

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Diagnóstico por PCR e Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* em Diferentes Sítios Anatômicos de Cães
Naturalmente Infectados**

Marize Quinhones Pires

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO POR PCR E ESTUDO DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM DIFERENTES
SÍTIOS ANATÔMICOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS**

MARIZE QUINHONES PIRES

Sob a Orientação da Professora
Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

e Co-orientação de
Dra. Raquel da Silva Pacheco

Dissertação submetida como re-
quisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias,
Área de Concentração em Parasitologia
Veterinária

Seropédica, RJ
Junho de 2010

636.0896

P667d

T

Pires, Marize Quinhones, 1967-.

Diagnóstico por PCR e estudo da variabilidade genética de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em diferentes sítios anatômicos de cães naturalmente infectados / Marize Quinhones Pires - 2010.

46 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 34-46.

1. Cão - Doenças - Teses. 2. Leishmaniose visceral - Teses. 3. Parasitologia veterinária - Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARIZE QUINHONES PIRES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/06/2010



Raquel da Silva Pacheco. Dr. FIOCRUZ
(Co-orientador)



Maria de Fátima Madeira. Dr. FIOCRUZ



Teresa Cristina Bergamo do Bonfim. Dr. UFRRJ

A presente Dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Sistemática Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, e com a participação do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ e do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária/ UFRRJ.

Dedico este trabalho:
À minha família, meus irmãos,
meus pais Lahy e Marinalva

A questão das questões para a espécie humana é a determinação do lugar que o homem ocupa na natureza e sua relação com o universo das coisas.
Thomas H Huxley.

AGRADECIMENTOS

Durante toda a elaboração deste estudo tive, a convicção que a construção de um trabalho como este não se realiza só. Tentando incluir a todos nos diversos momentos vividos, dirijo meus agradecimentos àqueles que acreditaram na minha capacidade, que deram sugestões e orientações, que tentaram dirimir dúvidas com palavras experientes, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído.

À Dra Raquel da Silva Pacheco, pela orientação, pelos preciosos ensinamentos que conduziram este trabalho, pela confiança dispensada durante todos esses anos e pelo inestimável carinho estabelecendo uma afetuosa relação de amizade.

À Profa Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pela oportunidade e apoio em me receber sob sua orientação. Obrigada pela confiança depositada em mim.

À Dra Maria de Fátima Madeira pelo apoio e confiança, pela disponibilidade das amostras clínicas, e pelo começo deste trabalho, compartilhando comigo a idéia inicial deste estudo.

À Fernanda Santos Oliveira meu apreço pela colaboração em diversas etapas deste trabalho e pela sua prestimosa amizade, sempre companheira em todas as horas.

Ao Dr Filipe Anibal Costa, pela revisão minuciosa da Dissertação e sugestões preciosas. Tenho o prazer em tê-lo como grande companheiro de trabalho, estando sempre disposto em ajudar, nos dando aquela força.

À Dra Viviane Zahner, pelo apoio e amizade que desde longa data se afirma.

Aos colegas de laboratório Dr David e Milene pelo apoio, pela agradável convivência, amizade e alegria do dia-a-dia.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na pessoa do Prof José Luis Fernando Luque Alejos.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, na pessoa da Dra Tânia Araújo-Jorge pelo apoio na execução do estudo.

Aos professores, funcionários e alunos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo apoio direto ou indireto deste trabalho.

Ao Instituto Kinder do Brasil (IKB), CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

E aos meus pais, minha irmã e amiga Márcia que com carinho e compreensão sempre estiveram presentes com estímulo e entusiasmo indispensáveis.

RESUMO

PIRES, Marize Quinhones. **Diagnóstico por PCR e estudo da variabilidade genética de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em diferentes sítios anatômicos de cães naturalmente infectados.** 2010. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Na leishmaniose visceral (LV), uma doença de potencial zoonótico e de ampla distribuição, o cão possui um papel bem sedimentado, sendo considerado um importante reservatório doméstico de *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas. Nestes animais, a distribuição do parasita pode ser extensa, alcançando órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele e medula óssea. É o parasitismo de pele íntegra que faz do cão um elo importante na cadeia epidemiológica da doença. Embora a pele seja um sítio de investigação diagnóstica, não se conhece a variabilidade clonal da distribuição de subpopulações de *L.(L.) chagasi* neste e nos demais órgãos nos cães infectados. O principal objetivo do presente trabalho foi utilizar o ensaio da PCR para o diagnóstico específico da infecção e, investigar através de técnicas moleculares (LSSP-PCR e RFLP-PCR) a variabilidade genética intraespecífica de *L.(L.) chagasi* presente em fragmentos de pele íntegra, lesão cutânea, baço, fígado e linfonodos de cães naturalmente infectados do Município do Rio de Janeiro. De um total de 17 cães, 106 fragmentos teciduais foram analisados. Destes, 66 (62,26%) foram PCR positivos com os iniciadores D1/D2 específicos para as espécies do complexo *L. donovani*. O maior percentual de detecção foi observado em fragmentos de linfonodos cervical (17/17, 100%) e poplíteo (17/17, 100%), seguido do baço com o percentual de 76,47% (13/17) e, em pele íntegra com 12 biopsias positivas em 17 (70,59%). A técnica de RFLP-PCR, associada aos ensaios de PCR, foi escolhida para confirmar a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em lesões cutâneas e de *L. (L.) chagasi* em fragmentos de órgãos internos de dois cães, confirmando dois casos caninos de coinfeção no Município do Rio de Janeiro. Através da técnica de LSSP-PCR foi possível evidenciar que a infecção canina por *L. (L.) chagasi* pode manifestar-se com disseminação parasitária e tropismo tissular por populações do parasita geneticamente diferenciadas. Não foi possível, no entanto, observar associação entre determinado perfil genético e o estado clínico do animal. O presente estudo contribuiu para um melhor entendimento da dinâmica da infecção na LV canina no que diz respeito ao tropismo diferenciado e ao envolvimento de subpopulações parasitárias de *L. (L.) chagasi*. Além disso, o estudo permitiu rastrear a variabilidade genética de algumas cepas circulantes na população canina das áreas investigadas.

Palavra chave: leishmaniose visceral canina, LSSP-PCR e RFLP-PCR

ABSTRACT

PIRES, Marize Quinhones. **PCR diagnosis and study of the genetic variability of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in distinct anatomic sites of naturally infected dogs.** 2010. 46 p. Dissertation (Master Science in Veterinary, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Visceral leishmaniasis is a potentially zoonotic disease with a broad geographical distribution. Dogs play a crucial role in its epidemiology, being considered as important domestic reservoirs for *Leishmania (Leishmania) chagasi* in the Americas. In these dogs, *L. (L.) chagasi* presents an extensive tissue distribution, being found in organs such as the spleen, the liver, lymph nodes, skin and bone marrow. Despite diagnostic investigation is usually performed in the skin, the clonal variability of *L. (L.) chagasi* subpopulations in the skin (and other affected organs) is not well understood. The main objective of this study was to: i) perform specific molecular diagnosis of leishmaniasis through PCR, and ii) assess intraspecific genetic variability of distinct *L. (L.) chagasi* strains characterized in different host tissues by two molecular techniques (LSSP-PCR and RFLP-PCR). Fragments of normal skin, cutaneous lesions, spleen, liver and lymph nodes obtained from naturally infected dogs living in the state of Rio de Janeiro were analyzed. One hundred six tissue fragments obtained from 17 dogs were studied. Through PCR, 66 (62.26%) of the fragments proved positive utilizing specific primers D1/D2 to species belonging to the *L. donovani* complex. Cervical and popliteous lymph nodes presented the highest rate of positivity (100%, 17/17). Spleen and normal skin presented detection rates of 76.47% (13/17) and 70.59% (12/17), respectively. RFLP-PCR was performed in order to confirm the presence of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* DNA in cutaneous lesions and in internal organs, respectively, detecting two cases of co-infection with both parasites. Through LSSP-PCR it was possible to demonstrate that *L. (L.) chagasi* infection courses with parasitic spread and different tissue tropism of genetically distinct subpopulations of the parasite. Nevertheless, it was not possible to correlate specific genetic profiles with distinct clinical outcomes. The present study contributed to understand the dynamics of *L. (L.) chagasi* infection, concerning tissue tropism and the role of distinct parasitic subpopulations of *L. (L.) chagasi*. In addition, it was possible to assess the genetic variability of some strains circulating in dogs in the studied area.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, LSSSP-PCR and RFLP-PCR

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA- Bovine Serum Albumin (Soro Albumina Bovina)

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dATP- Deoxiadenosine Trifosfato

dCTP- Deoxicitidine Trifosfato

dGTP- Deoxiguanosine Trifosfato

dTTP- Deoxitimidine Trifosfato

dNTPs- Deoxinucleotídeos Trifosfato

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

kDNA- DNA do cinetoplasto

LVA- Leishmaniose Visceral Americana

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

LSSP- Low Stringency Single Primer

MS- Ministério da Saúde

µg- micrograma

µl- microlitro

µg/ml- micrograma por mililitro

ml- mililitro

mm- milímetro

mM- milimolar

ng- nanograma

OMS- Organização Mundial de Saúde

pb- pares de base

PCR- Polymerase Chain Reaction

pmol- picomol

RAPD- Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

RNAse- Ribonuclease A

rpm- Rotações por minuto

SE- Tampão Salina-EDTA

SMS- Secretaria Municipal de Saúde

TBE- Tampão Tris-Borato EDTA

TE- Tampão Tris-EDTA

TRIS- Tris (hidroximetil) aminometano

UNDP- United Nations Development Programme

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
2.1 Leishmaniose visceral americana	3
2.2 Leishmaniose visceral canina	4
2.2.1 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral canina	4
2.3 Epidemiologia da leishmaniose visceral	5
2.4 O DNA do cinetoplasto (kDNA)	6
2.5 Diagnóstico, tipagem molecular e diversidade genética	7
2.5.1 Reação em cadeia da polimerase específica (PCR)	7
2.5.2 Estudo da variabilidade genética	8
2.5.3 Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição – RFLP	8
3. Material e Métodos	10
3.1 Procedência das amostras analisadas	10
3.2 Amostras analisadas	10
3.3 Amostras de referências	10
3.4 Obtenção do DNA a partir dos fragmentos de tecidos	11
3.4.1 Extração e purificação do DNA genômico	11
3.4.2 Extração e purificação de kDNA de <i>Leishmania</i>	12
3.5 Detecção do gene da beta globina através da PCR	13
3.6 Detecção de <i>Leishmania</i> em fragmentos de tecidos através da PCR específica para os complexos <i>Leishmania (Leishmania) donovani</i> e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	13
3.7 Eletroforese em gel de agarose	15
3.8 Purificação dos produtos da PCR	15
3.9 Reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência – LSSP-PCR	16
3.10 Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição da reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR)	16
3.11 Análise fenética	17
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Análise molecular	18
4.2 Ensaio da PCR para o gene de β -globina	18
4.3 Detecção de DNA parasitário pela PCR específica	19
4.4 Evidência de infecção mista de leishmaniose tegumentar e visceral	24
4.5 A heterogeneidade genética intrapopulacional de <i>L.(L.) chagasi</i>	27
5. Conclusões	33
6. Referências Bibliográficas	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos cães, procedência, condição clínica e titulação sorológica	11
Tabela 2: Iniciadores utilizados nas amplificações pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
Tabela 3: Componentes da PCR específica por tubo de reação	15
Tabela 4: Enzimas de restrição, microorganismo da qual foi isolada e sequência de reconhecimento	17
Tabela 5: Identificação dos cães, procedência, sítios anatômicos e PCR	21
Tabela 6: Detecção de DNA de <i>L. (L.) chagasi</i> , através de PCR com os iniciadores D1/D2, em diferentes sítios anatômicos de 17 cães residentes na zona oeste do município do Rio de Janeiro	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A e B: Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. mostrando os produtos amplificados, de algumas amostras representativas, após PCR do gene de β -globina de com os iniciadores PC03/PC04. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp; **A:** Cão A28 – 1:P abd, 2:P esc, 3:B, 4:F, 5:LM, 6:LCd, 7:LCE, 8:LPd, 9:LPe; Cão A29 – 10:P abd, 11:P esc, 12:B, 13:F, 14:LM, 15:LCd, 16:LCE, 17:LPd. **B:** Cão A30 – 1:Le, 2:P abd, 3:P esc, 4:B, 5:LM, 6:LCd, 7:LCE, 8:LPd); Cão A34 – 9:P abd, 10:P esc, 11:B, 12:F, 13:LM, 14:LCd, 15:LCE, 16:LPd, 17:LPe 18

Figura 2: Produtos da PCR específica com os iniciadores D1/D2 em gel de agarose a 1.5%. **M:** Marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A33 – 1:Pe, 2:B, 3:F, 4:LM, 5:LC, 6:LP; 5- *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); Cão A34 – 7:Pe, 8:B, 9:F, 10:LM, 11:LC, 12:LP; 13:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); CN- controle negativo. **B:** Cão A36 – 1:Pe, 2:B, 3:F, 4:LM, 5:LC, 6:LP; Cão A30 – 7:Le, 8:Pe, 9:B, 10:F, 11:LM, 12:LC, 13:LP; 14: *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **C:** Cão A39 – 1:Pe, 2:B, 3:LM, 4:LC, 5:LP; Cão A44 – 6:Pe, 7:B, 8:F, 9:LM, 10:LC, 11:LP; Cão A53 – 12:Pe, 13:B, 14:F, 15:LM, 16:LC, 17:LP; 18:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) 20

Figura 3: A: Produtos amplificados de lesões cutâneas após PCR específica com os iniciadores B1/B2 em gel de agarose a 1,5%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. Canaletas: 1.Cão A30- lesão; 2.Cão A43- lesão; 3.Cão A41- lesão; 4.Cão A63- lesão 01; 5.Cão A63- lesão 02; 6.*Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 7.CN- controle negativo. B: Produtos amplificados após PCR específica com os iniciadores B1/B2 e D1/D2 em gel de agarose 1,5%. M: marcador DNA Ladder 100 bp. **B1/B2:** 1.Cão A43- lesão; 2.Cão A63- lesão; 3.*Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 4. controle negativo. **D1/D2:** 5.Cão A43- baço; 6.Cão A43- linfonodo cervical; 7. Cão A63- baço; 8.Cão A63- linfonodo cervical; 9.*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); 10.controle negativo 25

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando os perfis de restrição dos produtos amplificados de lesão cutânea, baço e linfonodo, após digestão com as enzimas Hinf I, Rsa I, MboI e Msp I. **A:** perfis de restrição dos produtos amplificados de lesão cutânea, após digestão com as enzimas Hinf I e Rsa I. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. Canaletas: 1 e 4.Cão A43- lesão; 2 e 5.Cão A63- lesão; 3 e 6.*Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). **B:** perfis de restrição dos produtos amplificados de baço e linfonodo, após digestão com as enzimas Hinf I e MboI. Canaletas: 1 e 6.Cão A43- baço; 2 e 7.Cão A43- linfonodo cervical; 3 e 8.Cão A63- baço; 4 e 9.Cão A63- linfonodo cervical; 5 e 10.*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **C:** perfis de restrição dos produtos amplificados de lesão cutânea, baço e linfonodo, após digestão com a enzima Msp I. Canaletas: 1.Cão A43- lesão; 2.Cão A63- lesão; 3.Cão A43- baço; 4.Cão A43- linfonodo cervical; 5.Cão A63- baço; 6.Cão A63- linfonodo cervical 26

Figura 5: Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética nas populações parasitárias presentes nos diferentes órgãos, em gel de agarose high resolution 2%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp; **A:** Cão A28 – 1:B, 2:LC, 3:LP; Cão A29 – 4:Pe, 5:B, 6:LP; Cão A30 – 7:Le, 8:Pe, 9:B, 10:LC, 11:LP; 12:controle negativo; 13:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **B:** Cão A33 – 1:Pe, 2:LC, 3:LP; Cão A34 – 4:Pe, 5:B, 6:LC, 7:LP; Cão A41 – 8:Le, 9:Pe, 10:B, 11:LC, 12:LP; 13:controle negativo; 14:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) 28

Figura 6: Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética nas populações parasitárias presentes nos diferentes órgãos, em gel de agarose high resolution 2%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A37 – 1:LC, 2:LP; Cão A39 – 3:Pe, 4:B, 5:LM, 6:LC, 7:LP; Cão A40 – 8:B, 9:LC, 10:LP; 11:controle negativo; 12:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **B:** Cão A42 – 1:B, 2:LC, 3:LP; Cão A43 – 4:Pe, 5:B, 6:LC, 7:LP; Cão A44 – 8:Pe, 9:B, 10:LC, 11:LP; 12 *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) 29

Figura 7: Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética nas populações parasitárias presentes nos diferentes órgãos, em gel de agarose high resolution 2%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A36 – 1:Pe, 2:B, 3:LM, 4:LC, 5:LP; Cão A63 – 6:Pe, 7:B, 8:LC, 9:LP; Cão A62 – 10:B, 11:LM, 12:LC, 13:LP; 14:controle negativo, 15:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **B:** Cão A53 – 1:Pe, 2:B, 3:LC, 4:LP; Cão A61 – 5:Pe, 6:B, 7:F, 8:LM, 9:LC, 10:LP; 11:controle negativo; 12:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) 30

Figura 8: Análise fenética utilizando-se o coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de amplificação por LSSP-PCR, em diferentes clusters. L.chagasi: Cepa referência de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) 31

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses englobam um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de parasitas do gênero *Leishmania* Ross, 1903 os quais são transmitidos através da picada das fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), conhecidos como flebotomíneos. A distribuição geográfica abrange os continentes asiático, africano, europeu e americano. Dados da Organização Mundial de Saúde revelam uma prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas expostas ao risco de adquirir a doença.

A doença, nas suas formas tegumentar e visceral, representa um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, ocupando lugar de destaque entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância. Populações de 88 países são afetadas sendo 66 do Velho Mundo e 22 do Novo Mundo. No Novo Mundo, as leishmanioses podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) de acordo com os distintos tropismos tissulares das espécies envolvidas na infecção. No Brasil existem pelo menos oito espécies de *Leishmania* que causam a enfermidade no homem, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Entre estas, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* e a *Leishmania (Viannia) braziliensis* são consideradas as mais importantes e com maior potencial de transmissão em áreas urbanas.

No Brasil, são registrados por ano aproximadamente 35 mil casos de LTA e 4 mil casos de LVA. A LTA encontra-se distribuída amplamente por todo o território brasileiro, desde a Amazônia até os estados do Sul, sendo que as regiões Norte e Nordeste apresentam a maior incidência entre os habitantes das áreas rurais. Tanto a prevalência da infecção humana como a epidemiologia variam conforme a região geográfica do País.

A LVA tem ocorrência em todos os estados costeiros, do Pará ao Paraná e em estados centrais como Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. No Nordeste, os estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão contribuem com 92,4% dos casos notificados no Brasil. A *Leishmania (L.) chagasi* é o agente etiológico responsável pela doença nas diversas áreas endêmicas de LVA na América Latina. Em áreas silvestres, as raposas são os hospedeiros naturais. Os cães domésticos são os mais importantes reservatórios e talvez os responsáveis pelas mudanças no perfil epidemiológico da doença.

O calazar é a forma mais grave, pois, quando não tratado adequadamente determina elevados índices de letalidade. Encontra-se amplamente distribuído no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, e Américas, com exceção da Oceania e da Antártida. Nas Américas ocorre desde o México até a Argentina, sendo que, cerca de 90% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil. A estimativa mundial de casos novos anuais é de 1 a 2 milhões.

A LVA foi detectada pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro em 1977, no município do Rio de Janeiro, bairro de Bangu, na zona oeste da cidade. A partir da comprovação da autoctonia desse caso, da notificação de cães parasitologicamente positivos e da presença de *Lutzomyia longipalpis* foi instituído oficialmente, em 1980, pelo Ministério da Saúde (na época SUCAM) a prática de inquéritos sorológicos caninos. O objetivo é monitorar os cães domésticos e eliminar os positivos, interrompendo o ciclo de transmissão, baseando-se em ações já aplicadas em outras regiões do país.

Diferentemente do que ocorre no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar, onde se desconhece o potencial do cão doméstico como reservatório, na LVA esse animal possui um papel já bem definido, sendo considerado um importante reservatório doméstico de *L. (L.) chagasi* nas Américas. No Brasil, apesar do primeiro caso canino ter sido descrito em 1938, foi a partir dos relatos de Deane & Deane, em 1955, que constatou-se a presença de formas amastigotas na pele de cães infectados, facilitando a infestação pelos

vetores. A partir daí passou-se a considerar os cães como prováveis elos no ciclo de transmissão no ambiente doméstico. Desde então, a notificação de cães infectados em áreas endêmicas, associada ao aparecimento dos casos humanos, tem sugerido que o cão infectado possa manter e amplificar ciclos instalados no peridomicílio. Isto levou os órgãos sanitários competentes a adotarem medidas objetivando a interrupção deste ciclo de transmissão, através da detecção e eliminação dos cães suspeitos.

Já é estabelecido que parasitas do gênero *Leishmania* circulam na natureza como um conjunto de subpopulações heterogêneas. Dessa forma, as populações naturais de *Leishmania* têm sido consideradas como clones e este conceito, ligado à reprodução assexuada, é importante quando consideramos a evolução deste gênero. Embora existam evidências de troca genética em *Leishmania*, o papel deste fenômeno em populações naturais ainda não está bem claro. Estima-se que a troca genética não seja um fenômeno regular no ciclo de vida destes parasitas admitindo-se ser um evento raro ou ausente, sendo o processo de propagação clonal o evento básico para a dispersão destes parasitas. Assim, a variabilidade genética pode ter importantes conseqüências para a dinâmica parasita-hospedeiro em uma escala ecológica e evolutiva.

O advento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) específica, associada ou não à hibridização molecular, permite detectar a presença de infecção por *Leishmania* diretamente de material clínico e sua identificação ao nível subgenérico, apresentando portanto vantagens em relação aos métodos convencionais. Apesar dos testes sorológicos serem importantes ferramentas diagnósticas, estes não apresentam alta especificidade, podendo apresentar reatividade cruzada entre espécies do mesmo gênero e também com outros tripanosomatídeos. Diversas metodologias utilizando ferramentas moleculares baseadas na PCR como as técnicas de PCR de iniciador (“primer”) único em condição de baixa estringência (LSSP-PCR) e a de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP-PCR) vêm apresentando resultados promissores, permitindo observar o polimorfismo genotípico (“fingerprint”) do parasita, sendo portanto aplicadas em estudos taxonômicos, evolutivos e epidemiológicos.

O objetivo geral deste estudo foi aplicar as técnicas de PCR para detecção de DNA parasitário e de LSSP-PCR no intuito de caracterizar o polimorfismo genético dos clones naturais, em relação ao tropismo tecidual (modelo histotrópico clonal) em diferentes sítios anatômicos de cães naturalmente infectados. Um inóculo composto de uma população multiclonal ao infectar o hospedeiro, pode conter clones com tropismos específicos para diferentes tecidos.

Nossos objetivos específicos foram: i) aplicar as técnicas de PCR para o diagnóstico específico; ii) utilizar a técnica de RFLP-PCR para tipar e caracterizar *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* em cães com suspeita de co-infecção; iii) utilizar as técnicas de LSSP-PCR, tendo como alvo o DNA da região variável de minicírculo de kDNA em fragmentos de pele íntegra, lesão cutânea, baço, fígado e linfonodos (mesentérico, poplíteo e cervical), visando investigar através destes marcadores a variabilidade genética intra-específica de *L. (L.) chagasi* presente nas amostras de diferenciados sítios anatômicos dos cães sororreagentes e, (iv) realizar estudos de taxonomia numérica (análise fenética) com base nos perfis genéticos obtidos pelo marcador molecular LSSP-PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral americana

No Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA), é descrita desde 1913. A LVA, conhecida como calazar americano, é primariamente uma doença zoonótica, ou seja, uma doença que afeta animais e, a partir destes, é transmitida ao homem; o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (mosquito palha, birigui) é o principal vetor (SOUZA et al., 1981). Os hospedeiros vertebrados são animais silvestres (gambás, raposas, etc), animais domésticos (cães, gatos etc) e o homem. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) é considerado o principal reservatório (ALENCAR & CUNHA, 1963; LAINSON & SHAW, 1979; LAINSON, 1983; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A identidade do agente etiológico da LV nas Américas tem sido causa de inúmeras controvérsias (LAINSON et al., 1983, LAINSON & SHAW, 1987; MOMEM et al., 1987, 1993; SHAW, 2002). Atualmente admite-se que a espécie tenha sido introduzida no continente americano durante a colonização européia através de cães infectados por *L. (L.) infantum*.

Alguns autores admitem que a *L. (L.) chagasi* seja uma variante de *L. (L.) infantum*, que adaptou-se a um ecossistema em que cão, homem e flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* mantém o ciclo (MOMEN et al., 1993; MAURICIO et al., 1999; SHAW, 2002).

Há autores, no entanto, que consideram ser o calazar americano uma zoonose autóctone das Américas, que possui nos canídeos silvestres, como *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*, conhecidos vulgarmente como "raposas", seus reservatórios naturais (DEANE & DEANE, 1954a, 1954b, 1955; DEANE, 1956; SHERLOCK et al., 1996, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A LVA manifesta-se normalmente em caráter endêmico, sendo considerada uma doença crônica de alta letalidade em indivíduos não tratados, cuja severidade depende normalmente do tempo de evolução da doença (DESJEUX & ALVAR, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Cerca de 90% dos casos de LV das Américas ocorre no Brasil, sendo que a região nordeste apresenta 94% de todos os casos de LV registrados, especialmente nos estados do Piauí, Maranhão, Bahia e Ceará, devido a fatores climáticos favoráveis e vegetação favoráveis (BAVIA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005). No Brasil, embora a LVA guarde em muitas situações suas características de zoonose predominantemente rural, em algumas cidades, talvez em consequência da grande imigração de trabalhadores e de seus cães infectados, ocorre também nos bairros localizados próximos de criadouros dos transmissores, que picam indiferentemente homens e animais. Estabelece-se, assim, um processo de urbanização da enfermidade que, na dependência das facilidades que os flebotomíneos encontrem para a manutenção de seus criadouros, poderá ampliar as proporções da endemicidade (SOUZA et al., 1981; EVANS et al., 1992; ARIAS, 1996; SHERLOCK, 1996; SILVA et al., 2001a).

A LVA é considerada uma doença reemergente e em franca expansão no Brasil, apresentando significativo aumento do número de casos em seres humanos e caninos em áreas endêmicas. A doença tem sido registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, em cerca de 1600 municípios das regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Sudeste, apresentando transmissão autóctone nestas regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No entanto, há recentes relatos de transmissão autóctone na região Sul, na cidade de Porto Alegre-RS (SOUZA et al., 2009). O diagnóstico de leishmaniose canina na região sul do país é raro e sugere extensão a partir de focos endêmicos de outras regiões do país (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Estima-se que para cada caso humano, ocorra uma média de pelo menos 200 cães infectados. As

infecções dos cães precedem sempre a aparição dos casos humanos, pois estes são o reservatório da doença no ambiente doméstico (MONTEIRO et al., 1994; DESJEUX, 2003). Também no Velho Mundo, o cão é o principal reservatório da leishmaniose visceral. Estes animais são encontrados infectados em todos os focos da doença humana sendo considerado o principal elo na cadeia de transmissão da LV (DESJEUX, 2004; GONTIJO & MELO, 2004; DANTAS-TORRES, 2007).

2.2 Leishmaniose visceral canina

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de potencial zoonótico e de ampla distribuição mundial, causada por protozoários do complexo *L. donovani* (PARANHOS-SILVA, 1996; TAFURI et al., 2001; CAMARGO et al., 2007; MARZOCHI et al., 2009).

Diferentemente do que ocorre no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar, onde se questiona o potencial do cão doméstico como reservatório, na leishmaniose visceral, esse animal possui um papel já bem sedimentado, sendo considerado um importante reservatório doméstico de *L. (L.) infantum*, no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi*, nas Américas (OMS, 2008).

A distribuição da LV no município do Rio de Janeiro se sobrepõe em diversas áreas de ocorrência da LT, como é o caso dos bairros de Jacarepaguá, Campo Grande, Barra de Guaratiba, Realengo, Bangu e Barra da Tijuca. A sobreposição das duas doenças torna-se um fator complicador para o diagnóstico da infecção canina, pois a sorologia não discrimina as duas doenças (MADEIRA et al., 2006; MARZOCHI et al., 2009). A endemia, que tem se estabelecido nas vertentes continental e costal do maciço da Pedra Branca e na vertente costal do maciço de Gericinó, vem se expandindo para a área urbana. No momento, de acordo com a diretriz do Ministério da Saúde, o município do Rio de Janeiro é considerado área de transmissão esporádica para LV (MARZOCHI et al., 2009)

A LVC representa um importante problema da clínica médico-veterinária. Simultaneamente, a informação sobre a epidemiologia da infecção por *L.(L.) chagasi* nos cães é essencial para a definição de medidas eficazes de controle da leishmaniose humana (WHO, 1990, OMS, 2008).

2.2.1 Manifestações clínicas na leishmaniose visceral canina

O quadro clínico da LVC é bastante variável, apresentando-se desde aparente estado sadio a quadros severos de caquexia associada a outras complicações (MARZOCHI et al., 1985; CIARAMELLA et al., 1997; ALVAR et al., 2004; BRITO et al., 2004; LIMA et al., 2004; LINHARES et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007). A evolução da doença também é bastante variável, podendo variar de uma forma aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas, a uma forma de evolução lenta, que pode durar anos, acompanhada ou não de sintomas que podem evoluir para formas graves ou até mesmo regredir espontaneamente (ALENCAR, 1959; MARZOCHI et al., 1985; MICHALICK & GENARO, 2005). Os sinais clínicos mais comuns na LVC são as alterações cutâneas (alopecia, dermatites, descamações, úlceras cutâneas, onicoglifose), os sinais oculares (conjutivite, ceratoconjutivite, uveíte), e outras manifestações sistêmicas como febre, linfadenopatia local ou generalizada, anemia e hepatoesplenomegalia (MARZOCHI et al., 1985; FERRER, 1988; GENARO et al., 1988; GARCIA-ALONSO et al., 1996; TAFURI et al., 1996, 1997; CIARAMELLA et al., 1997; ALVAR et al., 2004; BRITO et al., 2004). De acordo com a ausência ou presença de um ou vários destes sintomas, os animais podem ser classificados como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (ABRANCHES et al., 1991; MOLINA et al., 1994; CABRAL et al., 1998). Embora os fatores que

determinam estas condições não sejam bem conhecidos, é importante ressaltar que, em todas essas fases, o animal apresenta intenso parasitismo cutâneo, servindo portanto como fonte de infecção para os insetos vetores (TRAVI et al., 2001). O período de incubação no cão varia de um mês a sete anos (OLIVEIRA et al., 1993; SCOTT et al., 1996; TABOADA & MERCHANT, 1997) e observa-se linfadenopatia localizada ou generalizada em mais de 90% dos cães afetados (TABOADA & MERCHANT, 1997).

2.3 Epidemiologia da leishmaniose visceral

Admitem-se em geral dois ciclos para a LVA: um silvestre, no qual a raposa e os marsupiais são considerados reservatórios e outro ciclo doméstico, onde o cão doméstico assume o papel principal (DEANE & DEANE, 1955; LAINSON & SHAW, 1979; LAINSON, 1983; SHERLOCK et al., 1996; ANDRADE et al., 1999; MARZOCHI et al., 2009). Atualmente, a LVA mostra expansão no país, sendo considerada uma doença de área rural e de áreas periurbanas. (GONTIJO & MELO, 2004; MARZOCHI et al., 2009).

A manutenção da endemia em áreas rurais e periurbanas está associada a vários fatores, e entre eles: as condições econômicas e sociais precárias das comunidades afetadas, que se expressam em condições inadequadas de moradia e baixos níveis nutricionais (VIEIRA & COELHO, 1998; ASHFORD et al., 1998). As secas que periodicamente atingem a região semi-árida nordestina, intensificam este quadro, como também acentuam a migração de famílias procedentes de regiões endêmicas. Muitas vezes, indivíduos acometidos da doença ou mesmo acompanhados de cães infectados ou doentes, vêm a se instalar em áreas com poucos recursos e de desmatamento recente, onde há a presença do flebotomíneo vetor. (COSTA et al., 1990; CESSÉ et al., 1999, 2001).

A espécie *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da *L. (L.) chagasi* nas Américas, esta espécie tem a capacidade de se adaptar ao ambiente peridoméstico, principalmente se houver condições climáticas favoráveis e abundância de fonte alimentar. Além do cão, a espécie *Lutzomyia longipalpis* tem sido observada alimentando-se em outros vertebrados como bovinos, eqüinos, macacos, suínos e galinhas, não sendo, portanto particularmente antropofílica (MORRISON, 1995; GALATI, 1997; LAINSON & RANGEL, 2005).

A identificação de cães infectados em uma determinada área é um poderoso indicador do potencial de transmissão da leishmaniose. Sabe-se que a proporção da população humana infectada, comparada aos casos caninos em diferentes lugares, é variável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Em muitos estudos epidemiológicos realizados em área urbana tem sido relatado o encontro de cães soropositivos (MARZOCHI et al., 1985; SILVA et al., 2001a, 2001b; MADEIRA et al., 2004, 2006; GUIMARÃES et al., 2005). Entretanto, não existe ainda um consenso que correlacione a presença da LVC com a ocorrência de casos humanos, embora alguns estudos apontem para esta possibilidade (CUNHA et al., 1995; ASHFORD et al., 1998; GONTIJO & MELO, 2004).

A LVA é considerada endêmica em vários estados do Brasil. Entre os anos de 2000 e 2005 houve em média 3.500 novos casos humanos por ano, destacando-se aqueles da região Nordeste (MARZOCHI et al., 2009). Nos últimos anos houve uma modificação marcante do quadro epidemiológico da leishmaniose visceral, se tornando cada vez mais comum a ocorrência de casos humanos em áreas urbanas ou periurbanas (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, em 2004 o crescente número de casos humanos e o grande número de cães positivos registrados em várias cidades da região Nordeste, Norte, Sudeste e Centro Oeste, retratam a importância dessa endemia no Brasil.

2.4 O DNA do cinetoplasto (kDNA)

Entre os DNAs mitocondriais, o DNA do cinetoplasto (kDNA), encontrado nos protozoários da ordem Kinetoplastida, é um dos mais peculiares: está localizado em uma região diferenciada da mitocôndria única desses organismos, denominada cinetoplasto. O cinetoplasto é uma estrutura altamente organizada, que apresenta atividade para certas enzimas de cadeia respiratória e realiza a fosforilação oxidativa (MEYER, 1968; SIMPSON, 1972).

O kDNA representa cerca de 20% do DNA total da célula e está organizado em uma rede formada pela concatenação de milhares de moléculas de DNA circulares, assemelhando-se uma malha entrelaçada (SIMPSON & BERLINER, 1974; MOREL et al., 1980), sendo constituído por dois tipos de moléculas circulares: os maxicírculos e os minicírculos.

Os maxicírculos são minoritários (5%) e contam com cerca de 20 a 40 kb, dependendo da espécie. São formados por sequências homogêneas e estão presentes de 20 a 50 cópias por rede, codificando os genes mitocondriais estruturais (SIMPSON & BERLINER, 1974; DE-LA CRUZ, 1984; SHAPIRO & ENGLUND, 1995). São homólogos funcionais do DNA mitocondrial de outros eucariotas e codificam RNAs ribossomais, alguns RNAs guias e proteínas envolvidas nos processos mitocondriais de geração de energia. Os minicírculos são moléculas menores que constituem aproximadamente 95% do kDNA e se encontram na rede com cinco a dez mil cópias, na maioria das espécies de tripanosomatídeos. São heterogêneos em sequências e variam em tamanho de 0.5 kb a 2.5 kb, entre as diferentes espécies de tripanosomatídeos, embora não sejam intraespecificamente constantes. Os minicírculos não são replicados enquanto estão ligados à rede. O mecanismo de replicação envolve a ação de uma enzima topoisomerase II, que libera os minicírculos da rede sob a forma de moléculas circulares covalentemente fechadas que se deslocam para a periferia da rede. Nesta região eles se replicam e são novamente reincorporados à rede, que assim dobra de tamanho e se segrega durante a divisão celular (RYAN et al., 1988; FERGUSON et al., 1992; SHLOMAI, 1994). A função genética principal dos minicírculos é a de codificar os pequenos RNAs guia que controlam a especificidade da edição do RNA (SHAPIRO & ENGLUND, 1995).

As regiões conservadas e variáveis variam em tamanho e em número de cópias e são encontradas nas moléculas de minicírculos. A sequência nucleotídica da região conservada é compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA enquanto a da região variável não é (SIMPSON, 1987; SHAPIRO, 1993; MORRIS et al., 2001).

A região conservada está relacionada à replicação dos minicírculos e possui um tamanho aproximado de 120 a 200 pb. Quando presentes em número maior do que um apresentam disposição simétrica ao longo da molécula. Na região conservada há uma sequência dodecamérica (GGGGTTGGTGTA), também conhecida como sequência universal dos minicírculos, presentes em todos os tripanosomatídeos da ordem Kinetoplastida, representando a origem da replicação (KIDANE et al., 1984; NTAMBI & ENGLUND, 1985; RAY, 1989; MORRIS et al., 2001).

A região variável apresenta uma heterogeneidade cuja origem é ainda obscura. A função codificante para RNAs guias fornece uma explicação para a heterogeneidade de sequências intra e interespecíficas. Esta heterogeneidade sugere uma taxa de evolução elevada e difere entre as regiões variáveis e conservadas (ROGERS & WIRTH, 1987). As diferenças de sequências em classes diferentes de minicírculos têm sido utilizadas como marcadores para distinguir diferentes espécies e cepas, sendo utilizadas na epidemiologia e no diagnóstico (PACHECO et al., 1995). Uma das vantagens adicionais é o grande número

de cópias que estas moléculas apresentam por rede, o que facilita o diagnóstico através da PCR e as análises de polimorfismos de fragmentos de restrição em diferentes classes de seqüências.

2.5 Diagnóstico, tipagem molecular e diversidade genética

Os estudos de identificação, classificação e caracterização de *Leishmania* pelos métodos moleculares têm se mostrado de grande valor na identificação das espécies deste gênero, com importância evidente na taxonomia. Por outro lado, os dados obtidos têm também sido úteis para estudos em epidemiologia, diagnóstico, terapêutica e profilaxia da doença.

Desde os anos 80, com o avanço da biologia molecular, uma variedade de métodos tem sido empregada na busca de marcadores taxonômicos, analisando características genéticas, imunológicas e bioquímicas/moleculares, podendo-se destacar: eletroforese de isoenzimas (RIOUX et al., 1990; CUPOLILLO et al., 1994; PACHECO et al., 1998), análise do perfil de restrição do kDNA (LOPES et al., 1984; JACKSON et al., 1986; PACHECO et al., 1986; PACHECO et al., 1990; 1995), reatividade de anticorpos monoclonais com antígenos espécie-específicos do parasita (PRATT & DAVID, 1981; MCMAHON-PRATT et al., 1986; SHAW et al., 1987), hibridização com sondas moleculares espécie-específicas (WIRTH & MCMAHON-PRATT, 1982), análise de diferentes regiões do nDNA, por sequenciamento ou por polimorfismos gerados por enzimas de restrição - RFLP (BEVERLEY et al., 1987; GUEVARA et al., 1992; FERNANDES et al., 1994; MENDOZA-LEON et al., 1995), polimorfismos pela amplificação aleatória de DNA polimórfico – RAPD (TIBAYRENC et al., 1993; GOMES et al., 1995; PACHECO et al., 2005). Mais recentemente, novas ferramentas como a análise de microssatélites (ALAM et al., 2009) vêm sendo utilizadas.

A utilização de ferramentas moleculares em estudos taxonômicos, evolutivos e de epidemiologia molecular do gênero *Leishmania* vem também contribuindo para o conhecimento e estabelecimento de relações filogenéticas entre os parasitas (PACHECO et al., 1986; PACHECO et al., 1990; CUPOLILLO et al., 1994; PACHECO et al., 2000).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), um método desenvolvido por Saiki *et al.* (1985), quando usada no diagnóstico de *Leishmania*, proporciona uma rápida detecção do DNA destes parasitas em amostras clínicas humanas e caninas, demonstrando maior sensibilidade quando comparada aos métodos convencionais de diagnóstico (LOPEZ *et al.*, 1993; RODRIGUEZ et al., 1994; AVILES et al., 1999; WEIGLE et al., 2002. MADEIRA et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2008). Vários sistemas de detecção de DNA de *Leishmania* baseados na PCR foram desenvolvidos, sendo revistos por Degraeve et al. (1994). Estas metodologias vêm contribuindo também para os estudos genético-moleculares de inúmeras doenças e agentes infecciosos.

2.5.1 Reação em cadeia da polimerase específica (PCR)

A técnica de PCR (SAIKI et al., 1985), envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de enzima DNA polimerase. A reação baseia-se em ciclos térmicos de desnaturação da fita de DNA, seguida do anelamento e da extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (primers), que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Esses iniciadores são sintetizados artificialmente, de maneira que as seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo.

A hibridização molecular, quando empregada juntamente à técnica da PCR, é fundamental como método de detecção de DNA, não somente como teste confirmatório dos produtos amplificados, mas também pela capacidade de aumentar a sensibilidade da reação. Ao mesmo tempo, é possível tipar ao nível dos complexos as amostras positivas para de *Leishmania*. Desta forma, a PCR associada à hibridização é uma ferramenta útil tanto para o diagnóstico das leishmanioses como para a discriminação taxonômica, essencial em estudos epidemiológicos, possuindo também aplicação clínica (RODRIGUEZ et al., 1994; BRENIÈRE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2005; MADEIRA et al., 2006).

2.5.2 Estudo da variabilidade genética

A técnica LSSP-PCR ou a reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência, descrita por Pena et al., (1994), é baseada nos mesmos princípios da PCR, consistindo na re-amplificação de um fragmento alvo de DNA, previamente amplificado, sob condições de baixa estringência, utilizando-se concentrações elevadas de DNA polimerase e apenas um dos iniciadores específicos para uma das extremidades do fragmento analisado. O produto da reação analisado seria como uma impressão digital do DNA, focalizando o polimorfismo existente em um único segmento gênico. Esta metodologia tem sido empregada em abordagens distintas para estudos de variação de seqüências do DNA, traduzindo um polimorfismo intraespecífico e, portanto, constituindo uma nova ferramenta para os estudos de variabilidade genética. Tem sido usada em diferentes organismos como tripanosomatídeos (VAGO et al., 1996; ANDRADE et al., 1999; CABRINE-SANTOS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005; BAPTISTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010), amebas (GOMES et al., 1997), vírus (STAMENKOVIC et al., 2001) e bactérias (OOTEMAN et al., 2004).

Obter um diagnóstico preciso e mais confiável de genótipos de espécies de *Leishmania* é de grande importância para um melhor entendimento clínico e epidemiológico da doença. O uso do marcador molecular LSSP-PCR tendo como alvo minicírculo de kDNA para discriminar diferentes variantes de parasitas diretamente de material clínico ou cultivo de parasitas é uma potencial ferramenta para investigar assinaturas de kDNA (kDNA signature) das populações de parasitas. A LSSP-PCR tendo como alvo minicírculos do kDNA produz perfis que refletem os polimorfismos de classes de minicírculos predominante, e pode ser útil para estudos que visam discriminar genótipos de espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2007; BAPTISTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

2.5.3 Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição - RFLP

A técnica do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição - RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), descrita por Gradzicker et al. (1974) consiste em analisar os polimorfismos no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Este polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição. A descoberta das enzimas de restrição que reconhecem e clivam sítios específicos na molécula de DNA e a análise em gel de agarose ou poliacrilamida dos fragmentos gerados permitem o uso desta metodologia na caracterização bioquímica ao nível genotípico de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (PACHECO et al., 1986, 1995; BRITO et al., 2003). Esta técnica é comumente usada em produtos amplificados por PCR (PCR-RFLP), no qual o fragmento alvo de DNA, amplificado por PCR, é submetido a digestão com uma ou mais enzimas de restrição, específicas para a verificação dos polimorfismos.

Recentemente, foi desenvolvido marcador molecular baseado na PCR-RFLP utilizando a região constante de minicírculos e sequências do gene de miniexon para a genotipagem de isolados de *Leishmania*, podendo aplicar este método de genotipagem em materiais clínicos de hospedeiros naturalmente infectados para a diferenciação de espécies de *Leishmania*. O ensaio de genotipagem baseada na PCR-RFLP tem uma suficiente sensibilidade, alta especificidade e a habilidade para diferenciar inter e intraespecificamente espécies de *Leishmania* (MARFURT et al., 2003a, 2003b; VOLPINI et al., 2004; ANDRADE et al., 2006; ROTUREAU, et al., 2006; SERIN et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência das amostras analisadas

Os cães incluídos neste estudo foram selecionados a partir de inquéritos sorológicos para LVC realizados no período de 2003 e 2004 em 32 áreas do município do Rio de Janeiro, compreendendo o Maciço de Gericinó e o Maciço da Pedra Branca, os bairros de Campo Grande, Barra de Guaratiba e Ilha de Guaratiba (dados da SMS/RJ), localizados na zona oeste do município do Rio de Janeiro. Todos os cães eram sororreagentes pela RIFI (reação de imunofluorescência indireta), realizado pelo Centro de Referência em Leishmanioses, e foram eutanasiados pelo Serviço de Zoonoses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ IPEC – FIOCRUZ, cumprindo uma das medidas de controle preconizadas pelo MS, onde foram coletados os fragmentos teciduais.

3.2 Amostras analisadas

Foram estudadas no presente trabalho 106 amostras de diferenciados sítios anatômicos de 17 cães sororreagentes para LVC, presumivelmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, provenientes de diferentes áreas endêmicas do município do Rio de Janeiro, onde foram realizados os inquéritos caninos. Foram processadas amostras de diferentes sítios anatômicos: fragmentos pele normal (abdominal ou escapular), lesão, baço, fígado e linfonodos cervical, poplíteo e mesentérico. Todas as biopsias foram mantidas em freezer a -20° C até o momento do processamento.

A condição clínica, o resultado da sorologia e a região de procedência de cada cão analisado estão listados na Tabela 1.

3.3 Amostras de referências

Para os padrões de referência foram utilizadas cepas de *Leishmania* selecionadas pela Organização Mundial de Saúde, que devem servir de referencial em todos os estudos em diagnóstico e genotipagem em *Leishmania* e leishmanioses (UNDP/ WORLD BANK/WHO, 1990). Estas amostras encontram-se mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido no criobanco do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do IPEC – FIOCRUZ, a descrição de cada uma está resumida abaixo.

MHOM/BR/74/PP75 *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Isolada de caso humano de LVA na cidade de Ituaçu, Bahia.

MHOM/BR/75/M2903 *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Isolada de caso humano de LTA na Serra dos Carajás, Pará.

*Esta Dissertação de Mestrado é parte de um projeto maior do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ), aprovado no Comitê de Ética Animal (CEUA/Fiocruz), sob o número L- 023/06.

Tabela 1. Identificação dos cães, condição clínica, titulação sorológica e procedência.

Cães	Clínica	Sorologia pela RIFI	Localidade no município do Rio de Janeiro
A28	Assintomático ^a	1:160	Barra de Guaratiba
A29	Sintomático ^b	1:80	Barra de Guaratiba
A30	Sintomático	1:160	Grota Funda
A33	Sintomático	1:640	Campo Grande
A34	Sintomático	1:80	Ilha de Guaratiba
A36	Assintomático	1:1280	Campo Grande
A37	Assintomático	1:1280	Campo Grande
A39	Sintomático	1:640	Ilha de Guaratiba
A40	Sintomático	1:640	Ilha de Guaratiba
A41	Assintomático	1:640	Ilha de Guaratiba
A42	Assintomático	1:320	Ilha de Guaratiba
A43	Sintomático	1:640	Campo Grande
A44	Sintomático	1:320	Campo Grande
A53	Assintomático	1:640	Ilha de Guaratiba
A61	Sintomático	1:1280	Pontal
A62	Assintomático	1:1280	Pontal
A63	Assintomático	1:1280	Campo Grande

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta/ Dados da SMS/ RJ

a: Assintomático- não apresenta sintomas

b: Sintomático apresenta três ou mais sintomas

3.4 Obtenção do DNA a partir dos fragmentos de tecidos

3.4.1 Extração e purificação do DNA genômico

O processo de extração do DNA genômico foi seguido de acordo com o protocolo do kit comercial GenomicPrepTM Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Biosciense – GE Healthcare) disponibilizado pelo fabricante, com modificações. Para a realização da lise celular, 2 mm de fragmentos teciduais foram colocados em tubos eppendorf de 1,6ml contendo 510µl de solução de lise celular (Cell Lysis Solution), resfriado em gelo, adicionando-se N-lauril sarcosil 30% na proporção de 1/10 (60µl), para um volume final de 600µl, sendo em seguida macerados com a utilização de pistilos.

O lisado foi mantido em gelo até o momento da incubação em banho-maria (Multi-Blok Heater, Lab-Line Instruments.) a 65°C por 1 hora. Em seguida adicionou-se 30µl de solução de proteinase K (20 mg/ml), permanecendo incubado em banho-maria a 55°C “overnight”. Após a incubação o lisado foi então deixado à temperatura ambiente por 10 minutos para o seu resfriamento e em seguida submetido a tratamento com 3µl de solução de RNase A (4 µg/µl), misturando a amostra invertendo-se o tubo algumas vezes, seguindo incubação a 37°C por 1 hora. O lisado foi resfriado por 5 minutos à temperatura ambiente acrescentando-se em seguida 200µl de solução de precipitação de proteínas (protein precipitation solution), seguindo-se agitação vigorosa com o auxílio de vórtex por 20 segundos. Após esta etapa, os lisados foram centrifugados a 13.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf® por 7 minutos. Com a utilização de pipetas o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo Eppendorf® de 2 ml, sendo então adicionados 800µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para uma nova desproteinização. Nesta etapa o DNA foi submetido a uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 7 minutos, podendo ser observadas três fases: a 1ª fase, superior, é o DNA, a 2ª fase proteínas e a inferior o clorofórmio/álcool isoamílico. Com a utilização de pipetas foi retirada a 1ª fase contendo o DNA e transferida para um novo tubo eppendorf contendo 600µl de isopropanol 100%, sendo misturada invertendo-se gentilmente o tubo por várias vezes até visualizar-se a formação de um fio branco de DNA. Em seguida o material foi centrifugado a 13.000 rpm por mais 3 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e os tubos foram invertidos sobre o papel filtro para a secagem do DNA à temperatura ambiente. Após a adição de 600µl de etanol 70% gelado, inverteu-se os tubos várias vezes para a lavagem do “pellet” de DNA. Em seguida foi feita nova centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. O etanol foi removido e os tubos foram deixados à temperatura ambiente sobre o papel filtro para a secagem do “pellet” de DNA. Para a hidratação do DNA ressuspendeu-se o “pellet” com 50µl de solução de hidratação (DNA Hydration Solution) e deixou-se à temperatura ambiente “overnight”.

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro GeneQuant® Amersham Pharmacia, usando-se diluições 1:10 em H₂O ultra-pura. A pureza foi estimada pela razão entre os valores de densidade ótica obtidos a 260 e 280nm. A pureza do DNA foi avaliada após corrida eletroforética de 1µl do DNA extraído em gel de agarose a 1% (p/v), a 100V por 1 hora e 30 minutos.

O DNA extraído foi então diluído e aliquoteado a um volume final de 20 ng/µl.

3.4.2 Extração e purificação do kDNA de *Leishmania*

O processo de extração do kDNA baseou-se nos protocolos descritos por Morel et al. (1980) e Pacheco (1986).

Os parasitas de cultura estocados (cerca de 10⁹ parasitas totais), foram retirados do nitrogênio líquido e as células ressuspendidas em um volume mínimo de 2,55 ml SE 1X gelado (NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, pH 8.0), adicionando-se proteinase K (20mg/ml) na proporção de 1/20 e N-lauril sarcosil (30%) na proporção 1/10, para um volume final de 3 ml (0,15 ml e 0,30 ml respectivamente). Após a homogeneização e incubação em banho-maria a 60°C por 3 horas, o lisado foi passado através de agulha 25 x 8 mm, sob pressão positiva, com a finalidade de diminuir a viscosidade do meio por quebra das moléculas de DNA nuclear. As redes cinetoplásticas foram coletadas por centrifugação (Ultracentrífuga Beckman em rotor T50i) a 33.000 rpm a 4°C durante 1 hora. Após a 1ª centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi então ressuspendido em 3 ml de tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) e recentrifugado nas mesmas condições. Um volume de 200 µl de TE 1X foi acrescentado ao sedimento e este em

seguida foi submetido ao tratamento com 2 µl de solução de RNase (4 µg/10⁹ células) seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 1 hora.

Para a desproteíntização foram adicionados 200 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). O material foi homogeneizado e centrifugado em microcentrífuga a 13.000 rpm por 7 minutos, sendo visualizadas três fases: a fase superior é o DNA do cinetoplasto, a intermediária representa as proteínas e a inferior o clorofórmio/álcool isoamílico. A fase superior, representando o kDNA, foi coletada e transferida para um novo tubo Eppendorf® de 1,5 ml, que ficou reservado. Foram adicionados 100 µl de TE 1X ao tubo inicial com o restante do material, onde havia proteínas e álcool, sendo o material novamente centrifugado, retirando-se a 1ª fase, adicionando-a ao Eppendorf® reservado. O volume do DNA foi medido, sendo adicionado o dobro deste volume em clorofórmio/álcool isoamílico e, após nova centrifugação, o sobrenadante (1ª fase) foi transferido para um novo tubo Eppendorf®. Em seguida foi adicionado 1 ml de éter saturado, agitou-se vigorosamente e pode-se observar duas fases: a superior, que é o éter, foi desprezada, sendo o procedimento repetido por 3 ciclos. O kDNA purificado foi precipitado com NaCl 4 M na proporção de 1/20 e 3 volumes de etanol absoluto, durante a noite a -20°C. O material foi centrifugado a 13.000 rpm em microcentrífuga sob refrigeração a 4°C por 30 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” de DNA incubado em estufa a 37°C por 20 minutos para secagem. Logo após o “*pellet*” foi ressuspensionado com 10 a 20 µl de TE 1X, hidratado sob refrigeração a 4°C “*overnight*” e estocado a -20°C até o momento de uso.

3.5 Detecção do gene da beta globina através da PCR

Para o teste de inibição de DNA nos fragmentos teciduais foi previamente realizada uma amplificação da sequência genômica de β-globina, utilizando-se o par de iniciadores PC03 (5'ACACAAACTGTGTTCACTAGC3') e PC04 (5'CAACTTCATCCACGTTTACC 3'), que é direcionado ao segmento do gene de β-globina segundo Saiki *et al.*, 1985. Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen®.

A amplificação foi realizada usando-se 3 µl do DNA dosado de cada amostra, o que corresponde a 20ng de DNA. Como controle positivo foram utilizadas amostras teciduais caninas e controle negativo foi utilizado o mix da reação de PCR sem o DNA. Cada tubo de reação continha um volume final de 25 µl, contendo 3 µl do DNA, solução tampão 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3 – Invitrogen), 0,2mM de cada deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs – Promega), 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), 15 pmol de cada iniciador, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra-pura para PCR.

Os ciclos de amplificação consistiram em uma etapa inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento (ligação dos iniciadores) a 63°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final do ciclo a 72°C por 10 minutos. A reação de PCR foi realizada em termociclador GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer, Cetus – MA).

3.6 Detecção de *Leishmania* em fragmentos de tecidos através da PCR específica para os complexos *L. donovani* e *L. braziliensis*

A amplificação do DNA genômico das amostras estudadas foi realizada em termociclador GeneAmp 9600 da Perkin-Elmer, utilizando dois pares de iniciadores D1/D2 específicos para espécies do complexo *L. donovani*, direcionados à região variável dos minicírculos de kDNA de 800 bp (SMYTH *et al.*, 1992) e B1/B2 que é direcionado à

região variável dos minicírculos de kDNA (750 bp), específicos para as espécies do complexo *L. braziliensis* (De BRUIJN & BARKER,1992). Os iniciadores foram sintetizados pela RWGene, Inc – USA. As sequências estão mostradas na Tabela 2.

O material clínico em que não foi detectado DNA de *L.(L.) chagasi* pelos iniciadores D1/D2, foi submetido a uma amplificação com os iniciadores B1/B2 para a detecção de DNA *L.(V.) braziliensis*. A amplificação foi realizada usando-se 2 µl do DNA dosado de cada amostra, o que corresponde a 20 ng de DNA. Como controles positivos de PCR foram utilizadas as cepas de referência PP75 de *L.(L.) chagasi* e M2903 de *L.(V.) braziliensis* e controle negativo, o mix da reação de PCR sem DNA.

Para o complexo *L. donovani* o DNA foi amplificado segundo Smyth *et al.* (1992), com modificações na mudança da temperatura de anelamento de 60°C para 63°C e com modificação na mudança de concentração de 100 pmol para 1,5 pmol de cada iniciador. Cada tubo de reação continha um volume final de 25 µl, contendo 2 µl do DNA, solução tampão 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3 – Invitrogen), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs – Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1,5 pmol de cada iniciador, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura para PCR. Os componentes da reação são apresentados na Tabela 3. Os ciclos de amplificação consistiram em uma etapa inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento (ligação dos iniciadores) a 63°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final do ciclo a 72°C por 10 minutos.

Para as espécies do complexo *L. braziliensis*, o DNA foi amplificado segundo De Bruijn & Barker (1992), com modificação na mudança de concentração de 10 pmol para 1,5 pmol de cada iniciador. Os ciclos de amplificação consistiram em uma etapa inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 67,5° por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final do ciclo a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas amplificações pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

INICIADOR	SEQUÊNCIA	Nº DE NUCLETÍDEOS	% G+C
D1	5'CCAGTTTCCCGCCCCG3'	16	75%
D2	5'GGGGTTGGTGTAATAATAG3'	18	44%
B1	5'GGGGTTGGTGTAATATAGTGG3'	21	48%
B2	5'CTAATTGTGCACGGGGAGG3'	19	58%

Tabela 3. Componentes da PCR específica por tubo de reação

COMPONENTES	QUANTIDADE
Taq DNA Polimerase	2,5 unidades
Tampão 1X	25mM KCl, 1,5mM MgCl ₂ e 10mM Tris HCl pH 8,3
Deoxinucleotídeos Trifosfatos (dNTPs)	0,2mM de cada (dCTP, dATP, dGTP e dTTP)
Iniciadores D1 e D2 – B1 e B2	1.5pmol
DNA	20ng de cada amostra
Volume final	25µl

3.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1X (0,89 M Trizma-Base, 0,89 M Ácido Bórico e 0,24 M EDTA Na₂, pH8.3), submetidos a uma tensão de 80V por 2 horas. Foi utilizado o marcador de 100bp – 100 Base-Pair DNA Ladder (GE Healthcare). Foi aplicada no gel uma alíquota de 10µl dos produtos amplificados com 1µl da solução corante (0,02 g de azul de bromofenol, 0,02 g de xilenocianol, 2,5 g de ficoll 400 e 10ml TBE 5X). Após a eletroforese o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV), sendo fotografado em sistema de fotodocumentação (EasyDoc 100, BioAgency), com câmera digital Canon S10 acoplada a um computador.

3.8 Purificação dos produtos da PCR

O processo de purificação dos produtos amplificados foi seguido de acordo com o protocolo do kit comercial ChargeSwitch®PCR Clean-Up Kit, disponibilizado pelo fabricante (Invitrogen). Antes de iniciar-se o processo de purificação, foi agitado no vórtex o tubo contendo pérolas de magnetos (Charge Switch®Magnetic Beads). Para a realizar-se a purificação, 25-50 µl dos produtos de PCR foram transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 µl estéril. A este tubo foram adicionados 25 µl (para 25 µl do produto PCR) ou 50 µl (para 50 µl do produto PCR) de tampão de purificação (Purification Buffer - N5), 3,0 µl (para 25 µl do produto PCR) ou 6µl (para 50 µl do produto PCR) de Charge Switch®Magnetic Beads, homogeneizando-se gentilmente com a micropipeta. Em seguida deixou-se o tubo incubando a temperatura ambiente por 1 minuto. Após este procedimento, colocou-se o tubo no MagnaRack® por 1 minuto, ou até a formação de um *pellet*. Sem retirar-se o tubo do MagnaRack®, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e descartado. O tubo contendo o *pellet* foi retirado do MagnaRack®, adicionando-se 70 µl de tampão de lavagem (Wash Buffer - W12) ao tubo homogeneizando-se gentilmente com a pipeta. Colocou-se novamente o tubo no MagnaRack® até a formação de um *pellet*. Sem retirar-se o tubo do MagnaRack®, o sobrenadante foi retirado e descartado. O processo de

lavagem do produto PCR foi realizado duas vezes. O tubo contendo o *pellet* foi retirado do MagnaRack®, adicionando-se 25 µl (para 25 µl de produto PCR) ou 50 µl (para 50 µl de produto PCR) de tampão de eluição (Elution Buffer) ao tubo. Homogeneizou-se gentilmente com a pipeta e incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto. Após a incubação colocou o tubo no MagnaRack® até a formação do *pellet*. Sem retirar-se o tubo do MagnaRack®, o sobrenadante contendo o produto de PCR purificado foi transferido para outro tubo (0,2 ml) estéril, deixando-se um volume final de 5,0 µl para aplicação em gel (visualização do resultado final da purificação). O produto purificado foi estocado a -20°C.

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

Os produtos positivos pela PCR específica para o complexo *L. donovani* foram submetidos a uma segunda amplificação utilizando apenas um dos iniciadores específicos D1(5'-CCAGTTTCCCGCCCCG-3'), que amplifica uma região específica para espécies deste complexo, em condições de baixa estringência e concentrações elevadas de DNA polimerase. O produto de PCR purificado (800 bp) foi re-amplificado segundo Pena *et al.* (1992), com modificações na mudança do número de ciclos de 35 para 44 e a utilização de pérolas liofilizadas (kit Ready-To-Go PCR Analysis Beads – GE Healthcare) contendo polimerases termoestáveis (AmpliTaq™ DNA polimerase e Fragmento Stoffel), dNTPs (0.4 mM de cada dNTP em um volume de reação de 25 µl), BSA (2.5 µg) e tampão (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl e 10 mM Tris, pH8.3). Cada tubo de reação continha um volume final de 25 µl, com 40 pmol do iniciador D1, 3 µl do produto de PCR, pérola liofilizada Ready-To-Go e água ultra pura para PCR. Os ciclos de amplificação consistiram em uma etapa inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 44 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 37°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguindo-se uma extensão final do ciclo a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos gerados após a reamplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (*high resolution*, Sigma) a 2% em TBE 1X, sendo submetidos a corrida em 80V por 5 horas.

3.10 Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição da reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR)

A Tabela 4 mostra as endonucleases de restrição utilizadas no estudo, os microorganismos dos quais elas foram isoladas e sua sequência de reconhecimento na fita de DNA. As digestões dos produtos de PCR obtidos com os dois pares de iniciadores B1/B2 e D1/D2 (produtos de 750 bp e 800 bp) dos cães A43 e A63 (fragmentos de lesão, baço e linfonodo cervical), visando-se a análise eletroforética, foram realizadas em volumes finais de 10 µl, a 37°C, durante 4 horas. Na preparação da reação de digestão foram adicionados 3 µl do produto amplificado, 5 U da enzima de restrição utilizada (Hinf I, Rsa I, MboI e Msp I) e tampão 1X apropriado às respectivas enzimas.

As reações foram interrompidas e os produtos da digestão foram preparados para a eletroforese pela adição de 2 µl de solução corante.

Os fragmentos gerados após a digestão enzimática foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 1X, submetidos a uma corrida de 90V por 3 horas. Foi utilizado o marcador de 100bp – 100 Base-Pair DNA Ladder (Ge Healthcare).

Tabela 4. Enzimas de restrição, microorganismo da qual foi isolada e sequência de reconhecimento

Enzima	microorganismo do qual foi isolada	Sequência de reconhecimento
Msp I	<i>Moraxella sp</i>	5' -C/CGG-3'
Hinf I	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'-G/ANTC-3'
Rsa I	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'-GT/AC-3'
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	5'- /GATC

3.11 Análise fenética

A análise fenética dos perfis genéticos gerados pela LSSP-PCR (low stringency single specific primer PCR) foi obtida calculando-se os níveis de similaridade, através do coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o coeficiente de similaridade de Jaccard. A matriz de similaridade foi transformada em um fenograma através do método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA). Para a realização desta análise foi usado o programa NTSYS versão 2.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise molecular

Um total de 106 fragmentos teciduais foi obtido de 17 cães e submetido: i) ao teste de inibição ao PCR com o gene de β -Globina, ii) à PCR específica e iii) à PCR de “primer” único em condição de baixa estringência (LSSP-PCR). Os cães procediam de áreas urbanas e periurbanas do município do Rio de Janeiro e apresentavam sorologia (RIFI) com títulos que variavam de 1:80 a 1:1280. Em alguns animais os sintomas clínicos de LV eram evidentes, ao passo que outros foram considerados assintomáticos. Em alguns animais, lesões cutâneas também foram observadas (Tabela 5).

4.2 Ensaio da PCR para o gene de β -globina

De um total de 106 fragmentos teciduais que foram submetidos a amplificação enzimática do gene de β -globina no intuito de testar-se possível inibição da amplificação do DNA, 87 (82%) amplificaram com os iniciadores PC03/PC04, gerando-se produtos de amplificação de 110 bp.

A Figura 1 mostra o resultado dos produtos da PCR de algumas amostras com os iniciadores PC03/PC04, em gel de agarose a 1,5%, corado pelo brometo de etídio. Estes produtos foram analisados em conjunto com o marcador de tamanho molecular (DNA-Ladder 100 bp), o que forneceu uma base para o estabelecimento do tamanho, em pares de base, do produto de amplificação gerado pelo iniciador. As dezenove amostras que não tiveram o gene de β -globina amplificado, indicando inibição, foram repurificadas antes de serem novamente resubmetidas aos ensaios de PCR, onde continuou apresentando inibição.

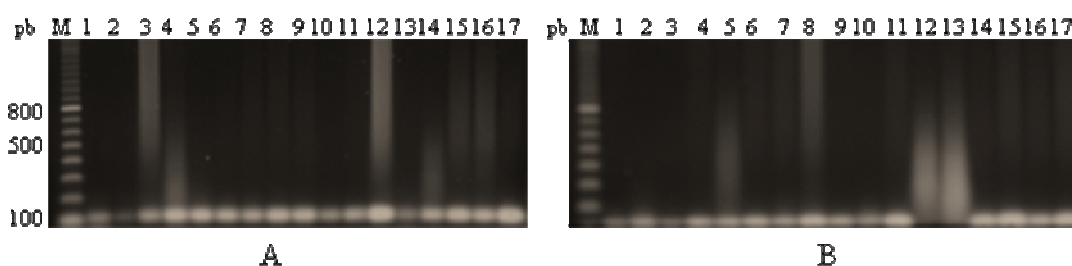


Figura 1. A e B: Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. mostrando os produtos amplificados, de algumas amostras representativas, após PCR do gene de β -globina de com os iniciadores PC03/PC04. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A28 - 1:P abd, 2:P esc, 3:B, 4:F, 5:LM, 6:LCd, 7:LCE, 8:LPd, 9:LPe; Cão A29 - 10:P abd, 11:P esc, 12:B, 13:F, 14:LM, 15:LCd, 16:LCE, 17:LPd; CN- controle negativo. **B:** Cão A30 - 1:Le, 2:P abd, 3:P esc, 4:B, 5:LM, 6:LCd, 7:LCE, 8:LPd; Cão A34 - 9:P abd, 10:P esc, 11:B, 12:F, 13:LM, 14:LCd, 15:LCE, 16:LPd, 17:LPe.

Le= lesão cutânea, Pabd= pele abdominal, Pesc= pele escapular, B= baço, F= fígado, LM= linfonodo mesentérico, LCd= linfonodo cervical direito, LCE= linfonodo cervical esquerdo, LPd= linfonodo poplíteo direito LPe= linfonodo poplíteo esquerdo.

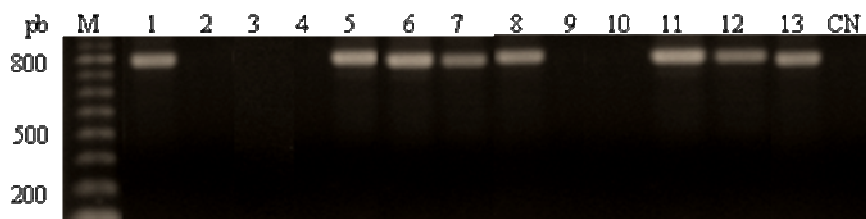
4.3 Detecção de DNA parasitário pela PCR específica

Antes do ensaio da PCR específica com os iniciadores D1/D2, realizamos uma padronização da técnica, com o intuito de se evitar o aparecimento de produtos inespecíficos da reação. De acordo com o número de ciclos de 30 a 35 propostos por Smyth *et al.* (1992), optamos por 33 ciclos de amplificação. Foram modificadas também as condições de temperatura de anelamento de 60°C para 63°C e a concentração de iniciadores de 100 pmol para 1.5 pmol. Estas condições foram consideradas ideais para detectar-se o DNA parasitário em fragmentos teciduais, diminuindo-se assim o aparecimento de bandas inespecíficas. No artigo de Smyth *et al.* (1992), os autores relataram que é comum a observação de bandas inespecíficas na faixa acima de 800 pb. No entanto, em nosso estudo, após a padronização inicial descrita foi possível diminuir, em muito, o aparecimento de bandas inespecíficas.

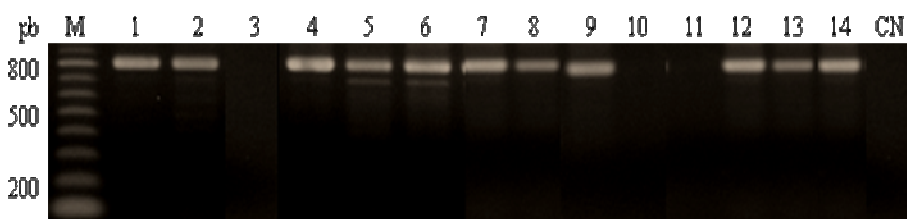
Entre os 106 fragmentos teciduais testados, 66 (62,26%) geraram produtos de amplificação de 800 bp, utilizando-se os iniciadores D1/D2 específicos para espécies do complexo *L. donovani*. A Figura 2 demonstra o resultado da PCR específica com estes iniciadores de algumas amostras em gel de agarose a 1,5%, corado pelo brometo de etídio. A Tabela 5 apresenta a população canina, suas respectivas amostras clínicas, sua procedência, assim como os resultados da PCR específica com os iniciadores D1/D2 e da amplificação do gene da β globina.

O maior percentual de detecção foi observado em fragmentos de linfonodos cervicais (17/17, 100%) e poplíteos (17/17, 100%), seguidos do baço com percentual de 76,47% (13/17) da pele normal com 12 biopsias positivas em 17 (70,59%). Os resultados sugerem que estes sítios anatômicos podem ser os de maior atividade parasitária na LV canina. No entanto, nos chama à atenção o baixo percentual de positividade em fragmentos de fígado (1/17, 5,88%). Entretanto, é provável que este fato esteja relacionado a problemas técnicos como degradação/inibição do DNA durante a extração ou ao tamanho do fragmento processado (Tabela 6).

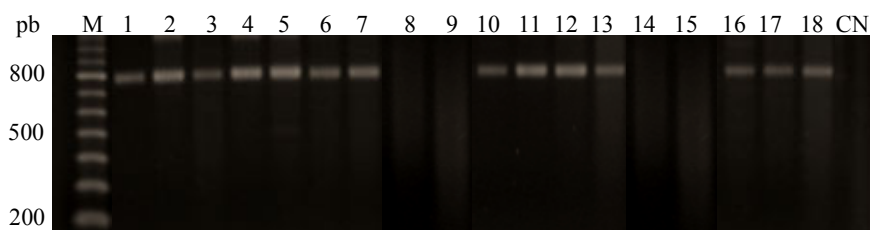
A linfadenopatia generalizada é uma característica clínica clássica, frequentemente relatada na LV canina. Hipertrofia e hiperplasia de linfonodos, sem lesões específicas, são descritas em cães assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (LIMA *et al.* 2004). Giunchetti *et al.* (2008) sugerem que alterações nos linfonodos no curso da LV canina refletem não só o perfil da resposta imune do hospedeiro mas também a intensidade da carga parasitária durante toda a infecção por *L. (L.) chagasi*. No presente estudo, 52,94% dos cães naturalmente infectados eram assintomáticos e 47,06% sintomáticos. Apesar de ter sido observada uma maior positividade da PCR nos cães sintomáticos, especialmente nas amostras de pele, não houve diferença significativa entre os grupos clínicos ou nos órgãos examinados. Foi observado um alto percentual de detecção de DNA parasitário em linfonodos cervical e poplíteo, tanto em cães assintomáticos quanto em sintomáticos. Entretanto, Lima *et al.* (2004) analisando os linfonodos cervicais e poplíteos de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, encontraram variabilidade na carga parasitária, sugerindo um parasitismo mais intenso em cães assintomáticos do que aquele observado nos animais oligossintomáticos ou sintomáticos. Na pele, segundo os mesmos autores, foi observada uma carga parasitária mais alta nos cães sintomáticos, corroborando nossos resultados.



A



B



C

Figura 2. Produtos da PCR específica com os iniciadores D1/D2 em gel de agarose a 1.5%. **M:** Marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A33 - 1:Pe, 2:B, 3:F, 4:LM, 5:LC, 6:LP; Cão A34 - 7:Pe, 8:B, 9:F, 10:LM, 11:LC, 12:LP, 13:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), CN:controle negativo. **B:** Cão A36 - 1:Pe, 2:B, 3:F, 4:LM, 5:LC, 6:LP; Cão A30 - 7:Le, 8:Pe, 9:B, 10:F, 11:LM, 12:LC, 13:LP, 14:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **C:** Cão A39 - 1:Pe, 2:B, 3:LM, 4:LC, 5:LP; Cão A44 - 6:Pe, 7:B, 8:F, 9:LM, 10:LC, 11:LP; Cão A53 - 12:Pe, 13:B, 14:F, 15:LM, 16:LC, 17:LP; 18:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

Le= lesão cutânea, Pe= pele íntegra, B= baço, F= fígado, LM= linfonodo mesentérico, LC= linfonodo cervical, LP= linfonodo poplíteo.

Tabela 5. Identificação dos cães, procedência, sítios anatômicos e PCR (continua)

Cães	Procedência	Sítio anatômico	PCR	
			D1/D2	β - globina
A28	Barra de Guaratiba	pele normal	-	+
		baço	+	+
		fígado	-	+
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A29	Barra de Guaratiba	pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	+
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	-	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A30	Grota Funda	lesão	+	+
		pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
A33	Campo Grande	linfonodo poplíteo	+	+
		pele normal	+	+
		baço	-	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
A34	Ilha de Guaratiba	linfonodo poplíteo	+	+
		pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	-
		linfonodo cervical	+	+
A36	Campo Grande	linfonodo poplíteo	+	+
		pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	+	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+

Tabela 5. Continuação

Cães	Procedência	Sítio anatômico	PCR	
			D1/D2	β - globina
A37	Campo Grande	pele normal	-	+
		baço	-	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	-
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A39	Ilha de Guaratiba	pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	+	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A40	Ilha de Guaratiba	pele normal	-	+
		baço	+	+
		fígado	-	+
		linfonodo mesentérico	-	-
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A41	Ilha de Guaratiba	lesão	+	+
		pele normal	+	+
		baço	-	-
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
A42	Ilha de Guaratiba	linfonodo poplíteo	+	+
		pele normal	-	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
A43	Campo Grande	linfonodo poplíteo	+	+
		lesão	-	+
		pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+

Tabela 5. Continuação

Cães	Procedência	Sítio anatômico	PCR	
			D1/D2	β - globina
A44	Campo Grande	pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	-
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A53	Ilha de Guaratiba	pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	-
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A61	Pontal	pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	+	+
		linfonodo mesentérico	+	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A62	Pontal	pele normal	-	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	+	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+
A63	Campo grande	Lesão 01	-	+
		Lesão 02	-	+
		pele normal	+	+
		baço	+	+
		fígado	-	-
		linfonodo mesentérico	-	+
		linfonodo cervical	+	+
		linfonodo poplíteo	+	+

Tabela 6. Detecção de DNA de *L. (L.) chagasi*, através de PCR com os iniciadores D1/D2, em diferentes sítios anatômicos de 17 cães residentes na zona oeste do município do Rio de Janeiro.

Sítio anatômico	Número de fragmentos avaliados	Número de fragmentos positivos	% de fragmentos positivos
Pele normal	17	12	70,6
Baço	17	13	76,4
Fígado	17	1	5,9
Linfonodo mesentérico	17	4	23,5
Linfonodo cervical	17	17	100
Linfonodo poplíteo	17	17	100
Lesão ulcerada de pele	4*	2	50
Total	106	66	62,3

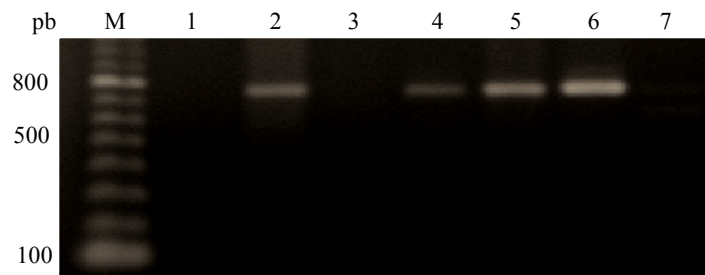
*Nos dois fragmentos de lesão cutânea negativos para *L. (L.) chagasi* foi detectado DNA de *L. (V.) braziliensis*, caracterizando-se a co-infecção pelas duas espécies.

A detecção de 70.59% de positividade em fragmentos de pele normal reforça a importância dos cães como reservatórios domésticos na cadeia epidemiológica da LV. Além disso, nossos resultados corroboram os experimentos de Madeira et al. (2009), que obtiveram 78.7% de positividade no isolamento de *L. (L.) chagasi* em cultura a partir de pele normal de cães sororretores. No presente trabalho, o resultado da PCR específica sugere que os linfonodos (cervical e poplíteo), o baço e a pele normal podem ser considerados como sítios alvo para o diagnóstico da LV canina em animais sororretores para *L. (L.) chagasi*.

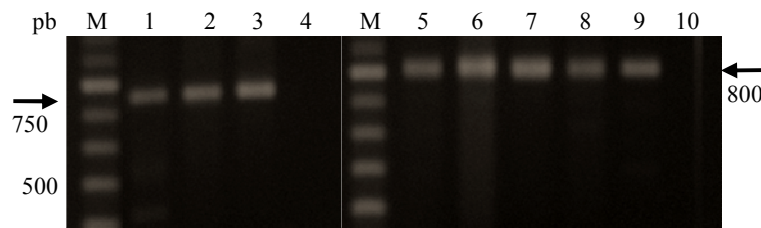
4.4 Evidência de infecção mista de leishmaniose tegumentar e visceral.

Os fragmentos de lesões cutâneas dos dois cães (A43 e A63) que mostraram resultados negativos com os iniciadores D1/D2 (Figura 3A, Tabela 5) foram submetidos a um segundo ensaio de PCR com iniciadores B1/B2 direcionados à região variável dos minicírculos de espécies do complexo *L. braziliensis*. Após a PCR, as esperadas bandas diagnósticas de 750 bp foram observadas em gel de agarose a 1,5%. É importante ressaltar que amostras de baço e linfonodos desses mesmos cães foram positivas para *L. (L.) chagasi*. A Figura 3B evidencia a infecção mista mostrando os produtos de amplificação (bandas de 750 pb) dos fragmentos de lesão após PCR com os iniciadores B1/B2 e as bandas diagnósticas de 800 pb após PCR com os iniciadores D1/D2.

A técnica de RFLP-PCR, associada aos ensaios de PCR, foi escolhida para confirmar a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* nas lesões cutâneas e de *L. (L.) chagasi* em fragmentos de órgãos internos dos dois cães. A técnica de RFLP foi realizada com um painel de quatro enzimas de restrição para confirmar a especificidade dos produtos de kDNA amplificados pelos iniciadores B1/B2 e D1/D2. Como pode ser observado na Figura 4 (A e B), a técnica de RFLP-PCR confirmou a infecção mista. Em experimentos anteriores, Lopes et al. (1984) e Pacheco et al. (1986) determinaram que as enzimas de restrição Msp I, RsaI, Hinf I e MboI foram consideradas as mais apropriadas para a tipagem de espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Para as espécies do subgênero *Viannia*, a enzima MspI reconhece um único sítio de restrição nas



A



B

Figura 3. A: Produtos amplificados de lesões cutâneas após PCR específica com os iniciadores B1/B2 em gel de agarose a 1,5%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. Canaletas: 1.Cão A30- lesão; 2.Cão A43- lesão; 3.Cão A41- lesão; 4.Cão A63- lesão 01; 5.Cão A63- lesão 02; 6.*Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 7.CN- controle negativo. B: Produtos amplificados após PCR específica com os iniciadores B1/B2 e D1/D2 em gel de agarose 1,5%. **B1/B2:** 1.Cão A43- lesão; 2.Cão A63- lesão; 3.*Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 4.CN. **D1/D2:** 5.Cão A43- baço; 6.Cão A43- linfonodo cervical; 7.Cão A63- baço; 8.Cão A63- linfonodo cervical; 9.*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); 10.CN.

moléculas de minicírculos, linearizando-os. Esta enzima reconhece também vários sítios em *L. (L.) chagasi*, revelando perfis de restrição polimórficos (Figura 4C).

Aqui, os perfis de restrição com as enzimas Hinf I e Rsa I, obtidos do DNA parasitário amplificado de lesões cutâneas, foram similares ao da cepa referência de *L.(V.)braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Os perfis de restrição dos produtos amplificados de baço e linfonodos, após digestão com as enzimas de restrição HinfI e Mbo I, além de mostrarem-se mais polimórficos do que os de *L.(V.) braziliensis*, foram também similares quando comparados aos da cepa referência de *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). A técnica de RFLP-PCR com as enzimas Hinf I e MboI corroborou com os resultados da PCR específica justificando o uso desta metodologia associada ao diagnóstico, para a identificação de espécies de *Leishmania*.

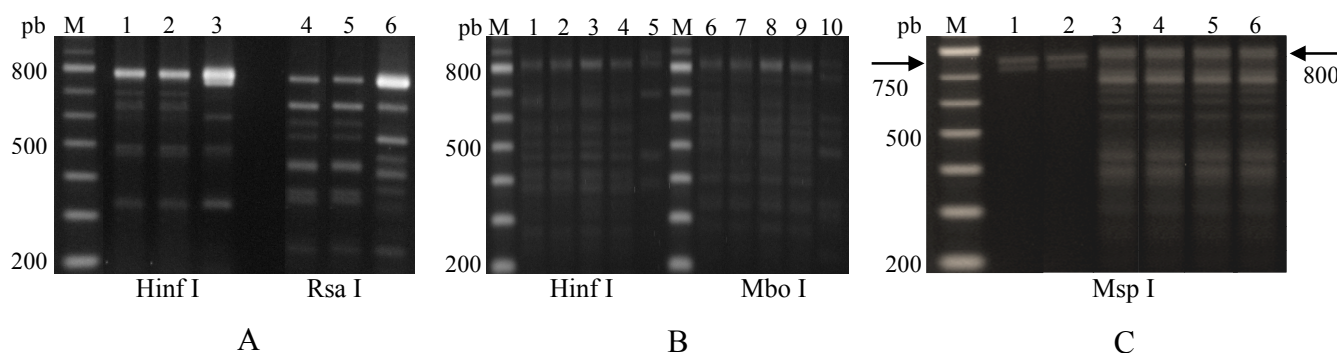


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando os perfis de restrição dos produtos amplificados de lesão cutânea, baço e linfonodo, após digestão com as enzimas Hinf I, Rsa I, MboI e Msp I. **A:** perfis de restrição dos produtos amplificados de lesão cutânea, após digestão com as enzimas Hinf I e Rsa I. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. Canaletas: 1 e 4.Cão A43- lesão; 2 e 5.Cão A63- lesão; 3 e 6.*Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). **B:** perfis de restrição dos produtos amplificados de baço e linfonodo, após digestão com as enzimas Hinf I e MboI. Canaletas: 1 e 6.Cão A43- baço; 2 e 7.Cão A43- linfonodo cervical; 3 e 8.Cão A63- baço; 4 e 9.Cão A63- linfonodo cervical; 5 e 10.*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **C:** perfis de restrição dos produtos amplificados de lesão cutânea, baço e linfonodo, após digestão com a enzima Msp I. Canaletas: 1.Cão A43- lesão; 2.Cão A63- lesão; 3.Cão A43- baço; 4.Cão A43- linfonodo cervical; 5.Cão A63- baço; 6.Cão A63- linfonodo cervical.

É reconhecido que no estado do Rio de Janeiro a transmissão da *L (V.) braziliensis* ocorre em áreas periurbanas onde a vegetação da floresta primitiva foi substituída pela ocupação humana desordenada (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). A infecção, além de ocorrer em humanos, tem sido relatada também em cães e equinos (MARZOCHI et al., 1985; BARBOSA-SANTOS et al., 1994). Áreas de sobreposição da LT e LV já foram mapeadas no município do Rio de Janeiro, principalmente em no bairro de Campo Grande, de onde provêm os dois cães com infecção mista analisados no presente trabalho. Nestas áreas, a infecção mista por *L (V.) braziliensis* e *L (L.) chagasi* já foi notificada em um paciente humano (OLIVEIRA-NETO et al., 1986) e em um cão (MADEIRA et al., 2006).

A ocorrência simultânea, em uma determinada área endêmica, de casos caninos de ambas as doenças dificulta, ao mesmo tempo, o diagnóstico e a implementação das medidas de controle (MADEIRA et al., 2006; MARZOCHI et al., 2009). Nossos resultados reforçam que, durante os inquéritos epidemiológicos para LV canina, é importante realizar outros métodos de diagnóstico em cães que apresentem lesões cutâneas, principalmente se os animais são procedentes de áreas de sobreposição de LT e LV.

4.5 A heterogeneidade genética intrapopulacional de *L(L.) chagasi*

Através dos perfis polimórficos obtidos pela técnica de LSSP-PCR foi possível evidenciar a variabilidade genética intrapopulacional em *L. (L.) chagasi*. Subpopulações parasitárias geneticamente distintas foram observadas em diferentes sítios anatômicos.

Ao delimitar-se uma faixa compreendida entre 800 a 300 bp, foi possível observar que as amostras compartilhavam fragmentos majoritários em comum nas faixas de 700 bp, 500 bp e 450 bp. Os fragmentos variaram em número e tamanho de 5 a 13 bandas. As Figuras 5, 6 e 7 demonstram os padrões polimórficos, gerados pela LSSP-PCR, das 66 amostras clínicas, após amplificação com o iniciador D1 em gel de agarose a 2% “*high resolution*” corado pelo brometo de etídio. Para cada amostra clínica, os fragmentos com mobilidade eletroforética idênticas foram considerados como sendo o mesmo eletromorfo.

Através da técnica de LSSP-PCR foi possível observar que as populações parasitárias presentes nos diferentes sítios anatômicos exibiram perfis genéticos distintos. No entanto, 2 perfis idênticos foram detectados em distintos sítios anatômicos em um mesmo animal. Observamos ainda que perfis genéticos diferenciados foram observados tanto em diferentes órgãos de um mesmo animal como entre os diferentes animais. A análise fenética agrupou os perfis genéticos em 3 *clusters* diferenciados, com coeficientes de similaridade variando de 0.74 a 1.00. O primeiro *cluster* foi composto por populações presentes em 13 (19,7%) amostras clínicas obtidas de quatro cães (A28, A29, A30 e A 40), parecendo ser o mais diferenciado geneticamente. A maioria das amostras analisadas (80,3%, 53/66) foi agrupada nos clusters II e III, ligando-se entre si por um coeficiente de similaridade de 0.56. A cepa referência de *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foi agrupada, com a maioria das amostras, no *cluster* II.

A Figura 8 mostra o dendrograma baseado nos perfis de amplificação por LSSP-PCR das 66 amostras, utilizando-se o coeficiente de Simple Matching e algoritmo de agrupamento UPGMA.

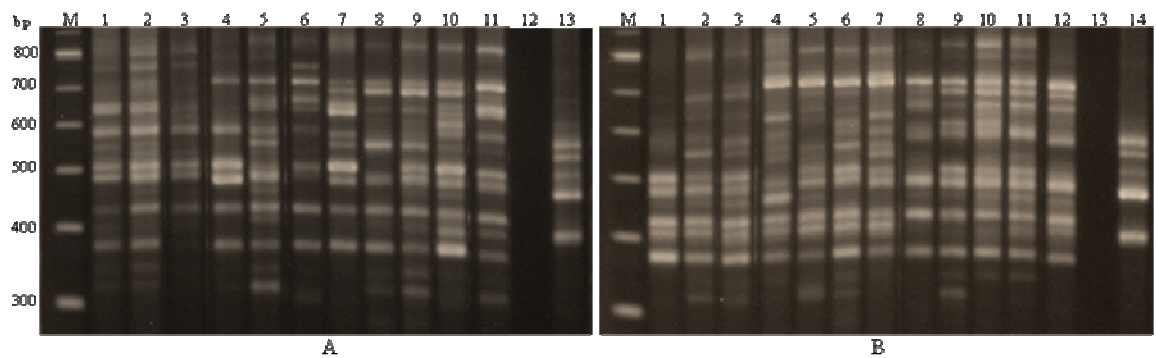


Figura 5. Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética nas populações parasitárias presentes nos diferentes órgãos, em gel de agarose high resolution 2%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp; **A:** Cão A28 - 1:B, 2:LC, 3:LP; Cão A29 - 4:Pe, 5:B, 6:LP; Cão A30 - 7:Le, 8:Pe, 9:B,10:LC, 11:LP; 12: controle negativo; 13:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **B:** Cão A33 - 1: Pe, 2:LC, 3:LP; Cão A34 - 4:Pe , 5:B, 6:LC, 7:LP; Cão A41 - 8:Le, 9:Pe, 10:B, 11:LC, 12:- LP; 13:controle negativo; 14:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

Le= lesão, Pe= pele integra, B= baço, LC= linfonodo cervical, LP= linfonodo poplíteo.

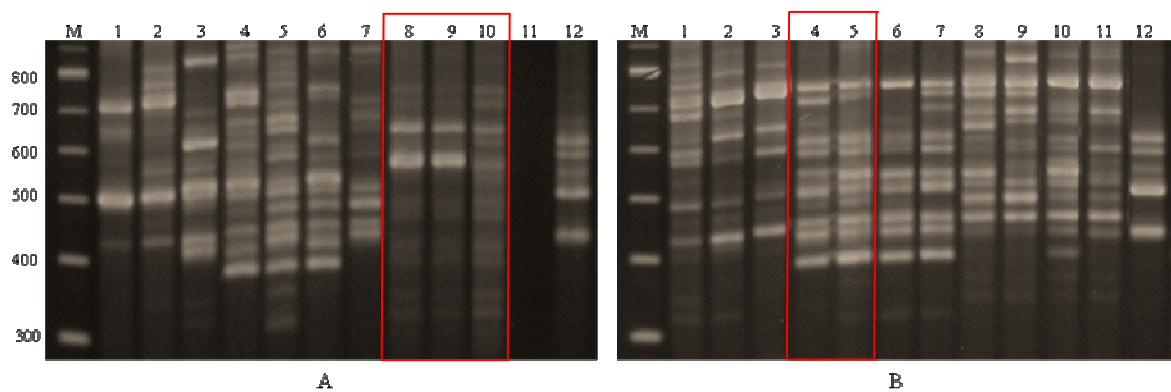


Figura 6. Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética nas populações parasitárias presentes nos diferentes órgãos, em gel de agarose high resolution 2%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A37 - 1:LC, 2:LP; Cão A39 - 3:Pe, 4:B, 5:LC, 6:LM 7:LP; Cão A40 - 8:B, 9:LC, 10:LP; 11:controle negativo; 12:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **B:** Cão A42 - 1:B, 2:LC, 3:LP; Cão A43 - 4:Pe, 5:LC, 6:B, 7:LP; Cão A44 - 8:Pe, 9:B, 10:LC, 11:LP; 12:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

Pe = pele integra B= baço, F= fígado, LM= linfonodo mesentérico, LC= linfonodo cervical, LP= linfonodo poplíteo.

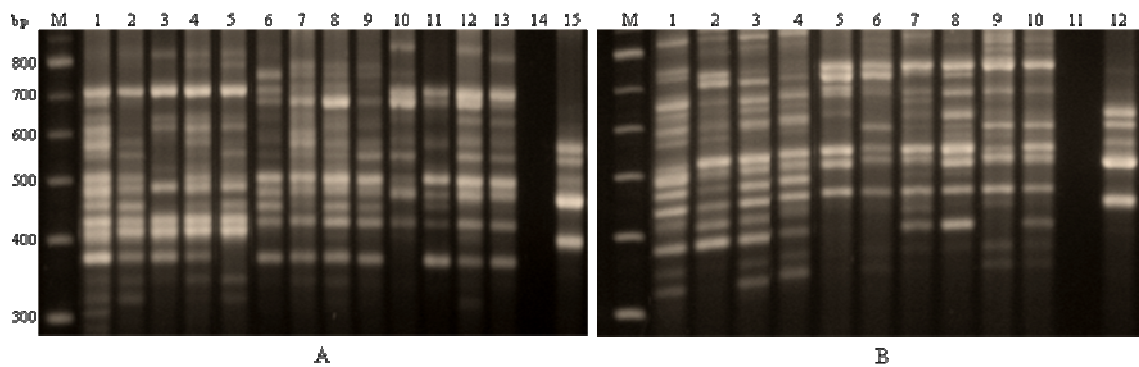


Figura 7. Perfis gerados por LSSP-PCR mostrando a variabilidade genética nas populações parasitárias presentes nos diferentes órgãos, em gel de agarose high resolution 2%. M: marcador molecular DNA Ladder 100 bp. **A:** Cão A36 - 1:Pe, 2:B, 3:LM, 4:LC, 5:LP; Cão A63 - 6:Pe, 7:B, 8:LC, 9:LP; Cão A62 - 10:B, 11:LM, 12:LC, 13:LP; 14:controle negativo; 15:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). **B:** Cão A53- 1:Pe, 2:B, 3:LC, 4:LP; Cão A61 - 5:Pe, 6:B, 7:F, 8:LM, 9:LC, 10:LP; 11:controle negativo; 12:*Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

Pe = pele integra B= baço, F= fígado, LM= linfonodo mesentérico, LC= linfonodo cervical, LP= linfonodo poplíteo.

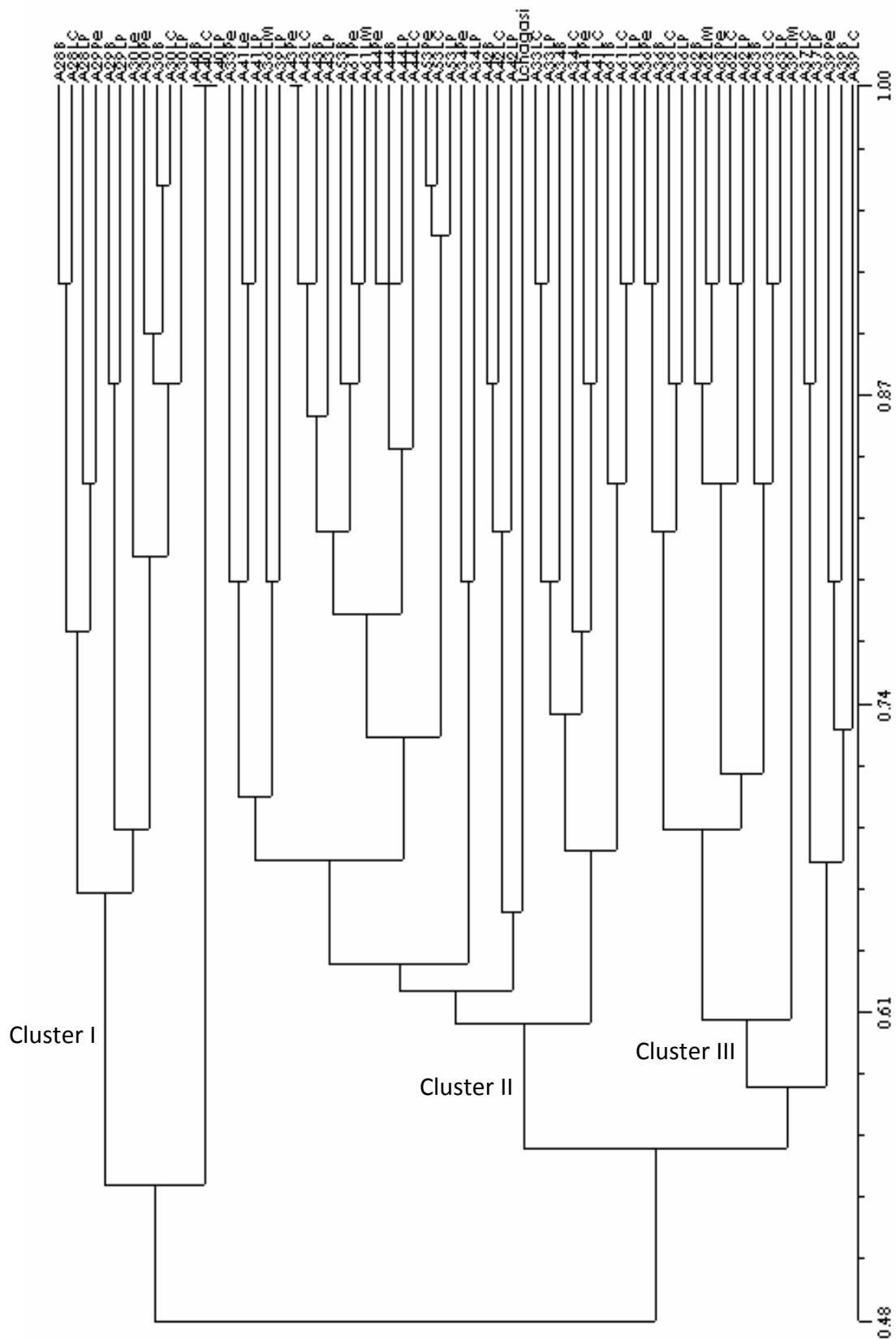


Figura 9. Análise fenética utilizando-se o coeficiente de concordância simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de amplificação por LSSP-PCR, em diferentes clusters. Cepa referência de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).
 Le= lesão cutânea, Pe= pele íntegra, B= baço, LM= linfonodo mesentérico, LC= linfonodo cervical, LP= linfonodo poplíteo.

Diferentes técnicas moleculares, tendo como alvo tanto o DNA nuclear como o DNA do cinetoplasto, têm sido capazes de mostrar heterogeneidade genética em *Leishmania* aos níveis inter e intraespecífico (clonal) corroborando com a afirmativa que estes parasitas circulam como um conjunto de subpopulações (clonais) heterogêneas (PACHECO et al., 1995, 2000; FERNANDES et al., 1998; CUPOLILLO et al., 2003; BAPTISTA et al., 2009). É sabido que a estrutura populacional de *Leishmania* é clonal (TIBAYRENC & AYALA, 1991). Adicionalmente, a existência de cepas multiclonais já foi comprovada tanto em *Leishmania* (PACHECO et al., 1990) quanto em *Trypanosoma cruzi* (DEANE et al., 1984). Uma única cepa pode conter dois ou mais genótipos clonais. Por outro lado, apesar de polimorfismos genéticos terem sido observados em isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes com manifestações clínicas típicas e atípicas de leishmaniose tegumentar, nenhuma associação foi encontrada entre um determinado genótipo e a manifestação clínica da doença (BAPTISTA et al., 2009). Em contrapartida, segundo Vago et al., (2000), foi observada uma associação entre os distintos genótipos e diferentes manifestações clínicas na doença de Chagas; distintos perfis foram encontrados no coração e no esôfago indicando a ocorrência de uma distribuição tissular diferenciada, de populações geneticamente diversas de *T. cruzi*, no mesmo paciente.

No presente trabalho, foi possível evidenciar que a infecção canina por *L. (L.) chagasi* pode manifestar-se com disseminação parasitária e tropismo tissular por populações do parasita geneticamente diferenciadas. No entanto, não foi possível observar uma associação entre determinado perfil genético em diferenciados sítios anatômicos e o estado clínico do animal.

5 CONCLUSÕES

As seguintes conclusões foram elaboradas com base nos resultados obtidos em nosso estudo.

- 1- A técnica de PCR específica mostra-se eficaz, como método auxiliar, no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.
- 2- O resultado da PCR sugere que os linfonodos (cervical e poplíteo), pele íntegra e baço podem ser considerados como sítios alvo para o diagnóstico da LV canina em animais sororretores para *L. (L.) chagasi*.
- 3- A positividade em fragmentos de pele normal reforça a importância dos cães como reservatórios domésticos na cadeia epidemiológica da LVA.
- 4- A presença de infecção mista foi caracterizada pelo encontro do DNA de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) chagasi*, respectivamente, em lesões cutâneas e órgãos internos de dois cães no município do Rio de Janeiro.
- 5- A infecção canina por *L. (L.) chagasi* pode manifestar-se com disseminação parasitária e tropismo tissular por populações parasitárias geneticamente diferenciadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTANAGOMES, G. M.; JANS, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J Parasitol.**, v. 77, n. 4, p. 557-561, 1991.

ALAM, M. Z.; KUHL, K.; SCHWEYNOCH, C.; SUNDAR, S.; RIJAL, S.; SHAMSUZZAMAN, A. K. M.; RAJU, B. V. S.; SALOTRA, P.; DUJARDIN, J. C.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of *Leishmania donovani* strains in the Indian subcontinent. **Infect Genet Evol.**, v. 9, n. 1, p. 24-31, 2009.

ALENCAR, J.E. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil. **Imprensa Oficial**, Fortaleza, 342p, 1959.

ALENCAR, J. E.; CUNHA, R. V. Inquérito sobre o calazar no Ceará. Novos resultados. **Rev Bras Malariol Doenças Trop.**, v. 15, p. 391-403, 1963.

ALVAR, J.; CANĀVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol Biochem Parasitol.**, v.100, n. 2, p.163-172, 1999.

ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol.**, v. 140, n. 3-4, p. 231-238, 2006.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F. P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **J Parasitol.**, v. 85, n. 2, p. 181-187, 1999.

BAPTISTA, C., SCHUBACH, A. O., MADEIRA, M. F., LEAL, C. A., PIRES, M. Q., OLIVEIRA, F. S., CONCEIÇÃO-SILVA, F., ROSALINO, C. M., SALGUEIRO, M. M., PACHECO, R. S. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Exp Parasitol.**, v. 121, n. 4, p. 317-322, 2009.

BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; MARZOCHI, M. C. A.; FURTADO, W.; QUEIROS, F.; CHICARINO, J.; PACHECO, R. S. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis*

in a mare (*Equus caballus*) Immunotherapy and chemotherapy assays. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 2, p. 217-220, 1994.

BAVIA, M. E.; CARNEIRO, D. D.; GURGEL, H. C.; MADUREIRA FILHO C.; BARBOSA, M. G. Remote sensing and geographic information systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Parasitology**, v. 47, n. 1, p. 165-169, 2005.

BEVERLEY, S. M.; ISMACH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, n. 2, p.484-488, 1987.

BRENIÈRE, S.F.; TELLERIA, J.; BOSSENO, M.F.; BUITRAGO, R.; BASTRENTA, B.; CUNY, G.; BANULS, A.L.; BREWSTER, S.; BARKER, D.C. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. **Acta Trop.**, v.73, n.3, p.283-293, 1999.

BRITO, C. M. M.; PIRES, M. Q.; PACHECO, R. S. chagas disease and co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastid Biol Dis.**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2003.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; ORTIZ, J. P. D.; MAIA, F. C. L.; SILVA JUNIOR, V. A.; LAUS, J. L. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 925-929, 2004.

CABRAL, M.; GRADY, J. E. O.; GOMES, S.; SOUZA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet Parasitol.**, v. 76, n. 3, p. 173-180, 1998.

CABRINE-SANTOS, M.; SILVA, E. L.; CHAPADEIRO, E.; RAMIREZ, L. E. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Exp Parasitol.**, v.99, n. 3, p.160-167, 2001.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano XII, n. 71, p.86-92, 2007.

CESSE, A. E. P.; CARVALHO, E. F. Expansão e urbanização da leishmaniose visceral estudo epidemiológico do processo de transmissão ativa em área urbana – Petrolina/PE, 1992-1997. In: V JORNADA CIENTÍFICA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FIOCRUZ, 1999, Rio de Janeiro. **Anais da V Jornada Científica de Pós-Graduação da FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: Editora da FIOCRUZ, 1999, supl. I, p. 159-159.

CESSE, E. A. P.; CARVALHO, E. M. F.; ANDRADE, P. P.; RAMALHO, W. M.; LUNA, L. Organização de espaço urbano e expansão do calazar. **Rev Bras Saúde Mat Infan.**, Recife/PE, v. 1, n. 2, p. 167-176, 2001.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical study of canine

leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Rev Saúde Pub.**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

CUNHA, S.; FREIRE, M., EULALIO, C., CRISTOVAO, J., NETTO, E., JOHNSON Jr., W.D., REED, S.G.; BADARO, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 89, n. 2, p. 155-158, 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALD JR.; G.; MOMEM, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg.**, v.50, n. 3, p.296-311, 1994.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; BRITO, M. E.; FALQUETO, A.; FARIAS, N. M.; GRIMALDI, G.Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmanai (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, 2003.

DANTAS-TORRES, F. & BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol.**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectada pela *L. donovani*. **Hospital**, v.46, p. 651-653, 1954a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, no Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 419-421, 1954b.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. 1956. 162f. Tese (Doutorado em Serviço Nacional de Educação Sanitária), Universidade de São Paulo, São Paulo.

DEANE, M. P.; SOUSA, M. A.; PEREIRA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H.; MOREL, C. M. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strain from doubly infected mice, as demonstrate by schizodeme and zymodeme analyses. **J Protozool.**, v. 31, n. 2, p. 276-280, 1984.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D., BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

De BRUIJN, M. H. ; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop.**, v. 52, n. 1, p. 45-58,1992.

DE-LA CRUZ, V. F.; NECKELMANN, N.; SIMPSON, L. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. **J Biol Chem.**, v. 259, n. 24, p. 15136-15147, 1984.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe.. **Ann Trop Med Parasitol.**, London, v. 97, sup.1, p. 3-15, 2003.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; McAULIFFR, I. T.; VASCONCELOS, I.; VASCONCELOS, A. W.; SOSA, A. D.; LIMA, J. W.; PEARSOPN, R. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J Infect Dis.**, v.166, n. 5, p.1124-1132, 1992.

FERGUSON, M.; TORRI, A. F.; WARD, D. C.; ENGLUND, P. T. In situ hybridization of the *Crithidia fasciculata* kinetoplast reveals two antipodal sites involved in kinetoplast DNA replication. **Cell** v. 70, n. 4, p. 621-629, 1992.

FERNANDES, O.; MURTHY, V. K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 66, n. 2, p. 261-271, 1994.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRET, T. V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosome cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 58, n. 6, p. 807-811, 1998.

FERREIRA, G. A.; SOARES, F. C.; VASCONCELLOS, S. A.; RODRIGUES, E. H.; WERKHÄUSER, R. P.; de BRITO, M. E.; ABATH, F. G. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. **J Parasitol.**, v. 93, n. 3, p. 712-714, 2007.

FERRER, L. Skin lesions in canine leishmaniasis. **J Small Anim Pract.**, v. 29, n. 6, p. 381-389, 1988.

GALATI, E. A.; NUNES, V. L.; REGO JUNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Saúde Pub.**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F. J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 18, n. 12, p. 617-623,1996.

GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; COSTA, C. A.; MELO, M. N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 43, 1988.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, 2008.

GOMES, R. F.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; MELO, N. M. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Exp Parasitol.**, v.80, n. 4, p.681-687, 1995.

GOMES, M.A.; SILVA, E.F.; MACEDO, A.M.; VAGO, A.R.; MELO, M.N. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. **Parasitology**, v. 114, n. 6, p.517-520, 1997.

GONTIJO, C. M. F. & MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Rev Bras Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRADZICKER, T.; ANDERSON, C.; SHARP, P. A.; SAMBROOK, J. Conditional lethal mutants adenovirus 2-simian virus 40 hybrids. I. Host range of mutants Ad2 + ND1. **J Virol.**, v. 13, n. 6, p. 1237-1244, 1974.

GUEVARA, P.; ALONSO, G.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; MELLO, M.; SCORZA, J. V.; AÑEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 56, n. 1, p. 15-26, 1992.

GUIMARÃES, K. S., BATISTA, Z. S.; DIAS, E. L., GUERRA, R. M.; COSTA, A. D.; OLIVEIRA, A. S.; CALABRESE, K. S.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S.; do VALE, T. Z.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 131, n. 3-4, p. 305-309, 2005.

JACKSON, P. R.; LAWRIE, J. M.; HAWKINS, D. N.; WOHLHIETER, J. A.; ROWTON, E. D. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. **Vet Parasitol.**, v. 20, n. 1-3, p. 195-215, 1986.

KIDANE, G. Z.; HUGUES, D.; SIMPSON, L. Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania tarentolae*. **Gene**, v. 27, n. 3, p. 265-277, 1984.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA-ALVES DA, A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p.907-910, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Role of the animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: W.H.R. Lumsden & D.A. Evans. **Biology of the Kinetoplastida**, Academic Press, London, v. II, pp. 1-116, 1979.

- LAISON, R. The American leishmaniasis: some observation on their ecology and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis*, on the Island of Marajó, Pará State. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 77, n. 3, p. 323-330, 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETRES, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London, UK: Academic Press inc, 1987, v. 1, p. 1-120.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
- LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; TAFURI, L. W.; TAFURI, L. W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop.**, v. 92, n. 1, p. 43-53, 2004.
- LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P. R.; AMARAL, A. V. C.; SOUZA, M. A. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiania. **Rev Patol Trop.**, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.
- LOPES, U. G.; MOMEN, H.; GRIMALD Jr, G.; MARZOCHI, M. C. A.; PACHECO, R. S.; MOREL, C. M. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous leishmaniasis. **J Parasitol.**, v. 70, n. 1, p. 89-98, 1984.
- LOPEZ, M. ; INGÁ, M.; GANGALAYA, J.; ESCHEVARRIA, A.; LLANOS-CUENTAS, C.; ORREGO, A.; AREVALO, J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **Am J Trop Med Hyg.**, v.49, n. 3, p.348-356, 1993.
- McMAHON-PRATT, D. M.; JAFFE, C. L.; BENNETT, E.; DAVID, J. R.; GRIMALDI JR., G. Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903. In: **Leishmania. Taxonomia and Phylogeny**, RIOUX, J-A.(Org.),1986, Montpellier: IMEEE, p.173-178.
- MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; LEAL, C. A.; MARZOCHI, M. C. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.
- MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. A. C. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G.; NASCIMENTO, L. D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; de PAULA, C. C.; BOGIO, A.; GOMES, M. C.; BESSA, A. M.; PASSOS, S. R. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Res Vet Sci.**, v. 87, n. 2, p. 260-262, 2009.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, D.; BECK, H. P.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 46, n. 2, p. 115-124, 2003a.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H. P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3147-3153, 2003b.

MARZOCHI, M. C. A., COUTINHO, S. G., SOUZA, W. J. S., TOLEDO, L. M., GRIMALD-FILHO, G., MOMEN, H., PACHECO, R. S., SABROZA, P. C., SOUZA, M. A., RANGEL-FILHO, F. B., TRAMONTANO, N. C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MARZOCHI, M. C., MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pub.**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M. V.; SOUZA, M. B.; MADEIRA, M. F.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Rev Soc Bras Med Trop.**, V. 42, n. 5, p. 570-580, 2009.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, n. 3, p.237-246, 1999.

MENDOZA-LEON, A.; HAVERCROFT, J. C.; BARKER, D. C. The RFLP analysis of the beta-tubulin gene region in New World *Leishmania*. **Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 1-9, 1995.

MEYER, H. The fine structure of the flagellum and kinetoplast chondriome of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in tissue culture. **J Protozool.**, v. 15, n. 3, p. 614-621, 1968.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 56-72.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. In: **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. MS (Ed.), Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania*

infantum to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

MOMEN, H.; GRIMALDI JUNIOR, G., DEANE, L. M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of american visceral leishmaniasis (AVL)? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 447-448, 1987.

MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; CUPOLILLO, E.; GRIMALDI Jr, G. Molecular evidence for the importation of old World *Leishmania* into the Americas. **Biol Research.**, v.26, n. 1-2, p.249-255, 1993.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 27, supl. II, p. 67-72, 1994.

MONTEIRO, E. M., DA SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; de PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L.; ROCHA, M. F.; FORTE-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprint of kinetoplast DNA minicircles. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 29, n. 5, p. 1070-1074, 1980.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; PARDO, R.; TORRES, M.; DEVLIN, B.; WILSON, M. L.; TESH, R.B. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol.**, v. 32, n. 4, p. 538-548, 1995.

MORRIS, J. C.; DREW, M. E.; KLINGBEIL, M. M.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, Z. W.; ENGLUND, P. T. Replication of kinetoplast DNA: na update for the new Millennium. **Int J Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 453-458, 2001.

NTAMBI, J. M.; ENGLUND, P. T. A gap at a unique location in newly replicate kinetoplast DNA minicircle from *Trypanosoma equiperdum*. **Biol Chem.**, v. 260, n. 9, p. 5574-5579, 1985.

OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 243-248, 1993.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 129, n. 3-4, p. 219-227, 2005.

OLIVEIRA, F. S.; VALETE-ROSALINO, C.M.; SCHUBACH, A. O.; PACHECO, R. S. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.66, n. 4, p. 361-365. 2010.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MARZOCHI, M. C. A.; GRIMALDI Jr, G.; PACHECO, R. S.; TOLEDO, L. M.; MOMEN, H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani chagasi* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 80, n. 6, p. 587-592, 1986.

OOTEAMAN, M. C.; VAGO, A. R.; KOURY, M. C. Potencial application of low-stringency single primer-PCR in the identification of *Leptospira* in the serum of patients with suspected leptospirosis. **Can J Microbiol.**, v.50, n. 12, p.1073-1079, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Magnitude of the problem. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em: 30 abr. 2010.

PACHECO, R. S.; LOPES, U. G.; MOREL, C. M.; GRIMALDI JR., G.; MOMEM, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: **Leishmania. Taxonomy and Phyogeny**, RIOUX, J.A.(Org.), Montpellier: IMEEE, 1986, p.67-65.

PACHECO, R. S.; GRIMALDI Jr, G; MOMEN, H & MOREL, C. M. Populational heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. **Parasitology**, v. 100, n. 3, p. 393-398, 1990.

PACHECO, R. S.; MARTINEZ, J. E.; VALDERRAMA, L.; MOMEN, H.; SARAVIA, N. G. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 69, n. 2, p. 197-209, 1995.

PACHECO, R. S.; FERREIRA, M. S.; MACHADO, M. I.; BRITO, C. M.; PIRES, M. Q.; DA-CRUZ, A. M.; COUTINHO, S. G. Chagas' disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 165-169, 1998.

PACHECO, R. S.; FERNANDES, O.; SALINAS, G.; SEGURA, I.; MOMEN, H.; DEGRAVE, W.; SARAVIA, N. G.; CAMPBELL, D. A.. Intraspecific heterogeneity in the mini-xon gene localization of *Leishmania (V) panamensis* and *Leishmania (V) guyanensis* from Colombia. **J Parasitol.**, v. 86, n. 6, p. 1250-1253, 2000.

PACHECO, R. S.; BRITO, M. C.; SARQUIS, O.; PIRES, M. Q.; BORGES-PEREIRA, J. LIMA, M. M. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. **Biochem Genet.**, v. 43, n. 9-10, p. 519-530, 2005.

PARANHOS- SILVA, M.; FREITAS, L. A.; SANTOS, W. S.; GRIMALDI JR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PENA, S. D. ; BARRETO, G.; VAGO, A. R.; DE MARCO, L.; REINACH, F. C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n. 5, p.1946-1949, 1994.

- PRATT, M. D.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. **Nature**, v. 291, n.5816, p.581-583, 1981.
- RAY, D. S. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircle from diverse species of trypanosomes. **Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 3, p. 1365-1367, 1989.
- RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J.; Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann Parasitol Hum Comp.**, v.65, n. 3, p.111-125, 1990.
- RODRIGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **J Clin Microbiol.** v.32, n.9, 2246-2252, 1994.
- ROGERS, W. O.; WIRTH, D. F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, n. 2, p. 565-569, 1987.
- ROTUREAU, B.; RAVEL, C.; COUPPIÉ, P.; PRATLONG, F.; NACHER, M.; DEDET, J. P.; CARME, B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 459-467, 2006.
- RYAN, K. A.; SHAPIRO, T. A.; RAUCH, C. A.; ENGLUND, P. T. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. **Ann Rev Microbiol.**, v. 42, p. 339-358, 1988.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, n. 4732, p.1350-1354, 1985.
- SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Rev Clin Vet.**, v.11, p. 24-28, 1997.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Doenças de pele causadas por vírus, riquetsias e protozoários. In: _____. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5. ed., Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, cap.7, p.435-447.
- SERIN, M. S.; WAKI, K.; CHANG, K. P.; ASLAN, G.; DIREKEL, S.; OTAG, F.; KAYAR, B.; KOKSAL, F.; EMEKDAS, G. Consistence of miniexon polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 57, n. 3, p. 295-299, 2007.
- SHAPIRO, T. A. Kinetoplast DNA maxicircles: Networks within networks. **Proc Natl Acad Sci USA**, v, 90, n. 16, p. 7809-7813, 1993.
- SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Ann Rev Microbiol.**, v. 49, p. 117-143, 1995.
- SHAW, J. J.; LAINSON, R.; RYAN, L.; BRAGA, R. R.; McMAHON-PRATT, D.; DAVID, J. R. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania*

braziliensis braziliensis in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 81, n. 1, p. 69-72, 1987.

SHAW, J. J. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrel (Org.) **World Class Parasites: Leishmania**, 4 Kluwer academic Publishe Boston, Dordrecht, London. p.11-31, 2002.

SHAW, J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007

SHERLOCK, I. Ecological interation of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, n. 6, p.671-683, 1996.

SHLOMAI, J. The assembly of kinetoplast DNA. **Parasitol Today**, v. 10, n. 9, p. 341-346, 1994.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F., PACHECO, R. S., FIUZA, V. O. P., BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001a.

SILVA, E. S.; ROSCO, E.H.; ARRUDA, L. Q.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S. Canine visceral leishmaniasis: clinical epidemiological study and diagnosis. **Bras J Vet Med.**, v. 23, n.3, p. 111-116, 2001b.

SIMPSON, L. The kinetoplast of the hemoflagellates. **Int Rev Cytol.**, v. 99, p. 140-207, 1972.

SIMPSON, L.; BERLINER, J. Isolation of the kinetoplast DNA of *Leishmania tarentolae* in a form of a network. **J Protozool.**, v. 21, n. 2, p. 382-393, 1974.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Ann Rev Microbiol.**, v. 41, p. 363-382, 1987.

SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M. Q.; BASU, D.; De BRUIJN, M. H.; ADHYA, S.; MALLYK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and samples of kalazar patients. **Parasitology**, v.105, n. 2, p.183-192, 1992.

SOUZA, M. A.; SABROZA, P. C.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. 1- Flebotomíneos de área de procedência de caso humano autóctone. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 2, p. 161-168, 1981.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J. D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009.

STAMENKOVIC, G.; GUDURIC, J.; VELICKOVIC, Z.; SKERL, V.; KRTOLICA, K.; VELJKOVIC, E.; DIMITRIJEVIC, B. Analysis of 5' non-coding region in hepatitis C vírus by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR. **Clin Chem Lab Med.**, v.39, n. 10, p.948-952, 2001.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Infecções causadas por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. cap.68, p. 554-572.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L.; BARBOSA, A.J. A.; MICHALICK, M. S.; GENERO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C., MAYRIK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 81-89, 1996.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O.; SILVA, J. C. F.; NASCIMENTO, E. Canine visceral leishmaniasis immunocytochemical study of the MHC class II antigens in liver and lymphoid organs. **Arq Bras Med Vet Zool.**, v. 49, p. 673-684, 1997.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M.; MELO, M. N. Canine Visceral Leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSÓRIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia. Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg.**, v.64, n. 3-4, p.119-124, 2001.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of micro-organisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitol Today**, v.7, n.9, p.228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F. J. Genetic characterization of parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 4, p.1335-1339, 1993.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; REIS, D. A.; PEREIRA, M. E. S.; SIMPSON, A. J. G.; TOSTES JR., S.; PENA, S. D. J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am J Pathol.**, v.149, n. 6, p.2153-2159, 1996.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; d'AVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S. Jr; MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am J Pathol.**, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, 2000.

VIEIRA, J. B.; COELHO, G. E. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 31, n. 2, p. 85-92, 1998.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

WEIGLE, K. A.; LABRADA, L. A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D. C. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J Clin Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 601-606, 2002.

WHO. Control of the leishmaniasis. Technical Report Series. World Health Organization, Geneva, 793, 1990.

WIRTH, D. F.; McMAHON-PRATT, D. M. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 79, n. 22, p. 6999-7003, 1982.