

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Laboratório de Imunopatologia

**“ Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de
Leishmania infantum obtidos de cães naturalmente infectados: uma busca
racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade ”**

Samuel Leôncio Braga

Ouro Preto

2011

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Laboratório de Imunopatologia

**“ Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de
Leishmania infantum obtidos de cães naturalmente infectados: uma busca
racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade ”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia aplicada a produção e testes de vacinas, diagnósticos e tratamento em doenças infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Ouro Preto

2011

B813c

Braga, Samuel Leôncio.

Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de *Leishmania infantum* obtidos de cães naturalmente infectados [manuscrito] : uma busca racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade / Samuel Leôncio Braga. - 2011.

xiv, 84f.: il., color.; graf.; tabs.

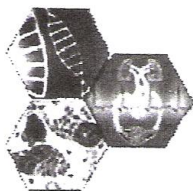
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Processos e
ao Tratamento de Doenças.

1. *Leishmania* - Teses. 2. Isoenzimas - Teses.
3. Virulência(Microbiologia) - Teses. 4. Patogenicidade - Teses.
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

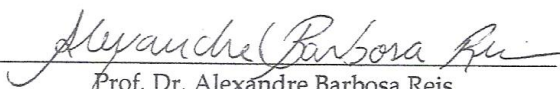


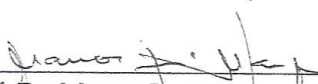
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

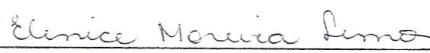
"Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de *Leishmania infantum* obtidos de cães naturalmente infectados - Uma busca racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade"

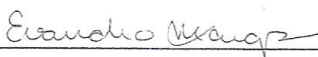
Aos 29 dias do mês de abril de 2011, às 14h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno Samuel Leôncio Braga. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovar o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
Orientador (UFOP)


Prof. Dr. Marcos José Marques (Co-orientador)
Presidente (UNIFAL)


Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos
Examinadora (UFES)


Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 29/04/2011

Colaboradores:

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti ^I

Dr. Wendel Coura Vital ^I

Dra. Marta de Lana ^{II}

Dra. Helen Rodrigues Martins ^{III}

Dra. Norma Maria Melo ^{IV}

M.s Bruno Mendes Roatt ^I

M.s Nadia das Dores Moreira ^I

M.s Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares ^I

I – Laboratório de Imunopatologia NUPEB/UFOP

II – Laboratório de Doença de Chagas NUPEB/UFOP

III – Laboratório de Doenças Parasitárias/UFVJM

IV – Laboratório de Parasitologia /UFMG

Dedico este trabalho á toda a minha família:

*Aos meus queridos e amados pais Silvestre e Maria pelo carinho, amor e
compreensão;*

*Aos meus queridos irmãos (Filipe, Estevão e Silmara) pela força e amizade
sincera nos momentos mais difíceis.*

*E finalmente dedico este trabalho à minha querida esposa Micheline pelo
apoio, amor e companheirismo durante estes seis anos.*

Agradecimentos

À Deus pelo simples fato de ter me dado o maior dos presentes, a vida.

À minha esposa Micheline Soares Braga pelo amor, paciência, incentivo, entusiasmo e carinho sempre presentes e inabaláveis. Você foi minha conselheira, amiga e confidente, sempre compreendendo as inúmeras vezes que precisei deixá-la ou mesmo em momentos quando ainda presente não conseguiu te dar atenção merecida. Obrigado por fazer parte da minha vida e por sempre me ajudar a enxergar e entender o lado feliz e triste da vida de forma serena e tranqüila. Te amo muito!

Aos meus queridos pais (Silvestre e Maria) pelo amor, carinho, apoio, confiança durante estes anos, sem vocês nunca teria conseguido. Amo vocês!

Aos meus irmãos (Filipe, Estevão e Silmara) mesmo distantes vocês me ajudaram muito. Obrigado por sempre acreditarem em mim.

Ao professor Alexandre Barbosa Reis, exemplo de sabedoria e competência, te agradeço profundamente por todos os ensinamentos, pela paciência, confiança, atenção e auxílio. Obrigado pelo apoio, entusiasmo e incentivo constantes, mesmo estando à distância você sempre esteve presente.

Ao professor Marcos José Marques, por ter aceitado este grande desafio em me co-orientar e orientar neste projeto, pois sem a sua ajuda dificilmente conseguiria concluir este projeto. Obrigado pelo apoio e incentivo. Aprendi muito com você.

Aos professores Rodolfo Cordeiro Giunchetti e Cláudia Martins Carneiro, pelo incentivo, atenção e ensinamentos nestes últimos anos. Realmente fico muito feliz em conhecer pessoas como vocês.

Às colaboradoras Dra. Maria Norma Melo e Dra. Helen Rodrigues Martins por terem disponibilizado os seus laboratórios para a realização das reações de isoenzimas e PCR. Obrigado pelos ensinamentos, sugestões e pelos ricos momentos de convivência.

Aos amigos e irmãos do LIMP, Bruno (Catatau), Rodrigo Dian (Sapo), Henrique (Quick) pelo apoio e aprendizado destes anos. Vocês foram fundamentais neste trabalho. Obrigado por me ensinarem tudo sobre arte que é o cultivo de parasitos do gênero *Leishmania*.

Ao grande amigo e irmão Wendel, pelo apoio na padronização e realização da PCR e PCR- RFLP. Foram meses padronizando reações, mas valeu à pena. Admiro sua persistência e entusiasmo, aprendi muito com você.

Ao grande amigo Sheler, pela amizade e momentos de descontração no LIMP. Realmente você é um comédia, mantenha sempre este bom- humor.

Às “meninas” do LIMP, Amanda, Carol, Juliana, Kátia, Nádia e Paula pela amizade e ajuda nos experimentos, vocês são nota 10.

Aos incansáveis e sempre prestativos alunos da iniciação científica do LIMP (Fernando, Jamile, Levi, Lígia e Liliane), obrigado pelas incontáveis vezes que tive que incomodá-los pedindo materiais para o cultivo das leishmanias, sem vocês, não teria conseguido.

Ao grande Philipe (PH) sempre disposto a fornecer os materiais e reagentes para realização dos experimentos, muito obrigado pela ajuda.

À Tânia e a Maria Aparecida Reis Trópia (Cida) pela disponibilidade e empenho em resolver os problemas burocráticos e administrativos que surgiram durante a realização trabalho.

À professora Renata Guerra, por ter aceitado me supervisionar durante o estágio de docência. Aprendi muita biologia molecular com você. Obrigado por tudo.

Aos amigos da República K-Zona que acompanharam a minha trajetória desde a iniciação científica durante a graduação aos dias de hoje. Obrigado pela amizade sincera e companheirismo nestes últimos setes anos de convivência.

À grande amiga Iara por me acolher em seu apartamento e Belo Horizonte durante a realização de alguns experimentos. Muito obrigado por tudo.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), por fornecerem os animais utilizados neste experimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/ NUPEB/UFOP pela oportunidade fornecida para o desenvolvimento desta dissertação.

À CAPES pela bolsa de estudos que propiciou a minha dedicação de forma exclusiva à este projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

Sumário

Lista de Tabelas	ix
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
1 – Introdução	xiv
2 - Revisão de Literatura.....	5
2.1 - As Leishmanioses	6
2.2 - Leishmaniose Visceral (LV).....	7
2.3 - Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	7
2.4 - Agente etiológico.....	10
2.5 – Caracterização do gênero <i>Leishmania</i>	11
2.5.1 - Caracterização Biológica gênero <i>Leishmania</i>	12
2.5.2 - Análise de Isoenzimas.....	13
2.5.3 - Marcadores baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR)	15
2.5.4 - Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD).....	16
2.5.5 - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP)	17
3 - Justificativa.....	19
4 - Objetivos.....	21
4.1 - Objetivo Geral	21
4.2 - Objetivos Específicos	21
5 - Material e Métodos.....	21
5.1 - Amostras de referência	23
5.2 - Seleção dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i>	23
5.3 - Características das áreas de onde foram obtidos os cães portadores de LVC	23
5.4 - Isolamento dos parasitos.....	24
5.5 - Preparação das massas para ensaios isoenzimáticos e moleculares	26
5.6 - Comportamento em meio de cultura - curvas de crescimento	26
5.7 - Infecção experimental em hamster <i>Mesocricetus auratus</i>	27
5.8 – Animais	28
5.8.1- Necropsia dos hamsters <i>Mesocricetus auratus</i> e obtenção do material biológico para avaliação de carga parasitária	28
5.8.2 - Diagnóstico Parasitológico e avaliação da carga parasitária	29
5.9 - Análise do perfil isoenzimático dos isolados de <i>Leishmania spp.</i>	29
5.9.1 - Preparo das amostras utilizadas.....	29
5.9.2 - Extrações de DNA das formas promastigotas	30
5.9.3 - Controles para PCR, PCR-RFLP e RAPD-PCR	31
5.9.4 - Análise do DNA	31
5.9.5 - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
5.9.6 - Análise dos produtos da PCR.....	32
5.9.7 - PCR-RFLP <i>mkDNA</i>	32

5.9.8 - RAPD (Amplificação aleatória de DNAs polimórficos).....	32
5.9.9 - Análise dos resultados RAPD e construção do fenograma.....	33
6 - Análise estatística dos resultados	34
7 - Resultados.....	35
7.2 - Análise dos produtos da PCR pelos iniciadores 150 e 152	36
7.3- Análise dos produtos da PCR-RFLP para diferentes espécies do gênero <i>Leishmania</i>	37
7.4 - Análise dos produtos da PCR-RFLP para os isolados de <i>Leishmania spp</i> obtidos de cães naturalmente infectados.....	38
7.5 - Amplificação Randômica do DNA (RAPD)	40
7.6 - Análise do perfil isoenzimáticos dos isolados de <i>Leishmania spp</i>	43
7.7 - Avaliação do comportamento das curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania</i> isoladas de cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da LVC	46
7.8 - Infecção experimental em hamster <i>Mesocricetus auratus</i>	48
8 - Discussão.....	49
9 - Conclusões.....	62
11 – Considerações Finais	66
12 – Referências Bibliográficas	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Amostras de referência de <i>Leishmania spp.</i>	23
Tabela 2: Sistemas enzimáticos utilizados na análise de isoenzimas	30
Tabela 3: Iniciadores aleatórios utilizados nas reações de RAPD-PCR.....	33
Tabela 4: Número de isolados de <i>Leishmania spp.</i> obtidos de cães naturalmente infectados	36
Tabela 5: Avaliação parasitológica em hamster <i>Mesocricetus auratus</i> após infecção experimental.....	48

Lista de Figuras

Figura 1: Manifestações clínicas de cães sintomáticos para leishmaniose.....	9
Figura 2: Formas <i>Leishmania spp.</i> : promastigotas (1-A) e amastigotas (1-B).....	10
Figura 3: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> utilizando os iniciadores 150 e 152, em gel de poliacrilamida 10%.	37
Figura 4: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> antes e após a restrição por Hae III em gel de poliacrilamida 10%.....	38
Figura 5: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> após a restrição por Hae III em gel de poliacrilamida 10%.....	39
Figura 6: Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras cepas de referência de <i>Leishmania</i> : La, <i>L.(L.) amazonensis</i> (MHOM/BR/1973/M2269); Lb, <i>L.(V). braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903); Li, <i>L.(L.) infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75) e de isolados obtidos de cães sintomáticos (I-1, I-2, I-3, I-4, I-5) e de cães assintomáticos (I-6, I-7, I-8, I-9, I-10)	41
Figura 7: Fenograma consenso das cepas de referência de <i>L.(L.) infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75) e <i>L.(V). braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903) e, isolados obtidos de cães portadores de diferentes formas clínica da LVC construído pelo método de UPGMA do Treecon for Windows.	43
Figura 8: Diagrama representativo do resultado da eletroforese das enzimas G6PD, GDH, ME, 6PGD, IDH, MDH, GPI com a amostra de referência <i>L.(L.) infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75); I-1; I-2; I-3; I-4; I-5 (Isolados obtidos de cães sintomáticos) / I-6; I-7; I-8; I-9; I-10 (Isolados obtidos de cães assintomático).	45
Figura 9: Cinética de crescimento de promastigotas de <i>L (L.) infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75) e de isolados de cães sintomáticos e assintomáticos em meio LIT no período de 0-20 dias. O eixo y representa o número médio de parasitos x 10 ⁷ /mL e o eixo x representa os dias de cultivo. Cepa de referência (--- PP75); Isolados de cães sintomáticos (— 1; — 2; — 3; — 4; — 5); Isolados de cães assintomáticos (— 6; — 7; — 8; — 9; — 10). A contagem foi realizado em triplicata.	47

Lista de Abreviaturas e símbolos

°C - graus Celsius
% - percentual
µg - Micrograma
µL - Microlitro
BOD - Biochemical Oxygen Demand
COBEA - Código Brasileiro de Experimentação Animal
CCA – Centro de Ciência Animal
CCZ - Centro de Controle de Zoonoses
DIA - Diaforase
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA - Ethylene Diamine TetrAcetic Acid
ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay
FH - Fumarato hidratase
G6PD - Glicose-6-fostafo desidrogenase
GLUD - Glutamato desidrogenase
GOT - Glutamato oxaloacetato transaminase
GPI - Glicose fosfato isomerase
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
IDH- Isocitrato desidrogenase
Ig - Imunoglobulina
IgE- Imunoglobulina da classe E
IgG - Imunoglobulina da classe G
IgG1- Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2- Imunoglobulina da subclasse G2
IgM- Imunoglobulina da classe M
Kb - Kilo base
KCl - Cloreto de Pótássio
Kg - Kilograma
KCl - Cloreto de potássio
kDNA - DNA do cinetoplasto
LDU - Leishmania Donoan Units
LIMP - Laboratório de Imunopatologia
LIT - Liver infusion tryptone
LSSP-PCR- Low Stringency Single Primer/PCR
LV - Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose Visceral Canina
LVH - Leishmaniose Visceral Humana
LTA - Leishmaniose tegumentar americana
MDH - Malato desidrogenase

ME - Enzima Malica
MPI - Manose- fosfato isomerase
mM- Milimolar
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
MHOM - Mamífero homem
mg - Miligrama
mL- Mililitro
MLE - Eletroforese de multilocus enzimáticos
MON - zymodeme code of Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, Université de Montpellier, France
NaCl - Cloreto de sódio
ng - Nanograma
NHI - Nucleoside hidrolase
NNN - Meio de cultura Novy McNeal e Nicolle
NUPEB - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
OMS - Organização Mundial de Saúde
pb - Pares de bases
PBS - Phosphate buffered saline
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PGM - Fosfoglicomutase
pH - Potencial hidrogeniônico
pmol - picomol
RAPD - Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
RIFI - Reação de imunofluorescência indireta
SSR - PCR - PCR Ancorada a repetições de sequências simples
TBE - Tris borato EDTA
Th1 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2 e IFN-γ)
Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP - Universidade Federal de Ouro
UFVJM - Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri
UPGMA - Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
WHO World Health Organization - Organização Mundial de Saúde
6PGD-6-fosfogluconatodesidrogenase

Resumo

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada por *Leishmania infantum* e os cães tem sido considerados como os principais responsáveis pela dispersão da doença. A LVC pode se manifestar com diferentes formas clínicas, variando desde uma infecção de caráter assintomático até uma forma sintomática grave, a qual na maioria das vezes culmina com a morte dos animais. O presente estudo empregou ferramentas biotecnológicas para avaliar características biológicas, bioquímicas e genéticas em dez cepas de *Leishmania spp.* isoladas de cães naturalmente infectados, portadores de diferentes formas clínicas (assintomática ou sintomática) da LVC, buscando identificar fenótipos de virulência e patogenicidade. Todos os isolados obtidos foram submetidos às seguintes avaliações: (i) comportamento em meio de cultivo (LIT); (ii) infectividade e patogenicidade mediante infecção experimental no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*); (iii) análise bioquímica por meio de perfil de isoenzimas; (iv) identificação da espécie de *Leishmania* por PCR-RFLP; (v) RAPD-PCR para identificação de possíveis polimorfismos genéticos. Os resultados demonstram que os isolados de *Leishmania* obtidos de cães com ambas formas clínicas, apresentam fenótipos de crescimento diferenciados. Apesar da baixa taxa de infectividade obtida pela infecção experimental em hamster, foi possível selecionar dois isolados (I-3 e I-8), com diferentes potências de infectividade quando comparados aos demais isolados e a cepa de referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). As análises dos perfis enzimáticos (G6PD, IDH, GDH, MDH, ME e 6PGD), demonstraram que os isolados obtidos tanto de cães sintomáticos como assintomáticos apresentam padrões similares em relação ao número e migração das bandas eletroforética quando comparados com a cepa de referência de *L. infantum*. A PCR-RFLP demonstrou que nove isolados apresentaram perfil idêntico ao observado para cepa de referência de *L. infantum*, enquanto um isolado apresentou perfil semelhante ao da espécie *L. amazonensis*. Com o intuito de identificar características genéticas entre os isolados, que pudessem ser associadas com as formas clínicas da LVC foi empregada a técnica de PCR-RAPD. Os resultados obtidos permitiram a construção de um fenograma consenso gerado pelos iniciadores (M13-40F, QG1, L15995, K7, P53-1), demonstraram que maioria dos isolados apresentavam perfil genético semelhante ao da cepa de referência de *L. infantum*, sem diferenças significativas entre isolados obtidos de cães sintomáticos e assintomáticos. O conjunto de resultados obtidos no presente estudo vem contribuindo para um melhor entendimento das características biológicas, bioquímicas e genéticas de cepas de *L. infantum* oriundas de cães naturalmente infectados, portadores de diferentes formas clínicas da LVC.

Abstract

In Brazil, Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is caused by *Leishmania infantum* parasites and infected dogs have been the ones responsible for the spread of the disease in large Brazilian cities. CVL manifests itself as a broad clinical spectrum ranging from asymptomatic infection to patent severe disease, which mostly culminates on death. The main goal of this work was the employment of biotechnological tools to evaluate biochemical and genetic profiles of ten *Leishmania spp.* strains, isolated from naturally-infected dogs presenting the asymptomatic and symptomatic clinical forms of the disease. Our major focus was the identification of phenotypes associated to virulence and pathogenicity. To accomplish this goal all isolates underwent the following assessments: (i) evaluation of parasite growth in culture medium (LIT); (ii) measurement of parasite infectivity and pathogenicity in the hamster model; (iii) determination of the iso-enzymatic profile; (iv) PCR-RFLP for species identification, and (v) RAPD-PCR for identification of possible genetic polymorphisms. Our results revealed that all isolates from both asymptomatic and symptomatic groups exhibited different *in vitro* growth curves. Despite the low rate of infectivity in the experimental hamster model of infection, we have selected two strains (I-3 and I-8) with differing potential for infection when compared to the reference *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) and to other isolates. Analyses of the enzymatic systems (G6PD, IDH, GDH, MDH, ME and 6PGD) employed herein demonstrated that the isolates from symptomatic and asymptomatic dogs presented similar patterns in respect to the number of bands and electrophoretic profile when compared to the *L. infantum* reference strain. The PCR- RFLP technique revealed that nine out of ten isolates presented a RFLP profile identical to the *L. infantum* reference strain. For the remaining isolate, a RFLP profile similar to the *L. amazonensis* species was obtained. At last, RAPD-PCR analyses of the isolates enabled the construction of a consensus phenetic tree generated using five primers (M13-40F, QG1, L15995, K7, P53-1). In this experiment we demonstrated that most isolates displayed genetic profiles similar to the *L. infantum* reference strain, with no meaningful distinction between the isolates from symptomatic and asymptomatic dogs. The data obtained in this study have contributed to a better understanding of the biological, biochemical and genetic profiles of *L. infantum* strains isolated from naturally-infected dogs with different clinical forms of CVL.

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitos protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903; Lainson & Shaw, 1987). Neste sentido, são consideradas um conjunto de síndromes complexas e multifacetada, que apresentam um amplo espectro de formas clínicas que podem se manifestar através de lesões ulceradas na pele, inflamação destrutiva na mucosa ou infecção visceral disseminada para órgãos linfóides (Nylen & Sacks, 2007).

As leishmanioses são endêmicas nos continentes africano, asiáticos, europeu e americano, com ocorrência em áreas de clima temperado e tropical. A estimativa anual de incidência da doença, no mundo, é de aproximadamente 1,5 a 2 milhões de casos, com mais de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (Croft *et al.*, 2001; Desjeux, 2004). A leishmaniose visceral (LV) forma mais grave da doença, ocorre mais especificamente em 65 países, sendo que 90% dos casos afetam populações pobres que residem em áreas rurais ou suburbanas de países como: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (Desjeux, 2004).

Os fatores que influenciam a prevalência e a forma da doença incluem a espécie do parasito, o inseto vetor, reservatórios e hospedeiros bem como a elevada diversidade de ecossistemas (Lainson & Shaw, 1987). As leishmanioses são transmitidas pela picada vetores pertencente à ordem Díptera, família Psychodidae (Martins *et al.*, 1978), pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (World Health Organization – WHO, 2003). Os agentes etiológicos são representados por aproximadamente 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. No novo mundo, a leishmaniose pode se manifestar na forma cutânea causada pelas espécies dos Sub-Gêneros *Viannia* e *Leishmania*. A forma visceral da doença é causada principalmente pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* considerada por muitos pesquisadores sinonímia de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, devido às semelhanças bioquímicas e genéticas (Mauricio *et al.*, 2000, Lukes *et al.*, 2007). Esses autores sugeriram que estas espécies possam ser apenas uma, que foi provavelmente introduzida em nosso continente por colonizadores europeus. Atualmente o Organização Mundial de Saúde já considera apenas duas espécies neste subgênero (*L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*) (WHO, 2010a; 2010b).

Ao analisar o conjunto de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, que podem ser consideradas agentes etiológicos de diversas manifestações clínicas das

leishmanioses, é possível identificar uma série de reservatórios primários dentre mamíferos silvestres, como roedores, raposas, gambás, canídeos, edentados, primatas (Ashford, 1996; Gramiccia & Gradoni, 2005). Contudo, devido ao crescente processo de domiciliação do ciclo zoonótico, animais sinantrópicos e domésticos tem assumido importante papel como reservatórios do parasito, dentre os quais se destaca o cão (*Canis familiaris*) no contexto da LV (Palatinik-de-Souza *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Quinnell *et al.*, 2009).

Muitas espécies de *Leishmania* isoladas de hospedeiros vertebrados e invertebrados têm sido descritas e caracterizadas na literatura por meio de estudos que abordam aspectos clínicos, epidemiológicos e relacionados às características e comportamento biológicos do parasito (Lainson & Shaw, 1987, 1988). Recentemente, os métodos bioquímicos, moleculares e imunológicos têm sido amplamente utilizados como ferramentas adicionais aos estudos filogenéticos; e contribuíram de forma significativa na confirmação de muitas espécies, inclusão e/exclusão de outras (Grimaldi *et al.*, 1991; Thomaz-Sccol *et al.*, 1993; Cupolillo *et al.*, 1994, 1995; Botilde *et al.*, 2006; Routureau *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2010; Schonian *et al.*, 2010).

A caracterização das espécies causadoras das leishmanioses é um fator de suma importância para realização de um diagnóstico e um prognóstico correto da doença. Além disto, a filogenia moderna calcada em pilares da biologia molecular, bioquímica e genética de população de parasitos tem influenciado em diversas decisões que abrangem aspectos relacionados à epidemiologia, tratamento e medidas de controle da doença (susceptibilidade e resistência a drogas); além de contribuir para um melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro (Tibayrenc & Ayala, 2002; Oliveira *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006; Schonian *et al.*, 2010).

Considerando que (i) o ciclo epidemiológico rural e urbano da leishmaniose visceral no Brasil apresenta caráter zoonótico; e que (ii) o cão como principal reservatório doméstico do parasito, principalmente para a espécie responsável pela forma visceral da doença (*L. infantum*); este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Leishmania spp* oriundos de cães portadores de diferentes formas clínicas da leishmaniose visceral canina (LVC). Para alcançar este objetivo foram usados métodos biológicos como a avaliação de curvas de crescimento do parasito em meio de cultura e capacidade de infecção e multiplicação do parasito *in vivo*; além de técnicas isoenzimática e moleculares para identificar cepas com diferentes padrões genéticos (de virulência e patogenicidade), tentando associá-las com a evolução clínica na LVC.

No presente estudo, será utilizada a denominação de *L. infantum* para o agente etiológico da LV, considerando que nenhum encontro oficial de taxonomistas foi ainda realizado com intuito de oficializar novas propostas de nomenclatura desta espécie e seguindo as diretrizes do último manual da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Shaw, 2006; WHO, 2010b).

2.1 - As Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas umas das principais doenças negligenciadas no mundo e constituem um complexo de doenças parasitárias que afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o planeta (Desjeux, 2004). As diferentes manifestações clínicas da doença são devidas principalmente às diferentes espécies do parasito e o estado imunológico do hospedeiro.

De acordo com a OMS as leishmanioses podem ser organizadas em quatro grupos clínicos: leishmaniose cutânea (LC), cutânea difusa (LCD), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). A LC é considerada de baixa gravidade, sendo caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas que freqüentemente apresentam cura espontânea. A LCD é caracterizada por lesões difusas não ulceradas por toda a pele, sendo mais freqüente em indivíduos com comprometimento da resposta imune celular. A gravidade desta forma deve-se a lesões disseminadas e dificuldade no tratamento. A LMC pode causar extensiva destruição da cavidade nasal-oral e faringiana com lesões desfigurantes. A forma mais grave é a LV, caracterizada por febre alta, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia (Alencar & Neves, 1982; Desjeux, 2004; WHO, 2010b).

Atualmente, a coinfeção *Leishmania* e HIV (*Human Immunodeficiency Vírus*) tem sido descrita como um grande problema de saúde pública que requer uma atenção imediata, pois pacientes coinfectados, principalmente os acometidos pela forma visceral, apresentam recidivas que culminam geralmente com o óbito (Alvar *et al.*, 2008; Ezra *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime® e stibogluconato de sódio-Pentostan®, que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento. Como tratamentos alternativos no Brasil, são utilizadas a anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina B - lipossomal e anfotericina B - dispersão coloidal), as pentamidinas (sulafto e mesilato) e imunomoduladores (Gontijo & Melo 2004; Moore & Lockwood, 2010; Murray, 2010).

2.2 - Leishmaniose Visceral (LV)

Dentre as diversas manifestações clínicas das leishmanioses, grande destaque é dado para a forma visceral. A LV é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo 2004). Trabalho realizado por Desjeux (2004) relata que 59.000 pessoas morrem anualmente de LV sendo, 35.000 homens e 24.000 mulheres.

No Brasil, entre os anos de 1980 e 2005 foram registrados cerca de 59 mil casos de leishmaniose visceral (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Inicialmente, no Brasil, a LV era concentrada em áreas rurais pobres da região nordeste do país. Entretanto, desde 1980 os padrões epidemiológicos da doença têm sido modificados e a LV passou a ocorrer em grandes centros urbanos como Belo Horizonte, Campo Grande, Natal entre outras (Jeronimo *et al.*, 1994; Profeta-da-luz *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2006). Inúmeros fatores contribuem para o aumento da LV em grandes centros urbanos, dentre os quais se destacam o desmatamento, a migração populacional de áreas rurais endêmicas para os centros urbanos, as precárias condições socioeconômicas em áreas de vilas e favelas, com articulação dessas áreas com o ambiente rural, adaptação do vetor ao ambiente doméstico, mudanças climáticas, seleção de cepas resistentes aos fármacos de escolha para o tratamento e a subnutrição (Reithinger & Davies, 2002; Desjeux, 2004; Cardenas *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que o aumento da LV nos grandes centros tem forte relação com a participação de animais do peridomício no ciclo de transmissão da doença, pois o inseto vetor passou a utilizar estes animais como recurso para obtenção de alimento. Desta maneira, animais como o cão, vêm assumindo importante papel no ciclo epidemiológico da LV (Baneth *et al.*, 2008).

2.3 - Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Várias espécies de mamíferos naturalmente infectados por parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos na literatura, contudo, em áreas endêmicas, os cães são considerados os principais reservatórios para a leishmaniose visceral humana (LVH) (Palatinik-de-Souza *et al.*, 2001; Werneck *et al.*, 2006; Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Na literatura científica, diversos estudos têm demonstrado que cães podem ser naturalmente

infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, tais como *L. (L.) major* (Elbihari *et al.*, 1987), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Tolezano *et al.*, 2007), *L. (L.) infatum* (Palatinik-de-Souza *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Dantas-Torres & Brandão Filho, 2006; Quinell *et al.*, 2009), *L. (V.) braziliensis* (Aguilar *et al.*, 1989; Madeira *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007).

No Brasil, a prevalência da forma visceral da doença em cães, conhecida por LVC, em áreas endêmicas, varia de aproximadamente de 9% a 18% (França-Silva *et al.*, 2003; Malaquias *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento da história natural da LVC é observado o aparecimento de diversos sinais clínicos que incluem: lesões de pele (dermatites exfoliativas e ulcerações), opacificação do pêlo, linfadenopatia local ou generalizada, perda de peso, anorexia, anemia, conjuntivites, diarreia, onicogribose, apatia, caquexia, paresia dos membros posteriores e falhas renais, que na maioria das vezes culminam com a morte do cão (Mancianti *et al.*, 1988; Pumarola *et al.*, 1991; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Giunchetti *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009). Os sinais clínicos associados LVC podem aparecer de forma progressiva, onde animais que apresentam de 1 à 3 sinais clínicos (e.x. linfadenopatia, perda de peso moderada, opacificação do pêlo) são considerados como oligossintomáticos, animais que apresentam mais de 3 sinais clínicos (e.x. anorexia, onicogribose, ceratoconjuntivite, paresia dos membros posteriores) são ditos como sintomáticos e em alguns casos, os animais que não apresentam sinais clínicos evidentes, são denominados de assintomáticos (Mancianti *et al.*, 1988). Alguns destes sinais clínicos da leishmaniose visceral canina podem ser visualizados na **Figura 1**.

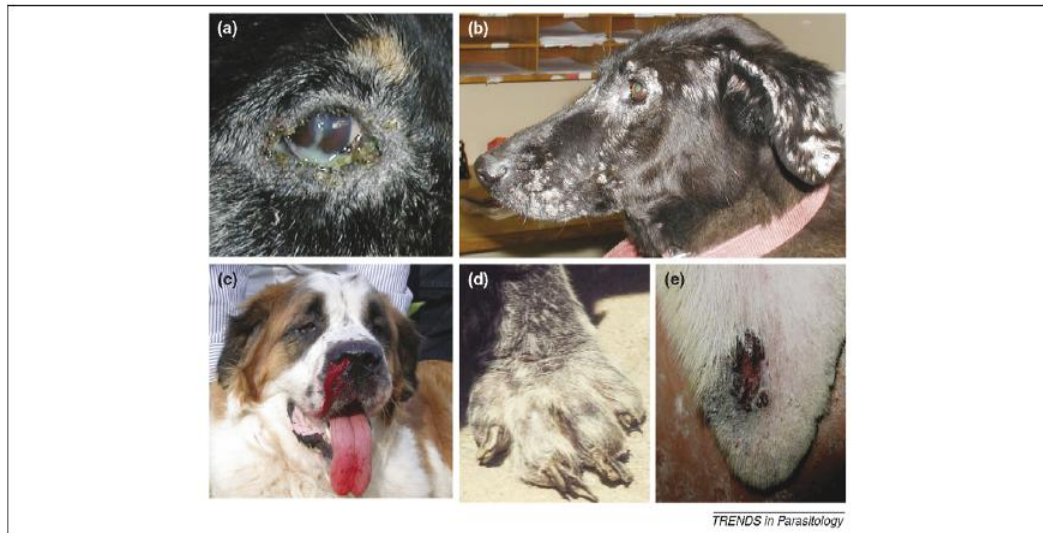
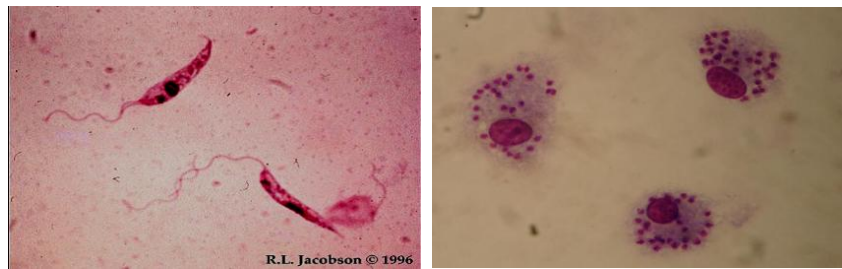


Figura 1: Manifestações clínicas de cães sintomáticos para leishmaniose: (a) ceratoconjuntivite com dermatite periocular, (b) lesão facial da pele com dermatite exfoliativa multifocal, (c) epistasia, (d) onicogribose, (e) lesão de ponta de orelha (Baneth *et al.*, 2008).

Um ponto importante a ser considerado é que, tanto animais sintomáticos quanto assintomáticos pode ser fonte de infecção para o inseto vetor, permitindo a transmissão do parasito para o homem e para outros vertebrados (Molina *et al.*, 1994). A maioria dos focos de LVH no Brasil está intimamente relacionada às áreas onde se encontram altos índices de soroprevalência canina. Desse modo, esses animais são considerados o principal reservatório urbano do parasito, apresentando uma posição de destaque na cadeia epidemiológica devido à sua proximidade com o homem, seja no ambiente doméstico ou peridoméstico (Moreno & Alvar, 2002; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Giunchetti *et al.*, 2006; Dantas-Torres, 2007; Baneth *et al.*, 2008).

2.4 - Agente etiológico

O protozoário causador das leishmanioses apresenta um ciclo de vida heteroxênico, alternado sua forma evolutiva entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado. O hospedeiro invertebrado é representado por insetos vetores pertencente à ordem Díptera, família Psychodidae (Martins *et al.*, 1978), pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. No seu ciclo evolutivo são observadas duas formas principais (**Figura 2**): as promastigotas (1-A), células flageladas alongadas encontradas no intestino médio do vetor e; amastigotas (1-B), constituindo-se de células imóveis, ovóides, com flagelo rudimentar encontradas no interior de fagócitos mononucleados de mamíferos, sendo responsáveis pela patologia da doença (Bates, 1994).



<http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/WhatIsLeishmaniasis.html>

<http://www.cambridgemedicine.org/imageexplain/2011-03#pollfield-102-0>

Figura 2: Formas *Leishmania spp.* : promastigotas (1-A) e amastigotas (1-B).

Os hospedeiros vertebrados são representados por mamíferos de diferentes espécies, abrangendo diversas espécies de roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça), marsupiais (gambás), canídeos e primatas (Lainson & Shaw, 1988). A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre após a picada das fêmeas de flebotomíneos que inoculam as formas promastigotas metacíclicas (Killick-Kendrick, 1990). Estas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, representadas principalmente pelos macrófagos e diferenciam-se em formas amastigotas no fagolisossomo (Peters & Sacks, 2006). As amastigotas interiorizadas realizam divisão binária e rompem a célula, podendo reinovar outros macrófagos, células dendríticas e até mesmo fibroblastos (Nader & Mcconville, 2008).

Durante novo repasto sanguíneo, macrófagos infectados com as formas amastigotas são ingeridos pelo vetor. Uma vez transformadas em promastigotas, estas exibem uma distribuição preferencial dentro do trato digestório do vetor, formando “micro-habitats” (Lainson & Shaw, 1987). Cerca de 2-5 dias depois, as formas promastigotas procíclicas

diferenciam-se em metacíclicas, que se desligam do epitélio intestinal. Em seguida, estas migram em direção a porção anterior do intestino de onde serão transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (Descoteaux & Turco, 1999).

Dentro do contexto do ciclo de vida do parasito, o mecanismo de reprodução e geração de diversidade genética do gênero tem causado nos últimos vinte anos, amplas pesquisas e discussões. Duas hipóteses têm sido debatidas, onde a primeira tem colocado que os parasitos apresentam uma reprodução clonal (teoria clonal) (Tibayrenc *et al.*, 1993); e a segunda que defende a reprodução sexual destes parasitos (Akopyants *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2010). Apesar das divergências e discussões, o entendimento da geração de diversidade genética nas populações de *Leishmania* é vital para a compreensão dos mecanismos relacionados com epidemiologia, virulência, tropismo tecidual e resistência a fármacos.

Desde a primeira descrição do gênero *Leishmania* realizada por Ross em 1903, o número de espécies do parasito tem sido variado. Acredita-se que das 30 espécies conhecidas, cerca de 20 são capazes de infectar os seres humanos e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (Ashford, 2000). Os primeiros estudos que permitiram a classificação e distinção das espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* eram baseados em parâmetros clínicos, biológicos, geográficos e epidemiológicos, e posteriormente através de critérios imunológicos, isoenzimáticos e moleculares (Lainson *et al.*, 1987; Schonian *et al.*, 2010).

2.5 – Caracterização do gênero *Leishmania*

Atualmente, a classificação taxinômica de *Leishmania* é feita pela técnica de Eletroforese de Multilocus Enzimáticos (MLEE) conhecida como isoenzimas, descrita por Rioux *et al.* (1990) e considerada padrão-ouro para a classificação. Na década passada, com desenvolvimento e evolução das técnicas do DNA-recombinante, inúmeras seqüências de DNA tornaram-se potenciais alvos para estudos de taxonomia e filogenia. Considerando o gênero *Leishmania*, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), possibilitou um grande avanço na elaboração de testes de diagnósticos mais sensíveis, rápidos e eficazes (Lachaud *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2007). Além disto, as variações da técnica de PCR, tais como o Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP) e a Amplificação Randômica do DNA (RAPD), permitiram distinção entre as

diferentes espécies e cepas do parasito (Martinez *et al.*, 2003; Volpini *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2006; Botilde *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Montalvo *et al.*, 2008; Quaresma *et al.*, 2009; Hamad *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010).

2.5.1 - Caracterização Biológica gênero *Leishmania*

As primeiras metodologias empregadas na classificação e identificação dos parasitos do gênero *Leishmania* eram baseadas em características como manifestações clínicas e aspectos biológicos como: o ritmo de crescimento em diferentes meio de cultura, o local de desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor, entre outras (Grimaldi & Tesh, 1993).

Um importante marco para a classificação dos parasitos do gênero *Leishmania* foi avaliação do desenvolvimento destes no trato digestório do inseto vetor. Lainson & Shaw nas décadas de 70 e 80 realizaram importantes estudos com base no ciclo intravetorial que levaram a um rearranjo sistemático na classificação. Foram descritas as regiões hipopilaria, peripilaria e suprapilaria onde se dava a reprodução do parasito no tubo digestório do inseto vetor; e proposta, desta forma, uma nomenclatura trinomial e o rearranjo das espécies em complexos (Lainson & Shaw, 1972, 1979). Para os parasitos que se desenvolviam na região peripilaria foi criado o subgênero *Viannia* (Lainson & Shaw, 1977) e posteriormente foi criado o subgênero *Leishmania* para os parasitos que se desenvolviam na suprapilaria (Safyanova, 1982). Na região hipopilaria é encontrado um gênero independente, *Sauroleishmania*, representando os parasitos dos répteis (Killick-Kendrick *et al.*, 1986).

Trabalhos envolvendo o cultivo *in vitro* do parasito em variados meios de cultura bem como a infecção *in vivo* em diferentes modelos experimentais (ex: camundongos, hamsters e cão), contribuíram significativamente para entendimento da história natural da doença (Nolan & Herman, 1985; Limoncu *et al.*, 1997; Mendez *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2006). Tendo a LV como a forma mais devastadora das leishmanioses, inúmeros grupos de pesquisas têm buscado cada vez mais por modelos experimentais que mimetizam a patogênese encontrada nos seres humanos e que possibilitem a elaboração de melhores estratégias de tratamento e prevenção da doença. Entre estes modelos experimentais, camundongos, hamsters e o cão têm sido empregados de maneira satisfatória para compreensão das leishmanioses no âmbito da imunologia, patologia, tratamento e desenvolvimento de vacinas (Garg *et al.*, 2006).

Modelos murinos para o estudo experimental das leishmanioses têm sido bem estabelecidos na comunidade científica. A dicotomia das respostas imunológicas Th1 e Th2 foi amplamente estudada em modelos murinos da linhagem C57BL/6 e BALB/c, através da infecção experimental por diferentes cepas e espécies de *Leishmania* (Howard *et al.*, 1980; Murray *et al.*, 1987).

O modelo hamster tem sido empregado como modelo experimental para LV dado a sua susceptibilidade à infecção por *L. donovani*. A infecção experimental neste modelo leva ao aumento da carga parasitária tecidual, principalmente em órgãos como o baço e o fígado; caquexia; hepatoesplenomegalia; pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Esta infecção reproduziu, de maneira semelhante, as alterações clínicas patológicas encontradas no homem (Pearson *et al.*, 1996).

Outro modelo experimental amplamente estudado é o cão, considerado por alguns pesquisadores um dos melhores modelos para o estudo da LV no âmbito da imunologia e desenvolvimento de vacinas (Moreno & Alvar, 2002; Molano *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2009, 2010).

2.5.2 - Análise de Isoenzimas

O termo isoenzima refere-se a um grupo de múltiplas formas moleculares de uma mesma enzima como resultado da existência de mais de um gene codificando cada uma das formas, este termo foi empregado primeiramente em trabalhos publicados por Hunter & Marketer (1957). A premissa básica adotada ao se utilizar dados enzimáticos é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que estas diferenças possuam base genética (Murphy *et al.*, 1990).

O primeiro estudo, empregando a análise de isoenzimas em *Leishmania*, foi realizado por Gardener *et al.* (1974). Estes autores analisaram o perfil de mobilidade da enzima Malato desidrogenase (MDH). Atualmente, a técnica de isoenzimas é considerada o padrão-ouro de classificação, pois permite a discriminação entre cepas e espécies do gênero *Leishmania*. Contudo essa técnica apresenta algumas desvantagens, visto que a mesma é muito laboriosa e que é necessário obter um elevado número de parasitos para sua realização (Rioux *et al.*, 1990).

Segundo Godfrey *et al.* (1976) as cepas de microorganismos que apresentam um mesmo perfil de isoenzimas formam um zimodema. As classificações e distinção entre os diferentes tipos de zimodemas em *Leishmania*, são feitas pelo laboratório de referência da OMS representado pelo *Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier, France*, que utilizam cerca de 15 sistemas enzimáticos para classificação do gênero. Esses sistemas são: DIA (diaforase), (NADH diaphorase), FH (fumarato hidratase), G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase), GLUD (glutamato desidrogenase), GOT1 e GOT2 (glutamato-oxaloacetato transaminase), GPI (glicose-fosfato-isomerase), IDH (isocitrato desidrogenase), MDH (malato desidrogenase), ME (enzima malica), MPI (manose-fosfato isomerase), NHI e NHD (nucleosídeo hidrolase), 6PGD (6-fosfogluconato desidrogenase) e PGM (fosfoglicomutase) (Lanotte *et al.*, 1981; Rioux *et al.*, 1990).

O emprego da técnica de isoenzimas na taxonomia de *Leishmania* possibilitou a descoberta de um estimável grau de diversidade enzimática entre as diferentes espécies do parasito e uma variabilidade expressivamente menor, ou mesmo não detectável, entre membros de um mesmo complexo (Kreutzer & Christensen, 1980; Grimaldi *et al.*, 1991; Tibayrenc, 2009). Segundo a classificação dada pelo *Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire*, a espécie *L. infantum*, está inserida dentro do zimodema denominado de MON-1, que é o principal zimodema que abriga cepas do parasito que causam leishmaniose visceral tanto o homem como no cão (Martín-Sánchez *et al.*, 2004).

Uma das dificuldades do emprego da isoenzimas está no elevado número de parasitos necessários para obtenção do extrato enzimático. Além disso, vários estudos têm demonstrando uma baixa eficiência dessa técnica em discriminar as cepas dessa espécie, quando comparadas a outros marcadores genéticos, dificultando muitas vezes o entendimento de aspectos relacionados a essa doença. Dentro deste contexto novas técnicas isoenzimáticas e moleculares para caracterização de *Leishmania* têm sido descritas e comparadas de forma sistemática com intuito de se obter um melhor entendimento deste complexo grupo de organismos (Botilde *et al.*, 2006; Schonian *et al.*, 2010).

2.5.3 - Marcadores baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O desenvolvimento da técnica de PCR, descrito por Kary Banks Mullis em 1983, representou um importante marco para estudos de biologia molecular, pois possibilitou a síntese *in vitro*, de grande quantidade de um determinado fragmento de DNA. A PCR possibilitou enorme progresso nas áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense, estudos genéticos entre muitas outras áreas da Biologia (Mullis *et al.*, 1986; 1987; 1990).

Nos estudos das leishmanioses, a PCR foi empregada inicialmente como um método rápido e sensível para diagnóstico, sendo empregado para detecção do DNA do parasito em amostras biológicas de sangue, baço, pele, linfonodo e medula (Lachaud *et al.*, 2002; Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2007).

Em *Leishmania* muitas seqüências de DNA têm sido empregadas como potenciais alvos para realização do diagnóstico, sendo DNA do cinetoplasto ou kDNA, um dos mais utilizados (Rodgers *et al.*, 1990). De acordo com Rodgers (1990), o kDNA é constituído por duas moléculas distintas: os minicírculos de cerca de 1 Kb e os maxicírculos com cerca de 36 Kb. Os minicírculos de kDNA são ótimos alvos para técnicas de replicação molecular, pois apresentam regiões com grande homologia de nucleotídeos entre as espécies de *Leishmania*, conhecidas como região conservada do minicírculo de kDNA, que possui aproximadamente 120 pb. Utilizando-se iniciadores complementares às seqüências conservadas dos minicírculos, é possível a detecção pela PCR de até 1% do kDNA de 1 parasito do subgênero *L. Leishmania* sp. (Rodgers *et al.*, 1990; Degraeve *et al.*, 1994; Noyes *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2008).

Além de ser empregada como um poderoso teste de diagnóstico, a PCR possui variações que tem sido amplamente utilizadas para estudos de taxonomia e filogenia de *Leishmania*, dentre as quais, grande destaque é dado para Amplificação Randômica do DNA, conhecida como RAPD (Williams *et al.*, 1990), e para as análise de Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição, denominados de RFLP (Botstein *et al.*, 1980). O uso de alvo como os microssatélites na PCR, têm sido uma poderosa ferramenta em análises de genotipagem e distinção de cepas de *Leishmania* que afetam diferentes hospedeiros em uma mesma área endêmica (Montoya *et al.*, 2007).

2.5.4 - Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD)

Uma das técnicas que derivaram da PCR foi à técnica da Amplificação Randômica do DNA, conhecida como RAPD, foi descrita quase que simultaneamente pelos pesquisadores Welsh & McClelland e Williams *et al*, durante a década de 90. Estes pesquisadores estudaram o emprego desta técnica como um importante marcador molecular para identificar polimorfismos em uma ampla variedade de organismos. Segundo Williams a técnica apresenta inúmeras vantagens quando comparada a outras, como por exemplo, a RFLP, pois a mesma permite empregar iniciadores universais que podem ser utilizados por um amplo grupo de organismos. É um método de baixo custo, sensível, rápido, relativamente simples e que revela vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de seqüências-alvo.

O polimorfismo dos marcadores RAPD é revelado pela amplificação de locos cromossômicos usando-se iniciadores compostos de seqüências curtas de oligonucleotídeos (aproximadamente 10). Na reação de amplificação, estes iniciadores quando submetidos a condições de baixa temperatura de anelamento (37 a 42°C) produzindo reação de baixa especificidade, estes iniciadores hibridizam com seqüências genômicas que lhes são complementares. Essas características permitem que o iniciador se anele em diversos locos, gerando múltiplas bandas no gel (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). O polimorfismo genético detectado por marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. A técnica de RAPD permite gerar uma grande quantidade de polimorfismos de segmentos de DNA distribuídos por todo o genoma do organismo sem o prévio conhecimento das seqüências alvos (Ferreira & Grattapalia, 1995; Perreira *et al.*, 2008).

Em *Leishmania*, a PCR-RAPD tem sido empregada como uma técnica válida para identificar polimorfismos genéticos dentro e entre as diferentes espécies de *Leishmania*, servindo como um poderoso marcador molecular nos estudos de taxonomia e filogenia (Hide *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2003; Zemanova *et al.*, 2004; Hamad *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010). Trabalho publicado por Carvalho *et al.* (2006) demonstrou que a RAPD é uma técnica que permitiu distinguir diferenças genéticas entre cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* oriundas de diferentes estados do Brasil, demonstrando que fatores ambientais e geográficos também afetam a diversidade

do parasito e que estes influenciam diretamente os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença.

Contudo, a RAPD, apresenta algumas desvantagens em relação a outros marcadores moleculares, entre as quais se destaca a baixa reprodutibilidade e ausência de dominância, uma vez que o mesmo comporta-se como marcador dominante, o que impossibilita a distinção entre genótipos heterozigotos (Clark & Lanigan, 1993; Hallden *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 2002).

2.5.5 - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP)

A técnica de RFLP é eficiente na identificação de diferentes espécies de *Leishmania* (Volpini *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2006; Quaresma *et al.*, 2009; Ben Abda *et al.*, 2011). A aplicação da PCR-RFLP requer uma pequena quantidade de DNA e permite a diferenciação entre as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Andrade *et al.*, 2006).

Na PCR-RFLP, após a amplificação de um locus, o amplicon é tratado com uma endonuclease de restrição. Se o local de reconhecimento para essa enzima está presente no amplicon, dois ou mais fragmentos de restrição são gerados. Assim, a variação da sequência entre os indivíduos no local de reconhecimento(s) pode ser detectada por eletroforese.

Volpini *et al.* (2004) ao realizar a amplificação da região conservada do minicirculo do cinetoplasto (mKDNA) que possui 120 pares de base (bp) em diferentes amostras biológicas de *Leishmania spp.* (obtidas de cultura ou de biopsias de lesão) e posterior digestão pela endonuclease Hae III, verificaram diferentes padrões de restrição para cada espécie do parasito. As amostras que não apresentavam restrição, isto é, matinha no gel os 120 pb após a digestão por Hae III pertenciam a espécie *L. amazonensis*. Por outro lado, as amostras que apresentavam perfil de restrição de tamanhos de 80 e 40 pb pertenciam a espécie *L. braziliensis* e por fim as amostras que possuíam fragmentos de 120, 80, 60 e 40 pb pertenciam a espécie *L. infantum*. Esses resultados demonstram que a PCR-RFLP pode ser usado como uma técnica rápida, prática e segura para identificação de espécies de *Leishmania* em diferentes amostras biológicas. Hajjarian *et al.* (2011) avaliando amostras obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea, demonstraram que a PCR-RFLP pode ser utilizada como uma poderosa técnica

de diagnóstico e prognóstico uma vez que permiti a identificação da espécie do parasito, possibilitando a prescrição do tratamento mais apropriado.

Além de ser uma técnica para identificação de espécies de *Leishmania*, a PCR-RFLP permite a realização de estudos que visam avaliar a diversidade genética do parasito isolado em diferentes hospedeiros (homem, cão e flebotomíneos) oriundos de diferentes regiões geográficas (Cortes *et al.*, 2006). Entretanto, a principal desvantagem da PCR- RFLP está relacionada à existência de mutações para o sítio de restrição enzimática. Estas mutações podem levar a obtenção de falsos resultados devido ao ganho ou perda nos fragmentos de restrição (Perreira *et al.*, 2008).

A LVC no Brasil destaca-se como um importante problema de saúde pública, principalmente pelo crescente processo de urbanização da doença. Considerando o cão como principal reservatório e mantenedor do parasito, torna-se fundamental a busca por novas estratégias, que permitam (i) caracterizar os isolados de *Leishmania spp* oriundos de cães naturalmente infectados, bem como (ii) identificar biomarcadores por meio de parâmetros moleculares e isoenzimáticos que possam estar correlacionados com fatores de virulência e patogenicidade. Neste trabalho foram utilizadas técnicas biológicas, isoenzimáticas e moleculares com intuito de caracterizar isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados, em diferentes regiões do estado de Minas Gerais - Brasil. Além disso, estas cepas foram estudadas em relação aos seus comportamentos *in vitro* e *in vivo*, pois estes são fundamentais na identificação de cepas com diferentes padrões de virulência, o que possibilitará a associação destas com a evolução clínica na LVC. A identificação de marcadores biológicos (Biodema) do parasito, como infectividade, tropismo e virulência (carga parasitária) são ferramentas complementares neste processo. Desta forma, a realização deste trabalho de caracterização biológica, isoenzimática e molecular destes isolados representa a etapa inicial na seleção de cepas a serem utilizadas em diferentes processos biotecnológicos tais como: ensaios de testes de resistência ou susceptibilidade à diferentes drogas empregadas no tratamento da LV. Além disto, este trabalho pretende selecionar cepas que possam ser empregadas em ensaios de bioprospecção de novos fármacos e de potenciais candidatos vacinais.

4 - Objetivos

4.1 - Objetivo Geral

Empregar ferramentas biotecnológicas para avaliar características biológicas, isoenzimáticas e genéticas em isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados, buscando identificar fenótipos de virulência e patogenicidade.

4.2 - Objetivos Específicos

4.2.1 - Selecionar cães portadores de diferentes formas clínicas da Leishmaniose Visceral Canina (Assintomáticos e Sintomáticos).

4.2.2 - Isolar os parasitos do gênero *Leishmania spp.* dos cães previamente selecionados.

4.2.3 – Caracterizar molecularmente os isolados por meio de PCR, PCR-RFLP, PCR-RAPD e isoenzimas.

4.2.4 - Avaliar o comportamento da curva de crescimento das promastigotas dos isolados em relação à cepa padrão de *L. infantum* da OMS ;

4.2.5 - Avaliar a infectividade e patogenicidade dos isolados *in vivo* em hamster *Mesocricetus auratus*.

5.1 - Amostras de referência

Como padrões de espécies de *Leishmania*, foram utilizadas no presente estudo, três amostras de referência da OMS que são mantidas no criobanco de cepas do Laboratório de Imunopatologia (LIMP) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Ouro Preto. Na **Tabela 1** estão listadas as espécies de *Leishmania* utilizadas no presente estudo.

Tabela 1: Amostras de referência de *Leishmania spp.* utilizadas no presente estudo

Amostras de referência	Código internacional
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M2269
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/1974/PP75

5.2 - Seleção dos cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.*

Para realização deste estudo, foram utilizados 44 cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.*, sendo que 39 animais oriundos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Governador Valadares - MG e os demais procedentes pelo CCZ da cidade de Itabirito - MG. Todos os animais apresentavam resultado positivo para o teste de imunofluorescência indireta (RIFI). Os cães foram avaliados clinicamente por um veterinário responsável e agrupados pela forma clínica (sintomática ou assintomática) seguindo os parâmetros descritos por Mancianti *et al.* (1988).

5.3 - Características das áreas de onde foram obtidos os cães portadores de LVC

A cidade de Governador Valadares, está localizada na região do Vale do Rio Doce (18°51'01" S, 41°56'18" W), com cerca de 263.000 habitantes. É uma região de clima quente e úmido, pertencente ao bioma de Mata Atlântica, com poucas variações de temperatura durante o ano (média de 25,6°C). O período de chuvas concentra-se nos meses de Dezembro à Maio, e o período seca ocorre entre os meses de Junho à Novembro. Nos últimos anos, a cidade vem registrando aumentos nos casos de

leishmaniose, tanto em humanos como em animais domésticos. Neste contexto, Governador Valadares vem assumindo status de uma área endêmica para leishmaniose, principalmente para a LVC (Malaquias *et al.*, 2006).

Situada no quadrilátero ferrífero de Minas Gerais (20° 15' 12" S, 43° 48' 05" W) , a cidade de Itabirito, possui cerca de 45.000 habitantes, e está localizada à 45 Km da cidade de Belo Horizonte (área endêmica para leishmaniose visceral). A cidade está inserida no bioma de Mata Atlântica, possuindo clima tropical de altitude com invernos secos e verões brandos. Sua temperatura média máxima é de 26°C e a mínima de 16°C, sendo a média compensada de 21,0°C. Em relação às leishmanioses, segundo dados publicados no Observatório de Saúde de Minas Gerais, em Itabirito, do ano de 2001 a 2006 foram confirmados 48 casos de leishmaniose em humanos, sendo 29 casos de LTA e 19 casos de LV.

5.4 - Isolamento dos parasitos

Após os cães passarem por uma rigorosa avaliação clínica, realizada pelo veterinário responsável, foram agrupados em dois grupos clínicos: (a) cães assintomáticos animais que não apresentavam sinais clínicos associados à LVC e (B) cães sintomáticos que apresentavam mais de 3 sinais clínicos associados à LVC.

Para realizar o isolamento dos parasitos foi realizada a punção de medula conforme metodologia descrita por Penny *et al.* (1970). Antes de iniciar os procedimentos de anestesia para a punção foi administrado 0,044 mg/Kg de atropina (Fagra®, Farmagráfica S A., Brasil), por via subcutânea, com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais relacionados a depressão cardiorrespiratória do sedativo. Após 10 minutos, os animais foram tranqüilizados com Cloridrato de Xilasina 2%, (Anasedan®, Vetbrands, Brasil), na dosagem de 0,1 mL/Kg de peso por via intravenosa. Após cerca de 2 minutos, foi administrado o anestésico geral Tiopental Sódico diluído a 2,5% (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e aplicado na dose de 0,3 mL/Kg de peso por via intravenosa. Constatado o estado de anestesia geral, o cão foi posicionado sentado para a coleta no esterno ou em decúbito lateral para a coleta na crista da tíbia e após a tricotomia e anti-sepsia local (Polivinil Pirrolidona Iodo 10% -PVPI Tópico). Posteriormente, com auxílio de agulha 18G 40x12 acoplada em uma seringa descartável (BD Plastipak®, Becton Dickinson Ltda, Brasil) de 20 mL, foi posicionada verticalmente na extremidade inferior do esterno ou na crista da tíbia e, por meio de

movimentos rotatórios, foi exercida uma pressão até atingir a cavidade medular e posteriormente, procedeu-se à aspiração do material medular. Um volume máximo de 0,5 mL de medula óssea foi aspirado por coleta. Imediatamente, após a retirada da agulha, uma a duas gotas do aspirado de sangue medular foi transferido para tubos de vidro contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT próximo ao bico de Busen para evitar contaminação. Para cada animal foram feitos 3 tubos previamente identificados.

Os tubos foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e após 7 dias. Após este período as culturas foram avaliadas através da confecção de duas lâminas por em microscopia óptica a fim de se identificar a presença de formas promastigotas do parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL do meio de cada tubo e repassado para um novo tubo contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT e após 7 dias foi feita uma nova avaliação no microscópio. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes sendo que ao final de três “repiques”, sem o achado dos parasitos, as culturas eram descartadas e considerado isolamento negativo.

Para aumentar as chances de isolamento de parasitos, após a punção de medula óssea, também foi realizada a coleta de amostras de fígado e baço dos animais. Imediatamente após a punção de medula, os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico diluído a 2,5% (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) sendo administrado 25 mg/Kg por via endovenosa. Após indução de anestesia geral, foi realizada a eutanásia através da administração por via endovenosa de 15 mL de cloreto de potássio 15% (KCl). Atestado o óbito, foram iniciados então os procedimentos de necropsia para retirada de fragmentos de fígado e baço para tentativa de isolamento em meio NNN/LIT.

As amostras de fígado e baço foram coletadas utilizando lâminas de bisturi descartáveis individuais para cada tecido. A partir de cada amostra de tecido coletado, fragmentos de fígado e baço em pedaços de aproximadamente 1 cm^2 foram colocados em tubo de vidro contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT, próximo ao bico de Busen para evitar contaminação. Para cada animal foram feitos 3 tubos de cada tecido previamente identificado. O procedimento para avaliação do isolamento nestes dois tecidos foi semelhante ao descrito para a tentativa de isolamento por aspirado de medula.

5.5 - Preparação das massas para ensaios isoenzimáticos e moleculares

As cepas isoladas de cães naturalmente infectados e as cepas de referência foram expandidas em meio LIT em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os parasitos foram cultivados por 7 dias, sendo homogeneizados diariamente, para obtenção de massa úmida com aproximadamente 1×10^{10} parasitos que foram empregados na análise de isoenzimas e de biologia molecular.

O número de parasitos foi expandido por meio de repiques sucessivos em tubos de vidro de 3 mL e posteriormente em Erlenmeyers de 25 mL, 50 mL e 500 mL, respectivamente, para a obtenção final de 1×10^{10} células/cepa. Após o sétimo dia do último repique uma alíquota de 20 μL de cada cepa foi removida em capela de fluxo laminar para realização da contagem em Câmara de Neubauer. Após a contagem e verificação do número de parasitos desejados (1×10^{10}), as culturas foram transferidas para tubos de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação em 3.800g, durante 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em solução PBS estéril pH 7,2. As células foram lavadas e centrifugados por 3 vezes (3.800g, durante 10 minutos a 4°C) em solução de PBS. A massa úmida obtida foi estocada em freezer sob temperatura -70°C , até o momento do uso. Todas as massas úmidas armazenadas se encontravam na quarta “passagem” após o isolamento.

5.6 - Comportamento em meio de cultura - curvas de crescimento

As curvas de crescimento *in vitro* foram realizadas a partir de um inóculo padrão de 1×10^7 parasitos/mL dos isolados oriundos de cães naturalmente infectados, bem como da cepa de referência de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) em meio LIT acrescido de 10% de soro bovino fetal. As curvas de crescimento foram realizadas através de contagem automática no Auto Hematology Analyzer (BC-2800Vet, MINDRAY), diariamente (0-20 dias). A contagem foi realizada em triplicata e os resultados expressos na contagem diária média.

5.7 - Infecção experimental em hamster *Mesocricetus auratus*

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP, OFICIO CEP N° 009/2009 e os procedimentos utilizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

No estudo de infecção *in vivo* foi utilizada formas promastigotas de *L. infantum*, da cepa de referência da OMS (MHOM/BR/1974/PP75). As cepas isoladas de cães naturalmente infectados em meio NNN/LIT foram utilizadas para infecção experimental em hamster *Mesocricetus auratus*, com intuito de se avaliar o perfil de virulência e patogenicidade pelo parâmetro carga parasitária, em dois órgãos alvos da infecção (baço e fígado).

Para a obtenção das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento as culturas foram expandidas a partir de um inóculo inicial de 10 mL de meio LIT contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL de *L. infantum* em crescimento logarítmico, adicionadas a 40 mL de meio de cultura NNN/LIT, distribuídos sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), sendo mantidas a temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após sete dias do inóculo inicial, foram realizados o primeiro repique com os isolados, com a análise da viabilidade e ausência de agentes contaminantes com auxílio do microscópio óptico, e distribuídos os 50 mL de cultura em cinco novos Erlenmeyers nas mesmas condições do inóculo inicial (10 mL de cultura em 40 mL de meio LIT). Ao término dos sete dias, foram obtidos 250 mL da cultura na concentração de 10^7 a 10^8 promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação a $900 \times g$ durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e, em seguida, foi realizada a centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez. Após as etapas de lavagem, realizou-se a contagem do número de promastigotas, as quais se encontravam em quinta passagem.

Para os inóculos com a cepa MHOM/BR/1974/PP75 e com as obtidas de cães naturalmente infectados foi utilizada a concentração de 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de cultura que foram concentradas em volume final de

500 µL para inóculo via intraperitoneal (IP) em hamster *Mesocricetus auratus* (machos).

5.8 – Animais

Os animais utilizados possuíam idade de 12 semanas e peso corporal de aproximadamente 100g. Os animais foram mantidos no setor de experimentação em hamster do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), em temperatura entre 21 a 25° C e alojados em gaiolas apropriadas para a espécie, forradas com serragem sendo oferecidos diariamente água e ração comercial *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 4 grupos, um grupo de 5 animais representando o grupo controle não infectado, inoculado via IP com solução salina estéril (NaCl 0,85%), outro de 5 animais representando o grupo controle infectado, inoculado via IP com 1×10^7 promastigotas da cepa de referência MHOM/BR/1974/PP75. Os outros dois grupos foram divididos em animais inoculados via IP com 1×10^7 promastigotas *L. infantum* obtidas de cães naturalmente infectados portadores da forma sintomática da LVC e o segundo por isolados obtidos de cães naturalmente infectados portadores da forma assintomática da doença.

5.8.1- Necropsia dos hamsters *Mesocricetus auratus* e obtenção do material biológico para avaliação de carga parasitária

Após três meses da infecção experimental foi realizada a necropsia dos animais para obtenção de material biológico para avaliação da virulência e patogenicidade das cepas. Para os procedimentos de eutanásia e necropsia dos hamsters iniciaram após administração de anestésico Tiopental Sódico diluído a 2,5% (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) na dose de 30 mg/Kg via intraperitoneal. Depois de atingido o plano anestésico adequado foi administrado uma dose letal (120 mg/Kg) do mesmo anestésico e constatado a eutanásia iniciados os procedimentos de necropsia e obtenção do material biológico. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Fragmentos de baço e fígado foram coletados de forma asséptica e analisados macroscopicamente levando-se em considerações critérios como tamanho e

presença de lesões. Baço e fígado foram subdivididos em pequenos fragmentos sendo estes destinados a confecção de esfregaços por aposição para avaliação da carga parasitária.

5.8.2 - Diagnóstico Parasitológico e avaliação da carga parasitária

Para avaliação da carga parasitária foram realizados esfregaços por aposição em lâmina com fragmentos de baço e fígado que foram secos em temperatura ambiente e, em seguida, corados pelo corante panótico (Panótico Rápido®, Larboclin, Brasil) e avaliados por microscopia óptica para identificação diagnóstica de formas amastigotas. Nas lâminas positivas foram determinadas as cargas parasitárias conforme Reis (2001) adaptado de Stauber *et al.* (1958). Os resultados dos índices de parasitismo correspondem ao número de amastigotas/1.000 células nucleadas ou LDU – *Leishmania* *Donoan Units*.

5.9 - Análise do perfil isoenzimático dos isolados de *Leishmania spp.*

5.9.1 - Preparo das amostras utilizadas

As massas úmidas de parasito (cepa de referência da WHO e dos isolados analisados no presente estudo) foi descongelada em banho de gelo e submetida à lise osmótica em estabilizador enzimático (Ditiotreitol 2,0mM, ácido -aminocapróico 2mM, ditiotreitol 2mM, ácido etilenodiamino tetracético de sódio – EDTA 2mM, pH 7,0 a 4°C), numa relação 1;1 (p/v). O lisado permaneceu por 20min no gelo e em seguida foi centrifugado a 4000rpm durante 15min a 4°C. O sobrenadante (extrato enzimático) foi armazenado em nitrogênio líquido, a -196°C. As isoenzimas foram separadas por eletroforese horizontal, sob refrigeração, em membrana de acetato-celulose segundo a metodologia de Ben Abderrazk *et al* (1993). Após a corrida enzimática, foi aplicado sobre a membrana o revelador específico para cada enzima estudada. Os perfis eletroforéticos obtidos foram fotografados para posterior análise. Os sistemas enzimáticos utilizados no presente estudo encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sistemas enzimáticos utilizados na análise de isoenzimas

Enzima	Nomenclatura	Código da EC*
GPI	Glicose-fosfato-isomerase	5.3.1.9
6 PGD	6-fosfogluconato desidrogenase	1.1.1.44
IDH	Isocitrato desidrogenase	1.1.1.42
MDH	Malato desidrogenase	1.1.1.37
ME	Enzima malica	1.1.1.40
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase	1.1.1.49
GDH	Glutamato desidrogenase	1.4.1.2

EC* = Comissão Internacional de Nomenclatura de Enzimas

5.9.2 - Extrações de DNA das formas promastigotas

A extração do DNA para realização das técnicas de PCR foi realizada a partir de massas úmidas de parasitos obtidos na fase *log* de crescimento preparadas segundo o item 4.3. Para obtenção do DNA das amostras o *kit* de extração Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante, conforme brevemente descrito a seguir.

As massas de parasitos armazenadas em -80°C foram descongeladas para a retirada de uma alíquota de 200 µL, a este volume foi adicionado 700 µL de solução de lise celular. Em seguida a amostra foi homogeneizada por 10 minutos e centrifugada a 15.000g por um minuto em microcentrífuga (Eppendorf® - Modelo 5418, NY, USA). Posteriormente foi descartado o sobrenadante e o precipitado agitado com o auxílio de vórtex (Vision Scientific®, Korea) por 15 segundos. Em seguida foi adicionado 200 µL de solução de lise nuclear e 75µL de solução de precipitação protéica. Novamente, com o auxílio do vortex, a amostra foi homogeneizada por 30 segundos e centrifugada a 15.000g por três minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde se adicionou 200 µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha), em seguida a amostra foi homogeneizada por aproximadamente 30 segundos. Após este procedimento a amostra foi centrifugada a 15.000g por um minuto, o sobrenadante descartado e o precipitado novamente levado ao vortex por 15 segundos. Posteriormente foi acrescentado 200 µL de etanol a 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) sendo a amostra homogeneizada e centrifugada a 15.000g por um minuto. Em seguida foi desprezado o sobrenadante e a amostra deixada por 35 a 45 minutos em temperatura ambiente até total evaporação do etanol. Finalmente, foi adicionado 100µL de solução de hidratação e as amostras foram mantidas por 24 horas a temperatura ambiente, sendo periodicamente homogeneizadas. Após este prazo foram armazenadas em geladeira a

4°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e início da reação de PCR.

5.9.3 - Controles para PCR, PCR-RFLP e RAPD-PCR

Foram usados como controles positivos amostras de DNAs padrões obtidos de cepas referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Estas cepas são provenientes do criobanco do Laboratório de Imunopatologia (Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - Universidade Federal de Ouro Preto). Como controle negativo da reação foi usado um tubo que continha todos os componentes, exceto DNA.

5.9.4 - Análise do DNA

Para averiguar a qualidade da extração foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1% corados pelo brometo de etídio. A cuba para eletroforese utilizada foi a GNA100 (Pharmacia Biotech®) ligada ao alimentador de força Live Technologies Model 250 (Gibco BRL®) na voltagem de 66V e corrente de 40A por 45 minutos. A visualização foi realizada com auxílio de um transiluminador de U.V. (UVP-Transilluminator; Modelo TM-36, USA).

5.9.5 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi empregado o par de iniciadores (150) 5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3' e (152) 5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3', direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (Degraeve *et al.*, 1994). A reação constituiu de: tampão 1x (Invitrogen®, SP, Brazil), 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 µM de dNTPs, 1,0 pmol de cada iniciador (150 e 152), 0,76 U Taq DNA polimerase (Fermentas - Sinapse®), 2,5 µL DNA e H₂O Milli Q totalizando 12,5 µL por poço da placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). As condições utilizadas na reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguida por 40 ciclos a 93°C por 30 segundos, 64°C por 1minuto, 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Verit Thermal Cycler 96well (Applied Biosystems®, Califórnia, USA).

5.9.6 - Análise dos produtos da PCR

Após amplificação 5µL do produto obtido foram ressuspensos em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol) e aplicados em gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 8%, a 40mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89mM, EDTA a 2mM) em um sistema de cubas preparadas para 20 amostras. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos *et al.*, 1993).

5.9.7 - PCR-RFLP *mkDNA*

Após a realização da PCR, foi realizada a RFLP *mkDNA* conforme (Volpini *et al.*, 2004). Resumidamente, 5µL do produto da PCR foi digerido, após incubação por 3 horas a 37°C, por 1 U da enzima Hae III em seu tampão de uso 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e H₂O Milli Q totalizando 15 µL por poço da placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10%, onde foi aplicado 4 µL do produto restringido em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol). A corrida eletroforética foi realizada a 40mA em TBE (Tris-base a 89 mM pH 8,0; ácido bórico a 89 mM, EDTA a 2 mM). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos *et al.*, 1993). Os fragmentos gerados foram comparados com cepas padrões presentes em nosso criobanco.

5.9.8 - RAPD (Amplificação aleatória de DNAs polimórficos)

Para as reações de RAPD foi utilizado o DNA extraído da massa úmida de promastigotas conforme o item 4.3. Na reação de amplificação foi utilizado o Kit GOTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). As reações foram realizadas para um volume final de 10 µml, contendo 5 µml de GOTaq® Green Master Mix, 1 µl de cada primer na concentração de 6,4 pmol/µml, 3 µml H₂O Milli Q e 1 µml de DNA molde na concentração de 3ng/µml. As condições utilizadas na reação de

PCR foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos, dois ciclos de anelamento à 30°C por 2 minutos, a extensão foi a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e 95°C para desnaturação, seguido de 33 ciclos com temperatura entre 33°C e 40°C, as reações de amplificação foram feitas no termociclador PTC-100 (MJ, Research, Inc). No final do ciclo o passo de extensão foi mantido por mais 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida 5%, sendo submetidos a eletroforese por aproximadamente 4 horas a 80V/cm. O peso molecular utilizado foi de 1kb *Plus* (Invitrogen). Após a eletroforese, a revelação dos produtos amplificados foi feita por coloração de prata de acordo com Santos *et al.*, (1993). Os iniciadores utilizados estão listados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Iniciadores aleatórios utilizados nas reações de RAPD-PCR.

Iniciador	Seqüência	NT	%G+C	Referência
M13-40 F	(5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')	17	52	Carvalho <i>et al.</i> ,2006
QG1	(5'-CCA TTA GCA CCC AAA GCA GAC CTC ACC CTG TGFG AGC-3')	38	58	Carvalho <i>et al.</i> ,2006
L15995	(5'-CTC CAC CATTAGCAC CCA AAG C-3')	22	59	Carvalho <i>et al.</i> ,2006
k-7	(5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3')	24	46	Carvalho <i>et al.</i> ,2006
P53-1	(5'-ACGACAGGGCTGGTTGCCCA-3')	20	55	Carvalho <i>et al.</i> ,2006

NT= número de nucleotídeos

5.9.9 - Análise dos resultados RAPD e construção do fenograma

Para analisar o padrão de bandas obtido em cada amostra, fotografias (24 x28cm) foram analisadas visualmente e os padrões de bandas (presença ou ausência) foram registrados no programa bloco de notas para serem analisados pelo *software* Treecon.

O programa de computador Treecon (Van-der-Peer, 1994) foi utilizado para a construção dos fenogramas. Foi usado o parâmetro $GD_{xy} = 1 (2N_{xy} / N_x + N_y)$ como medida de distância genética (Nei & Li, 1979), onde N_{xy} é o número de fragmentos (bandas) compartilhados entre as amostras x e y, N_x é o número de fragmentos na linha x e N_y é o número de fragmentos na linha y. As árvores foram construídas pelo Método da Média Aritmética não Ponderada - UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) (Sneath & Sokal, 1973). Os dados obtidos foram submetidos ao

teste de *Bootstrap* com 100 reamostragens. O *Bootstrap* envolve substituição aleatória de dados, de forma a criar uma série de conjuntos de dados diferentes, mas mantendo o mesmo tamanho do conjunto de dados original. O padrão de bandas é representado no programa por uma matriz onde o número zero (0) representa ausência e o número um (1) presença. O programa substitui aleatoriamente 0 por 1 (e vice-versa), em qualquer ponto da matriz, de forma a obter 100 matrizes diferentes. A partir de cada uma destas matrizes, automaticamente é construída uma árvore fenética. As árvores obtidas são, então, comparadas entre si. A significância estatística de um determinado agrupamento é dada pela porcentagem de árvores, baseadas nos dados reamostrados, contendo aquele agrupamento (Felsenstein, 1985). Apenas os valores de *Bootstrap* acima de 70% foram considerados significativos (Armitage & Berry, 1994).

6 - Análise estatística dos resultados

Os testes estatísticos utilizados na análise das curvas de crescimento foram feitos empregando-se o software *GraphPad Prism* 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Com objetivo de comparar o crescimento médio dos isolados obtidos com a cepa de referência de *L. infantum* empregou-se ANOVA e como pós-teste foi empregada a análise de Bonferroni. Para verificar potenciais diferenças entre o crescimento entre isolados de cães sintomáticos e assintomáticos foi utilizado o teste *T*. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *P* foi $<0,05$.

7.1 - Isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados

Um total de 44 animais de duas diferentes áreas endêmicas de Minas Gerais (Itabirito e Governador Valadares) apresentando sorologia positiva para leishmaniose foi avaliado neste estudo. Destes, 28 cães (63,6%) foram, após minucioso exame clínico, classificados como cães assintomáticos (CA) e 16 (36,4%) como sintomáticos (CS) para LVC. Com a metodologia de isolamento de *Leishmania spp.* em meio NNN/LIT foram obtidos 10 isolados dos 44 cães, ou seja, um índice de eficiência de 22,7%. Dentre os 10 isolados obtidos, cinco foram oriundos de cães sintomáticos (**I-1, I-2, 1-3, 1-4 e I-5**) e cinco de assintomáticos (**I-6, I-7, 1-8, 1-9 e I-10**). A **Tabela 4** apresenta os isolados obtidos após os três repiques realizados com o material obtido de 10 cães; além da positividade nos diferentes tecidos (baço, fígado e medula óssea). A melhor taxa de isolamento (positividade) em meio NNN/LIT foi verificada em animais sintomáticos, pois a maioria deles apresentou positividade na cultura de tecidos provenientes de mais de um órgão (**Tabela 4**). Comparando as tentativas de isolamento conforme o órgão observou-se que o material obtido da medula, seguido do baço foram os que apresentaram melhor positividade.

Tabela 4: Número de isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados

Nº de isolados	Forma clínica do cão	Tentativas de isolamento NNN/LIT			Origem do cão
		Medula	Baço	Fígado	
1	Sintomático	+	+	+	Governador Valadares – MG
2	Sintomático	+	-	-	Governador Valadares – MG
3	Sintomático	+	+	+	Itabirito- MG
4	Sintomático	-	+	+	Itabirito- MG
5	Sintomático	+	+	-	Itabirito- MG
6	Assintomático	+	-	-	Governador Valadares – MG
7	Assintomático	-	+	-	Governador Valadares – MG
8	Assintomático	+	+	-	Governador Valadares – MG
9	Assintomático	+	-	-	Itabirito- MG
10	Assintomático	+	-	-	Itabirito- MG

7.2 - Análise dos produtos da PCR pelos iniciadores 150 e 152

A **Figura 3** mostra produtos de amplificação da PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania spp.*; com a utilização dos iniciadores 150 e 152 e com a obtenção do fragmento de 120 pb. Na análise dos produtos de amplificação pela PCR, foi possível observar que todas as amostras de DNA amplificaram de

maneira satisfatória, tanto para as cepas de referência quanto para os isolados obtidos de cães naturalmente infectados, confirmando que todos os isolados pertencem ao gênero *Leishmania*.

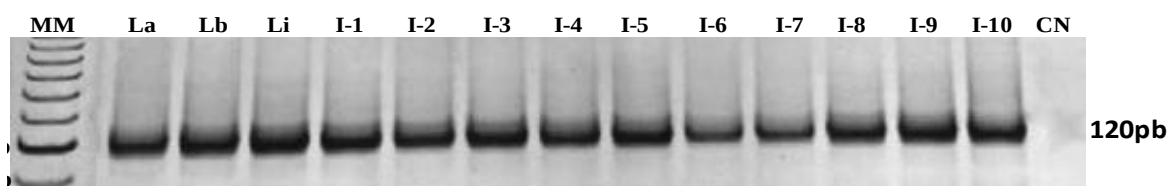


Figura 3: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* utilizando os iniciadores 150 e 152, em gel de poliacrilamida 10%. MM, Marcador molecular de 25 pb (Invitrogen); cepas de referência de *Leishmania*: La, *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); Lb, *L(V). braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Li, *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); I -1; I -2; I -3; I -4; I -5 (Isolados obtidos de cães sintomáticos); I -6; I -7; I -8; I -9; I -10 (Isolados obtidos de cães assintomático); CN (controle negativo).

7.3- Análise dos produtos da PCR-RFLP para diferentes espécies do gênero *Leishmania*

O gel representado pela **Figura 4** mostra os resultados referente à PCR-RFLP para aos produtos de amplificação de 120pb obtidos na reação de PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA, seguida pela digestão da enzima de restrição Hae III. A adição de Hae III levou a formação de diferentes perfis de restrição de acordo com a espécie de *Leishmania*. Para a espécie *L. (V.) braziliensis* foram gerados dois fragmentos, 80 pb e 40 pb; para a espécie *L. (L.) amazonensis* não houve restrição da região de 120 pb; e para a espécie *L. (L.) infantum* foi possível observar fragmentos de tamanhos de 120, 80, 60 e 40 bp. O isolado selvagem (IS) obtido de cão naturalmente infectado apresenta perfil idêntico ao da cepa referência de *L. (L.) infantum*.

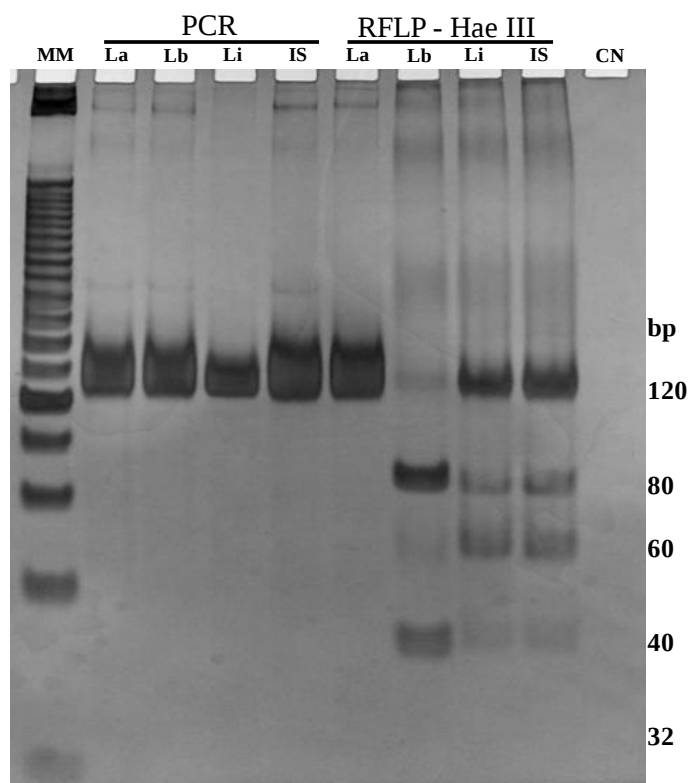


Figura 4: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* antes e após a restrição por Hae III em gel de poliacrilamida 10%. MM, Marcador molecular de 25 pb (Invitrogen); cepas de referência de *Leishmania*: La, *L.(L.) amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269); Lb, *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Li, *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); IS (isolado selvagem de *Leishmania* obtido de cão naturalmente infectado); CN (controle negativo).

7.4 - Análise dos produtos da PCR-RFLP para os isolados de *Leishmania* spp. obtidos de cães naturalmente infectados

Na análise do perfil de restrição do fragmento de 120 pb obtido a partir da região conservada do minicírculo do kDNA dos isolados de *Leishmania* spp. provenientes de cães naturalmente infectados, constatou-se que dos 10 isolados, nove apresentaram perfil semelhante a espécie de referência de *L (L.)infantum* com fragmentos de restrição de 120, 80, 60 e 40 bp. Contudo, um isolado (**I-10**), não apresentou perfil de restrição para o fragmento de 120 pb, assumindo um perfil semelhante ao da espécie de *L (L.) amazonensis* (**Figura 5**).

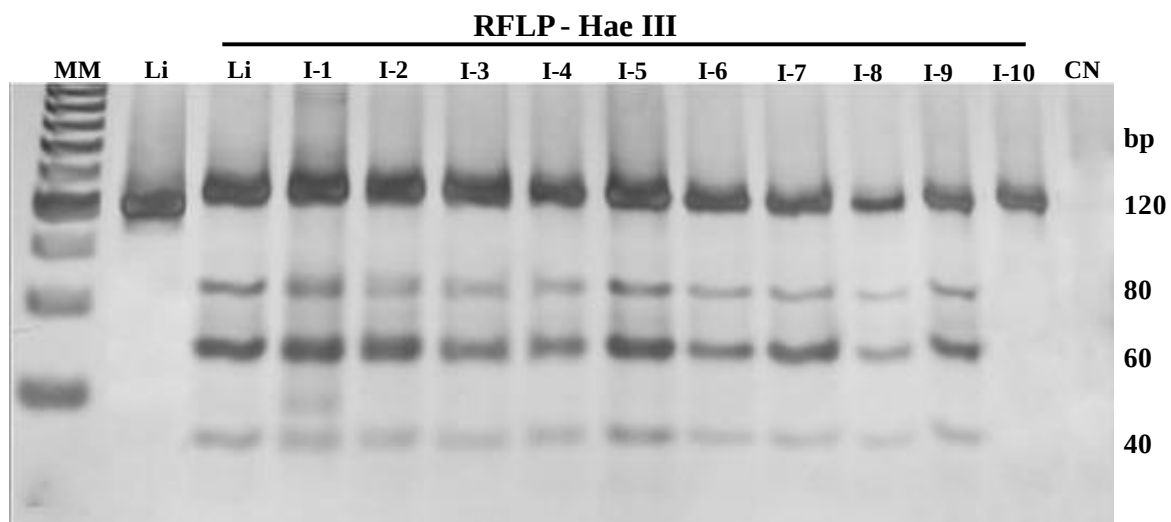
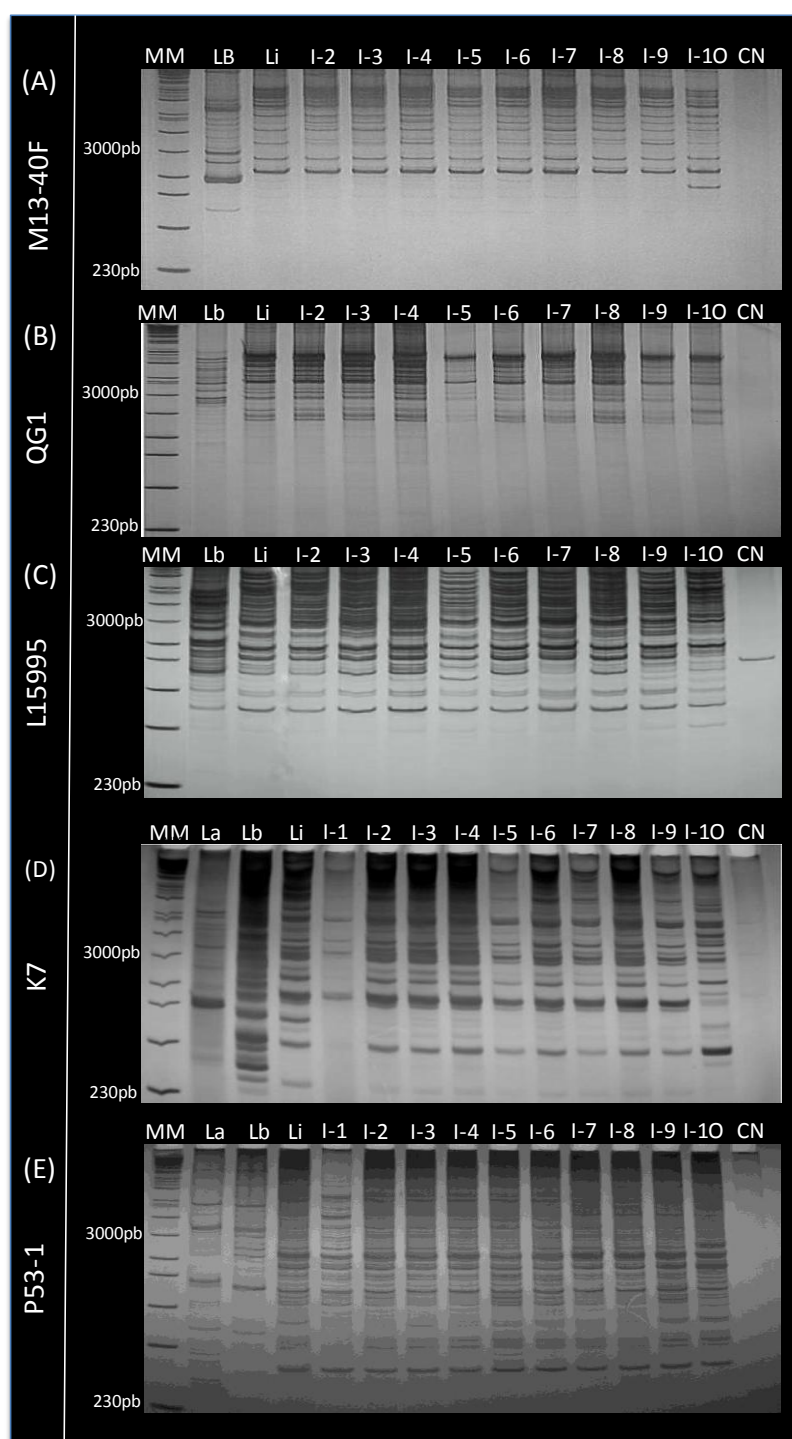


Figura 5: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* após a restrição por Hae III em gel de poliacrilamida 10%. MM, Marcador molecular de 25 pb (Invitrogen); cepa de referência Li, *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); I-1; I-2; I-3; I-4; I-5 (Isolados obtidos de cães sintomáticos); I-6; I-7; I-8; I-9; I-10 (Isolados obtidos de cães assintomático); CN (controle negativo).

7.5 - Amplificação Randômica do DNA (RAPD)

Na **Figura 6** é apresentado um painel de géis de poliacrilamida com os perfis de RAPD-PCR dos isolados obtidos de cães sintomáticos (**I-1**, **I-2**, **1-3**, **1-4** e **I-5**) e de cães assintomáticos (**I-6**, **I-7**, **1-8**, **1-9** e **I-10**), incluindo as três cepas de referência da OMS. Os resultados de RAPD obtidos com o uso dos iniciadores (A) **M13-40F**, (B) **QG1**, (C) **L15995**, (D) **K7** e (E) **P53-1** geraram perfis polimórficos com várias bandas (Figura 6). Torna-se importante ressaltar que durante a realização da técnica duas amostras, *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e o isolado **I-1** não amplificaram com os iniciadores **M13-40F**, **QG1** e **L15995**, respectivamente e, por este motivo, estas amostras não aparecem nos géis (A, B e C) da Figura 6, bem como na análise do fenograma consenso (Figura 7).

Para o cálculo dos coeficientes de similaridade e distância genética foram utilizados os fragmentos de RAPD-PCR entre 230 e 3000 bp. Esse intervalo foi escolhido baseado na melhor visualização e qualidade de definição das bandas. Através da análise dos perfis de bandas, foi possível identificar diferenças pela presença ou ausência de um ou vários fragmentos amplificados entre os cinco isolados de cães sintomáticos (**I-1**, **I-2**, **1-3**, **1-4** e **I-5**) e os cinco isolados de cães assintomáticos (**I-6**, **I-7**, **1-8**, **1-9** e **I-10**).



Figura

6: Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras cepas de referência de *Leishmania*: La, *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); Lb, *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Li, *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e de isolados obtidos de cães sintomáticos (I-1, I-2, I-3, I-4, I-5) e de cães assintomáticos (I-6, I-7, I-8, I-9, I-10), com o iniciador M13-40F (A), QG1 (B), L15995 (C), K7 (D) e P53-1 (E) em gel de poli-acrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Invitrogen 1Kb Plus); CN (controle negativo). Para a reação foi utilizado 3 ng de DNA *template* para cada amostra. O intervalo de entre 230 pb e 3000 pb foram considerados para análise de ausência e presença de bandas.

A **Figura 7** apresenta o fenograma consenso produzido pela análise dos perfis de RAPD-PCR obtidos para as amostras que amplificaram com os iniciadores M13-40 F, QG1, L15995, K7, P53-1. Na elaboração deste fenograma utilizou-se o método da média aritmética não ponderada (UPGMA). No fenograma consenso é possível observar a escala de distância genética entre as amostras analisadas e os valores de *Bootstrap* (variações aleatórias dos dados realizados pelo programa de análise filogenética *Treeconw*).

A princípio, os resultados apresentados no fenograma consenso indicam que apesar da proximidade genética (valor menor que 1) a técnica de RAPD foi capaz de diferenciar de forma significativa (valor de *Bootstrap* acima de 70%) as cepas de *Leishmania* utilizadas neste estudo formando três grupos; o primeiro grupo (A): constituído pelo **I-10** obtido de cão assintomático para LVC, o segundo grupo (B): formado pelos isolados (**I-2, I-3, I-4, I-5, I-6, I-7, I-8 e I-9**) e cepa de referência de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e, o terceiro grupo (C): espécie de *Leishmania* do complexo *Viannia* (MHOM/BR/1975/M2903). O nível de confiabilidade gerado pelos valores de *Bootstrap* foi de 100% para estes agrupamentos.

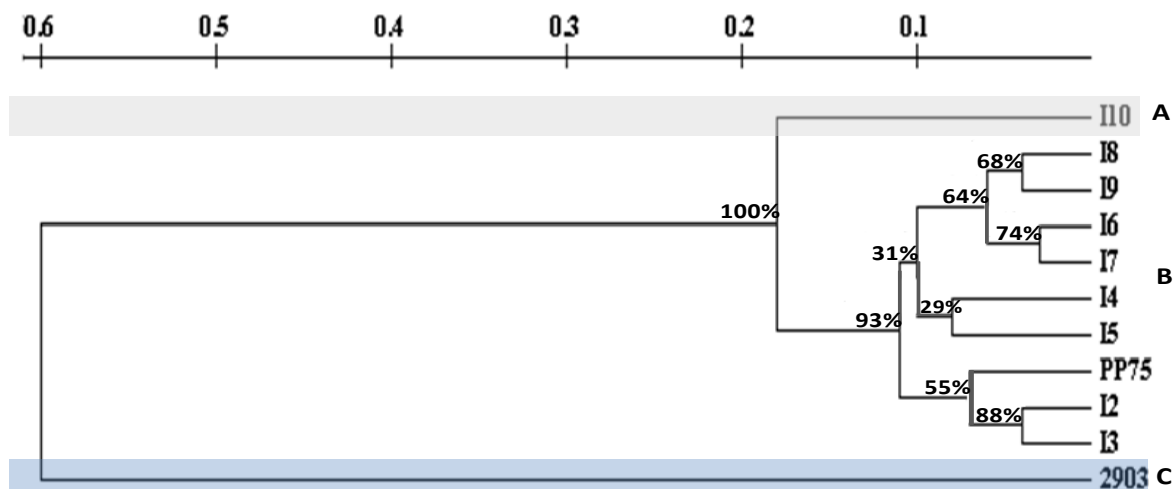


Figura 7: Fenograma consenso das cepas de referência de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e, isolados obtidos de cães portadores de diferentes formas clínicas da LVC construído pelo método de UPGMA do Treecon for Windows, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciadores M13-40F, QG1, L15995, K7, P53-1. Isolados obtidos de cães sintomáticos (I-2, I-3, I-4, I-5) e de cães assintomáticos (I-6, I-7, I-8, I-9, I-10). (A) grupo constituído pelo I-10 obtido de cão assintomático para LVC; (B) grupo formado pelos isolados (I-2, I-3, I-4, I-5, I-6, I-7, I-8 e I-9) e cepa de referência de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); (C) grupo formado pela espécie de *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). Os números nos braços indicam as porcentagens de 100 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

7.6 - Análise do perfil isoenzimático dos isolados de *Leishmania spp*

A **Figura 8** apresenta os resultados obtidos pela análise das eletroforeses de isoenzimas empregando sete sistemas enzimáticos que para determinação do perfil fenótipo de isoenzimas dos isolados. Para cada enzima, as bandas com mobilidade eletroforética idêntica foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. A maioria dos isolados obtidos neste estudo apresentou perfil enzimático semelhante ao da cepa de referência *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) para os sistemas G6PD, IDH, GDH, MDH, ME e 6PGD. Adicionalmente, não foram observadas diferenças entre os perfis dos isolados obtidos de cães obtidos de cães sintomáticos e assintomáticos, em relação a estes sistemas. Para a enzima GPI foi observado polimorfismo para os isolados **I-3, I-4, I-5, I-9 e I-10** quando comparados a cepa de referência. Foi possível constatar que estes isolados (**I-3, I-4, I-5, I-9 e I-10**) apresentam dois eletromorfos com perfis de migração semelhantes diferindo dos demais isolados e da cepa de referência, que apresentaram três eletromorfos (perfil heterozigoto para

enzima GPI). Os isolados (**I-1, I-2, I-6, I-7 e I-8**) que apresentaram três eletromorfos para o sistema GPI são oriundos de cães da cidade de Governador Valadares e os isolados (**I-3, I-4, I-5, I-9 e I-10**) que apresentaram dois eletromorfos são da cidade de Itabirito.

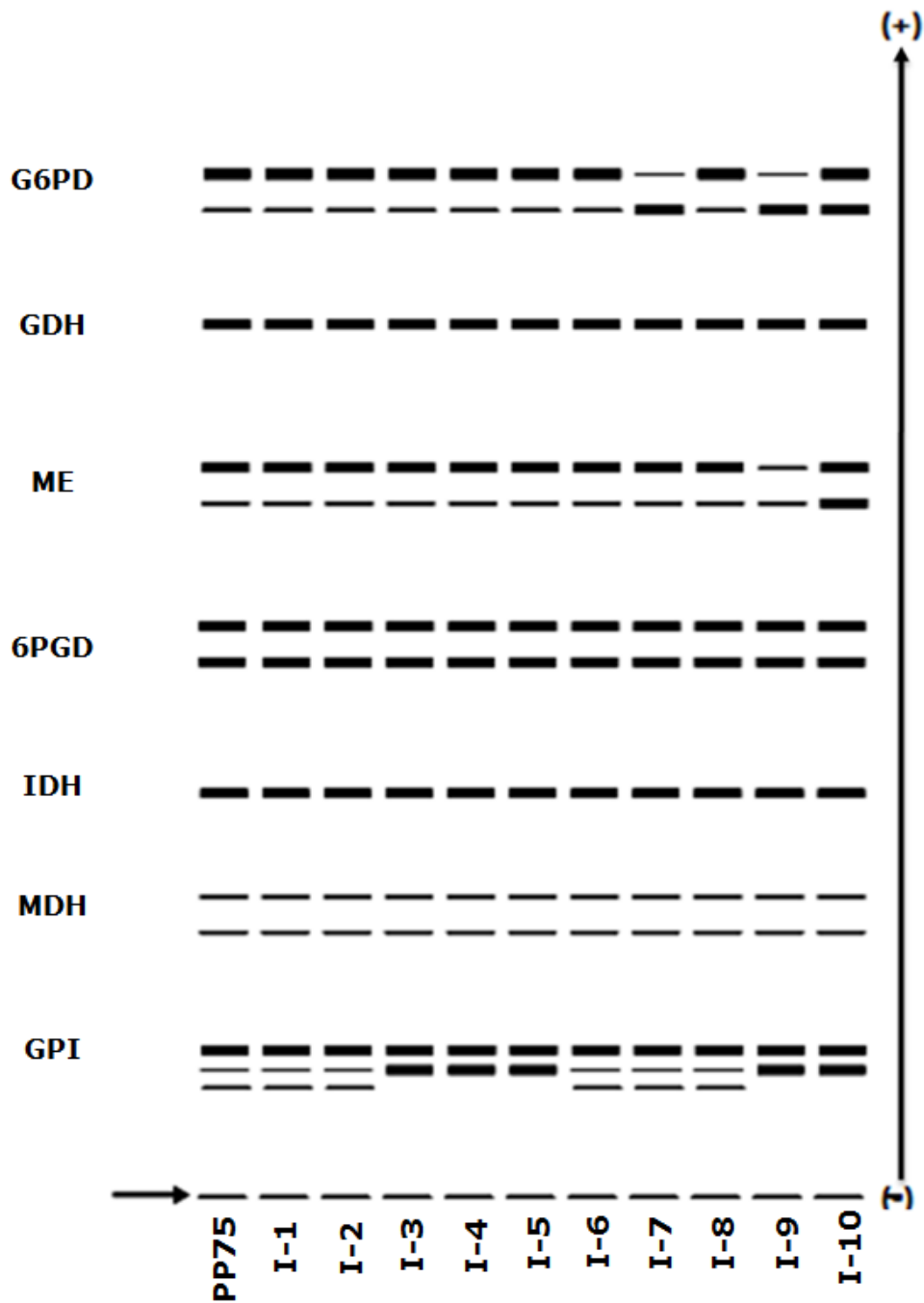


Figura 8: Diagrama representativo do resultado da eletroforese das enzimas G6PD, GDH, ME, 6PGD, IDH, MDH, GPI com a amostra de referência *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); I-1; I-2; I-3; I-4; I-5 (Isolados obtidos de cães sintomáticos) / I-6; I-7; I-8; I-9; I-10 (Isolados obtidos de cães assintomático). Ponto de aplicação da amostra (→) / Forte intensidade ■ / Fraca intensidade —

7.7 - Avaliação do comportamento das curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania* isoladas de cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da LVC

A **Figura 9** apresenta os gráficos do comportamento de crescimento de promastigotas de *Leishmania* isoladas de cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da LVC em meio de cultivo LIT no período de 0-20 dias. Após análise destes resultados foi possível verificar que a maioria dos isolados, independente da forma clínica dos cães de origem, apresentaram comportamento diferente do observado para a cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), para as diferentes etapas de crescimento (Fase *lag*, *log*, estacionária e de declínio).

Os gráficos de crescimento dos isolados obtidos de cães sintomáticos, demonstram que **I-1**, **I-3** e **I-4** apresentam crescimento superior ao da cepa de referência. Os demais isolados de cães sintomáticos (**I-2** e **I-5**) apresentaram comportamento semelhante ao da cepa de referência. Em relação aos cães assintomáticos, os isolados **I-6**, **I-7** e **I-10** também demonstraram crescimento superior ao da cepa de referência. O isolado **I-8** apresentou perfil de crescimento semelhante ao da cepa de referência. Dos isolados de cães assintomáticos, o **I-9**, foi que apresentou menor taxa de crescimento quando comparado a cepa de referência. Na análise comparativa, realizada por meio do teste *T*, não foi verificada nenhuma diferença significativa (valores de $P > 0,05$) entre o crescimento médio dos isolados de cães sintomáticos e assintomáticos.

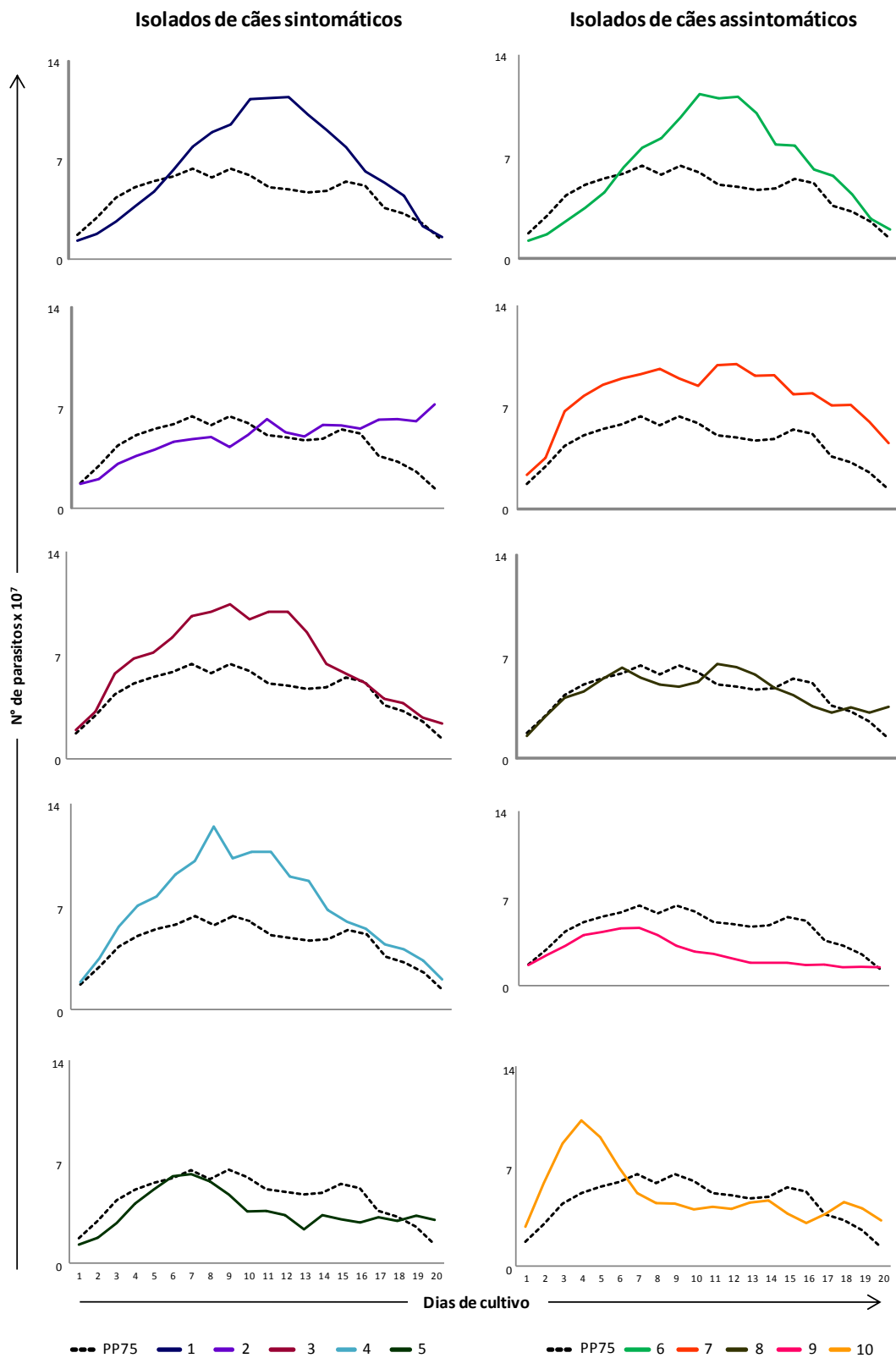


Figura 9: Cinética de crescimento de promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e de isolados de cães sintomáticos e assintomáticos em meio LIT no período de 0-20 dias. O eixo y representa o número médio de parasitos x 10⁷/mL e o eixo x representa os dias de cultivo. Cepa de referência (--- PP75); Isolados de cães sintomáticos (— 1; — 2; — 3; — 4; — 5); Isolados de cães assintomáticos (— 6; — 7; — 8; — 9; — 10). A contagem foi realizado em triplicata.

7.8 - Infecção experimental em hamster *Mesocricetus auratus*

Na **Tabela 5** estão representados os dados referente à avaliação parasitológica pós-infecção experimental em hamster (*Mesocricetus auratus*). Os animais foram necropsiados 90 dias após a infecção via IP com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* (cepa referência e isolados). A maioria dos isolados bem como a cepa de referência de *L. infantum* apresentaram resultados negativos na análise parasitológica em esfregaço por aposição de fragmentos de baço e fígado. Entretanto, o isolado **I-3** obtido de um cão sintomático apresentou positividade no baço em um dos cinco animais experimentalmente infectados, sendo que o mesmo apresentou valor médio de LDU de 177 amastigotas por 1000 células nucleadas. Também foi possível constatar que o isolado **I-8** oriundo de cão assintomático demonstrou positividade (baço) para três animais infectados, obtendo valor médio de quatro amastigotas por 1000 células nucleadas pela análise por LDU. A avaliação anatomopatológica de fragmentos do fígado e baço foram realizadas macroscopicamente e, na maioria dos casos, não foram evidenciadas alterações significativas nestes órgãos (aumento do órgão ou presença de lesões). Somente em um animal infectado, com o isolado **I-3**, foi observada alteração significativa no baço, que se encontrava aumentada e com presença de pequenos granulomas visíveis na macroscopia.

Tabela 5: Avaliação parasitológica em hamster *Mesocricetus auratus* após infecção experimental

Grupo Experimental do isolado (n=5)	Relação hamster positivo/hamster analisado (%) (Baço)	Relação hamster positivo/hamster analisado (%) (Fígado)	Valor Médio de LDU (Baço)	Valor Médio de LDU (Fígado)
PP75	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-1	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-2	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-3	1/5 (20,0)	0/5 (0,0)	177/1000	0/1000
I-4	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-5	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-6	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-7	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-8	3/5 (60,0)	0/5 (0,0)	4/1000	0/1000
I-9	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000
I-10	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/1000	0/1000

Por volta do século XIX, inúmeros pesquisadores (Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna) de forma quase simultânea identificaram o parasito agente etiológico das leishmanioses, o qual foi denominado por Ronald Ross com o nome de *Leishmania* (Ross, 1903). Atualmente, as leishmanioses continuam sendo umas das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando as populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que 350 milhões de pessoas se encontram em área de risco, e que 2 milhões de pessoas são infectadas todos os anos (Desjeux, 2004; WHO, 2010a; 2010b).

A doença pode se manifestar em diferentes formas clínicas podendo variar de pequenas lesões na pele que assumem aspecto de autocura até formas mais graves que podem resultar em um comprometimento visceralizante e sistêmico do organismo. Aparentemente as diferenças entre as formas clínicas da doença, estão intimamente relacionadas com o tipo de resposta imune adaptativa do hospedeiro, especialmente no que tange alterações envolvidas nas respostas celular e humoral (Sacks & Nancy, 2002). Entretanto, outro fator crucial que contribui para a existência das diferentes formas da doença está relacionado com a natureza do patógeno, isto é, as distintas espécies do parasito e suas diferenças genéticas intra e interespecíficas têm papel fundamental no desenvolvimento e estabelecimento da doença (Banuls *et al.*, 2007). Além disso, os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida complexo, e estão presentes em uma grande variedade de nichos, podendo infectar um grande número de hospedeiros vertebrados (Gramiccia & Gradoni, 2005).

Os estudos sobre identificação e classificação de parasitos *Leishmania* são relevantes, pois buscam atender as prioridades estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde que encoraja estes estudos na busca de biomarcadores de resistência e suscetibilidade a drogas por exemplo. Segundo este órgão: “um conhecimento taxonômico acurado é fundamental na prática, desde que a expansão das informações concernentes ao parasito e à doença é possível somente, quando novos fatos podem ser relacionados a parasitos adequadamente caracterizados e classificados” (WHO, 1984). Além disto, estudos de caracterização de parasitos do gênero *Leishmania* são fundamentais na elaboração de trabalhos de cunho biotecnológico nas leishmanioses tais como: teste de resistência ou susceptibilidade às drogas; triagem de cepas virulentas e avirulentas; elaboração de *Kits* de diagnóstico; ensaios proteômicos para rastreamento de antígenos vacinais dentre outros.

Desde 1970, critérios intrínsecos do parasito (biodema) tais como: crescimento, tropismo; a morfologia e o desenvolvimento em diferentes hospedeiros têm sido empregados para caracterização das espécies do parasito. Na década de 1990, os avanços das técnicas imunológicas, isoenzimáticas e moleculares, levaram à WHO a publicar uma lista que engloba cerca de 30 espécies do parasito das quais 20 representam risco patogênico para o homem (Cupolillo *et al.*, 2000). Dentro do contexto da caracterização de *Leishmania*, atualmente a técnica de isoenzimas representa o padrão-ouro para estudos que visam identificar espécies do parasito, além de ser uma ferramenta amplamente empregada em análises de diversidade genética (Rioux *et al.*, 1990; Tibayrenc *et al.*, 2009). Contudo, esta técnica, tem sido gradativamente substituída por técnicas moleculares mais sensíveis e específicas. A identificação de espécies e análise da diversidade genética do parasito tem sido amplamente explorada pela PCR e suas variantes, entre as quais se destacam a PCR-RAPD, PCR-RFLP e microsatélites (Ochsenreither *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2010; Hamad *et al.*, 2010).

Com a crescente urbanização do ciclo de transmissão das leishmanioses, em especial a LV, inúmeros animais do peridomício passaram a ser considerados reservatórios do parasito, dentre os quais, o cão tem desempenhado importante papel no ciclo epidemiológico da doença, servindo como importante fonte de infecção para flebotomíneos. Na literatura científica, inúmeros trabalhos têm relatado que cães podem ser infectados por *L. infantum* e outras espécies de *Leishmania* tais como: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. peruviana* (Elbihari *et al.*, 1987; Castro *et al.*, 2007; Tolezano *et al.*, 2007; Quinnell *et al.*, 2009). Entretanto, do ponto de vista epidemiológico, a espécie *L. infantum* (agente etiológico da leishmaniose visceral), tem sido responsável pelo aumento da doença em cães (LVC) e em humanos (LVH) em diferentes áreas consideradas endêmicas para a doença, tornando-se um grande problema de saúde pública (Dantas-Torres, 2007; Baneth *et al.*, 2008; Quinnell *et al.*, 2009, Reis *et al.*, 2009).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo empregar ferramentas biotecnológicas em um estudo do comportamento biológico, bioquímico e genético buscando caracterizar isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados, a fim de identificar fenótipos de virulência e patogenicidade. Para tanto, foram avaliados 44 cães que apresentavam sorologia positiva para leishmaniose, portadores de diferentes

formas da infecção, dos quais foram obtidos 10 isolados de *Leishmania spp*, sendo cinco oriundos de cães sintomáticos e cinco de cães assintomáticos.

Os dados obtidos com as tentativas de isolamento demonstraram que a medula óssea foi o tecido que apresentou maior índice de positividade. Resultados similares, obtidos por Genaro (1993), demonstram que o aspirado de medula óssea é uma importante fonte para isolamento e análise parasitológica em cães infectados por parasitos *L. infantum*. Interessantemente, os resultados referentes a tentativas de isolamento do parasito revelaram que os cães sintomáticos apresentaram maior positividade para órgãos como medula, baço e fígado. Estes dados demonstram que na LVC a intensidade do parasitismo em diferentes órgãos está relacionada à evolução e manifestações clínicas da doença (Reis *et al.*, 2006). Estes autores isolaram parasitos em 95% dos cães que apresentavam a forma sintomática da LVC, demonstrando que quanto mais a doença progride, maior é o potencial reservatório destes animais (Reis *et al.*, 2006). O baixo índice de eficiência no isolamento (22,7%) pode ser explicado pela elevada taxa de contaminação dos tubos com meio NNN/LIT, dado que este meio é rico em nutrientes. Com intuito de iniciar as primeiras análises dos isolados obtidos, foi realizada a avaliação da curva de crescimento em meio LIT, em intervalo de 0-20 dias, seguida da comparação do perfil de crescimento destes isolados com o perfil de crescimento da cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Na análise das curvas de crescimento foi constatado que a maioria dos isolados apresentaram perfis de crescimento diferente do demonstrado pela cepa de referência. Adicionalmente, não foi possível relacionar o fenótipo de crescimento dos isolados com a forma clínica do cão de origem (sintomático ou assintomático). Diferentemente, Louassini *et al.* (1998), demonstraram que cepas de *L. infantum* de origem viscerotrópica, quando mantidas em meio de cultivo *in vitro* produzem maior número de parasitos quando comparadas a cepas de origem cutânea. Contudo, os isolados **I-1, I-3, I-4** (cães sintomáticos) e os **I-6, I-7, I-10** (cães assintomáticos) apresentaram crescimento em meio de cultura superior ao registrado pela cepa de referência. Neste sentido, estas cepas aparentemente apresentam potencial para serem empregadas como potenciais candidatos para a obtenção de antígenos brutos ou solúveis, que poderão ser úteis no desenvolvimento de kits de diagnósticos e/ou na composição de futuras vacinas. Considerando que a cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e os isolados obtidos de cães portadores das diferentes formas clínicas da LVC (i) se encontravam na quinta “passagem” após o isolamento; (ii) as condições de cultivo foram às mesmas durante a

realização de todo o experimento; (iii) não foram observadas diferenças significativas entre o crescimento médio entre isolados de cães sintomáticos e assintomáticos; os resultados obtidos indicam que o perfil de crescimento observado em meio de cultivo é uma característica intrínseca de cada cepa de *Leishmania*. Trabalho publicado por Schuster *et al.* (2002) relata que cepas de parasitos mantidos sob mesmas condições de cultivo podem apresentar diferenças em seus perfis de crescimento. Desta forma, a princípio, a forma clínica do hospedeiro (cão sintomático ou assintomático) parece não influenciar o comportamento de crescimento dos isolados mediante o cultivo *in vitro*.

Com intuito de avaliar o comportamento biológico dos diferentes isolados, no contexto de uma infecção experimental *in vivo*, o presente trabalho empregou a análise da carga parasitária e presença de sinais clínicos da LV como principais parâmetros para a análise de virulência e patogenicidade no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*). Os resultados obtidos demonstraram que a maioria dos isolados apresentavam valores negativos após a infecção experimental seguida por três meses. Somente os isolados **I-3** (cão sintomático) e **I-8** (cão assintomático) apresentaram êxito em infectar os animais. A infecção foi confirmada pela análise parasitológica, por microscopia óptica, que identificou formas amastigotas do parasito no baço dos animais. Considerando o elevado valor do inóculo (1×10^7 promastigotas) e a infecção por via intraperitoneal, os resultados obtidos demonstram que a infecção permaneceu de forma assintomática ou subclínica para a maioria dos animais experimentalmente infectados. Nossos dados diferem dos descritos por Gifawesen *et al* (1989), Pearson *et al* (1990) e Melby *et al* (2001) que analisaram a infecção experimental por diferentes vias (intravenosa, intradérmica e intraperitoneal) em *Mesocricetus auratus* por parasitos do complexo “Donovani” (*Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*). Estes autores constataram que estes animais desenvolvem uma infecção sistêmica com elevada carga parasitária (baço e fígado) com presença de sinais clínicos tais como: a caquexia, a hepatoesplenomegalia, a pancitopenia e a hipergamaglobulinemia, os quais são típicos da progressão da LV, geralmente observados após três meses de infecção.

A baixa taxa de infecção e patogenicidade observada pelos isolados e pela cepa de referência de *L. infantum* no presente estudo pode ser explicada por: (i) a idade dos animais no dia da infecção (3 meses); (ii) a infecção foi realizada empregando a via intraperitoneal; (iii) o período de avaliação de 90 dias pode ter sido insuficiente para o acompanhamento do curso da infecção tendo em vista a via de inóculo utilizada; (iv) o *background* genético do parasito; (v) e a técnica de *LDU* para detecção do parasito

apresenta baixa sensibilidade por empregar a microscopia óptica. A infecção em hamster por parasitos do gênero *Leishmania* por via intracardíaca tem sido descrita na literatura como umas das principais rotas para infecção experimental de sucesso, pois a mesma resulta em uma de infecção de caráter crônico, com elevado grau de parasitismo tecidual com presença de sinais anatomopatológicos e clínicos da doença (Melby *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2008). De fato, esta via pode conduzir a uma infecção de cunho sistêmico com elevada carga parasitária em órgãos como o baço e o fígado, além de possibilitar a detecção e acompanhamento dos sintomas relacionados à progressão da LV em intervalos de tempo entre 50 e 90 dias após a infecção (Requena *et al.*, 2000; Melby *et al.*, 2001; Dea-Ayuela *et al.*, 2007).

Honore *et al* (1998) demonstraram que diferenças observadas no perfil de infecção por cepas de *L. infantum* em linhagens de camundongos se devem principalmente as diferenças genéticas de cada cepa do parasito. Considerando que o modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) tem sido descrito na literatura como um excelente modelo para estudo clinicopatológicos para LV, pois mimetiza os aspectos observados na doença humana e canina (Hommel *et al.*, 1995; Requena *et al.*, 2000; Melby *et al.*, 2001; Dea-Ayuela *et al.*, 2007; Nieto *et al.*, 2011), os resultados obtidos demonstram de forma preliminar que os isolados **I-3** e **I-8** são potenciais candidatos a cepas com diferenciado perfil de virulência/patogenicidade, pois apresentaram capacidade de infecção diferenciado quando comparados a cepa de referência e demais isolados.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos comparativos sobre as vias de infecção empregando o modelo hamster (*Mesocricetus auratus*). Estes trabalhos têm apontado que a via intracardíaca e a avaliação da capacidade de infecção entre 90 a 360 dias tem sido promissores na avaliação de perfis de virulência e patogenicidade entre diferentes cepas de *L. infantum* (Das Dores-Moreira, 2010 – comunicação oral). Além disso, nosso grupo de pesquisa tem utilizado a técnica de PCR em Tempo Real com intuito de aperfeiçoar os resultados obtidos na análise de densidade parasitária com a infecção experimental em hamster, pois esta técnica permite uma quantificação mais acurada da carga parasitária em órgãos como o baço e fígado quando comparados a técnica de LDU ou mesmo imunohistoquímica anti-*Leishmania*. De-Paiva-Cavalcanti *et al.* (2006) e Quaresma *et al.* (2009) demonstraram que a PCR em Tempo Real é uma excelente metodologia a ser empregada na avaliação da densidade parasitária tecidual causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Os resultados obtidos com a infecção experimental no presente estudo poderiam ser mais

bem compreendidos, empregando-se alterações no protocolo referente à infecção experimental como: (i) modificação da via de inóculo para intracardíaca; (ii) avaliação da infecção diferentes tempos (90, 180 e 360 dias); (iii) utilização da PCR em Tempo Real para avaliar a carga parasitária no baço e fígado; (iv) avaliação da resposta imunológica durante a infecção. Estas alterações poderiam fornecer informações relevantes para o planejamento de futuros experimentos que visam compreender mecanismos envolvidos durante o decorrer da infecção experimental entre diferentes cepas de *Leishmania infantum*, tendo em vista o perfil de virulência e patogenicidade. Por outro lado, a infecção experimental utilizada no presente estudo permitiu de alguma forma “filtrar” dois isolados (I-3 e I-8) com perfil diferenciado de virulência e patogenicidade.

Além da avaliação de parâmetros biológicos entre os isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães assintomáticos e sintomáticos, foram avaliadas no presente trabalho metodologias isoenzimáticas e moleculares para a identificação e caracterização de diferentes cepas e espécies de *Leishmania*, uma vez que estes fatores permitem um melhor entendimento da relação parasito e hospedeiro no decorrer da infecção (Banuls *et al.*, 2007). A análise do perfil isoenzimas para os sistemas (G6PD, IDH, GDH, MDH, ME e 6PGD) demonstrou que os isolados de cães sintomáticos e assintomáticos, possuem perfis semelhantes tanto no número quanto na migração das bandas eletroforéticas quando comparados com a cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Entretanto, é importante comentar que, para o sistema GPI foi constatado que a cepa de referência apresentou no gel eletroforese três eletromorfos (bandas) e este padrão foi observado para os isolados **I-1 e I-2** (cães sintomáticos) e **I-6, I-7, I-8** (cães assintomáticos), diferindo dos demais isolados que apresentaram dois eletromorfos. A presença de três eletromorfos para o sistema GPI sugere que este sistema enzimático é capaz de identificar a presença de perfil de heterozigose. A presença de padrões heterozigóticos para diferentes sistemas enzimáticos utilizados na caracterização de parasitos do gênero *Leishmania*, tem gerado ao longo dos anos inúmeras discussões a respeito do ciclo reprodutivo e geração da diversidade genética do parasito (Maazoun *et al.*, 1981; Tibayrenc *et al.*, 1990). Nos últimos 20 anos, a teoria clonal tem sido a hipótese mais aceita para explicar o ciclo reprodutivo do parasito (Tibayrenc *et al.*, 1990). Segundo a teoria clonal proposta por Tibayrenc e colaboradores, parasitos *Leishmania* se reproduzem assexuadamente, e a prole gerada possui características genéticas idênticas à linhagem parental. Porém, nos últimos, com

os avanços das técnicas de biologia molecular, surgiram novas hipóteses para explicar o ciclo reprodutivo do parasito, bem como a variabilidade genética do gênero *Leishmania*. Akopyants *et al.* (2010) conseguiram demonstrar experimentalmente que parasitos do gênero *Leishmania* podem realizar troca de material genético, e que esta troca poderia explicar a elevada diversidade genética e a presença de heterozigose entre parasitos deste gênero. Interessantemente, o polimorfismo apresentado para o sistema GPI possibilitou a distinção dos isolados, tendo em vista a região geográfica de origem. Os isolados (**I-1, I-2, I-6, I-7 e I-8**) que apresentaram três eletromorfos para o sistema GPI são oriundos de cães da cidade de Governador Valadares e os isolados (**I-3, I-4, I-5, I-9 e I-10**) que apresentaram dois eletromorfos são da cidade de Itabirito. Estes resultados demonstram que a técnica de isoenzimas possibilitou à identificação de variabilidade genética intra-específica em isolados de *L. infantum* e que esta variabilidade pode ser relacionada com fatores ambientais, neste caso, a origem geográfica (nicho ambiental) a qual pertence cada isolado. Resultados similares foram descritos por Gallego *et al* (2001), Pratlong *et al.* (2004) e Kallel *et al.* (2008) que identificaram polimorfismos enzimáticos em cepas de *L. infantum* oriundas de diferentes regiões geográficas do mediterrâneo. De forma geral, os resultados obtidos com análise de isoenzimas no presente estudo permitem inferir que os isolados obtidos de cães portadores de diferentes formas clínicas da LVC apresentam perfil homogêneo para a maioria dos sistemas enzimáticos analisados, e que estes perfis são compatíveis com os apresentados para espécie *L. infantum*. De fato, nossos dados são consistentes com os descritos por Braga *et al.* (1986) que descreveram a presença de homogeneidade isoenzimática em cepas de *L. chagasi/L. infantum* isoladas de diferentes hospedeiros no estado do Pará, Brasil. O presente estudo abordou de forma pioneira a análise de perfil isoenzimático em isolados obtidos de cães portadores de diferentes formas clínicas da LVC, com intuito de relacionar possíveis polimorfismos nestes sistemas com a progressão clínica da doença. Contudo, os dados obtidos demonstram que para uma melhor interpretação e entendimento da relação entre a progressão clínica da LVC e a presença de polimorfismos isoenzimáticos entre isolados de *Leishmania infantum*, oriundos de cães naturalmente infectados, é necessário aumentar o número de isolados bem como o de sistemas enzimáticos estudados (Andrews *et al.*, 1999).

Para ampliar as investigações no âmbito molecular, foi padronizada no presente estudo a técnica de PCR. A PCR foi empregada com intuito confirmar o gênero a qual pertenciam todos os isolados obtidos. Os resultados obtidos com a realização da PCR e

empregando os iniciadores 150 e 152, dirigidos para a região conservada do minicírculo do kDNA, demonstraram que todos os isolados pertenciam ao gênero *Leishmania*. Isto ficou evidenciado pela detecção de um fragmento de 120 pb nas espécies de referência da OMS [*L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75)] e nos isolados obtidos dos cães naturalmente infectados. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os encontrados por Degraeve *et al.* (1994).

Segundo Schonian *et al.* (2010) a identificação das espécies do parasito que causam as leishmanioses é de suma importância para o entendimento das manifestações clínicas da doença, contribuindo para um correto diagnóstico e prognóstico, além de proporcionar melhores decisões em relação às medidas de tratamento e controle da doença. Sendo assim, foi empregada técnica de PCR-RFLP, descrita por Volpini *et al.* (2004), com o objetivo de identificar a(s) espécie(s) a qual pertenciam os isolados avaliados no presente estudos. Os resultados obtidos com a realização da técnica utilizando as espécies de *Leishmania* referenciadas pela OMS, permitiram distinguir as espécies do parasito por meio do perfil de restrição dos fragmentos de 120 pb do minicírculo do kDNA, conforme descrito por Volpini *et al* (2004) e Andrade *et al* (2006).

Após a padronização da técnica, os isolados de *Leishmania* foram submetidos à PCR-RFLP, onde foi verificado que nove deles apresentaram perfil de restrição compatível com o observado para cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e um isolado (**I-10**), oriundo de um cão assintomático da cidade de Itabirito, não apresentou restrição para a região de 120 pb do mkDNA. Comparativamente, o perfil apresentado pelo **I-10** foi semelhante ao observado para a espécie *L. amazonensis*. Estes resultados demonstram que: (i) o cão é um importante reservatório para a espécie *L. infantum* no ambiente urbano; (ii) o ciclo da doença no Brasil tem assumido um forte caráter zoonótico; (iii) a PCR-RFLP é uma eficiente ferramenta molecular que permite a identificação do parasito a nível específico, podendo ser empregada de forma satisfatória em áreas endêmicas para a LVC (Andrade *et al.*, 2006; Quaresma *et al.*, 2009).

A obtenção de um isolado (**I-10**) com perfil de restrição semelhante à *L. amazonensis* de certa forma, foi algo inesperado, uma vez que este isolado pela técnica de isoenzimas apresentou perfis enzimáticos compatíveis com a cepa de referência de *L. infantum*. Tolezano *et al* (2007) foram os primeiros a relatar a infecção em cão por *L. amazonensis*

na região de Araçatuba - SP (região endêmica para leishmaniose visceral), demonstrando que a espécie pode estar presente no ambiente peridomiciliar. O resultado apresentado pelo **I-10** pela PCR-RFLP dificilmente poderia estar relacionado com contaminação do isolado pela espécie *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) presente em nosso laboratório, pois o cultivo de cada isolado e amostra de referência foram realizados de forma sistemática e cuidadosa. Além disto, o DNA usado na PCR-RFLP para cada cepa de referência da OMS e isolados analisados foram obtidos da mesma massa de promastigotas utilizada para extração de isoenzimas; o que atenua ainda mais a chance de uma possível contaminação entre diferentes cepas ou espécies de *Leishmania* no presente estudo. Uma possível explicação para esta discordância de resultados apresentados pela isoenzimas e a PCR-RFLP em relação ao **I-10** poderia ser proveniente de uma mutação genética pontual na região de 120 pb do mkDNA neste isolado, o que impossibilitou o reconhecimento do sítio de restrição pela endonuclease Hae III, levando a um resultado compatível com a espécie *L. amazonensis*. Perreira *et al.* (2008) relata que a técnica de PCR-RFLP é uma excelente ferramenta molecular para estudos que envolvem identificação de espécies de diferentes organismos, mas apresenta como principal desvantagem, a obtenção de falsos resultados (ganho ou perda de fragmentos de restrição), que podem ser gerados devido a existência de mutações para o sítio de restrição enzimática. Entretanto, esta incompatibilidade de resultados apresentados pelas duas técnicas poderá ser sanada mediante a utilização de novas enzimas de restrição e comparação do seqüenciamento molecular deste isolado e da amostra de referência *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269).

Nos últimos anos, as técnicas moleculares têm sido usadas como métodos complementares nos estudos de variabilidade e caracterização de *Leishmania*. Dentro deste contexto, o presente trabalho utilizou a técnica de amplificação randômica do DNA (RAPD) para identificar eventuais polimorfismos genéticos presentes em isolados obtidos de cães sintomáticos ou assintomáticos para a LVC. Importantes informações sobre o polimorfismos genéticos em *Leishmania* têm sido obtidas pela técnica da PCR-RAPD (Hide *et al.*, 2001).

Os resultados apresentados no fenograma consenso pelo método de UPGMA, para o perfil de bandas geradas pela PCR-RAPD, demonstraram que a utilização dos iniciadores M13-40 F, QG1, L15995, K7, P53-1 permitiu a diferenciação a nível intra-específica entre as cepas e isolados de *Leishmania* utilizadas neste estudo. A distância

genética entre todas as amostras foi pequena (menor que 1), indicando elevada similaridade entre aos isolados e as cepas de referência estudadas. No geral, os valores de *Bootstraps* obtidos pelo fenograma consenso demonstram que os isolados obtidos de cães naturalmente infectados e portadores de diferentes formas clínicas da LVC formam um grupo com elevada similaridade genética, não sendo possível evidenciar diferenças genéticas significativas que pudessem ser associadas aos isolados e a forma clínica dos cães de origem. Os genomas já anotados e descritos para *Leishmania* mostram que, mesmo as diferentes espécies, se apresentam muito semelhantes (Peacock *et al.*, 2007).

Considerando a localização geográfica (Governador Valadares ou Itabirito) os resultados obtidos com o RAPD não evidenciaram diferenças genéticas significativas entre os isolados que pudessem ser relacionadas à região geográfica de origem. Todavia, a técnica de RAPD tem se demonstrado válida para a caracterização genética de diferentes cepas e espécies de *Leishmania* (Martinez *et al.*, 2003; Zemanova *et al.*, 2004; Alimohammadian *et al.*, 2010). Utilizando os mesmos iniciadores para RAPD do presente trabalho, Gomes *et al* (1995) e Carvalho *et al* (2006) conseguiram identificar diferenças genéticas entre cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes humanos em diferentes regiões geográficas do Brasil. Em um estudo com cepas de *L. infantum* causadoras da forma visceral e cutânea da doença em humanos e cães, Toledo *et al* (2002) demonstraram por meio do RAPD, que estes parasitos apresentam perfil genético semelhante, independente da forma clínica da doença. Estes autores sugerem que a manifestação das diferentes formas clínicas da doença parece estar mais relacionada ao *status* imunológico do hospedeiro do que com o *background* genético do parasito.

Os resultados obtidos com a realização da PCR-RAPD foram semelhantes aos da técnica de isoenzimas, uma vez que grande parte dos isolados estudados apresentaram perfis bioquímicos e genéticos semelhantes ao da cepa de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75). Todavia, a análise do fenograma consenso demonstrou que o **I-10** formou um agrupamento a parte dos demais isolados de *L. infantum* (*Bootstrap* de 100%). Este dado é interessante, pois no presente estudo observamos que este mesmo isolado apresentou pela PCR-RFLP um perfil de *L. amazonensis* diferentemente do observado para os demais isolados, os quais apresentaram perfil de restrição semelhante ao da cepa de referência de *L. infantum*. Reforçando o que já foi discutido anteriormente em relação à técnica de isoenzimas, o **I-10** apresentou perfil isoenzimático compatível com cepa de referência de *L. infantum*, para todos os sistemas analisados.

De certa forma, os resultados obtidos para o isolado **I-10**, considerando a RAPD e PCR-RFLP e suas disparidades quando confrontados com a técnica de isoenzimas, são intrigantes, pois apontam para uma divergência entre os marcadores utilizados. Apesar de ser uma técnica amplamente utilizada na caracterização de parasitos *Leishmania*, as isoenzimas, refletem diretamente a expressão de características fenotípicas do parasito (Zaidi *et al.*, 2003). Mesmo refletindo indiretamente o genótipo, as isoenzimas podem apresentar elevada plasticidade fenotípica, levando em alguns casos a interpretações equivocadas de resultados. Grimaldi *et al.* (1982) relataram a presença de variações isoenzimáticas em cepa de *Leishmania* mantida sob diferentes condições de cultivo. Desta forma, os dados obtidos pela RAPD, PCR-RFLP e isoenzimas para o isolado **I-10** devem ser averiguados com mais cautela, pois somente através de testes moleculares mais específicos, como caracterização por RFLP do gene *hsp70*, perfil de microssatélites e ou sequenciamento será possível esclarecer de forma satisfatória os resultados obtidos previamente.

No presente trabalho utilizamos diferentes metodologias biológicas e biotecnológicas com intuito de caracterizar isolados de *Leishmania spp.* oriundos de cães portadores de diferentes formas clínicas da LVC. Neste sentido foram empregadas abordagens no âmbito do comportamento biológico dos isolados no contexto *in vitro*, avaliado pelo perfil de crescimento em meio de cultivo e *in vivo* através da infecção experimental em hamster. Além disto, foram empregadas metodologias bioquímicas e moleculares com intuito de identificar polimorfismos genéticos entre os isolados a fim de associá-los com as diferentes formas clínicas dos cães de origem. É consenso na comunidade científica que as manifestações clínicas nas infecções por *Leishmania* são determinadas por parâmetros multifatoriais, dentre os quais se destacam o *background* genético e *status* imunológico do hospedeiro e as diferentes espécies e cepas do parasito (Banuls *et al.*, 2007).

Diferentes ferramentas moleculares tais como: isoenzimas, RAPD e RFLP têm sido utilizados extensivamente na análise genética de parasitos *Leishmania* com intuito de relacionar os resultados obtidos com os parâmetros clínicos e epidemiológicos da doença (Rioux *et al.*, 1990; Indiani-de-Oliveira *et al.*, 2004; Cuervo *et al.*, 2004). Estes trabalhos revelam que estes marcadores são capazes de identificar e distinguir diferentes cepas e espécies de *Leishmania*. Contudo, os mesmos não conseguem explicar de forma satisfatória os diferentes fenótipos clínicos da doença. No trabalho publicado por Guerbouj *et al.* (2001); utilizando cariotipagem molecular em cepas de *L. infantum* e

com ênfase na análise do polimorfismos no tamanho cromossômico; foi possível identificar correlações entre o pleomorfismos clínicos causado pelos parasitos com dados genéticos. De acordo com Banuls *et al.* (2007) a maiorias dos estudos que abordam caracterização genética entre diferentes cepas e espécies de *Leishmania* não conseguem encontrar uma associação entre as diferentes formas clínicas da doença e a diversidade genética do parasito. Por este motivo, estudos recentes têm se concentrado na análise da genética parasitária tendo como foco os marcadores genéticos relacionados à virulência. Neste sentido, o completo seqüenciamento genômico da espécie *Leishmania major* tem contribuído com informações substanciais na análise de fatores de virulência, enzimas fundamentais na via metabólica e fatores parasitários responsáveis pelo tropismo e patogenicidade (Ivens *et al.*, 2005).

Dentro deste contexto, os resultados obtidos no presente estudo, reforçam a necessidade de uma melhor investigação tanto a nível biológico, bioquímico e molecular destes e de novos isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães portadores da forma clínica sintomática ou assintomática da LVC, pois desta forma poderão ser geradas novas informações que possibilitem a associação destes parâmetros com a evolução clínica da leishmaniose visceral canina. Adicionalmente, esta abordagem poderá auxiliar na seleção de cepas a serem empregadas na elaboração e desenvolvimento de novos experimentos de cunho biotecnológico que identifiquem cepas de *L. infantum* com diferentes perfis de virulência/patogenicidade.

9 - Conclusões

Após reunir o conjunto de dados obtidos neste trabalho que realizou a caracterização biológica, bioquímica e molecular e genética em isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

As diferenças observadas no perfil de crescimento *in vitro* e de infectividade *in vivo* parecem estar mais relacionados com o *background* genético de cada isolado, e estas aparentemente não estão correlacionadas com a expressão das diferentes formas clínicas (assintomática e sintomática) na LVC.

A infecção experimental no modelo Hamster (*Mesocricetus auratus*) permitiu apesar da baixa taxa de infectividade, selecionar dois isolados (I-3 e I-8) com potencial de infecção diferenciado quando comparados aos outros isolados e a cepa de referência de *Leishmania infantum*.

A técnica de isoenzimas não foi capaz de identificar diferenças genéticas significativas entre os isolados que pudessem ser correlacionadas com as forma clínicas (sintomática ou assintomática) do cão de origem. Entretanto, pela técnica de isoenzimas foi possível identificar variabilidade genética entre os isolados obtidos de cães da cidade de Governador Valadares e Itabirito, sendo desta forma, uma importante técnica ser empregada em estudos relacionados à epidemiologia molecular de isolados da mesma espécie oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil.

A PCR-RFLP é uma técnica que permite a identificação e diferenciação de espécies do gênero *Leishmania* sendo que a maioria dos isolados obtidos dos cães naturalmente infectados apresentaram perfil de restrição compatível com a espécie de *Leishmania infantum*.

A técnica de PCR-RAPD não foi capaz de identificar diferenças genéticas significativas entre os isolados que pudessem ser associadas às diferentes formas clínicas da LVC.

Os resultados obtidos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos relacionados à caracterização dos isolados de *Leishmania spp.* obtidos de cães naturalmente infectados e portadores de diferentes formas clínicas da LVC. Desta forma, os resultados obtidos com este trabalho permitem propor as seguintes perspectivas:

- Aumentar o número de isolados de *Leishmania infantum* obtidos de cães naturalmente infectados, portadores de diferentes formas clínicas e de diferentes regiões do Brasil, no sentido de buscar uma melhor compreensão e interpretação dos resultados obtidos com as análises biológicas, bioquímicas e moleculares;
- Avaliar o perfil de resistência ou susceptibilidade às drogas *in vitro* e *in vivo* dos isolados mediante o emprego de fármacos utilizados para o tratamento da LV;
- Avaliar a infectividade dos isolados mediante a infecção *in vitro* tendo como base a utilização de macrófagos murinos (linhagem J774);
- Estudar detalhadamente a infecção experimental no âmbito imunológico e parasitológico em modelo hamster, empregando a via de inoculo intracardíaca com períodos de avaliação entre 90 e 360 dias através dos seguintes parâmetros: (i) perfil hematológico por meio de hemograma automatizado; (ii) resposta imune humoral por ELISA para avaliar o perfil de imunoglobulinas IgG, IgM e IgE bem como as o perfil das subclasses IgG1a e IgG2b; (iii) resposta imune celular será avaliada no contexto *ex vivo* e *in vitro* empregando a imunofenotipagem por citometria de fluxo e (iv) carga parasitária no baço e fígado por meio de *Leishman Donovan Units* e pela PCR em Tempo Real;
- Utilizar outros marcadores moleculares tais como: o microssatélites, SSR-PCR e LSSP-PCR para identificação de polimorfismos genéticos entre os isolados que possam estar relacionados com a progressão clínica da LVC.

11 – Considerações Finais

Mediante os recentes avanços biotecnológicos obtidos nos últimos anos que permitem a detecção, e diferenciação de espécies e cepas de parasitos do gênero *Leishmania* e, considerando a diversidade de manifestações clínicas da leishmaniose visceral em especial a LV canina, no presente estudo foram empregadas as principais ferramentas biotecnológicas na identificação de isolados de *Leishmania spp.* de cães assintomáticos e sintomáticos. Inicialmente, o nosso objetivo foi de confirmar que a infecção dos cães era efetivamente por *L. infantum* e, posteriormente, identificar nestes isolados perfis distintos de virulência e patogenicidade. Nossas futuras ambições científicas nesta linha será a caracterização de cepas com padrões distintos de resistência e suscetibilidade a drogas bem definidos que permitirão a construções de modelos para ensaios terapêuticos em plataformas de testes de drogas *in vitro* e *in vivo*. Para atingir estas perspectivas é fundamental o conhecimento do comportamento biológico, bioquímico, genético destes e de outros isolados que o nosso grupo de pesquisa vem obtendo nos últimos anos a fim de fornecer um poderoso instrumento de bioprospecção de fármacos no futuro a médio e longo prazo. Neste trabalho, iniciamos os estudos em cepas de *Leishmania* isolados obtidos de cães nos últimos cinco anos na área endêmica de Governador Valadares e de Itabirito ambas cidades do estado de Minas Gerais. Além disso, este estudo se encontra em prosseguimento onde os isolados, provenientes de outras regiões de Minas Gerais e do Brasil, já foram obtidos e se encontram no biodepositário do Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP.

Nesta primeira etapa, foram mostrados os resultados obtidos de 10 isolados (cinco de cães assintomáticos e cinco de cães sintomáticos) em comparação com a cepa padrão da OMS de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) empregando como ferramenta avaliação clínica e diagnóstica (diagnóstico parasitológico e molecular) dos animais de área endêmica, curva de crescimento *in vitro* de todos os isolados, estudo bioquímico por isoenzimas, e molecular através da confirmação da espécie de *Leishmania* pela técnica de PCR-RFLP e o perfil genético das cepas pela RAPD. Para os estudos de patogenicidade foi empregada a infecção experimental *in vivo* em hamster (*Mesocricetus auratus*), com ênfase na análise da carga parasitária no baço e fígado após três meses de infecção. Desta forma, o presente estudo gerou uma contribuição significativa não apenas na implantação e consolidação de técnicas moleculares no LIMP, mas também de implementação de uma nova linha de pesquisa que está sendo amplamente fomentada em nosso grupo de pesquisa com o objetivo de contribuir em

diversas áreas do conhecimento tais como: biologia de parasitos, biologia molecular, bioquímica, cultivo celular de macrófagos imortalizados e testes de fármacos. Com os dados obtidos neste estudo preliminar está sendo possível planejar futuros experimentos onde poderemos compreender melhor mecanismos imunológicos entre cepas com elevado perfil de virulência e patogenicidade, seguido do estudo de resistência e susceptibilidade à drogas.

12 – Referências Bibliográficas

Aguilar, C.M.; Rangel, E.F.; Garcia, L.; Fernandez, E.; Momen, H.; Grimaldi Filho, G.; De Vargas, Z. (1989). Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 84, 19-28.

Akopyants, N.S.; Kimblin, N.; Secundino, N.; Patrick, R.; Peters, N.; Lawyer, P.; Dobson, D. E.; Beverley, S.M.; Sacks, D.L. (2010). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* New York, N.Y. 324, 265-268.

Alencar, J.E & Neves, J. (1982). Leishmaniose visceral (Calazar), Doenças infecciosas e parasitárias, edited by R. Veronesi, 724-738.

Alimohammadian, M.H.; Darabi, H.; Ajdary, S.; Khaze, V.; Torkabadi, E. (2010). Genotypically distinct strains of *Leishmania major* display diverse clinical and immunological patterns in BALB/c mice. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 969-975.

Alvar, J.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Den Boer, M.; Canavate, C.; Dedet, J.P.; Gradoni, L.; Ter Horst, R.; Lopez-Velez, R.; Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 334-359.

Andrade, H.M.; Reis, A.B.; dos Santos, S.L.; Volpini, A.C.; Marques, M.J.; Romanha, A.J. (2006). Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* 140, 231-238.

Andrews, R.H. & Chilton, N.B. (1999). Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. *International Journal for Parasitology* 29, 213-253.

Armitage, P. & Berry, G. (1994). Statistical inference. In: Armitage, P., Berry, G. (Eds.), *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Science, Oxford, 93–153.

Ashford, R.W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 14, 523-532.

Ashford, R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30, 1269-1281.

Baneth, G.; Koutinas, A. F.; et al. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 24(7), 324-330.

Banuls, A.L.; Hide, M.; Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* 64, 1-109.

Bates, P. A. (1994). The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 79(2), 215-218.

- Ben Abda, I.; de Monbrison, F.; Bousslimi, N.; Aoun, K.; Bouratbine, A.; Picot, S. (2011). Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 17-22.
- Ben Abderrazak, S.; Guerrini, F.; Mathieu-Daude, F.; Truc, P.; Neubauer, K.; Lewicka, K.; Barnabe, C.; Tibayrenc, M. (1993). Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods in Molecular Biology* 21, 361-382.
- Botilde, Y.; Lautrent, T.; Quispe Tintaya, W.; Chicarro, C.; Cañavate, C.; Cruz, I.; Kuhls, K.; Schonian, G.; Dujardin, J. C. (2006). Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, Genetics and Evolution* 6, 440-446.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.
- Braga, R. R.; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Ryan, L.; Silveira, F. T. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. (1986). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 143-5.
- Cardenas, R.; Sandoval, C.M.; Rodriguez-Morales, A.J.; Vivas, P. (2008). Zoonoses and climate variability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 326-330.
- Carvalho M.L.; de Andrade, A.S.; Fontes, C.J.; Hueb, M.; de Oliveira Silva, S.; Melo, M.N. (2006). *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Tropica* 98, 277-285.
- Castro, E.A.; Thomaz-Soccol, V.; Augur, C.; Luz, E. (2007). *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Parana (Brazil). *Experimental Parasitology* 117, 13-21.
- Clark, A. G.; Lanigan, C. M. S. (1993). Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Molecular Biology and Evolution* 10: 1096-1111.
- Cortes, S.; Mauricio, I.; Almeida, A.; Cristovao, J.M.; Pratlong, F.; Dedet, J.P.; Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International* 55, 277-283.
- Croft, S. L. (2001). Monitoring drug resistance in *Leishmania*. *Tropical Medicine & International Health* 6(11), 899-905.

- Cuervo, P., Cupolillo, E., Nehme, N., Hernandez, V., Saravia, N. and Fernandes, O. (2004). *Leishmania* (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology* 108, 59–66.
- Cupolillo, E.; Grimaldi, G.; Momen, H. (1994). A general classification of New-World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50, 296–311.
- Cupolillo, E.; Grimaldi, G.; Momen, H.; Beverley, S.M. (1995). Intergenic Region Typing (Irt)—a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73, 145–155.
- Cupolillo, E.; Medina-Acosta, E.; Noyes, H.; Momen, H.; Grimaldi, G. Jr. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today* 16, 142–144.
- da Silva, L.A.; de Sousa Cdos, S.; da Graca, G.C.; Porrozzi, R.; Cupolillo, E. (2010). Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 77–83.
- Dantas-Torres, F.; Brandao-Filho, S.P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 48, 151–156.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology* 149(3-4), 139–146.
- Dea-Ayuela, M.A.; Rama-Iniguez, S.; Alunda, J.M.; Bolas-Fernandez, F. (2007). Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. *Veterinary Research Communications* 31, 703–717.
- Degrave, W.; Fernandes, O.; Campbell, D.; Bozza, M.; Lopes, U.; (1994). Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 463–469.
- De Paiva Cavalcanti, M., Felinto de Brito, M.E., de Souza, W.V., de Miranda Gomes, Y., Abath, F.G. (2009). The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet J* 182, 356–358.
- Descoteaux, A.; Turco, S. J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1455(2-3), 341–352.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27, 305–318.

Dores-Moreira, N. (2010). Hamster *Mesocricetus auratus* como potencial modelo experimental para estudos de testes de drogas e vacinas contra Leishmaniose Visceral. Ouro Preto: Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. Qualificação de doutorado, 80p.

Elbihari, S. & el-Hassan, A.M. (1987). The histopathology of naturally-occurring cutaneous leishmaniasis in the reservoir host, *Psammomys obesus*. Bulletin de la Société de pathologie exotique 80, 615-623.

Ezra, N.; Ochoa, M.T.; Craft, N. (2010). Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. Journal of Global Infectious Diseases 2, 248-257.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

França-Silva, J. C.; da Costa, R. T.; et al. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Veterinary Parasitology 111(2-3), 161-173.

Ferreira, M.E. & Grattapalia, D. (1995). Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Emprabacenargen, 220p.

Gallego, M.; Pratlong, F.; Fisa, R.; Riera, C.; Rioux, J.A.; Dedet, J.P.; Portus, M. (2001). The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95, 269-271.

Gardener, P.J.; Chance, M.L.; Peters, W. (1974). Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 68, 317-325.

Garg, R.; Dube, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. The Indian journal of medical research 123, 439-454.

Genaro, O. (1993). Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado, 202p.

Gifawesen C.; Farrell JP. (1989). Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. Infection and Immunity 57, 3091–3096.

Giunchetti, R. C.; Mayrink, W.; et al. (2006). Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. Journal of Comparative Pathology 135(2-3), 100-107

Godfrey, D.G.; Kilgour, V. (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70, 219-224.

Gomes, R.F., Macedo, A.M., Pena, S.D., Melo, M.N. (1995). *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental parasitology* 80, 681-687.

Gomes, A.H.; Ferreira, I.M.; Lima, M.L.; Cunha, E.A.; Garcia, A.S.; Araujo, M.F.; Pereira-Chiocola, V.L. (2007). PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Veterinary parasitology* 144, 234-241.

Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaïem, D.E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Brodskyn, C.I. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7845-7850.

Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L.C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal* 175, 45-52.

Gontijo, C.M.F; Melo, M.N. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 3, 338-349.

Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35, 1169–1180.

Grimaldi, G.; Momen, H.; Naiff, R.D.; McMahonpratt, D.; Barrett, T.V. (1991). Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44, 645–661.

Grimald JR, G.; Momen, H.; Soares, M. J.; Moriearty, P. L. (1982). Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania Mexicana mexicana*. *Int J Parasitol.* 12, 185-9

Grimaldi, G. & Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 230-250.

Guerbouj, S., Guizani, I., Speybroeck, N., Le Ray, D. and Dujardin, J.C.(2001). Genomic polymorphism of *Leishmania infantum*: a relationship with clinical pleomorphism? *Infection, Genetics and Evolution* 1,49–59.

Hallden, C.; Hansen, M.; Nilsson, N.; Hjerdin, A.; Säll, T. (1996). Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1185-1192.

- Hamad, S.H.; Khalil, E.A.; Musa, A.M.; Ibrahim, M.E.; Younis, B.M.; Elfaki, M.E.; El-Hassan, A.M. (2009). *Leishmania donovani*: genetic diversity of isolates from Sudan characterized by PCR-based RAPD. *Experimental parasitology* 125, 389-393.
- Hajjaran, H.; Vasigheh, F.; Mohebbi, M.; Rezaei, S.; Mamishi, S.; Charedar, S. (2011). Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 25, 20-24.
- Hide, M.; Banuls, A.L.; Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* 123, 425-432.
- Hommel, M.; Jaffe, C.L.; Travi, B.; Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89 Suppl 1, 55-73.
- Honore, S.; Garin, Y.J.; Sulahian, A.; Gangneux, J.P.; Derouin, F. (1998). Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 21, 231-239.
- Howard, J.G.; Hale, C.E.; Chan-Liew, W.L. (1980). Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. I. Immunogenetics aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunology* 2, 303-14.
- Hunter, R.L. & Markert, C.L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science New York, N.Y.* 125, 1294-1295.
- Indiani de Oliveira, C., Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Ramos de Jesus, J., Bomura Rosato, A., Santa da Silva, J., Brodskyn, C., Barral-Netto, M. and Barral, A. (2004). *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and Infection* 6, 977-984.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Blanchettin, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- Jeronimo, S.M.; Oliveira, R.M.; Mackay, S.; Costa, R.M.; Sweet, J.; et al. (1994). An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 386-388.
- Kallel, K., Pratlong, F., Haouas, N., Kaouech, E., Belhadj, S., Anane, S., Dedet, J.P., Babba, H., Chaker, E. (2008). Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. *Acta Tropica* 106, 132-136.

Killick-Kendrick, R; Lainson, S; Rioux, J. A; Safyanova, V. M. (1986). The taxonomy of *Leishmania* like parasite of reptiles. IMEE. Montpellier, 143-148.

Killick-Kendrick, R. (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 65 Suppl 1, 37-42.

Kreutzer, R.D. & Christensen, H.A. (1980). Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 29, 199-208.

Lachaud, L.; Chabbert, E.; Dubessay, P.; Dereure, J.; Lamothe, J.; Dedet, J.P.; Bastien, P. (2002). Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125, 197-207.

Laison, R. & Shaw, J.J. (1972). Leishmaniasis of the New World. Taxonomic problems. *British Medical Bulletin* 28, 44-48.

Lainson, R.; Ward, R.D.; Shaw, J.J. (1977). *Leishmania* in phlebotomine sandflies. VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania Mexicana* and *L. braziliensis* complex. *Proceedings of the Royal Society* 199,309-320.

Laison, R. & Shaw, J.J. (1979). The role of animals in the epidemiology of the South American leishmaniasis. In: *Biology of Kitenoplastida*. Edited by Lumsden W. and Evans D. Academic Press, London 2,1-116.

Lainson, R. & Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. (Ed.). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. New York: Academic Press, 1-120.

Lainson, R. & Shaw, J. J. (1988). Observations on the developement of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 63, 134-145.

Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Maazoun, R.; Pasteur, N.; Pratlong, F.; Lepart, J. (1981). The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903,-The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance (author'transl). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 56, 575-591.

Limoncu, M.E.; Balcioglu, I.C.; Yereli, K.; Ozbilgin, A. (1997). A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2430-2431.

Lopes, R.; Lopes, M. T. G.; Figueira, A. V. O. ;et al (2002). Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp). *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 29.

Louassini, M., Adroher, F.J., Foulquie, M.R. and Benitez, R. (1998). Investigations on the in vitro metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 70, 355–368.

Lukes, J.; Mauricio, I.L.; Schonian, G.; Dujardin, J.C.; Soteriadou, K.; Dedet, J.P.; Kuhls, K.; Tintaya, K.W.; Jirku, M.; Chocholova, E.; Haralambous, C.; Pratlong, F.; Obornik, M.; Horak, A.; Ayala, F.J.; Miles, M.A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9375-9380.

Maazoun, R.; Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Pasteur, N.; Killick-Kendrick, R.; Pratlong, F. (1981). Significance of enzymatic polymorphism in *Leishmaniae* -On three heterozygous stocks of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania cf. tarentolae* Wenyon, 1921 and *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford and Bray, 1973 (author's transl)]. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 56, 467-475.

Madeira, M.F.; Schubach, A.; Schubach, T.M.; Pacheco, R.S.; Oliveira, F.S.; Pereira, S.A.; Figueiredo, F.B.; Baptista, C.; Marzochi, M.C. (2006). Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 442-445.

Maia-Elkhoury, A. N.; Alves, W. A.; et al. (2008). Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública* 24(12), 2941-2947.

Malaquias, L.C.; do Carmo Romualdo, R.; do Anjos, J.B. Jr.; Giunchetti, R.C.; Correa-Oliveira, R.; Reis, A.B. (2007). Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitology research* 100, 233-239.

Mancianti, F.; Gramiccia, M.; et al. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82(4), 566-567.

Martinez, E.; Alonso, V.; Quispe, A.; Thomas, M.C.; Alonso, R.; Pinero, J.E.; Gonzalez, A.C.; Ortega, A.; Valladares, B. (2003). RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology* 127, 513-517.

Martin-Sanchez, J.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T.; Ludovisi, A.; Morillas-Marquez, F. (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 228-232.

Martins, A. V.; Willians, P.; Falcão, A. L. (1978). American sanflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 195.
Mauricio, I.L.; Stothard, J.R.; Miles, M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16, 188-189.

- Melby, P.C.; Chandrasekar, B.; Zhao, W.; Coe, J.E. (2001). The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *The Journal of Immunology* 166, 1912-1920.
- Mendez, S.; Fernandez-Perez, F.J.; Santin, M.; De La Fuente, C.; Cuquerella, M.; Gomez-Munoz, M.T.; Alunda, J.M. (2001). Correlation between in vitro and in vivo infectivity of *Leishmania infantum* clones. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 616-621.
- Molano, I.; Alonso, M.G.; Miron, C.; Redondo, E.; Requena, J.M.; Soto, M.; *et al.* (2003). A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 92, 1-13.
- Molina, R.; Amela, C.; *et al.* (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(4), 491-493.
- Moore, E.M. & Lockwood, D.N. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases* 2, 151-158.
- Montalvo, A.M.; Monzote, L.; Fraga, J.; Montano, I.; Muskus, C.; Marin, M.; de Doncker, S.; Velez, I.D.; Dujardin, J.C. (2008). PCR-RFLP and RAPD for typing neotropical *Leishmania*. *Biomedica* 28, 597-606.
- Montoya, L.; Gallego, M.; Gavignet, B.; Piarroux, R.; Rioux, J.A.; Portus, M.; Fisa, R. (2007). Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 76, 888-895.
- Moreno, J. & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* 18, 399-405.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262, 56-61, 64-55.
- Murphy, R. W.; Sites, J. W.; Buth, D.G.; Haufler, C.H. (1990). Proteins I: Isozyme electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz C (eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Sunderland, 126.

Murray, H.W.; Stern, J.J.; Welte, K.; Rubin, B.Y.; Carriero, S.M.; Nathan, C.F. (1987). Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin-2 and interferon-gamma. *The Journal of Immunology* 138, 2290-2297.

Murray, H.W. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis in 2010: direction from Bihar State, India. *Future Microbiology* 5, 1301-1303.

Nader, T. & McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology* 10(2), 301-308.

Nei, M. & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 10, 5269-5273.

Nieto, A.; Dominguez-Bernal, G.; Orden, J.A.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N.; Carrion, J. (2011). Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Veterinary research* 42, 39.

Nogueira, Y.L. & Galati, E.A. (2006). Reproduction of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in conditioned cell culture growth medium. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48, 147-150.

Nolan, T.J. & Herman, R. (1985). Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *The Journal of Protozoology* 32, 70-75.

Noyes, H.A.; Reyburn, H.; Bailey, J.W.; Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2877-2881.

Nylen, S. Sacks, D. (2007), Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in immunology* 28, 378-384.

Observatório de Saúde de Minas Gerais – Microregião de Itabirito. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/estatistica-e-informacao-em-suade/observatorio-de-saude/municipios/ITABIRITO.pdf>>

Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schonian, G. (2006). Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 495-503.

Oliveira, F.S.; Pirmez, C.; Pires, M.Q.; Brazil, R.P.; Pacheco, R.S. (2005). PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology* 129, 219–227.

Oliveira, A.L.; Paniago, A.M.; Dorval M.E.; Oshiro, E.T.; Leal, C.R.; et al. (2006) Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 446–450.

Palatnik-de-Souza, C.B.; Santos, W.R.; França Silva, J.C.; Costa, R.T.; Barbosa Reis, A.; Palatnik, M.; Mayrink, W.; Genaro, O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 510–517.

Peacock, C. S.; Seeger, K.; Harris, D. et al. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*. 39, 839-47.

Pearson, R.D. & Roberts, D. (1990). Host immunoglobulin on spleen-derived *Leishmania donovani* amastigotes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43, 263-265.

Pearson, R.D. & Sousa, A.Q. (1996). Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 22, 1-13.

Penny, R.H.C. & Carlisle, C.H. (1970). The bone marrow of the dog: a comparative study of biopsy material obtained from the iliac crest, rib and sternum. *The Journal of Small Animal Practice* 11, 727-734.

Pereira, F.; Carneiro, J.; Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent patents on DNA and gene sequences* 2, 187-199.

Peters, N. & Sacks, D. (2006). Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological Reviews* 213, 159-179.

Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P. (2004). Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal Clinical Microbiology* 42, 4077-4082.

Profeta-da-Luz, Z.M.; Pimenta, D.N.; Cabral, A.L.; Fiuza, V.O.; Rabello, A. (2001). Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 249–254.

Pumarola, M.; Brevik, L.; et al. (1991). Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology* 105(3), 279-286.

Quaresma, P.F.; Murta, S.M.; Ferreira Ede, C.; da Rocha-Lima, A.C.; Xavier, A.A.; Gontijo, C.M. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica* 111, 289-294.

Quinnel, R. J. & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934.

- Reis, A. B. (2001). Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado, 180p.
- Reis, A. B.; Martins-Filho, O. A.; et al. (2006). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 81(1), 68-75.
- Reis, A. B.; Martins-Filho, O. A.; et al. (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128(1-3), 87-95.
- Reis, A.B.; Giunchetti, R.C.; Carrillo, E.; Martins-Filho, O.A.; Moreno, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 26, 341-349.
- Reithinger, R. & Davies, C.R. (2002). Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitology* 18, 289-290.
- Requena, J.M.; Soto, M.; Doria, M.D.; Alonso, C. (2000). Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary immunology and immunopathology* 76, 269-281.
- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Serres, E.; Pratlong, F.; Bastien, P.; Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 65, 111-125.
- Rodgers, M. R.; Popper, S. J.; Wirth, D. F. (1990). Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71, 267-275.
- Ross, R. (1903). Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal* 2, 1261-1262.
- Rougeron, V.; De Meeus, T.; Kako Ouraga, S.; Hide, M.; Banuls, A.L. (2010). "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS pathogens* 6.
- Rotureau, B.; Ravel, C.; Couppie, P.; Pratlong, F.; Nacher, M.; Dedet, J.P.; Carmne, B. (2006). 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. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 459-467.
- Safyanova, V.M. (1982). Classification of the genus *Leishmania* Ross. In: *The Leishmania*. Protozoology. Academy of Sciences, USRR All Union Society of Protozoologists 7, 573-576.

Santos, F.R.; Pena, S.D.; Epplen, J.T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics* 90, 655-656.

Schonian, G.; Mauricio, I.; Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology* 26, 466-469.

Schuster, F.L., Sullivan, J.J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 374-389.

Shaw, J.J. (2006). Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 577-579.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.; Melo, M.N. (2005). Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitology* 21, 550-552.

Silva Sde, O., Wu, A.A., Evans, D.A., Vieira, L.Q., Melo, M.N., (2009). *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania* major-like. *Acta Tropica* 112, 239-248.

Sneath, P. H. A.; Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy*. San Francisco, USA, W. H. Freeman.

Solano-Gallego, L.; Morell, P.; Arboix, M.; Alberola, J.; Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 560-563.

Stauber, L. A. (1958). Host resistance of the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. *Rice Institute Pamphlet* 45, 80-96.

Strauss-Ayali, D.; Jaffe, C.L.; Burshtain, O.; Gonen, L.; Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *Journal of Infectious Diseases* 189, 1729-1733.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2414-2418.

Tibayrenc, M.; Ben Abderrazak, S.; Guerrini, F.; Banuls, A. (1993). *Leishmania* and the clonal theory of parasitic protozoa. *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis* 70, 375-382.

Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology* 18, 405-410.

Tibayrenc, M. (2009). Multilocus enzyme electrophoresis for parasites and other pathogens. *Methods in Molecular Biology* 551, 13-25.

Thomaz-Soccol, V.; Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Pratlong, F.; Martinidumas, A.; Serres, E. (1993). Phylogenetic taxonomy of New-World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 68, 104–106.

Toledo, A., Martin-Sanchez, J., Pesson, B., Sanchiz-Marin, C., Morillas-Marquez, F. (2002). Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119, 257-264.

Tolezano, J.E.; Uliana, S.R.; Taniguchi, H.H.; Araujo, M.F.; Barbosa, J.A.; Barbosa, J.E.; Floeter-Winter, L.M.; Shaw, J.J. (2007). The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology* 149, 280-284.

Van der peer, Y.; Der wachter, R. (1994). Treecon for Windows, a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* 10, 569-570.

Volpini, A.C.; Passos, V.M.; Oliveira, G.C.; Romanha, A.J. (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90, 31-37.

Zaidi, N., Konstantinou, K., Zervos, M. (2003). The role of molecular biology and nucleic Acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med* 127, 1098-1105.

Zemanova, E.; Jirku, M.; Mauricio, I.L.; Miles, M.A.; Lukes, J. (2004). Genetic polymorphism within the *leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70, 613-617.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.

Werneck, G.L.; et al. (2006) Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection* 135, 195 –201.

Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

World Health Organization (1984). The Leishmaniasis: Report of a WHO expert committee. Tech. Rep. Series WHO No. 701, World Health Organization, Geneva, 105-107.

World Health Organization (2003). TDR diseases/Diseases current portfolio. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm> (Accessed 30 Dec 2003).

World Health Organization (2010a). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, 184.

World Health Organization (2010b). Control of the Leishmaniasis. WHO Technical Reports Series 949. In WHO Geneva, 1-201. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.in/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>.