e reservatórios à ambientes modificados, com transmissão peridomiciliar (MARZOCHI, 1992). A infecção atinge mulheres, crianças e, principalmente, adultos do sexo masculino, em alguns casos, todos os indivíduos de uma mesma família são acometidos pela doença (BRANDÃO-FILHO et al., 1999).

No Brasil, segundo o SINAN – Sistema de Informações de Agravos de Notificação, foram registrados, entre os anos de 2001 a 2009, mais de 230 mil casos, com média de 27 mil casos/ano (Gráfico 1). As regiões Norte e Nordeste concentram mais de 70% do total de casos notificados no Brasil (Gráfico 2).



**Gráfico 1. Número de casos de LTA registrados no Brasil durante o período de 2001-2009.**

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação (2010).



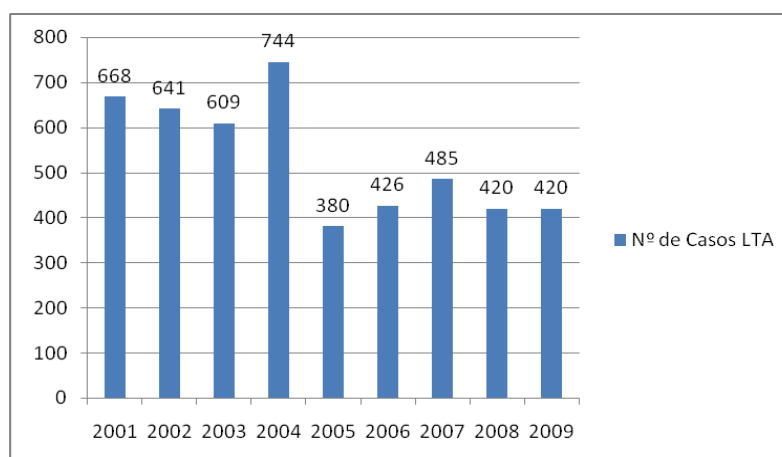
**Gráfico 2. Distribuição por região dos casos de LTA notificados no Brasil, entre os anos de 2001 a 2009.**

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação (2010).

Diversos aspectos relacionados à eco-epidemiologia da LTA na região da Zona da Mata Sul de Pernambuco foram bem caracterizados nos últimos anos, através de um estudo longitudinal desenvolvido no município de Amaraji, com importantes contribuições relacionadas à compreensão da expressão e prevalência da infecção e doença, vetores e hospedeiros reservatórios envolvidos na transmissão e manutenção da endemia na região (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 1994, 1999, 2003).

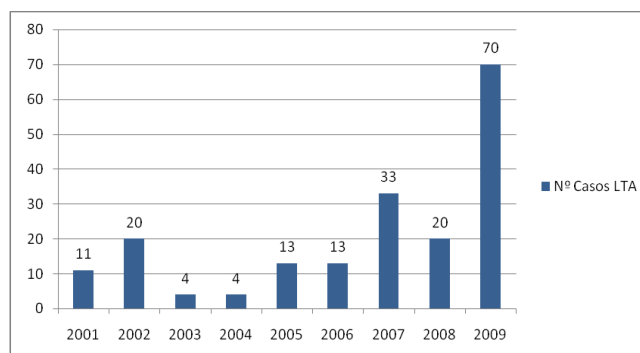
Considerando o indicador da densidade de casos de LTA (n.º de casos de LTA por Km<sup>2</sup>), identificou-se no período de 2001 a 2003, 24 circuitos de produção da doença de importância epidemiológica no Brasil, o que representa 75% (21.537) do total de casos registrados em 2004 (28.569), distribuídos em 1.926 (35%) municípios brasileiros. A LTA predomina em maiores de 10 anos, representando 90% dos casos e o sexo masculino, 74%. A faixa etária mais acometida foi a de maiores de 10 anos com aproximadamente 90% dos casos (19.439). Os indivíduos do sexo masculino representaram 60% dos casos (BRASIL, 2007).

Em Pernambuco, a LTA apresenta incidência importante, tendo notificado em 2009 420 casos (Gráfico 3). A LTA incide em todas as regiões do Estado, com predominância na Zona da Mata, com mais de 60% do total de casos notificados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRANDÃO-FILHO, 2001). O município de Vicência, localizado na Zona da Mata Norte pernambucana, tem apresentado elevado número de casos, sendo registrados em 2009, conforme informações obtidas pelo SINAN, 70 casos de LTA (Gráfico 4), o que corresponde ao maior número de notificações já verificado naquela localidade.



**Gráfico 3. Casos de LTA notificados em Pernambuco durante o período de 2001-2009.**

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação (2010).



**Gráfico 4. Casos de LTA notificados em Vicência - PE durante o período de 2001 a 2009.**

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação (2010).

A complexidade da LTA causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* está representada pelas diversas manifestações clínicas relacionadas à doença causada por esta espécie, a limitações no tratamento e à diversidade de vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, o que torna esta endemia um desafio para parasitologistas e para os programas governamentais de controle. Neste sentido, a identificação de hospedeiros naturais de *Leishmania* spp. é de fundamental importância para determinar o ciclo natural do parasito e para o melhor entendimento da eco-epidemiologia da doença.

## 1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana: história e epidemiologia no Brasil

No Brasil, Moreira em 1895 identificou pela primeira vez a existência do botão endêmico dos países quentes, chamado “botão da Bahia” ou “botão de Biskra”. Em 1908, houve uma epidemia em Bauru/SP, quando Lindemberg, Carini e Paranhos correlacionaram a “úlceras de Bauru” com o “botão do Oriente” e o seu agente causal com *Leishmania tropica*. Carini et al. (1909), fizeram observações pioneiras de lesões mucosas confirmadas por demonstração de *Leishmania*. Em 1911 Vianna considerou que havia diferenças morfológicas entre a *Leishmania tropica* e o agente etiológico da Leishmaniose Cutânea (LC) e a chamou de *Leishmania braziliensis*. Posteriormente, em 1923, criou-se o termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), denominação que abrange tanto a forma cutânea como a forma mucosa da doença. A Leishmaniose Tegumentar (LT) já era conhecida como um grupo

de doenças dermatológicas semelhantes entre si, e sua apresentação clínica era associada a lesões cutâneas, geralmente ulcerosas e, por vezes, com comprometimento da mucosa oronasal (BRASIL, 2007).

No final do século XIX foi estabelecida a identidade da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com o Botão de Briska, uma das várias denominações da forma cutânea do Velho Mundo (REY, 2001). Nessa mesma época, Cunningham observou pela primeira vez os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* nos macrófagos, em casos de calazar na Índia, o que foi confirmado por Firth em 1891, e sete anos após, por Borowsky, que descreveu com detalhes estes parasitos em um caso de Leishmaniose Cutânea. Em 1903, Leishman e Donovan redescobriram o parasita em um caso de calazar indiano, que Ross em seguida, denominou de *Leishmania donovani*. Concomitantemente, em 1903, Wright descobriu um parasito semelhante à *Leishmania tropica* (BRUCKER; GENTILINI, 1988).

No início do século XX, espécies de *Leishmania* do Novo Mundo foram identificadas na América Latina. Lindenberg, em 1909, demonstrou a presença dos parasitos em lesões cutâneas, e Vianna, em 1911 descreveu a espécie *Leishmania braziliensis* e, em seguida descobriu a ação curativa do tártaro emético, modificando o destino dos pacientes com leishmaniose em todo o Mundo. Neste período, verificou-se que o padrão epidemiológico que predominou foi o de antropozoonoses de transmissão silvestre, que atinge o homem quando este invade os ambientes florestais. Porém, alterações do meio ambiente em vários estados do Brasil vêm modificando o perfil epidemiológico da LTA, permitindo a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania* spp., e espécies de flebotomíneos adaptadas ao ambiente modificado pelo homem. A persistência da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas indica claramente a evolução de um ciclo de transmissão antropozoonótico ocorrendo no ambiente peridoméstico (BRANDÃO FILHO et al., 1999, 2003; BRASIL, 2007; LAINSON; SHAW, 1998).

Durante a construção da estrada de ferro que ligava Bauru (São Paulo) a Porto Esperança (Mato Grosso) no início do século XX, pesquisadores verificaram a ocorrência de surtos da doença entre operários da construção, denominando as lesões leishmanióticas cutâneas de "úlceras de Bauru". Estes surtos se caracterizavam por elevada incidência de leishmaniose, constituindo um grave problema de Saúde Pública no estado de São Paulo (ALVAR et al., 2006). Relatos de focos da doença nos estados de Minas Gerais e Bahia em trabalhadores da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, também reforçam a relação existente entre o surgimento de focos de transmissão de LTA com decorrentes da ação

antrópica, ocasionando a modificação do ambiente natural, o que caracterizava a LTA como uma doença ocupacional (PASSOS et al., 1993).

Na região Amazônica aconteceram surtos de LTA, como resultado da exploração de florestas e colonização rural. No Pará, onde foram implantados vários projetos de ocupação, como o projeto de mineração Carajás, e o projeto de celulose Jari, atraindo trabalhadores para zonas de floresta, e favorecendo o surgimento da doença entre os indivíduos envolvidos nesses projetos (SILVEIRA et al., 1991). A história da LTA no Brasil evidencia que o surgimento de casos da doença está, por vezes, diretamente relacionado às atividades do homem no campo, ao habitat de insetos transmissores e dos hospedeiros reservatórios (SILVEIRA et al., 1991).

Considerada uma doença em expansão no Brasil, a LTA representa importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o agente etiológico de maior prevalência, com distribuição geográfica em todas as regiões do país, cujas características eco-epidemiológicas e o modo de transmissão se expressam de acordo com as particularidades de cada região (LAINSON; SHAW, 1998).

Do ponto de vista epidemiológico da LTA são descritos três padrões de transmissão: silvestre, ocupacional e rural e periurbano em áreas de colonização. O padrão silvestre ocorre em áreas de vegetação primária e, está relacionada, fundamentalmente, ao ambiente silvestre, onde acomete animais, o homem, pode ser infectado, quando entra em contato com este ambiente. O padrão ocupacional está relacionado, principalmente, com a exploração desordenada da floresta, derrubada de matas e atividades de ecoturismo. Os processos migratórios, a ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais correspondem ao padrão rural e periurbano em áreas de colonização (BRASIL, 2007).

No Nordeste, a LTA ocorre tanto em áreas preservadas da Mata Atlântica, onde é mantida através do ciclo enzoótico primário entre mamíferos silvestres e algumas espécies de flebotomíneos e nas quais se verifica vegetação abundante, como também, em áreas com predominância de mata secundária e plantações diversas, ocupadas para a exploração agrícola e propícias à colonização dos flebotomíneos, mamíferos silvestres e sinantrópicos, nas quais a adaptação de vetores e reservatórios possibilitou a instalação de ciclos zoonóticos com transmissão peridomiciliar (LAINSON; SHAW, 1998; MARZOCHI, 1992).

A LTA ocorre em todas as faixas etárias, acometendo homens e mulheres. O padrão de transmissão predominante é o peridomiciliar, e verifica-se que vem ocorrendo um processo gradual de domesticação da doença, principalmente em áreas com história de colonização

antiga, onde há poucos remanescentes de floresta primária e houve a adaptação dos flebotomíneos vetores ao ambiente peridoméstico e doméstico e provavelmente a presença de hospedeiros reservatórios secundários, o que facilita a transmissão (DESJEUX, 2001).

Devido aos diversos fatores que envolvem a manutenção de ciclos de transmissão da LTA, são observados diferentes perfis que vão depender da área de circulação do parasito, das áreas onde ocorrem desmatamento para a construção de estradas e instalações de povoados, extração de madeira, atividades agrícolas e de pecuária, das áreas com preservação de pequenos trechos de cobertura vegetal, assim como áreas em que o processo de urbanização criou as condições favoráveis à produção de surtos endêmicos na periferia de cidades e povoados (BRASIL, 2007).

### 1.3 Agente etiológico

A *Leishmania* é um protozoário heteroxênico, se reproduz por divisão binária pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: a promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (REY, 2001).

No Novo Mundo, a *Leishmania (L.) infantum chagasi* corresponde a única espécie causadora da forma visceral, contudo para a forma tegumentar, várias espécies de *Leishmania* foram descritas como agentes etiológicos da LTA (LAINSON; SHAW, 1998).

No Brasil, pelo menos sete espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)* são agentes etiológicos da forma tegumentar da doença. As espécies descritas como causadoras da forma tegumentar no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindeberg* do subgênero *Viannia* e *L. (L.) amazonensis* do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2007).

*L. (V.) braziliensis* tem ampla distribuição, abrangendo desde o sul da bacia amazônica até a região Sudeste do país. Tem-se registrado poucos casos ao norte do rio Amazonas, com predominância em bosques e áreas de vegetação secundária (BRASIL, 2007). Casos de LTA por *L. braziliensis* são frequentemente encontrados em zonas de cultivo de cana-de-açúcar, cacau e banana. Em geral a transmissão vincula-se com atividades profissionais agrícolas realizadas nestas regiões (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Uma incidência significativa em

crianças sugere que parte da transmissão ocorre no peridomicílio. A infecção ocorre em terra firme, causando lesões cutâneas (raramente múltiplas) expansivas e persistentes, com tendência a produzir metástases em mucosa nasal, atingindo cerca de 4 a 5% dos casos. Em áreas de colonização antiga, onde o ambiente se encontra profundamente modificado, a *L. (Viannia) braziliensis* é o agente mais frequentemente associado à LTA (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

A LTA associada a esta espécie caracteriza-se por apresentar diferentes padrões regionais, da Amazônia ao Sudeste do Brasil, relacionados aos vetores envolvidos, possíveis reservatórios e perfil eco-epidemiológico (BRANDÃO-FILHO, 2001; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; SHAW; LAINSON, 1987). A enfermidade é conhecida por várias denominações: "úlceras de Bauru", leishmaniose cutâneo-mucosa, espúndia e ferida brava. A transmissão está diretamente relacionada com os seguintes vetores: *Psycodopigus wellcomei* encontrados em áreas silvestres nos Estados do Pará, Amazonas e Ceará; *Lutzomyia whitmani* em áreas de caatinga, cerrado, mata atlântica, nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná; *Lutzomyia intermedia* em áreas de colonização antiga, nos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (ARIAS et al., 1996).

*L. (V.) guyanensis* encontrada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e nas Guianas. Principalmente em florestas de terra firme, causa a doença do tipo "pian bois", que pode apresentar metástases nodulares ao longo dos vasos linfáticos. Os animais *Choleopus didactylus* (preguiça de dois dedos), *Tamandua tetradactyla* (Tamanduá-mirim), o marsupial *Didelphis marsupialis* e o roedor *Proechinys guyanensis*, encontrados em florestas primárias e secundárias, atuam como reservatórios, enquanto que os vetores envolvidos na transmissão são: *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia umbratilis* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

*L. (V.) lainsoni* causa lesões cutâneo-ulcerativas, é frequente em humanos e está associada com roedores silvestres, encontrados na região do Amazonas e em florestas primitivas e secundárias. O vetor incriminado é o *Lutzomyia ubiquitalis*, que não é muito antropofílico (BASANO; CAMARGO, 2004; SILVEIRA et al., 1987).

*L. (V.) naiffi* com poucos casos de leishmaniose relatados em humanos, é encontrada no Estado do Pará e Amazonas, tendo o tatu (*Dasypus novemcinctus*) como reservatório. O parasita causa lesões simples ou ulceradas que em geral evoluem para cura. Seus principais vetores são *Lutzomyia squamiventris*, *Lutzomyia paraensis* e *Lutzomyia ayrozai* (BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON; SHAW, 1989).



*L. (V.) shawi* causa leishmaniose com lesões cutâneas e está associada aos animais silvestres, é encontrada na região do Amazonas. A transmissão é realizada pelo vetor *Lutzomyia whitmani* (BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON; SHAW, 1989).

*L. (V.) lindenberg* foi descrita de infecções em soldados em treinamento em uma área de reserva florestal no Estado do Pará. Não existem relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. A espécie provável como vetora é *Lutzomyia antunesi* (BRASIL, 2007).

*L. (Leishmania) amazonensis* que ocorre nos Estados da região amazônica, Pará, Rondônia, sudeste do Maranhão, particularmente em áreas de igapó e de florestas tipo "várzea", estendeu-se para a região Nordeste (Bahia, Ceará, Piauí), região Sudeste (Minas Gerais) e região Centro Oeste (Goiás, Mato Grosso). É pouco frequente, associada à cerca de 3% dos casos em humanos. A doença causada por *L. amazonensis* provoca lesões cutâneas e difusas (forma anérgica). É considerada essencialmente uma zoonose e encontra-se em pequenos roedores silvestres, sendo transmitida ao homem ocasionalmente, caracterizando uma antroponose. Os principais vetores incriminados são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

#### 1.4 Vetores

Os vetores da LTA são insetos fêmeas hematófagos denominados flebotomíneos. Conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros; constituem insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos são mosquitos pequenos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com patas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Voam aos saltos e mantêm as asas eretas mesmo em repouso, ao contrário de outros dípteros da subfamília Phlebotominae, o que facilita a sua identificação. O sangue, ingerido durante o repasto, é necessário para a maturação dos ovos. Os machos se alimentam de sucos de flores e plantas, sendo considerados fitófagos (BASANO; CAMARGO, 2004).

Existem mais de 600 espécies ou subespécies de flebotomos no mundo, das quais menos de 50 foram incriminadas na transmissão de leishmaniose. *L. infantum chagasi* possui

como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, exceto na região entre Cuiabá e Mato Grosso onde *Lutzomyia cruzi* é incriminado como vetor. Já em relação à LTA, estão envolvidas nos ciclos de transmissão as espécies: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcome* e *Lutzomyia migonei* (BRASIL, 2007). Na Zona da Mata Sul de Pernambuco 97,4% da fauna é representada pela espécie de *Lutzomyia whitmani*, o provável vetor de *L. braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 1999), sendo *Lutzomyia complexa* o principal representante da fauna da Zona da Mata Norte (ANDRADE, 2004).

É importante ressaltar a vigilância entomológica em áreas de risco para a LT no intuito de analisar as condições epidemiológicas de transmissão, bem como fornecer dados básicos para a implementação de medidas de controle (GARCEZ et al., 2009). Também é necessário compreender aspectos fundamentais da ecologia e comportamento do vetor, especialmente hábitos alimentares relacionado ao grau de antropofilia e a atração por reservatórios naturais do parasito que constituem dois requisitos essenciais para classificação de uma espécie como vetora de doença (AFONSO et al., 2005).

## 1.5 Reservatórios

Os reservatórios variam conforme a espécie de *Leishmania*. Infecções por espécies de *Leishmania* que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) (GRIMALDI-JR; TESH, 1993). Com relação a este último, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi definitivamente esclarecido. A infecção no animal é inaparente, com parasitos podendo ser encontrados na pele ou vísceras. Todas as espécies de *Leishmania* têm uma origem zoonótica, sendo a variante antroponótica, ocorrente na Índia, Sudão e Afeganistão, consequência da adaptação de algumas espécies a estes ciclos (SHAW, 2007). Segundo Noyes et al. (1998), o homem é considerado hospedeiro acidental (antropozoonose), enquanto o protozoário infecta cerca de nove ordens de mamíferos e répteis em áreas subtropicais e tropicais do mundo.

Desde as primeiras décadas do século passado, pesquisadores em todo o mundo buscam descobrir os reservatórios “primários” das leishmanioses. A melhor definição para um reservatório seria a de “um sistema ecológico no qual o agente infeccioso possa persistir indefinidamente” (ASHFORD, 1996; ASHFORD, 2000). Podendo nas infecções transmitidas

por vetores ocorrer uma ou mais espécies de vetores e mamíferos, vivendo em condições de densidade populacional e proximidade espacial, tal que o agente possa ser indefinidamente transferido entre eles (ASHFORD, 1996).

Já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, endentados e canídeos silvestres. São numerosos os registros de infecção em animais domésticos. Entretanto, não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania*, sendo considerados hospedeiros acidentais da doença. Animais domésticos (caninos, felinos e equinos) demonstram lesões tegumentares causadas *L. (V.) braziliensis*, mas por não serem capazes de manter o ciclo epidemiológico em um ecótopo, são considerados hospedeiros secundários ou acidentais (FALQUETO; FERREIRA, 2005; LAINSON; SHAW, 1998; MADEIRA et al., 2003; REITHINGER; DAVIES, 1999; SCHUBACH et al., 2004). Silva et al. (2005) associaram o desenvolvimento de lesões de pele nestes animais como a demonstração de não serem hospedeiros naturais do parasito. A LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana, ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2007).

Outros estudos demonstram que caninos e equídeos podem ser considerados reservatórios de *L. (V.) braziliensis* em ambiente peridoméstico (CRUZ et al., 1989; REITHINGER; DAVIES, 2002; REITHINGER et al., 2003). Em área endêmica de LTA, pesquisadores demonstraram que a presença de cães no peridomicílio poderia aumentar em até 15 vezes o risco de transmissão para as pessoas. Em área endêmica de São Paulo, onde a busca do parasito entre reservatórios silvestres fracassou, concluiu-se que a doença poderia ocorrer não somente em ambientes florestais, mas também em focos antigos, com manutenção do ciclo entre animais domésticos e flebotomíneos com hábitos peridomiciliares (YOSHIDA et al., 1990).

No Panamá, Herrer et al. (1973; 1975), corroborando para a suspeita da origem silvestre das leishmanioses, detectaram a infecção natural por *Leishmania* spp. em animais pertencentes às ordens Carnivora, Marsupialia, Primata, Rodentia e Xenarthra (=Edentados), sugerindo esses autores, pelos diferentes comportamentos das cepas, em cultura e no hamster, se tratar de isolados de *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. hertigi*.

Na Amazônia Brasileira, estudos demonstraram, através de isolamento e caracterização, a infecção natural de animais por espécies de *Leishmania* como: *L. (V.) guyanensis* em *Tamandua tetradactyla*, “tamanduá-mirim” (LAINSON et al., 1981) e *L. (V.)*

*naiffi* em *Dasypus novemcinctus*, “tatu-galinha” (GRIMALDI; TESH, 1993), *L. (V.) shawi* em *Cebus apella*, “macaco-prego”, *Chiropotes satamus*, “caxiú-preto”, *Chloepus didactylus*, “preguiça de dois dedos”, *Bradypus tridactylus*, “preguiça de três dedos” e *Nasua nasua*, “quati” (GRIMALDI; TESH, 1993; LAINSON et al., 1989).

O primeiro estudo demonstrando a importância dos roedores na epidemiologia da leishmaniose ocorreu no Panamá, onde Hertig, em 1957, 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, comprovando a hipótese de que espécies de *Leishmania* do Novo Mundo possuem hospedeiros de habitats florestais onde mantém o ciclo enzoótico, e expandem-se para o homem e animais domésticos, no ciclo antrozoótico. O tipo de lesão pode funcionar como índice dessa 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 esses hospedeiros desempenhariam a função de reservatório do parasito (LAINSON et al., 1981). 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 parasito e hospedeiro.

No Novo Mundo, mais de 40 espécies de mamíferos de várias ordens são conhecidas como sendo hospedeiros de *Leishmania* spp., em diferentes ciclos de transmissão. Contudo, poucas espécies são consideradas como reservatório principal no ciclo de transmissão natural (GRIMALDI; TESH, 1993).

No Brasil, foram encontradas evidências de infecção natural de *Leishmania braziliensis* em várias espécies de roedores dos gêneros *Oryzomys* (LAINSON et al., 1981; LAINSON; SHAW, 1989), *Akodon* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; FORATTINI et al., 1972), *Holochilus* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), *Proechimys* (LAINSON; SHAW, 1973), *Rattus* (BRANDÃO-FILHO et al., 1994; LAINSON; SHAW, 1979; VASCONCELLOS et al., 1994), *Rhipidomys* (LAINSON, SHAW; POVOA, 1981), *Nectomys* (BRANDÃO-FILHO et al., 1994), *Bolomys* (BRANDÃO-FILHO, et al., 1994) e o marsupial *Didelphis* (LAINSON; SHAW, 1973). Através de infecção experimental, Roque et al. (2010), demonstraram que roedores do gênero *Thrichomys* podem atuar como hospedeiros de manutenção de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. No estudo longitudinal desenvolvido, em Pernambuco, foram incriminados categoricamente, através do isolamento e caracterização do

parasito e associação com o mesmo fenótipo e genótipo do parasito que causa a doença na população desta região, os roedores silvestres e sinantrópicos *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*, como reservatórios primários de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a maioria das áreas endêmicas está intimamente relacionada a áreas florestais, via de regra com pouca densidade populacional. 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 flebotomíneos peridomiciliários e tendo como reservatório (secundário) o cão e talvez até o próprio homem”.

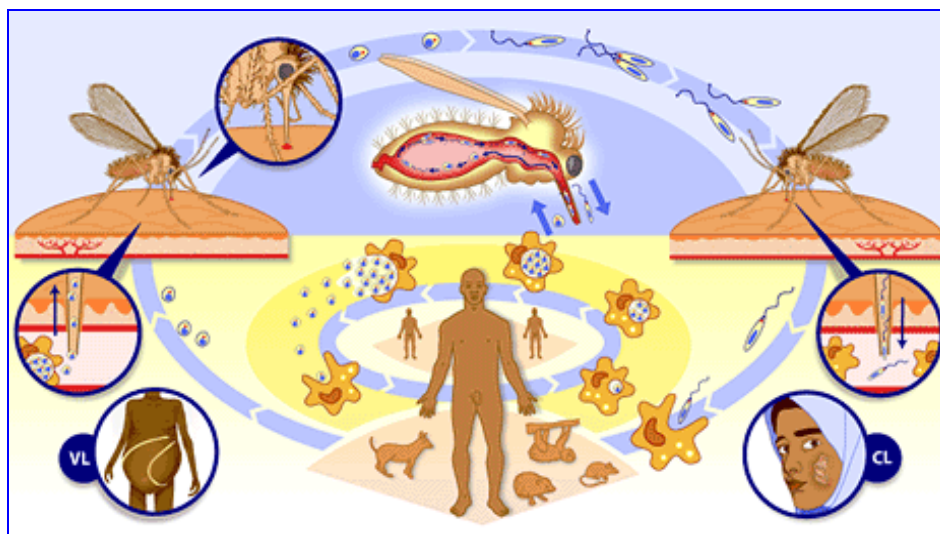
As alterações do meio ambiente decorrentes das ações antrópicas para a exploração de novos recursos naturais e agricultura, modificaram a epidemiologia da doença e novas áreas endêmicas são relatadas (LAINSON; SHAW, 1998). Brito et al. (1993) registram uma variante de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ocorrida no Estado de Pernambuco, Brasil, onde a ecologia da região é similar às já descritas para outras áreas endêmicas de LTA, nas quais o ambiente florestal original vem sendo alterado.

A diversidade epidemiológica associada à importância dada às leishmanioses no contexto da saúde pública e as dificuldades no controle, direcionam pesquisadores a estudos eco-epidemiológicos, envolvendo hospedeiros, reservatórios e flebotomíneos, vetores de *Leishmania spp.*

## 1.6 Ciclo Biológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem duas formas evolutivas em seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros: amastigota, encontrada em tecidos de hospedeiros de organismos vertebrados, e a promastigota, forma infectante, encontrada em invertebrados e meios de culturas artificiais. A forma promastigota multiplica-se por divisão binária longitudinal dentro do tubo digestivo do inseto vetor. Possui estrutura alongada, com um único núcleo, com flagelo livre e cinetoplasto anterior ao núcleo. As promastigotas são introduzidas no hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor e invadem o sistema fagocítico mononuclear iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasito, 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 flebotomíneo não infectado ingere células parasitadas durante o repasto sanguíneo, as células se rompem no interior de seu intestino e liberam as formas amastigotas, que se transformam em promastigotas (HOARE; WALLACE, 1966) (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.**  
Fonte: Organização Mundial da Saúde (2010).

### 1.7 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico da LTA pode ser realizado através de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico da leishmaniose pode ser realizado com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. A LTA produz um amplo espectro de lesões, o que dificulta o diagnóstico clínico, tornando-o por vezes, nem sempre simples ou imediato (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

As técnicas clássicas de diagnóstico para LTA incluem diagnóstico microscópico, Intradermoreação de Montenegro, isolamento do parasito em meio de cultura e detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por métodos sorológicos (BRITO et al., 2000; WEIGLE et al., 1987). O exame mais simples e de baixo custo é a pesquisa direta de formas amastigotas visualizadas ao microscópio óptico. A sensibilidade deste teste é inversamente proporcional

ao tempo de evolução da lesão, sendo raros os parasitos após um ano de evolução da doença, com exceção dos pacientes que desenvolvem a forma difusa da LTA, pois neste caso os nódulos presentes na pele estão ricos em parasitos (CUBA CUBA et al., 1985). Além do exame direto, a tentativa do isolamento do parasito *in vivo* ou *in vitro* é fundamental, inoculando o material obtido de lesões em meio de cultura e em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*) (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Teste imunológico muito utilizado é a Intradermorreação de Montenegro (IRM) que avalia a resposta de hipersensibilidade celular tardia, uma vez que, imunologicamente, a LTA se caracteriza pela resposta celular durante a doença e após o tratamento ou cura espontânea (MARZOCHI, 1992). O teste é positivo durante a doença e após a cura e não diferencia doença atual de pregressa, nem distingue doença de infecção, porém é habitualmente negativo na forma difusa, na forma visceral e nos pacientes imunodeprimidos. A IRM é de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, constituindo valioso recurso nos casos em que os parasitos estão escassos ou ausentes, e é também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de prevalência em áreas endêmicas (KAR, 1995; SHAW; LAINSON, 1975).

Dentre os métodos sorológicos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) é o mais utilizado. É uma técnica sensível, porém apresenta reações cruzadas com outras doenças parasitárias, especialmente com a doença de Chagas e Leishmaniose Visceral, além da esquistossomose (BRITO et al., 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003; RODRIGUES et al., 2002).

A necessidade de métodos mais sensíveis tem contribuído para desenvolvimento de técnicas de diagnóstico baseadas na detecção de DNA. Em particular, os tripanosomatídeos apresentam um DNA mitocondrial, conhecido como DNA do cinetoplasto (kDNA), situado numa porção especializada destes organismos unicelulares, na base do flagelo. A estrutura básica e função do kDNA são essencialmente as mesmas para toda a ordem Kinetoplastida. O kDNA compreende uma estrutura única na natureza, representado por uma cadeia de DNA com milhares de círculos que estão topologicamente entrelaçados. Estes círculos são de dois tipos: os minicírculos e os maxicírculos. Existem milhares de pequenos círculos e poucas dúzias de maxicírculos. Ainda não está claro porque os tripanosomatídeos são os únicos eucariotos que possuem uma organização mitocondrial desse tipo (RODRIGUES, 2000). A abundância e outras características dessas moléculas tem sido alvo para um grande número de técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). (DE BRUIJN; BARKER, 1992; FABER et al., 2003; RODRIGUES et al., 2002). Vários estudos têm demonstrado também a importância do uso do kDNA na identificação e classificação das espécies de

*Leishmania* (RODRIGUEZ et al., 2004). Todavia, estudos apontam características moleculares em observações acerca de genômica funcional ocorrentes em tripanosomatídeos, o que poderia contribuir para um melhor conhecimento da natureza genotípica em *Leishmania* spp (RODRIGUES et al., 2002).

São adotados critérios pertinentes para definição de caso em LTA, sendo a pesquisa direta do protozoário na lesão, exame histopatológico ou isolamento do parasito através de cultura e PCR, os que corroboram para elucidar essa morbidade (RODRIGUES et al., 2002).

A PCR constitui o principal teste molecular devido à alta sensibilidade e especificidade podendo detectar DNA ou RNA do parasito antes mesmo de aparecerem alguns sintomas ou sinais clínicos (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). A disponibilidade de métodos diagnósticos baseados em PCR tem permitido maior sensibilidade e rapidez no diagnóstico, além da tipagem de *Leishmania* spp.

## 1.8 Tratamento

Apesar dos avanços tecnológicos na área de fármacos e dos vários esforços dedicados na tentativa de desenvolvimento de tratamentos alternativo para a LTA, as leishmanioses permanecem como doenças negligenciadas e há várias décadas é utilizada como droga de primeira escolha, o antimonial pentavalente, disponibilizado sob duas formas: antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio, dos quais o primeiro é distribuído pelo programa de controle da LTA e LVA do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2007). O stibogluconato de sódio, embora, seja, considerado uma das drogas de primeira escolha, não é distribuído pelo programa de controle das leishmanioses no Brasil. Os antimoniais são indicados para o tratamento de todas as formas de Leishmaniose Tegumentar, sendo necessário maior cuidado nos casos de leishmaniose mucosa e muco-cutânea devido a respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose seja calculada em mg/SbV/Kg/dia. Atualmente utiliza-se a seguinte dosagem: casos de lesão cutânea têm tratamento via parenteral, dose de 10 a 20 mg/Kg/dia durante 20 dias seguidos. Em lesões de mucosa a dose recomendada é de 20 mg/Kg/dia por 30 dias seguidos e em até três séries consecutivas de tratamento. Se não houver regressão após três meses do término do tratamento, deve-se repetir o esquema (BRASIL, 2007).



As drogas de segunda escolha, nos casos em que não há resposta satisfatória ao tratamento com antimoniais pentavalentes, são Anfotericina B (Fungizon<sup>®</sup>) por via endovenosa, gota-a-gota, com dose diária de 0,2mg/Kg até 50 mg/Kg, dissolvido em soro glicosado a 5% e com infusão de 3 a 4 horas; Pentamidina em doses de 4mg/Kg/dia via intramuscular de dois em dois dias (BRASIL, 2007).

Casos de leishmaniose mucosa devem ser acompanhados com mais cuidado e durante o tratamento com antimonial recomenda-se associação de corticóides para que não ocorra exacerbação das lesões e obstrução respiratória alta.

### **1.9 Critérios de Cura**

Forma cutânea: Define-se a cura a partir do aspecto clínico da(s) lesão(ões): devem apresentar-se reepitelizadas, com regressão total de infiltração e eritema, até 3 meses após o término do esquema terapêutico.

Forma mucosa: Também baseia-se no aspecto clínico, sendo necessária a regressão de todos os sinais, com comprovação por exame otorrinolaringológico até 6 meses após a conclusão do tratamento.

É necessário, ainda, que o paciente retorne mensalmente à consulta durante o primeiro trimestre após o fim do tratamento. Após a comprovação da cura, deve haver acompanhamento de 2 em 2 meses até que se completem 12 meses do fim do tratamento (BRASIL, 2007).

### **1.10 Medidas de Controle**

Um dos grandes desafios relacionados às leishmanioses, em especial à LTA, constituem as medidas de controle, visto que a diversidade de agentes etiológicos, vetores, hospedeiros e reservatórios envolvidos na transmissão, associados aos processos de adaptação destes aos ambientes modificados por ações antrópicas, convergem para um sistema complexo de difícil controle. O Manual de Controle da LTA, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2007), recomenda para um melhor controle desta

doença que deve-se buscar o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos e redução do contato homem-vetor, realizar investigações epidemiológicas; orientação quanto às medidas de proteção individual, como o uso de roupas apropriadas, repelentes, mosquiteiros; controle de reservatórios (masurpias, roedores, preguiça, tamanduá, cão e equinos) e vetores através do uso de inseticidas em áreas peridomiciliares e domiciliares, além de medidas educativas que atinjam tanto as equipes de saúde quanto a população.

## 2 JUSTIFICATIVA

O município de Vicência, localizado na Zona da Mata Norte de Pernambuco, tem apresentado elevado número de casos de LTA, constituindo-se excelente área para o estudo desta endemia. Em 2009, dos 420 casos de LTA notificados em Pernambuco, 70 foram notificados em Vicência, sendo 90% desses casos notificados em Vicência, oriundos da localidade de Imbú. O município apresenta atributos e características diversas das observadas em estudos na, Zona da Mata Sul de Pernambuco, região em foi bem caracterizada a eco-epidemiologia e o padrão de transmissão da LTA. O estudo sobre hospedeiros reservatórios de *Leishmania* spp. associadas à LTA na Zona da Mata Norte possibilitará uma comparação com aspectos caracterizados na região de Amaraji (BRANDÃO-FILHO, 2001), Zona da Mata Sul de Pernambuco e uma contribuição ao conhecimento do padrão de transmissão nesta área da Zona da Mata Norte, possibilitando desta forma um melhor embasamento para o planejamento e implementação de medidas de controle.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da LTA em Vicência, área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco.

#### 3.2 Específicos

- a) Verificar a infecção por *Leishmania (Viannia)* spp nos animais capturados através de métodos parasitológicos e moleculares;
- b) Identificar espécies de hospedeiros reservatórios envolvidos na manutenção da LTA na localidade de Imbú, Vicência.
- c) Comparar estatisticamente os resultados obtidos da infecção natural dos animais silvestres e sinantrópicos entre as diferentes espécies.
- d) Comparar os índices de infecção natural dos animais silvestres e sinantrópicos em relação às variáveis local de captura, sexo e biópsias coletadas (pele, baço e fígado).
- e) Comparar estatisticamente o resultado da infecção natural nas biópsias coletadas (pele, baço e fígado) em relação às espécies de animais silvestres e sinantrópicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo observacional do tipo descritivo como forma de identificar os hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão da LTA, através da pesquisa direta, e, por métodos moleculares.

### 4.1 Área de estudo

A pesquisa foi desenvolvida na localidade de Imbú (Figura 2 e 3), no município de Vicência, Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco, limítrofe com a mesoregião Agreste, distante à 75,4 Km da capital, Recife. Vicência possui 250,3 Km<sup>2</sup> e está localizado nas coordenadas geográficas 07° 39' 25 de Latitude; 35° 19' 36'' de Longitude; a uma altitude média de 119m do nível do mar.

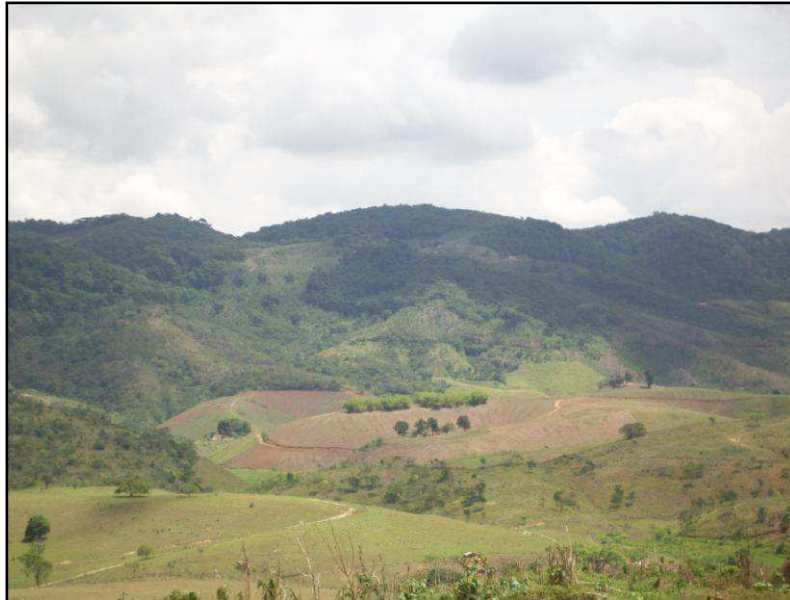


**Figura 2. Localização da área de estudo, no Estado de Pernambuco.**

Fonte: Elaborado pelo autor.

O município apresenta um baixo grau de urbanização, com 36% da sua população habitando a zona urbana, o que corresponde a cerca de 10.375 habitantes, e, 64% habitando a

zona rural (Figura 4), correspondendo a 18.444 habitantes, apresentando assim, taxas inferiores de urbanização em relação as da Zona da Mata Norte (69,68%), da Zona da Mata com 69,03% e ao Estado de Pernambuco, que apresenta 76,51% da população urbanizada.



**Figura 3. Vista panorâmica da localidade de Imbú, Vicência-PE.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009a).



**Figura 4. Domicílio na localidade de Imbú, Vicência - PE.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009b).



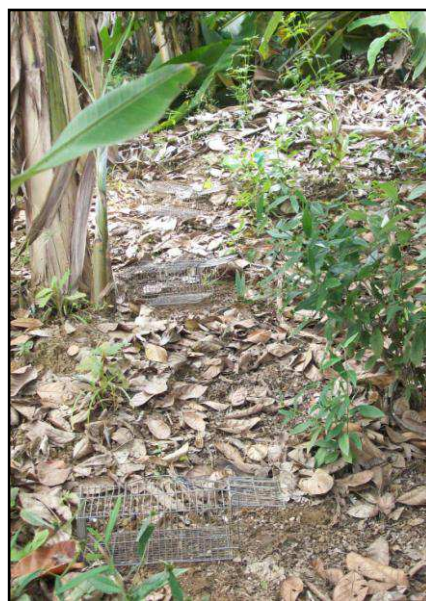
## 4.2 Captura de animais

Os animais foram capturados no período de fevereiro de 2008 a setembro de 2009. Foram realizadas capturas mensais durante cinco dias consecutivos de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos nos ecótopos correspondentes ao intra, peridomicílio e extradomicílio. No intra e peridomicílio, as capturas eram realizadas no interior e nos arredores de residências (entre 10 a 20 metros), respectivamente. No extradomicílio, as capturas foram realizadas em áreas de várzea, capinzais, áreas de plantações de milho, banana, cana de açúcar e, em áreas de resquícios de mata atlântica primitiva. Utilizamos para as capturas 40 armadilhas do tipo Tomahawk em dimensões padronizadas para pequenos mamíferos, contendo banana como iscas para os animais (Figura 5). As armadilhas foram distribuídas nos diferentes ecótopos, variando a distância no peri e extradomicílio, cerca de 3 a 5 metros umas das outras (Figura 6). As gaiolas de capturas foram instaladas no campo às 18 horas e retiradas às 7:00 horas do dia seguinte. Como forma de cobrir toda a área previamente demarcada, as armadilhas foram posicionadas em locais distintos, durante o intervalo de 12 horas.



**Figura 5. Captura de *Didelphis albiventris* utilizando Armadilha tipo Tomarrawk.**

Fonte: Marinho Júnior (2009c).



**Figura 6. Distribuição das armadilhas.**

Fonte: Marinho Júnior (2009d).

Após a captura, os animais foram retirados cuidadosamente das armadilhas e analisados para retirada de ectoparasitas, verificação da prenhez, e identificação da espécie (Figura 7). Em seguida, os animais foram acondicionados em microisoladores (Figura 8) e transportados ao Biotério NBA-3 (Nível de Biossegurança Animal 3) do CPqAM / FIOCRUZ. Os microisoladores, contendo os animais capturados, foram acondicionados em Isoladores de pressão negativa, para posterior eutanásia (Figura 9).



**Figura 7. Retirada de ectoparasitas.**

Fonte: Marinho Júnior (2009e).



**Figura 8. Acondicionamento dos roedores em microisoladores.**

Fonte: Marinho Júnior (2009f).

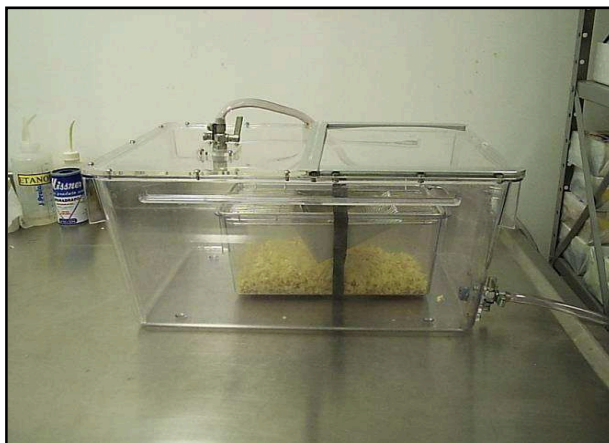




**Figura 9. Isoladores para acondicionamento dos roedores.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009g).

### 4.3 Eutanásia

Após período de quarentena no Biotério NBA-3, os animais capturados foram eutanasiados utilizando Câmara de CO<sub>2</sub> (Figura 10). Procedeu-se a necropsia dos animais coletando fragmento de baço para inóculo em meio de cultivo NNN modificado (Difco 45®) (Figura 11) e preparo de lâminas de “imprint” de baço e pele, e, esfregaço sanguíneo para pesquisa direta (Figura 12). As lâminas, após secagem, foram coradas com Giemsa 2% para posterior exame em microscópio óptico. Em seguida, foram coletadas biópsias de pele (orelha direita), baço e fígado em duplicata. As biópsias foram armazenadas em nitrogênio líquido, sendo uma delas destinada à análise molecular e, a outra, para estoque.



**Figura 10. Câmara de CO<sub>2</sub>.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009h).



**Figura 11. Processamento de fragmento de baço para inóculo em meio de cultivo NNN modificado.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009i).



**Figura 12. Confeção de lâmina (esfregaço) para pesquisa direta.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009j).

## 4.4 Diagnóstico

### 4.4.1 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta

As lâminas de esfregaço de sangue de fígado, e, lâminas de imprint de pele e baço confeccionadas na eutanásia dos roedores, foram examinadas em microscópio óptico com

objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* (BRASIL, 2007). Na tentativa de isolamento *in vitro* de *Leishmania* spp. em meio de cultivo NNN modificado (Difco 45®), foi retirado um fragmento de baço dos animais, imerso em solução salina e, em seguida, imerso em solução de antibióticos a 1% contendo penicilina e estreptomicina. Posteriormente, o fragmento foi macerado em 1mL da mesma solução com antibióticos e inoculado em meio NNN modificado (WALTON et al., 1977), para cultivo *in vitro*. As culturas foram observadas por 21 dias, em intervalos de 3 a 5 dias para pesquisa de promastigotas. Após esse período, as culturas com resultado negativo foram desprezadas.

#### 4.4.2 Abordagens moleculares

##### *4.4.2.1 Extração e purificação de DNA*

A extração de DNA de biópsias pele (orelha direita, baço e fígado) dos roedores e da cepa de referência MHOM/BR/75/M2903 foi realizada com o Illustra GenomicPrep Cells™ and Tissue DNA Isolation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as instruções do fabricante. Para cada extração foi utilizado aproximadamente 20 mg de biópsia. Após precipitação do DNA genômico purificado, o “pellet” foi ressuscitado em 100 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e estocado a -20°C. Dois µL foram usados na PCR.

As amostras devidamente purificadas foram quantificadas utilizando espectrofotômetro Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech®, para avaliação do grau de pureza de DNA genômico e concentração adequada à PCR.

##### *4.4.2.2 Amplificação do DNA através de PCR*

O DNA contido nos roedores silvestres e sinantrópicos foi submetido à amplificação em um termociclador automático (Master Cycler gradient - Eppendorf®). O sistema de PCR utilizava oligonucleotídeos iniciadores específicos que amplificava kDNA de parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia* (DE BRUIJN; BARKER, 1992).

#### 4.4.2.3 PCR específica para o subgênero *Viannia*

Na análise de PCR foram utilizados os oligonucleotídeo iniciador B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') (DE BRUIJN; BARKER, 1992). O oligonucleotídeo iniciador B1 é específico para cinetoplastídeos (hibridiza na possível origem de replicação), enquanto que o outro oligonucleotídeo B2 é específico para o subgênero *Viannia*. A PCR foi realizada em um volume final de 25µL contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,8 mM, 100 pmoles de cada um dos “primers” e 1 U de *Taq* DNA Polimerase. A essa mistura foram adicionados 2 µL da amostra a ser analisada. A PCR foi realizada em 35 ciclos (94 °C, 1 min; 65 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) (ERESH; MCCALLUM; BARKER, 1994), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C.

Como forma de minimizar o risco de contaminação da PCR com os produtos amplificados, um fluxograma de trabalho foi elaborado a fim de evitar a interação entre as áreas de pré-amplificação e pós-amplificação. Além disso, dois controles negativos (sem DNA) foram incluídos a cada preparação de novas reações juntamente com dois controles positivos procedentes de uma cepa de *Leishmania (V.) braziliensis* (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903) com 10 µg e 1 µg de DNA genômico de *Leishmania (V.) braziliensis* (controles de contaminação e controle de sensibilidade da PCR, respectivamente).

#### 4.4.2.4 Análise dos produtos da PCR

Dez µL dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% para o alvo de 750 pb com tampão TAE 1 x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) corados por solução de brometo de etídeo 10 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As bandas de DNA separadas eletroforéticamente foram visualizadas em um transluminador de luz ultravioleta e digitalizados com um sistema de documentação (Gel Logic 100 Imagem System Kodak®).

#### **4.5 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram processados e analisados através do programa estatístico Qui-quadrado, e, para a construção de tabelas e gráficos, foi utilizado o programa Excel (Microsoft®) (ZAR, 1996).

## 5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para realização deste trabalho obtivemos Certificado da Comissão de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA / FIOCRUZ), segundo o protocolo intitulado: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão (Anexos A e B), e, Autorização para atividades com finalidade científica (Anexo C) emitida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Capturas de Animais

Durante o período de fevereiro de 2008 a setembro de 2009 foram capturados 195 animais silvestres e sinantrópicos pertencentes a nove espécies diferentes (Tabela 1), sendo 106 machos e 89 fêmeas. As capturas ocorreram em ambientes de domicílios correspondentes ao intradomicílio (três animais), peridomicílio (sete animais) e extradomicílio (185 animais). As espécies *Nectomys squamipes* 51,3% (100/195) e *Rattus rattus* 25,1% (49/195) foram as principais encontradas, sendo esta última, a única espécie encontrada no Intra e Peridomicílio (Tabela 1).

Dos animais capturados, dezoito foram devolvidos ao campo, por não possuímos microisoladores com dimensão adequada para estes animais, sendo: 15 *Didelphis albiventris* (nove machos e seis fêmeas), dois *Monodelphis domestica* (um macho e uma fêmea) e um *Marmosa* spp. (fêmea); dois morreram no cativeiro: um *Nectomys squamipes* (macho) e um *Holochilus sciureus* (fêmea); e um *Nectomys squamipes* (fêmea) foi destinado à colônia de roedores silvestres localizada no Biotério NA-3 (CPqAM/FIOCRUZ-PE), sendo eutanasiados os 174 restantes (Tabela 2).

**Tabela 1. Animais silvestres e sinantrópicos capturados por ambiente de captura na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

Espécie	Locais de captura			Total	%
	Intradomicílio	Peridomicílio	Extradomicílio		
<i>Nectomys squamipes</i>	0	0	100	100	51,3
<i>Rattus rattus</i>	3	7	39	49	25,1
<i>Didelphis albiventris</i>	0	0	15	15	7,7
<i>Necomys lasiurus</i>	0	0	12	12	6,2
<i>Holochilus sciureus</i>	0	0	10	10	5,1
<i>Oryzomys subflavus</i>	0	0	3	3	1,5
<i>Galea spixii</i>	0	0	3	3	1,5
<i>Monodelphis domestica</i>	0	0	2	2	1,0
<i>Marmosa sp</i>	0	0	1	1	0,5
Total	3	7	185	195	100

**Tabela 2. Roedores silvestres e sinantrópicos, discriminados por sexo, utilizados para pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp., capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

Espécie	♂	%	♀	%	Total	%
<i>Nectomys squamipes</i>	49	50,0	49	50,0	98	56,3
<i>Rattus rattus</i>	35	71,4	14	28,6	49	28,2
<i>Necomys lasiurus</i>	5	41,7	7	58,3	12	6,9
<i>Holochilus sciureus</i>	3	33,3	6	66,7	9	5,2
<i>Oryzomys subflavus</i>	2	66,7	1	33,3	3	1,7
<i>Galea spixii</i>	1	33,3	2	66,7	3	1,7
Total	95		79		174	100

## 6.2 Diagnóstico parasitológico: cultura e pesquisa direta

Foram realizados 174 inóculos em meio de cultivo NNN modificado de material de baço dos roedores silvestres e sinantrópicos eutanasiados, no entanto, nenhum isolamento foi obtido.

Utilizando o método de pesquisa direta, na busca de formas amastigotas de *Leishmania* spp., foi observada presença de amastigotas em 9,52% (2/21) das lâminas de imprint de pele. Em lâminas de imprint oriundas de baço, foram visualizadas amastigotas em 4,65% (2/43) e em esfregaço sanguíneo 2,32%, o que corresponde a 1 de 43 lâminas. Todos os animais positivos na pesquisa direta de *Leishmania* spp., foram positivos, através da técnica de PCR, para a detecção de *Leishmania* (*Viannia*) spp.

## 6.3 Diagnóstico molecular: PCR específica para o subgênero *Viannia*

Foram analisadas por PCR para detecção de *Leishmania* (*Viannia*) spp., 517 amostras oriundas de 174 roedores silvestres e sinantrópicos sendo: 170 amostras de pele, 174 amostras de baço, e, 173 amostras de fígado. Nenhum dos 174 roedores silvestres e sinantrópicos analisados apresentou resultado positivo simultâneo para as três amostras analisadas (pele, baço e fígado).



### 6.3.1 Amostras de pele dos roedores silvestres e sinantrópicos

Foram analisadas 170 amostras de pele apresentando positividade em 26,5%, 45 no total. Como exemplo, podemos observar na figura 13, amostras positivas de pele dos roedores. Não houve significância estatística ( $p=0,8962$ ) quando comparamos os resultados de infecção de pele de roedores em relação às espécies (Tabela 3).

**Tabela 3. Resultados de infecção natural por *Leishmania* spp. através da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores B1/B2 a partir de amostras de pele de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

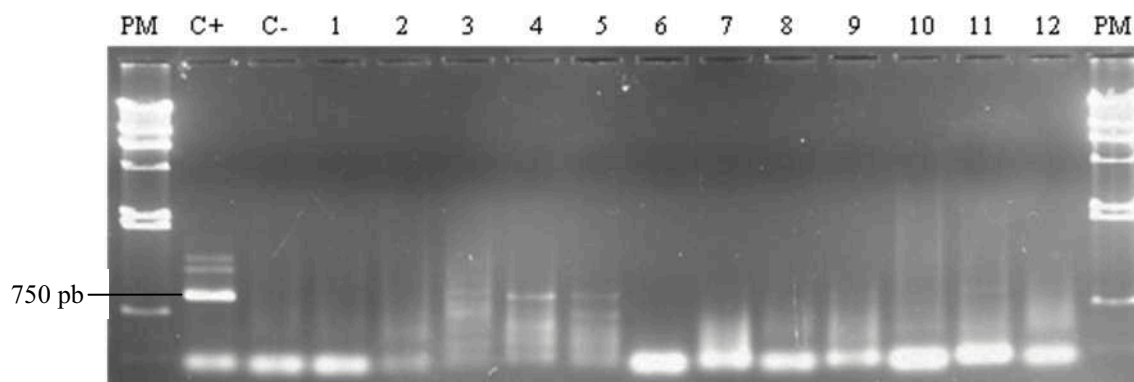
Espécie	N	PCR+	%
<i>Nectomys squamipes</i>	97	27	27,8
<i>Rattus rattus</i>	46	12	26,1
<i>Necromys lasiurus</i>	12	2	16,7
<i>Holochilus sciureus</i>	9	3	33,3
<i>Oryzomys subflavus</i>	3	0	0,0
<i>Galea spixii</i>	3	1	33,3
Total	170	45	26,5

Nota:

N= nº amostras de pele analisadas

PCR+ = amostras positivas na PCR

$p= 0,8962$



**Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de pele de animais silvestres e sinantrópicos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.**

Nota: Amostras de pele de animal silvestre (1-12) controle negativo (C-) e controle positivo (C+). O produto de amplificação de 750 bp encontra-se indicado por seta. PM, marcador de peso molecular  $\lambda$  + *Hind* III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

### 6.3.2 Amostras de baço dos roedores silvestres e sinantrópicos

A PCR descrita por de Bruijn e Barker (1992), capaz de identificar infecções causadas por parasitos do subgênero *Viannia*, foi positiva em 21 amostras (12,1%) do total de 174 amostras de baço analisadas. A figura 14 ilustra resultado de PCR de amostras de baço positivas. Comparando a infecção natural de amostras de baço detectada pela PCR, em relação às espécies estudadas, não houve significância estatística com  $p=0,5424$  (Tabela 4).

**Tabela 4. Resultados de infecção natural por *Leishmania* spp. através da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores B1/B2 a partir de amostras de baço de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

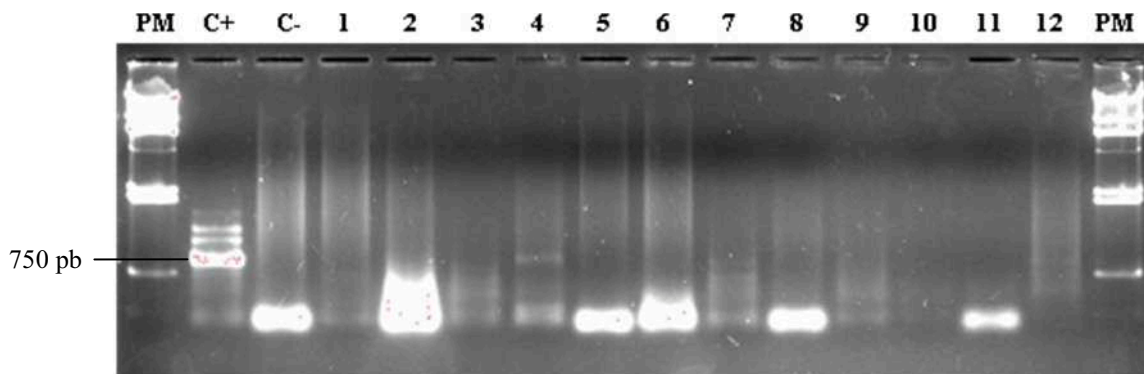
Espécie	N	PCR+	%
<i>Nectomys squamipes</i>	98	11	11,2
<i>Rattus rattus</i>	49	8	16,3
<i>Necomys lasiurus</i>	12	0	0,0
<i>Holochilus sciureus</i>	9	2	22,2
<i>Oryzomys subflavus</i>	3	0	0,0
<i>Galea spixii</i>	3	0	0,0
Total	174	21	12,1

Nota:

N= nº amostras de baço analisadas

PCR+ = amostras positivas na PCR

$p=0,5424$



**Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de baço de animais silvestres e sinantrópicos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.**

Nota: Amostras de baço de animal silvestre (1-12) controle negativo (C-) e controle positivo (C+). O produto de amplificação de 750 bp encontra-se indicado por seta. PM, marcador de peso molecular  $\lambda$  + *Hind* III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

### 6.3.3 Amostras de fígado dos roedores silvestres e sinantrópicos

Das 173 amostras analisadas de fígado dos animais, 5 (2,9%) foram consideradas positivas para subgênero *Viannia*. Na figura 15, observamos amostra de fígado positiva de um roedor *Nectomys squamipes*. A análise estatística comparando a infecção natural em relação às espécies não apresentou significância ( $p=0,8577$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5. Resultados de infecção natural por *Leishmania* spp. através da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores B1/B2 a partir de amostras de fígado de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

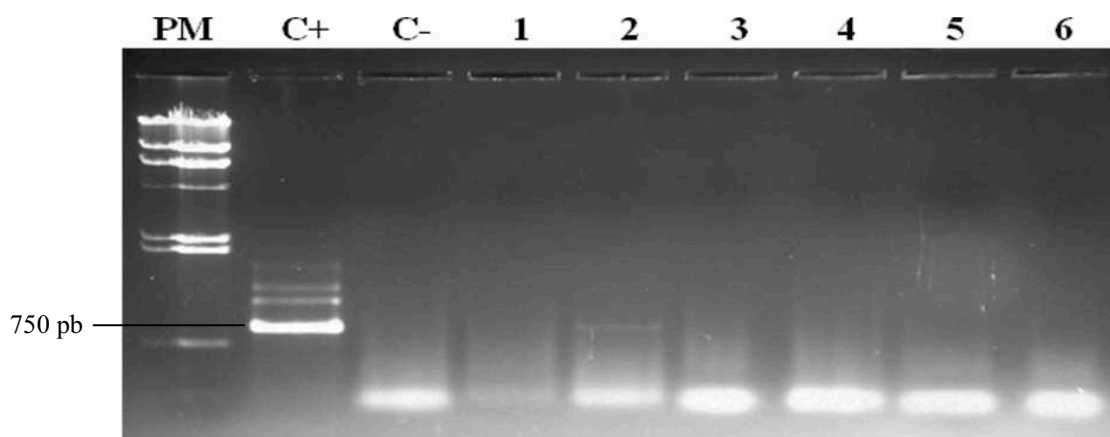
Espécie	N	PCR+	%
<i>Nectomys squamipes</i>	97	4	4,1
<i>Rattus rattus</i>	49	1	2,0
<i>Necomys lasiurus</i>	12	0	0,0
<i>Holochilus sciureus</i>	9	0	0,0
<i>Oryzomys subflavus</i>	3	0	0,0
<i>Galea spixii</i>	3	0	0,0
Total	173	5	2,9

Nota:

N= n° amostras de fígado analisadas

PCR+ = amostras positivas na PCR

$p= 0,8577$



**Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de fígado de animais silvestres e sinantrópicos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.**

Nota: Amostras de fígado de animal silvestre (1-6) controle negativo (C-) e controle positivo (C+). O produto de amplificação de 750 bp encontra-se indicado por seta. PM, marcador de peso molecular  $\lambda$  + *Hind* III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

Do total de testes positivos através de PCR em tecidos de seis espécies analisadas, foi verificada a infecção natural em cinco: *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Necromys lasiurus*, *Holochilus sciureus* e *Galea spixii*. A espécie *Oryzomys subflavus* não apresentou infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. O percentual total de positividade foi de 35,6% (62/174). Não foi possível atribuir que o dado foi significativamente estatístico ( $p=0,5273$ ), quando foi comparado infecção entre as diferentes espécies (Tabela 6).

**Tabela 6. Resultados da infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp., através de PCR, em roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência-PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

Espécie	N	PCR+	%
<i>Nectomys squamipes</i>	98	35	35,7
<i>Rattus rattus</i>	49	20	40,8
<i>Necromys lasiurus</i>	12	2	16,7
<i>Holochilus sciureus</i>	9	4	44,4
<i>Oryzomys subflavus</i>	3	0	0,0
<i>Galea spixii</i>	3	1	33,3
Total	174	62	35,6

Nota:

N= n° animais analisados

PCR+ = positivos em 1 ou mais tecidos na PCR

$p=0,5273$

Entre as espécies de *Nectomys squamipes*, capturadas em área de várzea e resquícios de mata atlântica do extradomicílio (Figura 16), analisados para detecção de DNA de *Leishmania (Viannia)* spp., verificamos que 35,7% (35/98) encontravam-se infectados naturalmente. Dentre esses animais, 28 apresentaram resultado positivo em apenas uma amostra: 20 em pele, seis em baço e dois em fígado; sete animais positivos em duas amostras: cinco positivos em amostras de pele e baço, e, dois positivos em amostras de pele e fígado (Tabela 7).



**Figura 16. Roedor silvestre *Nectomys squamipes*.**  
Fonte: Sawaya (2010).

Considerando os espécimes de *Rattus rattus* (Figura 17) capturados nos três ambientes de captura: intra, peri e extradomicílio (plantações de milho), verificamos que 40,8% (20/49) destes apresentaram infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. Os resultados das análises utilizando PCR consideraram os tecidos positivos, demonstrando que 11 exemplares foram positivos apenas para pele, oito positivos apenas em baço e um positivo para pele e fígado (Tabela 7).



**Figura 17. Roedor sinantrópico *Rattus rattus*.**  
Fonte: Brasil (2007).

A espécie *Necromys lasiurus* (Figura 18), encontrada nas plantações, capinzais e resquícios de mata atlântica do extradomicílio, apresentou um percentual de 16,7% (2/12) de sua população infectada naturalmente, sendo detectada através da positividade de amostras de

pele em PCR. Todas as amostras de baço e fígado examinadas apresentaram resultados negativos (Tabela 7).



**Figura 18. Roedor silvestre *Necromys lasiurus*.**  
Fonte: Brasil (2007).

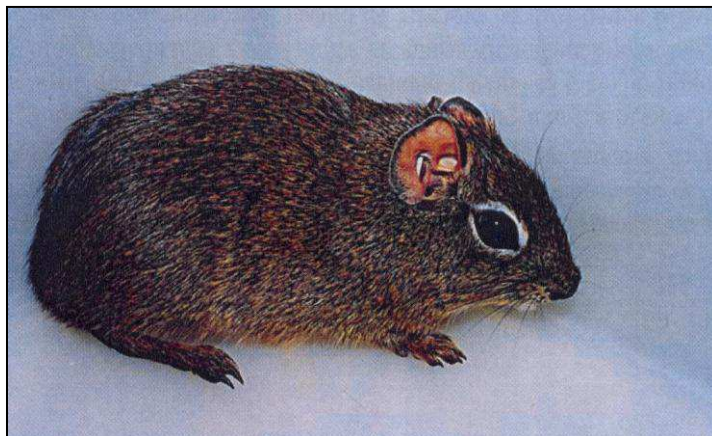
Considerando a espécie *Holochillus sciureus* (Figura 19), capturada no extradomicílio (área de várzeas e resquícios de mata), foi observado um percentual de 44,4% (4/9) dos espécimes capturados, quando detectado por PCR. Dois animais apresentaram infecção somente em pele, um animal em baço e um animal apresentou infecção em dois tecidos (baço e pele). Nas amostras de fígado analisadas não foi detectada infecção por *Leishmania (Viannia) spp.* (Tabela 7).



**Figura 19. Roedor silvestre *Holochillus sciureus*.**  
Fonte: Sawaya (2010).



Dos três exemplares de *Galea spixii* (Figura 20) capturados em área de capinzais do extradomicílio, apenas um (33,3%) apresentou infecção por *Leishmania (Viannia)* spp., obtendo-se positividade em uma amostra de pele analisada por PCR (Tabela 7).



**Figura 20. Roedor silvestre *Galea spixii*.**  
Fonte: Marinho Júnior (2009k).

**Tabela 7. Resultados de PCR para infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp., através de PCR, considerando os diferentes tecidos de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência - PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

Espécie	PCR					Total
	P+	B+	F+	P+/B+	P+/F+	
<i>Nectomys squamipes</i>	20	6	2	5	2	35
<i>Rattus rattus</i>	11	8	0	0	1	20
<i>Necomys lasiurus</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Holochilus sciureus</i>	2	1	0	1	0	4
<i>Oryzomys subflavus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Galea spixii</i>	1	0	0	0	0	1
Total	36	15	2	6	3	62

Nota:

P+ = Animais com apenas amostras de pele positivas

B+ = Animais com apenas amostras de baço positivas

F+ = Animais com apenas amostras de fígado positivas

P+/B+ = Animais com amostras de pele e baço positivas

P+/F+ = Animais com amostras de pele e fígado positivas

Considerando os 174 espécimes eutanasiados por ambiente de captura, três animais foram capturados no intradomicílio, sete no peridomicílio e 164 no extradomicílio. Nas capturas de intra e peridomicílio apenas a espécie *Rattus rattus* foi encontrada. Em relação aos animais capturados no intradomicílio, *Rattus rattus* (33,33%) apresentou positividade quando

analisado através da técnica de PCR. Na análise realizada em sete espécimes de *Rattus rattus* capturados no peridomicílio, cinco (71,4%) foram positivos na PCR e no extradomicílio foi encontrado um percentual de positividade de 35,9% (14/39).

Num contexto geral, quando foi comparada a infecção entre as diferentes amostras (pele, baço e fígado) e o ambiente de captura (intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio), houve diferença significativa unicamente com a amostra de pele e o local de captura ( $p=0,0208$ ), como demonstrado na Tabela 8. Comparando a infecção por *Leishmania (Viannia) spp.* em relação ao sexo dos animais, não houve diferença significativa conforme demonstrado na Tabela 9.

**Tabela 8. Comparação entre a infecção por *Leishmania (Viannia) spp.* dos diferentes tecidos em relação ao ambiente de captura, de roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência - PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

Variáveis	Ambiente de captura						p-valor
	Extradomicílio		Intradomicílio		Peridomicílio		
	N	%	N	%	N	%	
<b>Pele</b>							
Neg	121	75,62	2	66,67	2	28,57	0,0208
Pos	39	24,38	1	33,33	5	71,43	
<b>Baço</b>							
Neg	143	87,2	3	100	7	100	0,7281
Pos	21	12,8	0	0	0	0	
<b>Fígado</b>							
Neg	159	97,55	3	100	6	85,71	0,2602
Pos	4	2,45	0	0	1	14,29	

**Tabela 9. Comparação entre a infecção por *Leishmania (Viannia) spp.* e o sexo dos roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Imbú, Vicência - PE, no período de março de 2008 a setembro de 2009.**

Sexo	Infecção				p-valor
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
Fêmea	52	46,43	27	43,55	0,8364
Macho	60	53,57	35	56,45	



## 7 DISCUSSÃO

Todas as formas de leishmaniose nas Américas são zoonoses (LAINSON; SHAW, 2005). Há vários anos, alguns grupos de pesquisa, tem contribuído com a busca de hospedeiros reservatórios envolvidos nos ciclos enzoótico e zoonótico, com hipóteses que especulam e comprovam o papel de diferentes animais silvestres como reservatórios de *Leishmania* que causam a forma tegumentar.

Estudos têm demonstrado que roedores silvestres possuem papel fundamental na transmissão, atuando como reservatórios. Vários achados comprovaram esta tese, e acredita-se que os principais reservatórios de *L. amazonensis* sejam os roedores do gênero *Proechymis*. Já os reservatórios principais de *L. guyanensis* são edentados como o tamanduá e a preguiça (LAINSON et al., 1981; SHAW; LAINSON, 1998).

No Brasil, depois de vários anos de estudo, são poucos os reservatórios de *L.(V.) braziliensis* comprovados. *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* foram apontados, respectivamente, como reservatórios primários e secundário de *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). O padrão de transmissão dessa espécie é extremamente complexo em função de vários ecótopos onde este parasito é prevalente. Em microambientes diferentes, a transmissão envolve diversas espécies de flebotomíneos ou ainda a mesma espécie apresentando hábitos modificados e diferentes espécies de mamíferos. Estudos têm demonstrado que o padrão de transmissão da LTA varia de acordo com particularidades de cada região, o que dificulta bastante os mecanismos de controle, sugerindo ações específicas voltadas para cada foco endêmico. A *L. (V.) braziliensis* é o agente causal mais comum de LTA no Brasil e na América Latina (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; GONTIJO et al., 2002; PASSOS et al., 1993).

No estado de Pernambuco, 60% dos casos de LTA concentram-se na Zona da Mata (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), região em que predomina a cultura da cana de açúcar, plantações de banana e mandioca, dentre outras, e, onde grande parte da população reside em áreas rurais, com ocupação em atividades agrícolas. No município de Vicência, onde predominam as culturas da cana de açúcar e banana, mais de 60% da população reside na área rural. Segundo dados do SINAN e da Secretaria Municipal de Saúde de Vicência, foram registrados no período deste estudo (2008-2009), 90 casos de LTA, e destes, mais de 90% foram notificados na localidade de Imbú, envolvendo pacientes de todas as faixas etárias, inclusive crianças, o que sugere uma provável domiciliação da endemia, podendo, os roedores

e os animais domésticos presentes no intra e peridomicílio participar efetivamente do ciclo de transmissão.

Durante o século XX, foram registrados em várias regiões das Américas, achados referindo-se a *L. braziliensis* em diversos mamíferos silvestres e sinantrópicos, isto baseando-se apenas em características morfológicas do parasito ao microscópio óptico ou no comportamento de crescimento deste parasito em meio de cultura e ou em animais de experimentação como o hamster, considerado o modelo mais sensível à infecção (FORATTINI et al., 1972; LAINSON; SHAW, 1979; MAYRINK et al., 1979). As dificuldades para o isolamento e identificação dos parasitos, particularmente *L. braziliensis*, contribui para manutenção da transmissão em áreas onde os reservatórios naturais são geralmente desconhecidos.

Diversos estudos, utilizando principalmente abordagens moleculares, têm demonstrado a participação de roedores silvestres e sinantrópicos nos ciclos de transmissão da LTA, enfatizando a diversidade não só de reservatórios, mas também de agentes etiológicos e vetores, que configuram atributos particulares no padrão de transmissão da LTA em cada região. O teste de PCR tem sido uma ferramenta muito útil nos estudos epidemiológicos, tendo em vista a limitação do diagnóstico parasitológico da infecção através do isolamento e tipagem de espécies como *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO; SHAW, 2006).

A diversidade da fauna de roedores silvestres e sinantrópicos capturados em Imbú, Vicência – PE, demonstra que não há diferença significativa entre as espécies e infecção, reforçando a hipótese de que todas as espécies de roedores silvestres e sinantrópicos possuem a mesma importância, do ponto de vista estatístico, no ciclo de transmissão da LTA. Por outro lado, destaca-se um papel diferenciado de *Rattus rattus*, espécie provavelmente envolvida no ciclo doméstico zoonótico de transmissão, estabelecido no intra e peridomicílio.

Através da abordagem da PCR para detecção de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, foi obtida no presente estudo, uma positividade de 35,6% (62/174) para os animais silvestres e sinantrópicos examinados, sendo positivas amostras de pele, baço e fígado, provenientes de cinco diferentes espécies: *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Necromys lasiurus*, *Holochillus sciureus* e *Galea spixii*. Apenas a espécie *Oryzomys subflavus* não apresentou positividade, o que não descarta a participação dessa espécie como reservatório, pois há estudos que demonstram sua infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (GRIMALDI; TESH, 1993; MELO 2008; OLIVEIRA et al., 2005) e *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993). Em Cuiabá, no estado de Mato Grosso, foi detectada a infecção

por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em 23,86% (21/84) da fauna de roedores (FREITAS, 2010).

Nossos achados corroboram com estudos anteriores sobre hospedeiros reservatórios na Zona da Mata pernambucana, onde na Mata Sul, município de Amaraji, 17,6% dos animais silvestres e sinantrópicos apresentaram, através de PCR, infecção por *Leishmania (Viannia) spp.* *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus*, *Rattus rattus* e *Holochillillus sciureus*, obtendo inclusive seis isolados de *L. (V.) braziliensis* dos roedores *Necromys lasiurus* (5/6) e *Rattus rattus* (1/6) (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Já na Mata Norte, município de São Vicente Férrer, 9,32% dos animais apresentaram infecção por *Leishmania (Viannia) spp.* *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Holochillillus sciureus*, com um isolamento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no roedor *Nectomys squamipes* (LIMA, 2007).

A pele dos animais examinados foi o tecido que apresentou maior positividade 26,5% (45/174). Outros estudos já demonstraram a infecção por *Leishmania spp.* em pele de animais silvestres e sinantrópicos através da detecção de DNA por PCR. Em Minas Gerais, foi obtida uma positividade de 6,4%, sendo detectados DNA de *Leishmania* dos complexos *braziliensis* e *donovani* em amostras de pele de algumas espécies de roedores silvestres assintomáticos (OLIVEIRA et al., 2005). Em Mato Grosso, 7,95% de amostras de pele oriundas de roedores apresentaram infecção por *Leishmania* subgênero *Viannia* (FREITAS, 2010). Estudos na Zona da Mata Sul em Pernambuco apresentaram 17,6% de positivos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), enquanto que na Mata Norte, município de São Vicente Férrer, 18,64% das amostras foram positivas para *Leishmania (Viannia) spp.* (LIMA, 2007). Em todos os estudos realizados, a espécie *Rattus rattus* apresenta evidências de infecção por *Leishmania spp.* Esta espécie apresenta comportamento típico em ambiente doméstico, todavia parece ser muito comum em áreas endêmicas de LTA no Brasil, podendo estar diretamente relacionada com o ciclo zoonótico de transmissão.

Em relação aos achados encontrados em amostras de baço dos roedores silvestres, o índice de 12,1% (21/174) dos animais naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia) spp.*, pertencentes as espécies *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Holochillillus sciureus*, são menores que os achados encontrados na Zona da Mata Sul de Pernambuco por Brandão-Filho et al. (2003), que detectaram 16% de positividade de baço de roedores, enquanto que Lima (2007), não detectou a infecção por *Leishmania* neste tecido. Em Minas Gerais estudo demonstrou que 7,29% das amostras de baço de roedores apresentavam infecção por *Leishmania spp* (MELO, 2008).

Os resultados, utilizando abordagem molecular, a partir de tecido hepático dos roedores, apresentaram 2,9% (5/174) de positividade. Considerando apenas os resultados de fígado para diagnóstico da infecção, dois animais foram positivos nessa amostra. Esses resultados divergem de um estudo realizado em Minas Gerais, onde 15,25% das amostras de fígado de roedores foram positivas, constituindo neste estudo, as amostras de fígado como principal órgão de infecção por *Leishmania* spp., nos roedores oriundos do município de Belo Horizonte - MG (MELO, 2008).

Apesar de ser conhecida a dificuldade de crescimento do parasito em meio de cultura, o cultivo *in vitro* é fundamental, pois permite o isolamento de *Leishmania* para posterior identificação e caracterização da espécie. Embora tenhamos obtido elevada positividade em PCR (35,6%) e encontrado amastigotas na pesquisa direta de imprint de pele (9,52%), baço (4,65%) e esfregaço (2,32%) dos roedores eutanasiados, infelizmente não foi possível o isolamento do parasito. A dificuldade no isolamento de *Leishmania* (*Viannia*) spp. já foi relatada por Brandão-Filho e Shaw (2006). Os autores atribuem o sucesso no isolamento de *Leishmania* spp. ao período em que os animais apresentam parasitemia elevada. Entretanto, os fatores que controlam os níveis do parasito em reservatórios silvestres ainda são desconhecidos.

Embora a maior parte da detecção molecular de infecção por *Leishmania* (*Viannia*) spp. tenha sido obtida em análise de pele dos roedores 72,58%(45/62), a positividade encontrada em baço e fígado, associada a achados de outros estudos, sugerem uma circulação do parasito em todo o organismo dos roedores. Em alguns casos, a infecção nestes órgãos, apresenta inclusive, maior positividade quando comparados aos resultados de pele (MELO, 2008), sugerindo diferentes comportamentos do parasito em hospedeiros reservatórios. O comportamento parasitário está intimamente relacionado ao tropismo celular, ao alvo preferencial, onde estão relacionados mecanismos imunológicos e moleculares envolvidos durante o processo de infecção.

De especial importância ao presente estudo, os resultados de positividade de *Galea spixii*, constituem primeiro relato na literatura de infecção dessa espécie por *Leishmania* (*Viannia*) spp., apontando-a com possível hospedeiro reservatório no ciclo de transmissão da LTA na Zona da Mata Norte de Pernambuco. Em Pernambuco, já há relatos de *Galea spixii* atuando como possível reservatório de *Leishmania infantum chagasi* (dados não publicados de grupo de pesquisa). Desta forma, para ajudar a melhor esclarecer o papel desses roedores como hospedeiros de *Leishmania*, são necessários mais estudos sobre a participação desta espécie nos ciclos de transmissão da LVA (BARBOSA et al., 2008) e LTA.

As espécies *Didelphis albiventris*, *Monodelphis domestica* e o exemplar de *Marmosa* spp., que foram devolvidos ao campo, apesar de não terem participado das análises, podem efetivamente, também participar do ciclo de transmissão, pois existem relatos na literatura que demonstram a infecção destes animais por *Leishmania (Viannia)* spp. (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; FREITAS, 2010; MELO, 2008).

Durante os estudos sobre reservatórios em Vicência, também foi realizado, paralelamente, pesquisa sobre flebotomíneos vetores de *Leishmania* spp. na região, que apresentou a espécie *Lutzomyia whitmani* como a principal espécie encontrada no peri e intradomicílio, corroborando esse resultado com os achados de Brandão-Filho et al. (2003) que incriminaram esta espécie como vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Mata Sul, obtendo inclusive, isolamento de *L. (Viannia) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; BRITO et al., 2009). Já no extradomicílio, ambiente caracterizado principalmente por plantações e resquícios de mata atlântica, resultados obtidos sobre vetores, ainda não publicados por nosso grupo de pesquisa, encontraram *Lutzomyia complexa* como espécie predominante da fauna flebotomínica, corroborando com resultados de Lima (2007), e identificaram a infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. em um exemplar de *Lutzomyia viannamartinsi*. Informação que, além de sugerir a participação de outras espécies de flebotomíneos no ciclo de transmissão silvestre de LTA, reforça nossos achados no intuito de identificar e comprovar a participação de roedores silvestres e sinantrópicos, como hospedeiros reservatórios, no ciclo de transmissão de LTA na localidade de Imbú.

Comparando a infecção dos diferentes tecidos (pele, baço e fígado) com o local de captura dos animais, verificou-se como significativamente estatístico ( $p=0,0208$ ), reforçando que, no peridomicílio, a probabilidade de infecção encontrada nos roedores é de 71,43%, o que demonstra o alto risco de infecção existente neste ambiente estudado. Esses achados corroboram com estudo realizado em Minas Gerais, no qual, 44,44% (12/27) dos animais capturados no peridomicílio foi detectada a infecção por *Leishmania* spp. (MELO, 2008). Neste estudo em Minas Gerais foram capturadas no peridomicílio as espécies *Didelphis albiventris*, *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*. É importante ressaltar, que em nosso estudo, nos ambientes do peri e intradomicílio, apenas a espécie *Rattus rattus* foi encontrada.

Embora não tenhamos obtido isolamento de *Leishmania* spp., a presença do roedor *Rattus rattus* nos domicílios, associados a presença de casos de LTA, sugerem um elo entre os ciclos silvestres e domésticos de transmissão da LTA, com uma provável participação deste roedor como ligação entre os ambientes silvestre e doméstico. Estudos tem demonstrado a

importância desta espécie em ambientes urbanos atuando como reservatório de *Leishmania* nas regiões metropolitanas de Belo Horizonte-MG (MELO, 2008) e Cuiabá-MT (FREITAS, 2010).

Sabe-se que a detecção de infecção natural por *Leishmania* spp. em um roedor é uma forte evidência para suspeitá-lo como um hospedeiro reservatório, porém isto não é suficiente para incriminá-lo como tal. De acordo com Ashford (1996), considera-se reservatório a espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço. Para se definir uma determinada espécie como reservatório, é necessário estabelecer também certos parâmetros, como a distribuição geográfica do hospedeiro e do parasito dentro da área de distribuição do hospedeiro, a dinâmica das populações de hospedeiros no tempo, necessitando ainda de estudos longitudinais para identificar os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo, sua flutuação sazonal, e estabilidade da infecção e transmissibilidade.

A dificuldade de se estabelecer medidas efetivas de controle da LTA é, sobretudo, resultado de uma complexa associação casuística desta endemia, relacionada com as diversas manifestações clínicas, as limitações da terapêutica existente e à diversidade de vetores e reservatórios envolvidos nos ciclos de transmissão, principalmente, no que se refere à LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, protozoário presente em todas as regiões brasileiras, que tem apresentado a cada região estudada, distintos padrões de transmissão, tornando a LTA, um desafio aos parasitologistas e aos programas de controle.

Neste sentido, este estudo contribui para a identificação de hospedeiros reservatórios envolvidos em área de elevada endemicidade de LTA associada *L. (V.) braziliensis*, com evidências consistentes sobre a provável participação de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos na manutenção do ciclo zoonótico de transmissão. Por outro lado, o estudo também contribui diretamente com a caracterização do padrão de transmissão envolvido nesta região, contribuindo desta forma para o conhecimento da eco-epidemiologia da LTA em importante área endêmica de colonização antiga na região da Mata Atlântica.

Finalmente, em linhas gerais o estudo contribui direta e indiretamente para a melhor compreensão sobre aspecto importante da manutenção desta endemia, que constitui um importante problema de saúde pública no Brasil e nas Américas, com especial importância na região Nordeste.

## 8 CONCLUSÕES

- a) A infecção natural verificada nos roedores *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Necromys lasiurus*, *Holochilus sciureus* e *Galea spixii*, associada a análise estatística demonstra a participação de todas as espécies no ciclo de transmissão da LTA na localidade de Imbú, Vicência.
- b) A infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. em *Galea spixii*, constitui o primeiro relato na literatura de infecção desta espécie por *Leishmania* do subgênero *Viannia*.
- c) As espécies *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus*, *Holochilus sciureus* e *Galea spixii*, atuam no ciclo silvestre enzoótico de transmissão, mantendo o parasito circulante no ambiente silvestre da região.
- d) A infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. detectada no roedor sinantrópico *Rattus rattus* indica sua participação como hospedeiro reservatório do ciclo doméstico peridomiciliar de transmissão.
- e) Nossos achados na Zona da Mata Norte de Pernambuco associados aos relatos existentes na literatura indicam *Leishmania (Viannia) braziliensis* como o provável agente etiológico envolvido com a LTA na localidade de Imbú, Vicência - PE.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, M. M. S. et al. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1816-1820, 2005.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, p. 552-557, 2006.

ANDRADE, M.S. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em centro de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil**. 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2004.

ARIAS, J. et al. **Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996. (Cuaderno tecnico, 44).

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n 12/13, p. 1269-1281, 2000.

BARBOSA, P.B.B.M. et al. Experimental infection parameters in *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae) with *Leishmania infantum chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p. 545-548, 2008.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p. 328-337, 2004.

BRANDÃO-FILHO, S.P. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRANDÃO-FILHO S.P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in ‘Zona da Mata’ region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 445-449, 1994.



BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, p. 291-296, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; SHAW, J.J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, n. 11, p. 500-501, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BRITO, M.E.F. et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 633-634, 1993.

BRITO, M.E.F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, DC, v.7, n.2, p.318-321, 2000.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Nijmegen, v. 14, p. 1278-1286, 2009.

BRÜCKER, G.; GENTILINI, M. **As leishmanioses na America Latina**. Paris: La Fondation Rhône-Poulenc Santé, 1987.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de "l'Ulcera de Bauru" avec le Bouton d'Orient. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v.2, p.255-257, 1909.

CRUZ, M. A. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 19-28, 1989.

CUBA CUBA, C. A. et al. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 500-507, 1985.

DE BRUIJN, M.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v. 52, p. 45-58, 1992.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis world-wide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

ERESH, S.; MCCALLUM, S.M.; BARKER, D.C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 109, p. 423-433, 1994.

FABER, W.R. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.49, n.1, p.70-74, 2003.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado de Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 155-163, 1986.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L. Reservatórios e Transmissão de Leishmânias. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 739-752.

FIRTH, R.H. Notes on the appearance of certain sporozooid bodies in the protoplasm of an oriental sore. **British Medical Journal**, London, v.1, p.60, 1891.

FORATTINI, O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 2, p. 195-203, 1960.

FORATTINI, O.P. et al. Infecção natural de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.6, p.255-261, 1972.

FORATTINI, O.P. et al. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.7, p. 181-184. 1973.

FREITAS, T.P.T. **A Ecoepidemiologia das Leishmanioses**: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato Grosso. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

GARCEZ, L.M. et al. Etiology of cutaneous leishmaniasis and anthropophilic vectors in Juruti, Pará State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.10, p. 2291-2295, 2009.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F. et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 81, p. 143-150, 2002.

GRIMALDI-JR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUIMARÃES, F. N.; AZEVEDO, M.; DAMASCENO, R. Leishmaniose tegumentar - zoonose de roedores silvestres na Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 66, n.2, p. 151-168, 1968.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A. Infrequency of gross skin lesions among Panamanian forest mammals with cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 71, p. 87-92, 1975.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A.; BEUMER, R. J. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 22, p. 585-591, 1973.

HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B.; JOHNSON, C. M. Leishmaniasis transmission-reservoir project. **Annual Report of the Gorgas Memorial Laboratory**, Washington, 1956, p. 9-11, 1957.

HOARE, C.A.; WALLACE, F.C. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature**, London, v. 212, p.1358-1996, 1966.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.21, n.2, p.123-152, 1995.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World. Taxonomic problems. **British medical bulletin**, London, v.28, p. 44-48, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmanias and leishmaniasis fo the New World, with particular reference to Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v.7, p.1-19,1973.

LAINSON, R.; SHAW J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. Lumsden WHR & Evans D (Eds). **Biology of the Kinetoplastida**, Academic Press, London, v. 2, p. 1-116, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasybus novemcinctus* (L.) in Amazonan Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v.64, p.3-9, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L., BALOWS, A., SUSSMAN, M. (Eds.). **Topley & Wilson' s Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. 9. ed. London. Arnold, 1998. v. 5, p. 241-266.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L., BALOWS, A., SUSSMAN, M. (Eds.), **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 10 ed., v. 5, London. Hodder Arnold. 2005. cap 17, p. 313-349.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. The importance of edendates (sloths, anteates) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, a causative agent of “pian bois” in north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.75, p.611-612, 1981.

LAINSON, R. et al. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 437-439, 1992.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**. London. Hodder Arnold. v.1, p.1252-1254, 1903.

LIMA, B. S. **Perfil epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana em São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, Brasil.** 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Osvaldo Cruz, Recife, 2007.

LINDENBERG, A. L'ulcere de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. **Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v.2, p.252-254, 1909.

MADEIRA, M. F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, p. 551-555, 2003.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Vista panorâmica da localidade de Imbú, Vicência-PE.** Vicência. 23 set. 2009a. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Domicílio na localidade de Imbú, Vicência - PE.** Vicência. 23 set. 2009b. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Captura de *Didelphis albiventris* utilizando Armadilha tipo Tomarrawk.** Vicência. 23 set. 2009c. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Distribuição das armadilhas.** Vicência. 23 set. 2009d. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Retirada de ectoparasitas.** Vicência. 23 set. 2009e. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Acondicionamento dos roedores em microisoladores.** Vicência. 23 set. 2009f. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Isoladores para acondicionamento dos roedores.** Vicência. 23 set. 2009g. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Câmara de CO<sub>2</sub>.** Vicência. 23 set. 2009h. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Processamento de fragmento de baço para inóculo em meio de cultivo NNN modificado.** Vicência. 23 set. 2009i. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Confecção de lâmina (esfregaço) para pesquisa direta.** Vicência. 23 set. 2009j. 1 fotografia.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Roedor silvestre *Galea spixii*.** Recife. 08 mai. 2009k. 1 fotografia.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

MAYRINK, W. et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 73, p. 123-137, 1979.

MELO, L. A. **Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2008.

NOYES, H. A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 657-663, 1998.

OLIVEIRA, F. S. et al. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 219-227, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Geographical distribution.** 2010. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> >. Acesso em: 23/04/2010.

PASSOS, V. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 103-110, 1993.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. **Leishmaniose tegumentar americana.** Rio de Janeiro: Ministério da Educação, Serviço de Documentação, 1948.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 61, p. 530-541, 1999.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, p. 123-126, 2002.

REITHINGER, R. et al. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 1486-1493, 2003.

REMME, J. H. F. et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, p.421-426, 2002.

REY, L. Leishmaníases. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 227-239.

RODRIGUES, E. H. G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco**. 2000. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

ROQUE, A. L. R. et al. *Thrichomys laurentis* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v.4, n. 2, p. e589, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAWAYA, R.J. **Sigmodontinae Images** Disponível em: <<http://tolweb.org/images/Sigmodontinae/16548>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

SCHUBACH, T. M. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

**Transactions of the Royal Society and Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 98, p. 165-167, 2004.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London, v. 69, p.323, 1975.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In: Peters W & Killick-Kendrick R (Eds), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 291-363.

SHAW, J. J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SILVEIRA, F. T. et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 289-292, 1987.

SILVEIRA, F. T. et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no Estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 18-22, 1991.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**. Bombay, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003.

SILVA, O. et al. Leishmaniose visceral americana (LVA) no Município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco: com o papel do cão doméstico como reservatório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, p.402-403, 2005.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

VASCONCELOS, I. A. B. et al. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeast Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 158-164, 1994.



VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (*nota preliminar*). **Brasil Médico**. Rio de Janeiro, v.25, p.411, 1911.

WALTON, B. C.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 63, p. 1118-1119, 1977.

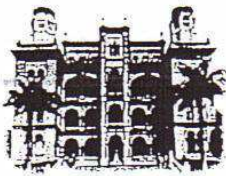
WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.36, n.3, p.489-496, 1987.

WRIGHT, J. H. Protozoa in case of tropical ulcer (“Delhi sore”). **Journal of Medical Research**, Boston, v.10, p.472-482, 1903.

YOSHIDA, E. L. A. et al. Human, canine and Equine (*Equus calallus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, p. 133-134, 1990.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville: Associated Publishers, 1994.

ZAR. J. H. **Biostatistical Analysis**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

**ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais**

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO


**Comissão de Ética no Uso de Animais**  
CEUA-FIOCRUZ

**CERTIFICADO**

**C**ertificamos que o Programa nº **P.0174-03**, intitulado **“Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão”** sob a responsabilidade da **Dr(a). Sinval Pinto Brandão Filho, CPqAM - Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 25/04/05.

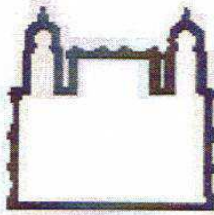
Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 25 de Abril de 2008.

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2005.

  
**Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto**  
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

Av. Brasil, nº 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil  
Tel: (+55) 21.3885-1696 - FAX: (+55) 21. 2590-9490 E. mail: hcastro@ioc.fiocruz.br/ceua@fiocruz.br

**ANEXO B – Termo Aditivo do Certificado da Comissão de Ética em Uso com Animais**



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

**TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DE LICENÇA Nº L-056/05**

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – em atenção à solicitação do Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, autoriza o presente Aditivo que altera a vigência desta licença, referente ao Protocolo intitulado: "Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão".

Ressaltamos que a nova data de validade desta licença é 25 de outubro de 2009.

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2009.

  
Drª. Norma Vollmer Laparthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ

Avenida Brasil nº 4036 – Prédio Expansão, sala 214 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil  
Tel: (21)3882.9192 E. mail: ceua@fiocruz.br



## ANEXO C – Autorização para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 12749-1	Data da Emissão: 22/02/2008 17:16	Data de Validade: 21/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2099130	Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.		
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0007-20

## Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br/cites">www.ibama.gov.br/cites</a> . Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Francisco Gomes de Carvalho	Biólogo responsável pela capturas	125.053.664-20	405657 SSP-CE	Brasileira
2	Maria Inês de Assis Cavalcanti	Médica veterinária	025.729.914-97	363724 SSP-PB	Brasileira

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO VICENTE FERRER	PE	Mundo Novo	Fora de UC
2	VICENCIA	PE	Imbu	Fora de UC
3	AMARAJI	PE	Refrigerio	Fora de UC
4	PAUDALHO	PE	CIMNC	Fora de UC

## Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Lutzomyia, Rodentia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Rodentia (*Qtde: 10), Lutzomyia (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Lutzomyia
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Rodentia

\* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

## Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Ectoparasita
---	--	--------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 54317542



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 12749-1	<b>Data da Emissão:</b> 22/02/2008 17:16	<b>Data de Validade:</b> 21/02/2009
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 2099130	Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.		
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0007-20
<b>Método de captura/coleta</b>		
2 Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual	
3 Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")	
<b>Destino do material biológico coletado</b>		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Instituição de pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 54317542**



Página 2/3





Ministério do Meio Ambiente - MMA

**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número: 12749-1</b>	<b>Data da Emissão: 22/02/2008 17:16</b>	<b>Data de Validade: 21/02/2009</b>
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 2099130	Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.		
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0007-20

**Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico**

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 54317542**

Página 3/3