

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

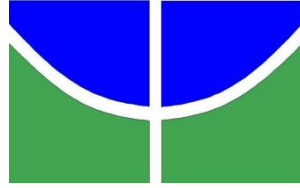
**Diagnóstico molecular e identificação das espécies de
Leishmania na leishmaniose visceral canina no Distrito
Federal, Brasil.**

Aurilene Gomes Monteiro

**Orientadora Prof.^a Dr.^a: Beatriz Dolabela de Lima
Coorientadora Prof.^a Dr.^a: Cecília Beatriz Fiuza Favali**

Brasília

2014



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

**Diagnóstico molecular e identificação das espécies de
Leishmania na leishmaniose visceral canina no Distrito
Federal, Brasil.**

Aurilene Gomes Monteiro

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília.

**Orientadora Prof.^a Dr.^a: Beatriz Dolabela de Lima
Coorientadora Prof.^a Dr.^a: Cecília Beatriz Fiuza Favali**

Brasília

2014

“Nós somos feitos da matéria de que são feitos os sonhos; nossa vida pequenina é cercada pelo sono”.

William Shakespeare

*Dedico este trabalho a Dona Irene, Srº. Vilmar, Vitória e
Joel, minha família a minha base de tudo.*

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é um desafio enriquecedor e de plena superação. Nos modificamos a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de ‘pesquisador’. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e incansável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente o que e para que nos envolvemos em pesquisa. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer: Preliminarmente, quero agradecer a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de chegar até aqui, lugar que parecia inatingível.

Quero agradecer a Prof.^a Dr.^a. Beatriz Dolabela de Lima, pela orientação do mestrado e pela experiência de vida compartilhada, os ensinamentos se estenderam além da parte acadêmica ou experimental, as lições passadas foram lições para a vida, serei eternamente grata. Agradeço a Prof.^a Dr.^a. Cecília Favali pela coorientação que neste trabalho teve o mesmo peso para as duas, portanto o agradecimento é o mesmo.

Em especial à Elane Maciel, ao Miguel Vieira, ao Alexandre da Zoonoses e o Anderson Rodrigues pois foram pessoas que me ajudaram muito, nas coletas, na confecção do painel para o congresso, enfim quero enfatizar meus sinceros agradecimentos, aos demais do grupo do Laboratório de Biologia do Gene (LaBioGene): Daniel Graziani, Stênia Magalhães, Agenor Castro, Ricardo Camargo, Agnelo Rodrigues e Fabiana Brandão, colegas de trabalhos que trocaram experiências, ajudaram na execução de tarefas e foram fundamentais para a realização deste trabalho. Não poderia esquecer a Marinez Viana, peça fundamental no laboratório que conecta o laboratório ao histórico dele, pois já está há muito tempo trabalhando e ajudando os alunos que por aqui passam, meu muitíssimo obrigada.

Agradeço também à prof.^a Dr.^a Consuelo Medeiros, pois sempre me ajudou com palavras de incentivo, conselhos e ensinamentos uteis para o desenvolvimento deste trabalho, bem como aos professores do presente programa que ministraram suas aulas de forma prazerosa e instrutiva servindo como exemplos a serem seguidos.

Agradeço à Pós Graduação em Biologia Microbiana, Prof. Ricardo Krüger, coordenador, e Luciana Medeiros, secretária, pelo apoio e oportunidade. Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos e à FAP-DF pelo apoio financeiro.

RESUMO

A leishmaniose é uma das doenças parasitárias mais relevantes, estando em expansão em áreas urbanas e periurbanas no Centro-Oeste do Brasil. Na verdade, o diagnóstico sorológico é empregado no Brasil para determinar a eutanásia de cães positivos. No presente estudo examinamos a relevância do diagnóstico molecular no controle da leishmaniose visceral canina. Por outro lado, a sorologia positiva não está diretamente relacionada a uma doença ativa. Desta forma, avaliamos cinquenta e oito (58) cães de diferentes regiões do Distrito Federal a partir de abril de 2012 a dezembro 2013 relativa à infecção por *Leishmania*. Para tanto, os animais foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, após investigação epidemiológica. Analisamos biópsias de fígado, baço, nódulos linfáticos e medula óssea através de exames parasitológicos (HE imprints e cultura dos parasitas isolados) e moleculares (PCR da região ITS1 do rDNA e da região 3' UTR do gene da HSP70). A amostra teve mais de 62% dos cães machos e a maioria destes animais tinha pelos curtos e as orelhas caídas. Análise por PCR das biópsias apresentou resultados positivos em 47 (81%) dos animais. As amostras positivas foram de 35 cães sintomáticos (83%) e 12 (75%) de cães assintomáticos. A reação de PCR-RFLP revelou a espécie *L. infantum* em 47 (100%) das amostras positivas para a PCR. Deste modo, concluiu-se que o diagnóstico molecular é mais sensível e específico para identificar a leishmaniose visceral em cães. Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, diagnóstico molecular, *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the most relevant parasitic diseases, being in expansion on urban and periurban areas in Brazil's Center East. Actually, serological diagnostic is employed in Brazil determining euthanasia of positive dogs. In this study we examined the relevance of the molecular diagnostic in the control of canine visceral leishmaniasis. On the other hand, a positive serology is not directly correlated to an active disease. In this way, we evaluated fifty-eight (58) dogs from different regions of the Federal District from April 2012 to December 2013 concerning *Leishmania* infection. For this purpose, animals were provided by the Center for Control of Zoonoses, after epidemiological investigation. We analyzed biopsies from liver, spleen, lymph nodes and bone marrow through parasitological (HE imprints and culture parasite isolation) and molecular tests (PCR of ITS1 region of the rDNA and 3' UTR region of the HSP70 gene). Our sample had more than 62% of male dogs and most of these animals had short hair and dropping ears. PCR analysis of the biopsies showed positive results in 47 (81%) animals. Positive samples were from 35 (83%) symptomatic and 12 (75%) asymptomatic dogs. PCR-RFLP revealed *L. infantum* in 47 animals (100% of the PCR positive samples). In this way, we concluded that the molecular diagnosis is more sensible and specific to identify visceral leishmaniasis in dogs.

Key words: Visceral canine leishmaniasis, molecular diagnostic, *Leishmania infantum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Imunoensaio Enzimático
HSP	Proteína do choque térmico
ITS1	<i>Internal transcribed spacer 1</i>
kDNA	DNA do cinetoplasto
L.	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutâneo-Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
Lu.	<i>Lutzomyia</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TNF	Fator de necrose tumoral
V.	<i>Viannia</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. Leishmaniose.....	1
2. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral (LV).....	1
3. Ciclo Biológico do Parasita.....	4
4. Resposta imune e patogênese na LV.....	6
5. Manifestações Clínicas.....	7
6. Diagnósticos.....	8
6.1. Diagnóstico Sorológico.....	8
6.2. Diagnóstico Parasitológico.....	9
6.3. Métodos moleculares.....	9
7. Justificativa do projeto.....	11
OBJETIVOS.....	12
1. Objetivo Geral.....	12
2. Objetivos Específicos.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
1. Estratégia experimental.....	13
2. Amostras biológicas.....	13
3. Coleta das amostras.....	14
4. Descrição dos animais e ficha epidemiológica.....	14
5. Cultura dos isolados.....	14
6. Extração de DNA das amostras.....	15
7. Amplificações da região ITS1 do DNA pela PCR.....	15
8. Amplificação da sequência 3' UTR do gene HSP70 do DNA pela PCR.....	16
RESULTADOS.....	17
1. Características dos animais.....	17
2. Distribuição geográfica.....	19
3. Diagnóstico molecular.....	20
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	26
APÊNDICE 1.....	27
APÊNDICE 2.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das áreas de transmissão de Leishmaniose Visceral no Brasil.....	2
Figura 2. Formas da <i>Leishmania</i>	4
Figura 3. Ciclo biológico da Leishmaniose.....	5
Figura 4. Resposta imune e patogênese da LV.....	6
Figura 5. Manifestações clínicas mais comuns na LVC em cães.....	8
Figura 6. Estratégia experimental.....	13
Figura 7. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados classificados entre os grupos de sintomáticos e assintomáticos, quanto aos sinais clínicos.....	17
Figura 8. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados separando os animais entre os grupos de pêlo curto dos de pelo longo.....	17
Figura 9. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados classificando entre machos e fêmeas.....	18
Figura 10. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados classificando os animais com as orelhas caídas ou com as orelhas em pé.....	18
Figura 11. Representação gráfica do número de cães com os sintomas clínicos e resultados da PCR. Grupos dos sintomáticos positivos e negativos para PCR e dos assintomáticos positivos e negativos para PCR.....	19
Figura 12. Gráfico representativo do percentual de cães analisados e as respectivas regiões de origem.....	19
Figura 13. Mapa geográfico das regiões do Distrito Federal, o local de origem dos cães e o número de cães por região.....	20
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR da Região ITS1.....	21
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da PCR digerida com a enzima de restrição Hae III (PCR-RFLP) da região ITS1.....	21
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR da sequência 3' UTR da <i>HSP70</i>	22
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da PCR digerida com a enzima de restrição Hae III (PCR-RFLP) da sequência 3' UTR da <i>HSP70</i>	23

INTRODUÇÃO

1. Leishmaniose

As leishmanioses são representadas por um grupo de doenças de caráter zoonótico, que acometem o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres causadas por protozoários digenéticos pertencentes à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Esses protozoários apresentam-se na forma promastigota ou amastigota, sendo que os promastigotas se replicam no inseto vetor e os amastigotas são as formas infectivas presentes em macrófagos do hospedeiro vertebrado (SOARES-BEZERRA et al., 2004). As formas replicativas são as amastigotas intracelulares, presentes em células do sistema fagocítico mononuclear, enquanto que as formas infectivas são as promastigotas.

A leishmaniose é considerada uma das cinco doenças infectoparasitárias endêmicas de maior relevância, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um importante problema de saúde pública mundial. A participação de animais domésticos no ciclo epidemiológico da leishmaniose nas Américas é conhecida desde o início deste século (DNDI, 2013).

Existem várias manifestações clínicas desta doença, que diferem de acordo com a espécie de *Leishmania* e com a resposta imune do hospedeiro. As leishmanioses são protozoonoses causadas por diferentes espécies do parasita do gênero *Leishmania* e podem ser classificadas nas seguintes manifestações em duas principais formas: leishmaniose tegumentar americana (LTA) que compreende o grupo: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD), e a outra forma é a leishmaniose visceral (LV) (SARAIVA et al., 1989). Na ausência de tratamento eficiente, a leishmaniose visceral é uma doença potencialmente fatal, podendo alcançar letalidade em 98% dos casos (DESJEUX, 2004).

2. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

Apesar de ser considerada endemia rural, a leishmaniose visceral (LV) tem sido frequentemente registrada em grandes centros urbanos e se tornou um problema

crecente de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (COSTA, 2005).

No mundo há aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas que vivem em área de risco de contrair a infecção. A leishmaniose ocorre em 88 países, sendo que 72 destes países são considerados em desenvolvimento (WHO, 2010).

A infecção por *Leishmania infantum*, que também é chamada de *Leishmania chagasi* na América Latina, representa 20% dos casos humanos globais (100.000 casos por ano) de LV, e sua incidência tem aumentando em áreas urbanas e periurbana dos trópicos (LAINSON et al., 1987; MS, 2006).

No Brasil, na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões foi atingindo áreas urbanas e periurbanas; essa situação se modificou no período de 2000 a 2002, quando a Região Nordeste apresentou uma redução para 77% dos casos do País (WHO, 2012).

Com relação à LV estima-se que 90% dos casos registrados na América Latina ocorram no Brasil, sendo que a maioria deles em crianças (DNDI, 2013). O mapa da Figura 1 mostra as áreas de transmissão da LV no Brasil e o Distrito Federal aparece como área de transmissão intensa.

Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil
Mapa de estratificação de LV, segundo município de residência e média de casos, de 2009 a 2011

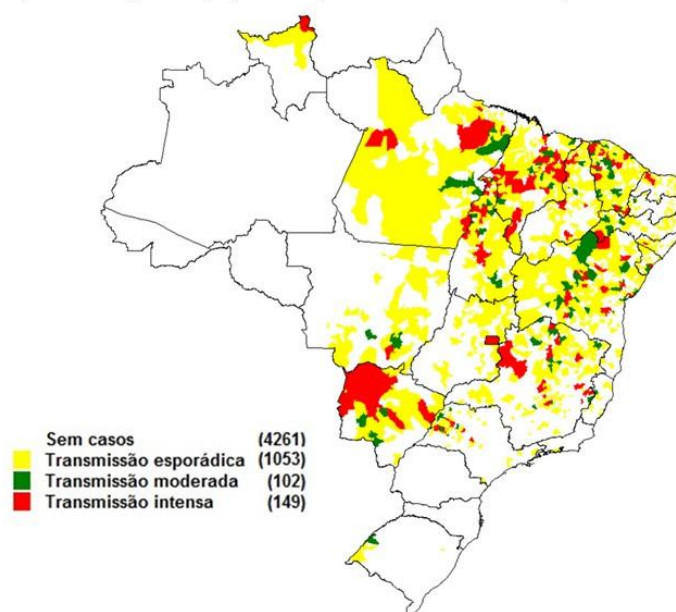


Figura 1. Mapa das áreas de transmissão de Leishmaniose Visceral no Brasil (OMS, 2012).

A razão da expansão da LV nos últimos anos é multifatorial, entre os fatores destacam-se o desmatamento desordenado, que culmina com a invasão do ambiente peridomiciliar pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*; a presença de grande população do cão doméstico nas áreas endêmicas susceptíveis à infecção pela *L. (L.) i. chagasi*, contribuindo para a manutenção do ciclo peridomiciliar da endemia; a migração de populações não imunizadas de outras regiões; e o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico (FILHO; SIQUEIRA 2007).

Considerando que o cão seja o principal reservatório de parasitas do gênero *Leishmania*, o mesmo tem sido alvo para controle da transmissão do parasita em países onde a LV é uma zoonose. Assim, o desenvolvimento de métodos de diagnósticos precisos, bem como vacinas mais eficazes para a LV canina, é altamente desejável para controlar a transmissão e a disseminação da doença em países mediterrâneos e latino-americanos (DANTAS-TORRES et al., 2006).

No Brasil, as formas canina e humana da LV ocorrem endemicamente em vários Estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e em todos os Estados há associação entre cães infectados e presença do vetor. Uma população subdesenvolvida ou em desenvolvimento, apresentando uma maior densidade dos flebotomíneos e a presença de cães infectados são fatores predisponentes para implantação dessa zoonose (MILES et al., 1999).

As principais medidas de controle da LV no Brasil estão baseadas na interrupção do ciclo de transmissão e envolvem o diagnóstico e tratamento de casos humanos, o controle vetorial através do uso de inseticidas e a triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido mais frequentemente utilizada na população canina (LACERDA, 1994).

Os testes sorológicos, como o imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), são usados como parte de inquérito epidemiológico canino, sendo eutanasiados os cães cujas amostras reagentes a partir da diluição de 1:80 são consideradas positivas. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em 30 dias, seguindo recomendação do Ministério da Saúde (WHO, 2012), porém, esses testes sorológicos apresentam reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (VEXENAT et al., 1996).

A estratégia de eliminação de cães soropositivos é atualmente um assunto polêmico e tem sido a causa de muitos debates. A eutanásia utilizada como recurso para controle da doença pode ser questionada, porque nos locais onde já realizam esta

execução de cães soropositivos há muito tempo, não houve uma redução da incidência da LV humana. Sendo assim, estudos por métodos moleculares da identificação das espécies de *Leishmania* presentes no cão infectado e sua relação com a infecção em humanos tornam-se necessários (MADEIRA et al., 2004).

3. Ciclo Biológico do Parasita

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida digenético (heteroxênico), alternando entre hospedeiro vertebrado e insetos vetores (Figura 2). Além do homem, outros mamíferos são hospedeiros vertebrados tais como cães e alguns animais silvestres (LAINSON; SHAW, 1988).

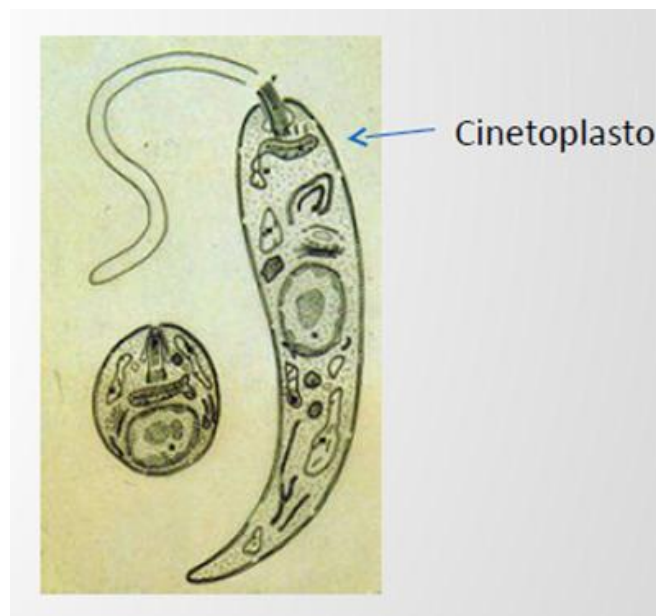


Figura 2. Formas da *Leishmania* apresentando amastigotas - forma arredondada e com flagelo curto ou não aparente, e promastigotas - forma alongada de flagelo longo (FIOCRUZ, 2014).

As fêmeas de *L. longipalpis* necessitam de alimentação sanguínea (repasto sanguíneo) para o desenvolvimento dos ovos. Ao se alimentarem do sangue de um animal infectado, as fêmeas ingerem, juntamente com o sangue, macrófagos e monócitos parasitados pelas formas amastigotas. Estas células parasitadas rompem-se liberando as formas amastigotas, que após divisão binária podem se transformar em duas formas de promastigotas: arredondadas e de flagelo curto que dividem, ou alongadas de flagelo longo cujo processo de divisão é bem menos intenso. Entre 48 a 71 horas após o repasto sanguíneo a matriz peritrófica rompe-se liberando as formas promastigotas livres que migram para o intestino anterior. Na válvula estomacal, no

esôfago, na faringe e no cibário são encontradas formas paramastigotas metacíclicas que são infectantes para o hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasito ocorre quando as fêmeas infectadas se alimentam em vertebrados susceptíveis (MICHALICK; GENARO, 2005).

O inseto vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas no local da picada no hospedeiro vertebrado, as mesmas são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos, onde encontram condições ideais para sua multiplicação. Imediatamente, transformam-se em formas amastigotas e iniciam sua multiplicação por divisão binária no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Quando estão densamente parasitados, os macrófagos rompem-se liberando as formas amastigotas que serão fagocitadas por novos macrófagos dando continuidade a sua multiplicação dentro do hospedeiro (ASHFORD, 2000).

No hospedeiro vertebrado, essas formas amastigotas localizam-se em órgãos linfoides, como a medula óssea, baço e linfonodos. No hospedeiro invertebrado flebotomíneo fêmea são encontradas as formas promastigotas e promastigotas metacíclicas ao longo do intestino médio e anterior (GONTIJO; CARVALHO 2003).

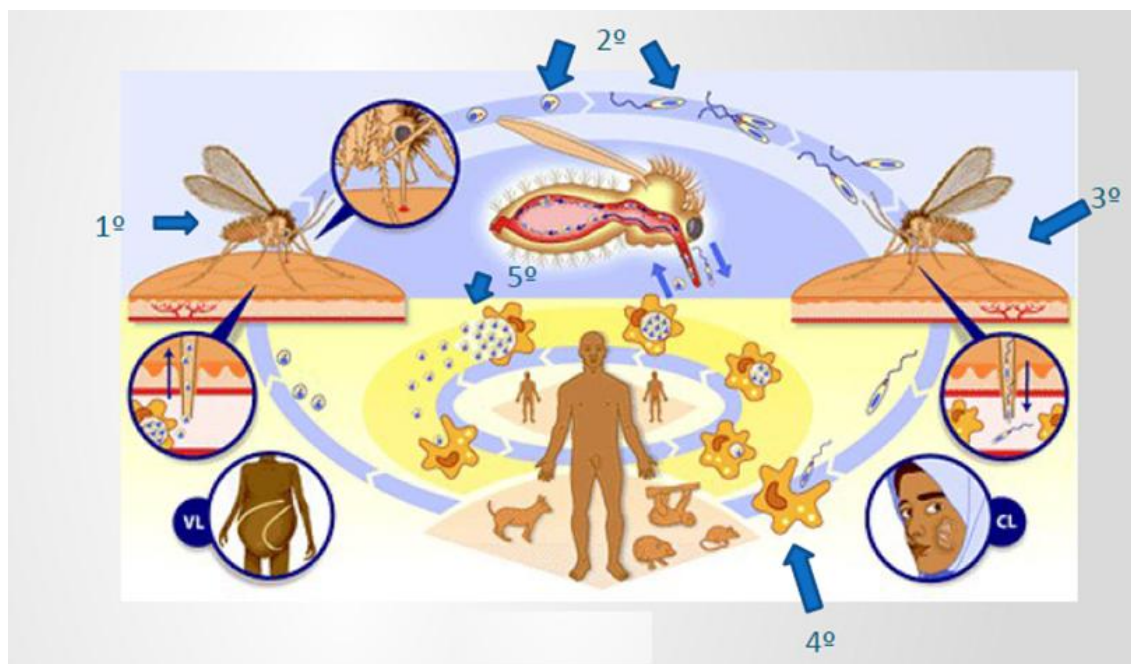


Figura 3. Ciclo biológico da Leishmaniose, enumerado de acordo com a sequência de eventos (1º Repasto sanguíneo, 2º Dentro do intestino do flebotomo ocorre a mudança do parasito da forma amastigota para a forma promastigota, 3º no repasto sanguíneo inoculando as formas promastigotas em um hospedeiro vertebrado, 4º as formas promastigotas entrando nos macrófagos e se multiplicando dentro deles, 5º O macrófago repleto de *Leishmanias* que o rompem e invadem outros macrófagos. LC= Leishmaniose cutânea e VL= Leishmaniose visceral (OMS, 2012).

4. Resposta imune e patogênese na LV

Vários componentes da resposta imune inata participam do mecanismo de defesa do hospedeiro contra a *Leishmania*, mas esses microorganismos escapam dessa defesa. (ZAMBRANO-VILLA et al., 2002). Embora *in vitro* as formas promastigotas de *Leishmania* sejam altamente sensíveis ao complemento, as formas infectantes resistem a sua ação. As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção (WOODMAN et al., 1998) e podem ser destruídas por meio da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atividade enzimática e produção de óxido nítrico (Figura 4). Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 e MIP-1 β , moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (BACELLAR; CARVALHO, 2005). As formas promastigotas de *Leishmanias* são internalizadas através de endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago (MICHALICK, 2005). Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos residentes, os promastigotas sobreviventes transformam-se e replicam-se como amastigotas, os quais infectam macrófagos adicionais tanto locais quanto de tecidos distantes, após a disseminação.

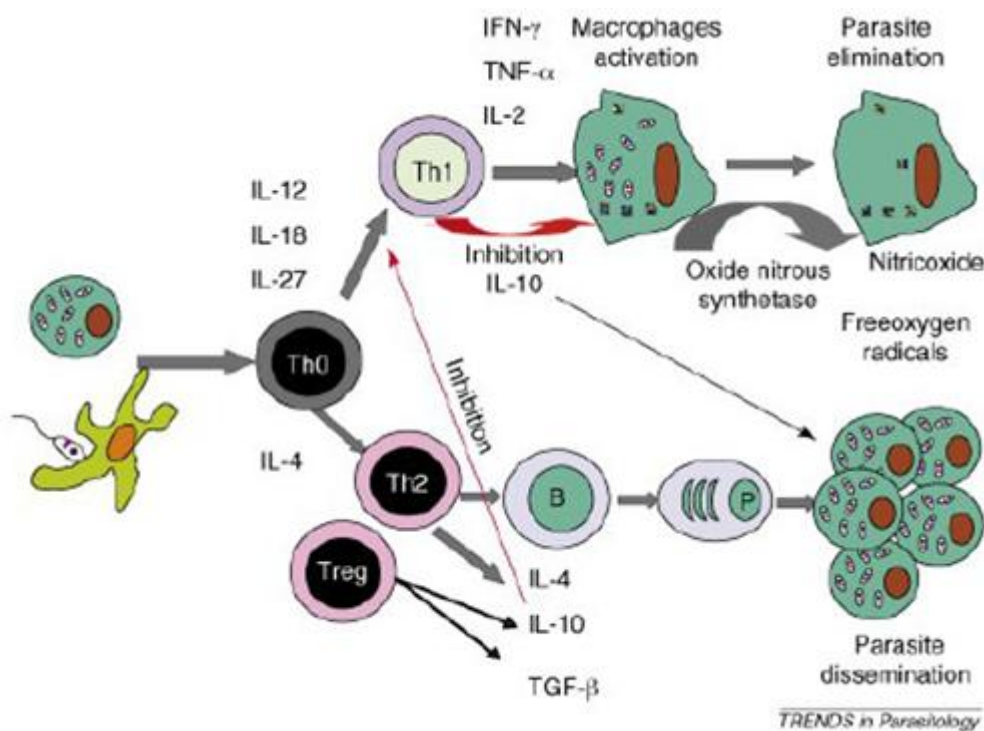


Figura 4. Resposta imune e patogênese da LV: células dendríticas reconhecem o parasito e podem apresentar um perfil de citocinas Th1 ou Th2, Th1 culmina na eliminação do parasito, Th2 culmina na disseminação do parasito. A *Leishmania* pode direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2 (BANETH et al., 2008)

Assim como outras infecções parasitárias, as infecções por *Leishmania* causam uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos celulares, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4+, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER et al., 2006; REIS et al., 2006)

A resposta adaptativa contra o protozoário ocorre após a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, via MHC classe II para as células T. Como outras células podem ser infectadas, e os macrófagos e células dendríticas também expressam moléculas de MHC classe I, nas infecções por protozoários há também ativação das células TCD8+ (MACHADO et al., 2004).

A *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção. Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos e conseqüentemente levando à destruição dos parasitos. No caso da LV a resposta é tipo Th2, portanto são produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrofágica e ativam a resposta humoral. Assim, o parasita escapa da resposta celular do hospedeiro e pode ser encontrado em órgãos como baço, fígado, linfonodo e medula óssea (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2006). A resposta humoral desenvolvida não é protetora e está envolvida em mecanismos de patogênese pela deposição de imunocomplexos observada na LV.

A resposta imune canina contra *Leishmania chagasi* é semelhante à resposta imune humana em vários aspectos. Sabe-se que os eventos iniciais da interação com o hospedeiro são essenciais para o estabelecimento da doença. Assim, dados da literatura gerados num sistema *in vitro* de infecção de células mononucleares caninas por promastigotas de *L. infantum*, demonstraram que havia um aumento do mRNA do IFN-gama, citocina relevante no controle do parasitismo por ativação macrofágica (RODRIGUES et al. 2009).

5. Manifestações Clínicas

A LV pode caracterizar-se pelo seu amplo espectro clínico, que pode variar desde infecção inaparente ou assintomática, as manifestações clínicas discretas

(oligossintomáticas) e moderadas até às graves. Em humanos as manifestações clínicas são febre, hepatoesplenomegalia e perda de peso (OMS, 2013).

Nos cães, os sintomas clínicos incluem as alterações dermatológicas clássicas, como descamação, seborreia, onicogribose, ulceração e alopecia. Dentre os achados de exame físico, merecem destaque a linfadenomegalia, caquexia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite (SALZO, 2008).



Figura 5. Manifestações clínicas mais comuns na LVC em cães; (a) ceratoconjuntivite purulenta, (b) lesões da pele, dermatite esfoliativa, (1) esplenomegalia, (c) epistaxe, (d) onicogribose, (e) ulcerações da pele relativa a orelha, (2) caquexia. (BANETH et al., 2008)

6. Diagnóstico

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina, entretanto nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004).

6.1. Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). O RIFI apresenta baixa especificidade. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar. O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI (MAIA; CAMPINO, 2008).

Outros testes sorológicos são o teste de aglutinação direta (DAT) e a imunocromatografia utilizando o antígeno rK39. Estes possuem limitações na sensibilidade e na especificidade (GONTIJO; MELO, 2004; DOURADO et al., 2007).

6.2. Diagnóstico Parasitológico

O exame parasitológico é considerado o teste de excelência para o diagnóstico da doença. A especificidade desse método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau de parasitismo. A observação direta das formas amastigotas do parasito em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados por Giemsa, Leishman ou Panótico é uma forma segura, relativamente simples e rápida para o diagnóstico da enfermidade (LAURENTI, 2009). Considerando a possível variação no número de parasitos para cada amostra, o aumento do tempo de observação e no número de campos observados refletirá em maior sensibilidade para o teste (MAIA; CAMPINO, 2008). O isolamento de promastigotas a partir de amostras em cultura também é considerado um método parasitológico de diagnóstico.

6.3. Métodos moleculares

A reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detectar uma única molécula de DNA numa amostra ou um fragmento contendo o alvo desejado. Na reação, regiões específicas do DNA, são amplificadas enzimaticamente. Durante a PCR, um segmento específico de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla ou de fita simples pode ser amplificado através de sucessivos ciclos (MELO, 2006).

A PCR e a PCR em tempo real (q-PCR) tem apresentado uma sensibilidade elevada na detecção de DNA e kDNA de *Leishmania* em amostras de pacientes (FERREIRA et al., 2007; PITA-PEREIRA et al., 2012). Domínios conservados de minicírculos têm sido utilizados como alvo para amplificação de DNA de kDNA de *Leishmania* (FERREIRA et al., 2007; ALVARENGA et al., 2012). As *Leishmanias* pertencem ao grupo de protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida, cuja característica mais distinta é a presença de uma estrutura subcelular conhecida como cinetoplasto. O cinetoplasto é uma região específica da mitocôndria e não está relacionado à motilidade dos parasitos, apesar de ser geralmente encontrado próximo ao

corpúsculo basal que está localizado na base do flagelo. O cinetoplasto consiste em uma estrutura condensada em forma de disco composto de uma rede de milhares de DNAs circulares topologicamente interligados formando o kDNA (DNA mitocondrial). Cada célula contém um cinetoplasto localizado na matriz de sua única mitocôndria, situada adjacente ao corpo basal do flagelo. A rede contém dois tipos de moléculas de DNA: os maxicírculos presentes em algumas cópias (20 a 50) e os minicírculos representados por milhares de cópias (5.000-10.000). Esse kDNA corresponde a 30% do DNA celular, sendo então um bom alvo para ser utilizado para o diagnóstico molecular desses parasitos (DEGRAVE et al., 1994).

Durante o seu ciclo de vida digenético, o parasita *Leishmania* necessita se adaptar a partir da temperatura ambiente no inseto vetor até à temperatura de hospedeiro mamífero (37° C). Como resultado, a resposta de choque térmico é induzida e as proteínas de choque térmico (*HSPs*) são chamadas a desempenhar um papel importante no processo de adaptação, influenciando a mudança no desenvolvimento de promastigotas nos flebotomíneos em amastigotas nos hospedeiros mamíferos (SHAPER et al., 1988; BENTE et al., 2003). Entre *HSPs*, a *HSP70* é altamente conservada tanto na sequência quanto na função. As proteínas da família *HSP70* são componentes fundamentais de muitos processos celulares críticos, incluindo o dobramento e montagem de proteínas recém-sintetizadas, redobrando e enovelando proteínas agregadas, a translocação de proteínas de membrana organelares e secretoras, degradação proteolítica de proteínas instáveis e monitoramento de proteína reguladora atividade (HART, 1996; FOLGUEIRA, REQUENA, 2007).

Duas classes de genes *HSP70*, *HSP70* e *HSP70* -I -II, a partilha de ' região não traduzida (UTR) e na região de codificação, mas diferentes em seus 3' a 5 UTR, têm sido descritas em diversas espécies de *Leishmania infantum* como *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonenses* (FOLGUEIRA et al., 2005; FOLGUEIRA et al., 2007). Em geral, estes genes são dispostos em um agrupamento único genômico contém cinco ou seis cópias Isso *HSP70* - I, seguido por uma cópia de *HSP70* - II. Em *L. infantum*, tem - se demonstrado que os RNAm de *HSP70* Considerando - I acumulam em resposta a um tratamento térmico de choque, e são traduzidas em ambas as 26 e 37 °C, os RNAm de *HSP70* - II não mostram uma acumulação dependente da temperatura, mas mostram preferencial tradução a temperaturas de choque térmico (FOLGUEIRA et al., 2005).

Outro método baseado em PCR para analisar diversidade genética baseia-se na amplificação das regiões espaçadoras (ITS), localizado dentro do cluster gênico do rRNA, seguido de digestão com enzimas de restrição, um método denominado IRT (*Intergenic Region Typing*) (CUPOLILLO et al., 1995) ou PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorfism*) (VOLPINI et al., 2004). Além disso, as regiões intergênicas podem também ser utilizadas para gerar informações úteis para os estudos de reconstrução filogenética e evolução molecular (DÁVILA; MOMEN, 2000).

7. Justificativa

Como discutido acima, a LV é uma zoonose, dentre as doenças negligenciadas, a que se encontra em expansão em determinadas regiões do Brasil e como consequência disso, apresenta um grande impacto e prejuízo à saúde pública. Existe uma grande dificuldade de diagnóstico precoce e conclusivo da LV, devido às limitações dos métodos sorológicos. Com um diagnóstico conclusivo seria possível evitar falsos resultados negativos e positivos para que assim evitasse a eutanásia de cães saudáveis que apenas entraram em contato com o parasito desenvolvendo resposta imunológica apresentando assim um resultado soropositivo nos testes sorológicos e evitaria que cães doentes continuassem a transmitir a doença, e ainda pelo fato de que há poucos estudos empregando a PCR e RFLP-PCR na busca da identificação das espécies de *Leishmania*. É fundamental a determinação da espécie específica para entender o papel do cão na transmissão da doença ao homem, assim como quais fatores incidem no surgimento de novos casos de LV na região.

OBJETIVOS

Geral

Obter um método de detecção conclusivo para a LVC por meio do diagnóstico molecular, relacionando as manifestações clínicas com resultados obtidos.

Específicos

- ✓ Comparar os resultados obtidos entre o diagnóstico molecular da região ITS1 do DNA ribossomal com o da sequência 3' UTR do gene *HSP70*.
- ✓ Identificar, através da técnica PCR-RFLP, as espécies das *Leishmania* dos isolados de cães com Leishmaniose visceral da região do Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Estratégia experimental

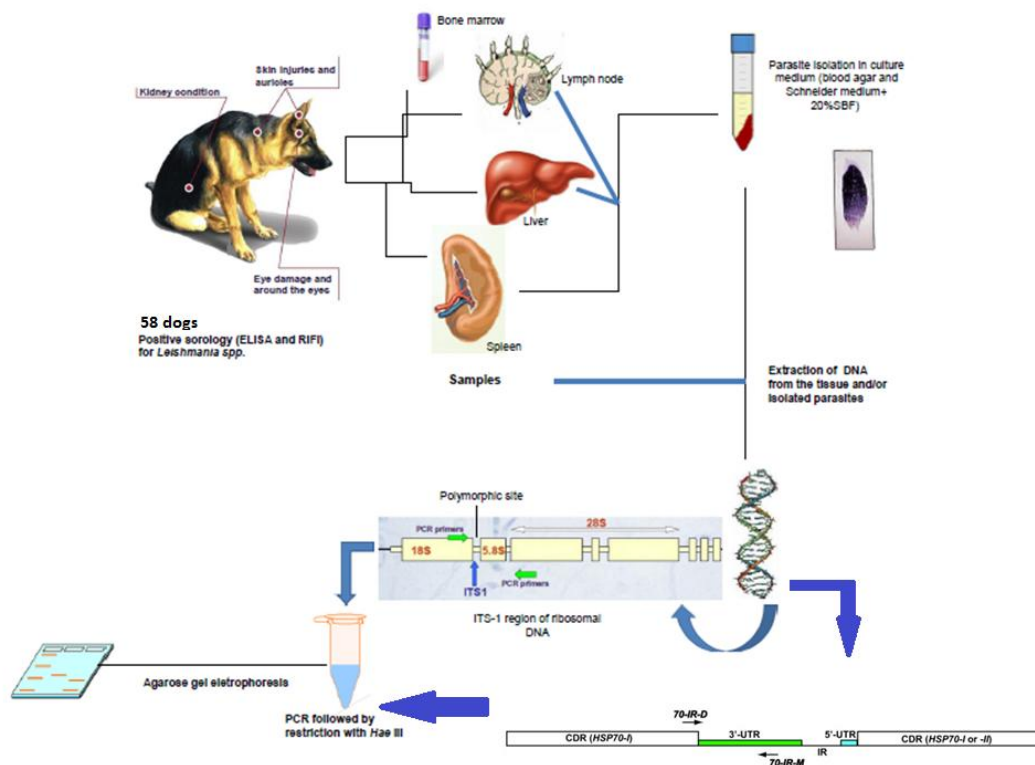


Figura 6. Esquema representativo da estratégia experimental e a metodologia utilizada na presente pesquisa: 1. Amostras biológicas de 58 cães reagentes nos testes sorológicos ELISA e RIFI para LVC, 2. Coleta de sangue periférico, medula óssea, linfonodo, baço e fígado, 3. Cultura dos isolados, 4. *Imprints*, 5. Extração do DNA, 6. PCR da região ITS1 e do *gene da sequência 3' UTR Hsp 70*, 7. Eletroforese em gel de agarose e avaliação das bandas visualizada na imagem gerada pelo fotodocumentador.

2. Amostras biológicas

Amostras de 58 cães de raça e idade variadas, machos e fêmeas, sorologicamente positivos para *Leishmania* spp nos exames ELISA e RIFI realizadas no período de 11 de abril de 2012 a 03 de dezembro de 2013, no Centro de Controle de Zoonoses de Brasília foram avaliadas. As amostras desses cães foram obtidas após a eutanásia, seguindo o protocolo do CCZ sob a supervisão do veterinário responsável do setor. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Biologia (Apêndice 1)

As avaliações realizadas de dados dos cães, quanto a morfologia das orelhas, a pelagem e os sinais clínicos e foram anotadas na ficha epidemiológica (Apêndice 2)

3. Coleta das amostras

Amostras de sangue periférico, medula óssea, baço, fígado e linfonodo, foram coletadas em triplicata. O material foi utilizado para diagnóstico molecular e parasitológico. Imprints das amostras dos isolados foram realizados em lâminas e corados por Giemsa. Parte das amostras foi conservada em formalina tamponada para confecção de lâminas histopatológicas.

4. Descrição dos animais e ficha epidemiológica

As avaliações realizadas dos dados dos cães, quanto a morfologia das orelhas, a pelagem e os sinais clínicos e foram anotadas na ficha epidemiológica (Apêndice 2)

5. Cultura dos Isolados

Cultura *in vitro* dos isolados consistiu na inoculação de amostras de tecidos que podem conter formas amastigotas do parasita em meios de cultura bifásicos contendo ágar sangue e meio Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF). Após períodos de incubação em estufa a 26°C as formas amastigotas intracelulares rompem as células do hospedeiro e se diferenciam em promastigotas no meio de cultura. As formas promastigotas foram observadas por microscopia óptica comum ou invertida. Os meios de cultura inoculados foram observados, semanalmente por um período de até quatro semanas para a possível observação das formas promastigotas.

Após o isolamento, as formas promastigotas são expandidas em meio Schneider suplementado com SBF, acompanhadas até a fase estacionária e posteriormente criopreservadas (5×10^6 /ml) em meio de congelamento contendo 60% de meio Schneider, 30% de SBF e 10% de glicerol. Parte das culturas isoladas são expandidas em 5 ml de meio Schneider suplementado com 20% de SBF até atingir a concentração de 10^7 parasitas/ml. Após atingir tal concentração, a cultura é centrifugada (800 g por dez minutos e 4°C) para obtenção do sedimento contendo os parasitas). Os sedimentos contendo os parasitas foram utilizados para a extração de DNA genômico. Culturas livres de contaminação em que o parasito atingiu a fase estacionária são transferidas para tubos de criopreservação em meio Schneider (Sigma), contendo soro fetal bovino e glicerol.

6. Extração de DNA das amostras

A extração de DNA genômico das biópsias dos tecidos, bem como das culturas dos isolados, foram realizadas com a utilização do kit Purelink (Invitrogen/Life Technologies), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para serem utilizadas posteriormente nas reações de PCR.

7. Amplificações da região ITS1 do DNA pela PCR

A amplificação por PCR do fragmento de DNA foi realizada com o mix contendo: Tampão PCR 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, BSA 0,1 mg/ml, Platinum Taq Polimerase 2 U (Invitrogen), 10 picomoles de cada primer: PR280: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' e PR281: 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' para a região espaçadora interna 1 (ITS1), e 100 ng do DNA total da amostra, em um volume final de 30 µl.

Foi realizado o seguinte protocolo para a amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 1 min; 35 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C, anelamento por 30s a 58°C e extensão por 40 s a 72°C; seguido de 1 min de extensão final a 72°C. Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio.

7.1 PCR-RFLP da região ITS1 do DNA

Para a análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de PCR (PCR-RFLP) foi utilizada a enzima de restrição Hae III. Os produtos da amplificação da PCR de todos os isolados incluindo as amostras de DNA das cepas de referência foram submetidos à digestão com Hae III. Para visualização dos fragmentos gerados pela PCR-RFLP foi realizada eletroforese em gel de agarose 2,5 %, corado com brometo de etídio.

8. Amplificações da sequência 3' UTR do gene *HSP70* do DNA pela PCR

A amplificação por PCR do fragmento de DNA foi realizada com o mix contendo: Tampão PCR 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, BSA 0,1 mg/ml, Platinum Taq Polimerase 2 U (Invitrogen), 10 picomoles de cada primer: PR513: 5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e PR514: 5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3' sequência 3' UTR do gene *HSP70* do DNA, e 100 ng do DNA total da amostra, em um volume final de 30 µl.

Foi realizado o seguinte protocolo para a amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 1 min; 35 ciclos de desnaturação por 30 s a 95°C, anelamento por 30s a 62°C e extensão por 40 s a 72°C; seguido de 1 min de extensão final a 72°C. Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio.

8.1. PCR-RFLP da sequência 3' UTR do gene *HSP70* do DNA

Para a análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de PCR (PCR-RFLP) foi utilizada a enzima de restrição Hae III. Os produtos da amplificação da PCR de todos os isolados incluindo as amostras de DNA das cepas de referência foram submetidos à digestão com Hae III. Para visualização dos fragmentos gerados pela PCR-RFLP foi realizada eletroforese em gel de agarose 2,5 %, corado com brometo de etídio.

RESULTADOS

1. Características dos animais

Do total de 58 cães avaliados, foram analisados os dados de cada animal com relação a sintomatologia, sexo, morfologia da orelha e pelagem, para posteriormente análise de DNA e comparação dos resultados. Sendo assim, 74% dos cães apresentavam as manifestações clínicas da doença que são os sintomáticos podendo ter de três ou mais destes sintomas: hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada, alopecia, lesões ulcerativas, ceratoconjuntivite, hiperqueratose, perda de peso e onicogribose e 26% assintomáticos (Figura 7).

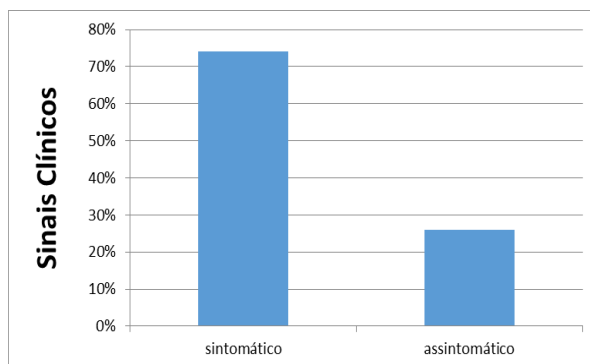


Figura 7. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados classificados entre os grupos de sintomáticos e assintomáticos, quanto aos sinais clínicos.

Os resultados apontam para um número maior de que os cães com pelagem curta em relação ao de pelagem comprida (Figura 8).

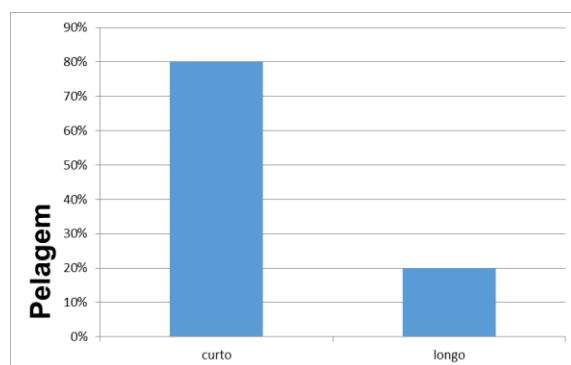


Figura 8. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados separando os animais entre os grupos de pelo curto dos de pelo longo.

Quanto à distribuição pelo sexo na nossa amostragem, observamos que há uma prevalência de cerca de 62% de cães machos (Figura 9). Dados da literatura

demonstram que cães de ambos os sexos, de quase todas as idades e de muitas raças foram já identificados com infecção por *L. infantum*.

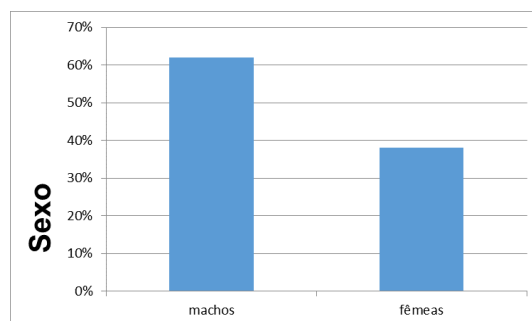


Figura 9. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados classificando entre machos e fêmeas.

Os dados encontrados em nosso trabalho quanto a morfologia da orelha apontam um número maior de cães com as orelhas caídas em relação aos cães com a orelha em pé, diferente do que pensávamos inicialmente que a orelha em pé poderia ser um facilitador para inoculação do parasita pelo inseto vetor, em nosso estudo observamos uma maior prevalência de animais com orelhas caídas nas amostras analisadas (Figura 10).

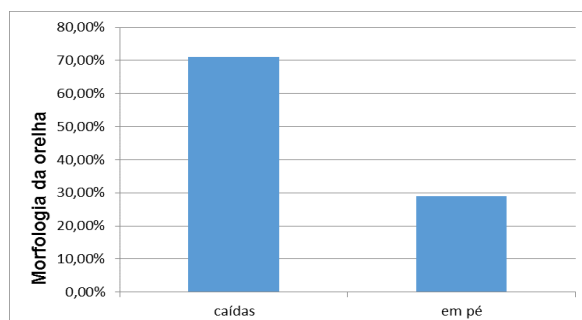


Figura 10. Representação gráfica do percentual dos 58 cães avaliados classificando os animais com as orelhas caídas ou com as orelhas em pé.

Para a análise molecular, o DNA foi extraído das amostras de linfonodo e foi realizada a PCR, resultando em 47 (81%) com resultado positivo. Entre os classificados como sintomáticos, 35 (83%) apresentaram resultados positivos e 7 (17%), resultados negativos. Com relação ao grupo assintomático, 12 (75%) foram identificados no teste como positivos e 4 (25%), como negativos (Figura 11).

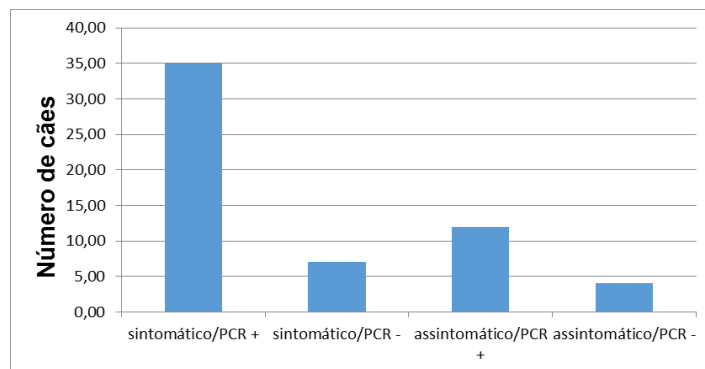


Figura 11. Representação gráfica do número de cães com os sintomas clínicos e resultados da PCR. Grupos dos sintomáticos positivos e negativos para PCR e dos assintomáticos positivos e negativos para PCR.

2. Distribuição geográfica

Nossos resultados apontam as seguintes áreas de origem dos cães como as três regiões com percentuais maiores, Sobradinho com 43%, Lago Sul 18%, Lago Norte 17%, e um menor percentual nas demais localidades como Fercal com 4% e Asa Norte, Asa Sul, Candangolândia, Colônia Agrícola, Gama, Taguatinga, Paranoá, de Rua com 2%, (Figura 12).

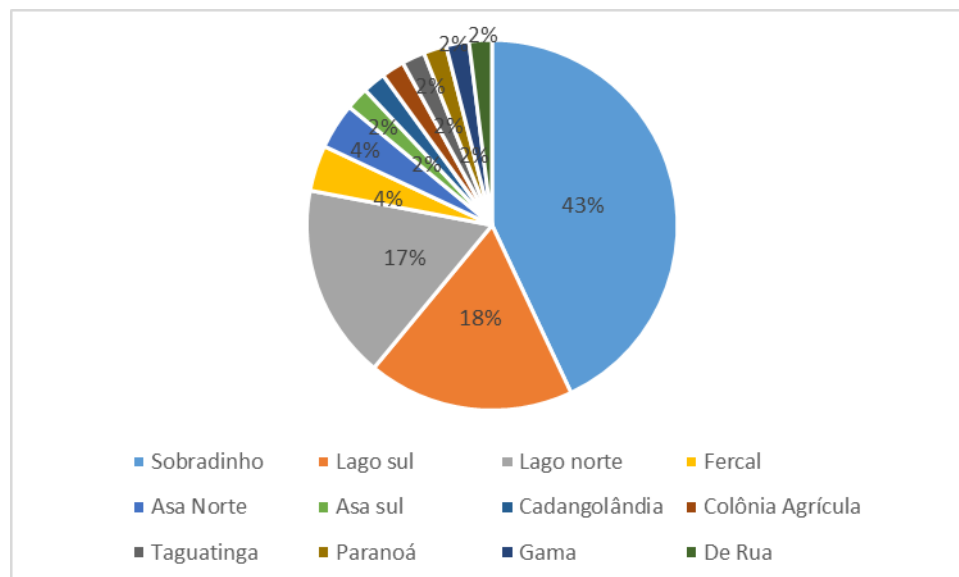


Figura 12. Gráfico representativo do percentual de cães analisados e as respectivas regiões de origem.

O mesmo resultado é mostrado na Figura 13, destacando número de cães e o respectivo local de origem no mapa geográfico das regiões do Distrito Federal, podemos observar que as regiões com maior número de cães são Sobradinho com 25 cães, Lago Norte com 11 e Lago Sul com 12 cães cada uma, sendo que essas são regiões

relativamente próximas uma da outra. Podemos dizer que as regiões onde foram encontrados o maior número de cães com leishmaniose visceral, são regiões endêmicas e as regiões onde ocorreu apenas um caso são regiões silenciadas.

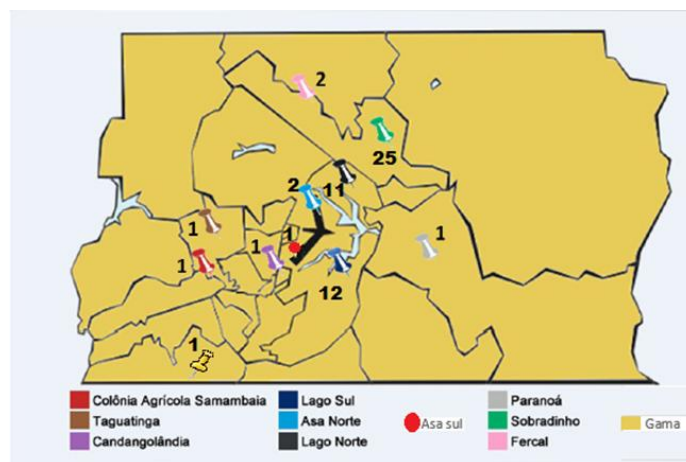


Figura 13. Mapa geográfico das regiões do Distrito Federal, o local de origem dos cães e o número de cães por região: Asa Norte (2), Asa Sul (1), Candangolândia (1), Colônia Agrícola Samambaia (1), Fercal (2), Gama (1), Lago Norte (11), Lago Sul (12), Taguatinga (1) e Paranoá (1), Sobradinho (25) (modificado de <http://wbrasil.com/MapaRegioesadm.jpg>, 2013).

3. Diagnóstico Molecular

A PCR foi o principal foco deste trabalho, pois além de ser considerada como um método rápido vem sendo amplamente utilizada para diagnóstico das doenças infecciosas, apresentando índices bastantes razoáveis de sensibilidade e especificidade. No caso específico da detecção do DNA de *Leishmania*, a PCR tem apresentado resultados promissores no sentido de discriminar a espécie do parasito envolvido na infecção.

A PCR realizada com o DNA extraído do sangue periférico dos cães com leishmaniose visceral confirmada pelo mesmo método molecular em amostras de outros tecidos mostrou-se incapaz de detectar a presença do parasito. Segundo Tafuri et al. (2001), cães com sintomatologia típica de LV canina e com comprovada infecção por *L. infantum* podem apresentar ausência de formas amastigotas na pele

Após extrair o DNA das amostras dos 58 cães avaliados, foi realizada a PCR da região ITS, das amostras analisadas foi possível confirmar a presença do parasito em 47 dessas amostras com os resultados positivos nas mesmas, bem como por PCR espécie-específica nas 47 amostras de biópsia confirmaram a identidade molecular dos isolados.

Todas as amostras apresentaram padrão de *L. infantum*. Como pode ser visualizado na figura 14, imagem em gel de agarose com as amostras de cultura de

isolados e biópsia do linfonodo dos cães avaliados, confirmando e validando a PCR através do controle positivo realizado com a cepa referência de *L. infantum*, as bandas visualizadas na figura apresentaram o mesmo tamanho do padrão.

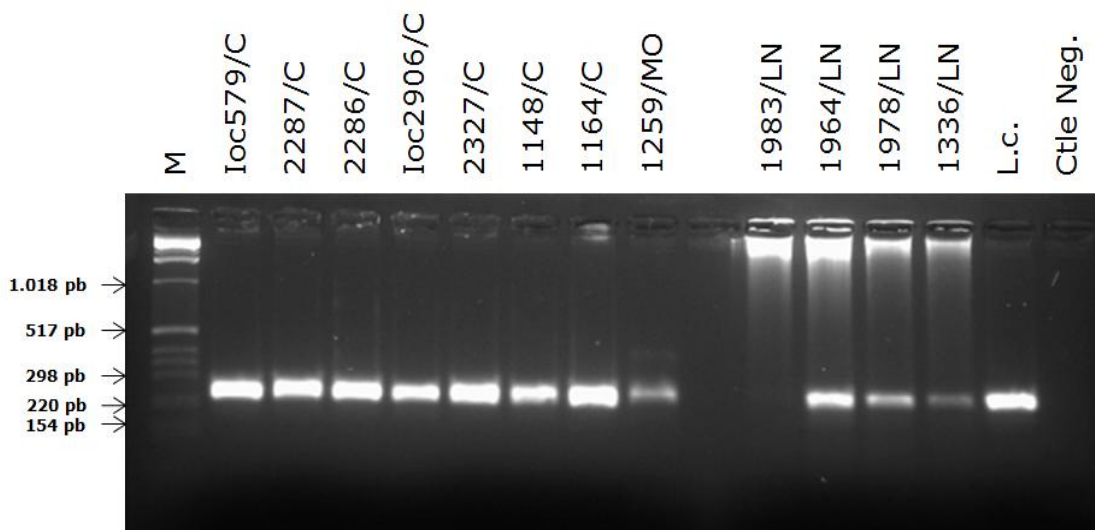


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR da Região ITS1 do DNA dos isolados das amostras dos cães. Marcador Molecular 1 kb ladder; Cepa referência *L. (L.) infantum* (Lc). C – Cultura, MO – Medula óssea, LN – Linfonodo.

As identificações através do método de PCR-RFLP da região ITS confirmou que a espécie de *Leishmania* presente nas amostras eram *L. infantum*, na figura 15 é possível visualizar que a bandas encontradas nas amostras são iguais ao padrão utilizado.

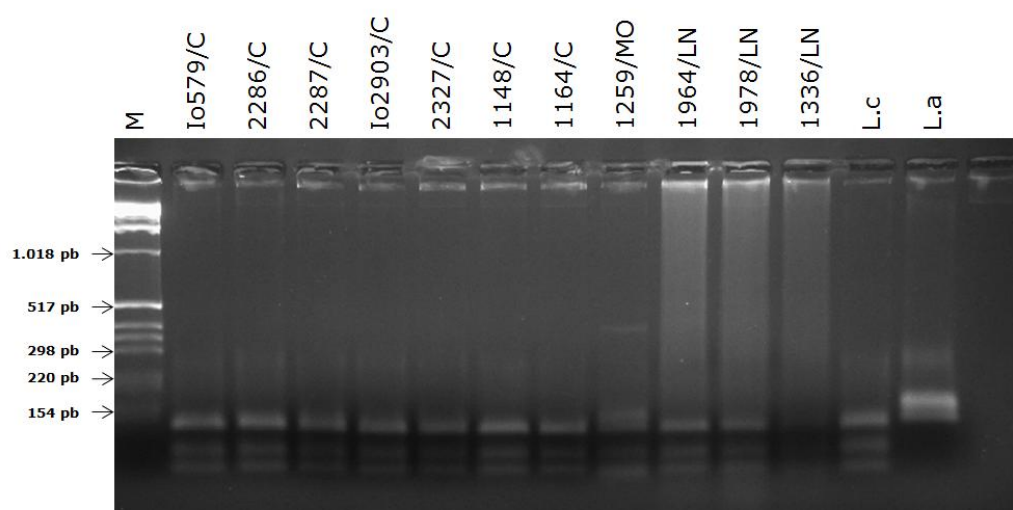


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da PCR digerida com a enzima de restrição Hae III (PCR-RFLP). Marcador Molecular 1 kb ladder; Cepa referência L.c= *L. (L.) infantum*, L.a=Cepa referência *L. amazonensis*. C – Cultura, MO – Medula óssea, LN – Linfonodo.

A utilização da amplificação sequência 3' UTR do gene *HSP70* do DNA seguido de corte com a enzima de restrição Hae III foi capaz de distinguir várias espécies de *Leishmania* (GARCIA et al., 2004). Com o objetivo de confirmar os resultados realizamos outras PCR's utilizando um par de primers que amplifica a sequência 3' UTR do gene *HSP70*. Os resultados obtidos corroboram com os resultados encontrados anteriormente, ou seja, dos 58 cães avaliados 47 apresentaram resultado positivo na PCR. Na figura 16 pode ser visualizada uma banda presente nas amostras no mesmo tamanho que da cepa referência *L. infantum*.

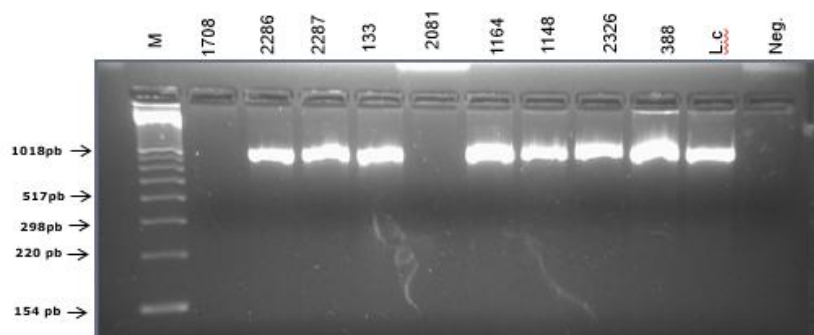


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR da Sequência hsp 70 do DNA dos isolados das amostras dos cães. Marcador Molecular 1 kb ladder; Cepa referência *L. (L.) infantum* (Lc).

As identificações através do método de PCR-RFLP da sequência 3' UTR do gene *HSP70* do DNA confirmou que a espécie de *Leishmania* presente nas amostras era *L. infantum*. Na figura 17 é possível visualizar que as bandas encontradas nas amostras são iguais ao padrão utilizado.

Observamos que algumas amostras apresentavam uma banda mais fraca no gel de agarose, mesmo quantificando o DNA amostral, a quantidade de DNA obtido era total, ou seja do cão avaliado e possivelmente do parasito, o que dificultou um pouco a realização do trabalho, sendo necessário refazer algumas PCR's destas amostras que provavelmente tinham carga parasitária menor.

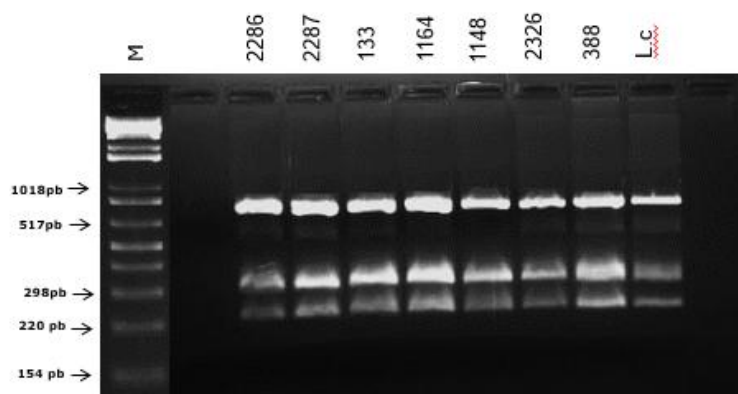


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do produto da PCR digerida com a enzima de restrição Hae III (PCR-RFLP). Marcador Molecular 1 kb *ladder*; Cepa referência L.c= *L. (L.) infantum*.

DISCUSSÃO

A PCR tem demonstrado ser uma técnica altamente sensível para o diagnóstico da LVC. A técnica de RFLP tanto da região ITS quanto da sequência *HSP70* mostraram-se eficientes no diagnóstico e identificação de espécie do gênero *Leishmania*, validando a PCR como método conclusivo e eficaz.

Das amostras que apresentaram o resultado negativo em ambas as PCR's que muito provavelmente não havia parasito nessas amostras, pois o resultado da PCR corrobora com os resultados observados nas laminas dos imprints. O que reforça as argumentações sobre a eutanásia de animais saudáveis bem como os animais que doentes que não reagiram aos testes sorológicos e permanecem vivos.

A análise dos dados sugere necessidade da associação das técnicas moleculares aos testes sorológicos, pois os resultados diagnósticos variam com a evolução da doença em cada animal. O protozoário migra do sangue periférico para o linfonodo, baço e medula óssea a medida que o hospedeiro entra em contato com o parasito. Pois ele tem tropismo por esses órgãos, o que explica a variação dos resultados diagnósticos de acordo com a evolução da infecção.

Os sinais clínicos mais comuns encontrados nos animais avaliados foram: hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada, alopecia, lesões ulcerativas, ceratoconjuntivite, hiperqueratose, perda de peso e onicogribose. Os cães levados a Zoonoses não recebem diagnóstico precocemente, uma vez que os donos não querem ter gastos com o animal, assim chegando em estágio avançado da doença. Estes são frequentemente considerados sinais compatíveis com a LVC (ALVAR et al., 2004).

Observou-se que para a variável sexo não houve prevalência significativa, mesmo que o resultado tenha apontado um número maior de cães machos infectados, embora haja relato de níveis significativamente maiores de infecção em machos (FISA et al., 1999; ZAFFARONI et al., 1999). Isso pode ser explicado por haver um número muito maior de cães machos em relação ao número de fêmeas independente da LVC.

Levando-se em consideração as características dos animais avaliados, observamos que os cães de pelagem curta apresentavam prevalência mais alta do que os de pelagem comprida, o que pode estar relacionado com a maior ou menor facilidade de acesso pelos vetores (MORILLAS et al., 1996).

Outra característica física relevante no estudo da prevalência da LV canina é a morfologia das orelhas. Neste trabalho observamos uma maior prevalência de animais com orelhas caídas nos animais avaliados. A pele da face e das orelhas é mais exposta ao ambiente e podem ser áreas predispostas à inoculação pelos vetores (LIMA et al., 2004).

Das 58 amostras 81% apresentou resultado positivo em ambas PCR's, confirmando a presença do parasito, no entanto não foi detectado a presença do parasito em 11 amostras, em ambas PCR, o que nos leva a crer que a RIFI obteve um resultado falso-positivo em 19% das amostras que foram testadas pela PCR. Desta forma, segundo a recomendação do Ministério da Saúde, onze animais não portadores da enfermidade foram eutanasiados.

Segundo Ikonopoulos et al. (2003), os resultados discrepantes encontrados na quantidade de animais diagnosticados com LVC no teste sorológico e no diagnóstico molecular. Podem ser devido a vários fatores, entre eles: a permanência de anticorpos circulantes mesmo após a eliminação do parasita; a baixa quantidade de parasito no tecido e conseqüentemente não detectado na PCR e reações cruzadas da sorologia com outras doenças.

De acordo com dados fornecidos pela Secretaria de Estado e Saúde de 2011, os locais de maior incidência da LV acontecem em áreas tradicionais de transmissão como Varjão, Sobradinho, Lago Sul e Lago Norte. Confirmando os resultados obtidos em nosso trabalho que apontam essas mesmas regiões como áreas endêmicas e ainda mostra outras áreas com um caso isolados como áreas silenciadas.

Como alguns autores enfatizam que o diagnóstico da Leishmaniose é uma combinação entre vários estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (SUNDAR et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2011) este trabalho avaliou todos os setores dos diagnósticos da LVC, incluindo a espécie de *Leishmania* envolvida do Distrito Federal. Desta forma podemos afirmar que os testes sorológicos, até o presente momento, não deveriam ser empregados sozinhos para determinação da LVC. Portanto, estamos sugerindo que os teste sorológicos deveriam ser associados às técnicas moleculares para evitar falsos positivos e/ou falsos negativos, por conseguinte a prevenção da disseminação da doença. Um diagnóstico mais confiável possibilita saber o real estado de saúde do animal, e com isso tomar as providências necessárias. Seja vacinando o cão para não ser contaminado, seja tratando o animal já contaminado.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que os cães machos com pelos curtos e orelhas caídas são mais susceptíveis a LVC e que esses animais apresentam de três a mais sintomas na maioria dos casos. A espécie de *Leishmania infantum* foi identificada pela técnica PCR-RFLP como sendo o principal agente causador da LVC no Distrito Federal. O diagnóstico molecular é o mais adequado na detecção da infecção por Leishmania spp.

APÊNDICE 1



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 4 de julho de 2011.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**PERFIL MOLECULAR E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS OBTIDOS DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL. ASSOCIAÇÃO COM ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO**", UnBDOC n.º 64411/2011, sob responsabilidade da Profa. Cecília Beatriz Fiúza Favali, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Aline Pic-Taylor
Coordenadora do CEUA

APÊNDICE 2Ficha Epidemiológica

Perfil molecular e diversidade genética de isolados obtidos de cães com Leishmaniose Visceral na região do Distrito Federal. Associação com atividade anti-*Leishmania* de plantas do Bioma Cerrado

Identificação(nome):

Número:

Data da coleta:

Responsável pela coleta:

Origem:

Sexo:

Porte:

Raça:

Pelagem:

Orelhas:

Sorologia:

Classificação clínica:

Sem sinais clínicos

Com sinais clínicos

1. Linfadenopatia:

1.1. Generalizada: ___ SIM ___ NÃO

1.2. Localizada:

1.2.1. Linf. Submandibular:

1.2.2. Linf. Pré-escapular:

1.2.3. Linf. Poplíteo

2. Anomalias locomotoras:

3. Sinais viscerais:

3.1. Perda de peso:

3.2. Fraqueza:

3.3. Alterações Gastrointestinais

3.4. Epistaxe:

3.5. Uveíte:

4. Sinais cutâneos:

4.1. Alopecia:

4.2. Descamação:

4.3. Hiperceratose:

4.4. Eritema:

4.5. Prurido:

4.6. Úlceras:

4.7. Nódulos:

4.8. Pústulas:

4.9. Onicogribose:

4.10. Lesões oculares:

Comentários:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENE, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.
- ALVARENGA, J.S., C.M. LIGEIRO, C.M. GONTIJO, S. CORTES, L. CAMPINO, A.R. VAGO, M.N. MELO. kDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from the new and the old world. **PLoS One** 7:e43363, 2012.
- ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad Saúde Pública.**;20(1):259-65,2004.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol** 30: 1269-1281. 2000
- BACELLAR, O; CARVALHO E. M. Imunopatogênese da *Leishmania Visceral*. **Gazeta Médica da Bahia.** 24-34,2005.
- BANETH G., KOUTINAS A.F., L., BOURDEAU P.,FERRER L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology Cell press.**Volume 24, Issue 7, Pages 285-330 (July 2008)
- BENTE, M.; HARDER, S.; WIESGIGL, M.; HEUKESHOVEN, J.; GELHAUS, C.; KRAUSE, E.; CLOS, J.; BRUCHHAUS, I.:Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*.**Proteomics** 3(9):1811-1829,2003.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitol.**Oxford, v.28, n.1, p.121-134, 1998.
- BOGDAN, C.; GESSNER, A.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites.Curr .Opin. Immunol.London, v. 8, p. 517-525, 1996.
- CORTES, S. J. C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. 163 p.**Tese (Doutorado)**. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa,2008.
- COSTA, C.H.N., PEREIRA H.F., ARAÚJO M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, 1980-1986. **Rev Saúde Pública.**24(5):361-72, 1990.
- COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia** 75:3-17,2005.
- COSTA, J.M.L., VIANA, G.M.C., SALDANHA, A.C.R, NASCIMENTO, M.D.S.B., ALVIM, A.C., BURATTINI, M.N. et al. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cad Saúde Pública.** 11(2):321-4,1995.
- COSTA, M.M., ANDRADE, H.M., BARTHOLOMEU, D.C.,Freitas, L.M.,PIRES, S.F., CHAPEAUROUGE, A.D., PERALES, J.,FERREIRA, A.T., GIUSTA, M.S., MELLO, M.N., GAZZINELLI, R.T. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **J Proteome Res.** 6;10(5):2172-84,2011.

- CUPOLILLO, E., G. GRIMALDI JÚNIOR, H. MOMEN, S.M. BEVERLEY. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol** 73:145-155, 1995.
- DANTAS-TORRES, F., BRITO, M.E.F., BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet. Parasitol.** 140, 54–60, 2006.
- DÁVILA, A.M., H. MOMEN. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasitol** 94:651-654, 2000.
- DEGRAVE, W., O. FERNANDES, D. CAMPBELL, M. BOZZA, AND U. LOPES. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 89:463-469, 1994.
- DENIAU, M.; CAÑAVATE, C.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; MARTY, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v.97, n.1, supl.1, p. 15–33, 2003.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 27:305-18, 2004.
- DOURADO, Z.F.; SILVA, H.D.; SILVEIRA-LACERDA, E.P.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 36 (3): 205-214. 2007.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Leishmaniose visceral. Disponível em: <http://dndi.org.br/pt/doencasnegligenciadas/leishmanioses/estrategia-da-dndi.html> capturado em 03 de Fevereiro de 2013.
- FERREIRA, G.A., F.C. SOARES, S.A. VASCONCELLOS, E.H. RODRIGUES, R.P. WERKHÄUSER, M.E. DE BRITO, F.G. ABATH. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. **J Parasitol** 93:712-714, 2007.
- FILHO, M. S. R; SILVEIRA, F. T. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará. **Rev. Para. Med.** vol.21 no.3 Belém. 2007
- FIOCRUZ. **Leishmania**. Disponível em: dbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm. Acessado em junho, 2014.
- FLOETER-WINTER, L. M. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. online, Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa73_leishmania.html. capturado em 03 de Fevereiro de 2013.
- FOLGUEIRA, C.; CANAVATE, C.; CHICHARRO, C.; REQUENA, J.M.: Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. **Parasitology** 134(Pt 3):369-377, 2007.
- FOLGUEIRA, C.; QUIJADA, L.; SOTO, M.; ABANADES, D.R.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M.: The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the

- temperature of growth through different mechanisms. **J Biol Chem**, **280**(42):35172-35183, 2005.
- FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J.M.: A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol Rev** **31**(4):359-377,2007.
- GARCIA L, KINDT A, BERMUDEZ H, LIANOS-CUENTAS A, DE DONCKER S, AREVALO J, TTAYA KWQ, DUJARDIN JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* **42**: 2294-2297, 2004.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.36(1):71-80, jan-fev, 2003.
- GONTIJO, C.M.F; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- HARTL, F.U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature** **381**(6583):571-579,1996.
- HOLZMULLER, P.;BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESTRE, J.L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, **132**, 19-32, 2006.
- HONIGBERG, B. M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In **Progress in Protozoology**, p. 68. Edited by J. Ludvik, J. Lom&J. Vavra. New York: Academic Press,1963.
- LACERDA, M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **89**: 489-495, 1994.
- LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed., Vol 5, **Parasitology**, Arnold, London,; 313-349,2005.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, p. 569-596, 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, London, v. 273, p. 595-600, 1978.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). Evolution, classification and geographical distribution. In: **Leishm. Biol. Med.** Academic Press, London, vol. 1, p. 1-120, 1987.
- LAURENT, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. **Bepa**, v.67, p.13-23, 2009.
- LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N., TAFURI, W.L. 2004. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica** **92**, 43-53
- MACHADO, P.R.L.; CARVALHO, L.; ARAUJO, M.I.A.S.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An. Bras. Dermatol.* vol. 79, n^o6, pp. 647-664, 2004.
- 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.** vol.8 no.6 Salvador dez, 2004.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v.158, p.274-287, 2008.

MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do DNA ribossômico nas espécies do Cluster *buzzatii* de *Drosophila* (Diptera: drosophilidae). **Ambiência Guarapuava.** v.2, n.1, p. 89-96, 2006

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma mansoni*.** Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

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

MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum.** p. 46-53,1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília: Ministério da Saúde. 113p, 2006.

MORILLAS, F.; RABASCO, F.S.; OCANA, J.; MARTIN-SANCHEZ, J.; OCANA-WIHELMI, J.; ACEDO, C.; SANCHIS-MARIN, M.C., Leishmaniosis in the focus of the Axarquia region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. **Parasitol. Res.** 82, 569/570,1996.

OMS. 2012. Control of Leishmaniasis. Disponível em: www.portaldasuade.gov.br. Acessado em fevereiro de 2013.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Las condiciones de salud en las Americas. Washington, v.1.(Publicacion científica nº 549), 1994.

PITA-PEREIRA, D., R. LINS, M.P. OLIVEIRA, R.B. LIMA, B.A. PEREIRA, O.C. MOREIRA, R.P. BRAZIL, C. BRITTO. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors** 5:15, 2012.

REIS, L.C.; BRITO, M.E.F.; SOUSA, M.A.; PEREIRA, V.R.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

RODRIGUES, C.A.T.; BATISTA, L.F.S.; FILHO, R.S.T.; SANTOS, C.S.; PINHEIRO, C.G.; FREITAS, L.A.R.; VERAS, P.S.T. IFN-g expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. **Vet Immunol Immunop** 127 (2009) 382–388

ROSAS, F., SOUZA, M., SILVEIRA, F. T. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará. **Rev. Para. Med.** [online], vol.21, n.3, pp. 7-18. ISSN 0101-5907, 2007

- SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico**, São Paulo, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.
- SARAIVA, N.G.L., VALDERRAMA, M., LABRADA, A.F., HOLGUÍN, C., NAVAS, G., PALMA, A., WEIGLE, K.A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases** 159:725-735, 1989.
- SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCHA, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBERA, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.v.47, p.349–358, 2003.
- SHAPIRA, M.; MCEWEN, J.G.; JAFFE CL: Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. **EMBO J** 7(9):2895-2901, 1988.
- SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; FERNANDÉS, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, v.65, n.6, p.896-898, 2001.
- SOARES-BEZERA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracellular molecules as a drug target. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.40 no.2 São Paulo Apr./June 2004
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 01-16, 2011.
- SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P. *et al.* - Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New Engl. J. Med.**, **347**: 1739-1746, 2002.
- TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. Trypanosomacruzi: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental Parasitology**. v.114, n.4, p.279-288, 2006.
- VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. do Inst. de Med. Tropical** de São Paulo, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.
- VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In **Biology of the Kinetoplastida**, pp. 1–34. Edited by W. H. R. Lumsden & D. A. Evans. London: Academic Press, 1976.
- VOLPINI, A.C., V.M. PASSOS, G.C. OLIVEIRA, A.J. ROMANHA. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 90, p. 31-37, 2004.
- WOODMAN, R.C , et al. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. **Journal Experimental Medicine**, v.188, p. 2181-2186, 1998.
- ZAMBRANO-VILLA S, ROSALES-BORJAS D, CARRERO JC, ORTIZ-ORTIZ L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 272-8, 2002.