

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINARIA
CAMPUS ARAÇATUBA

***Leishmania* spp. EM *Didelphis albiventris* E *Micoureus*
paraguayanus (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA)**

Amanda Pifano Neto Quintal
Medica Veterinária

Araçatuba – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS ARAÇATUBA

***Leishmania* spp. EM *Didelphis albiventris* E *Micoureus*
paraguayanus (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA)**

Amanda Pifano Neto Quintal

Orientadora Dra. Cárís Maroni Nunes
Co-orientador Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Curso de Medicina Veterinária, campus Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba-SP

2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Q7L Quintal, Amanda Pifano Neto.
Leishmania spp. em reservatórios marsupiais
Didelphis albiventris e *Micoureus paraguayanus* /
Amanda Pifano Neto Quintal. - Araçatuba: [s.n.], 2010
50 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientadora: Profa. Cária Maroni Nunes
Coorientador: Prof. Fernando Pacheco Rodrigues

1. Leishmaniose visceral 2. Epidemiologia 3. Reação em cadeia da polimerase

CDD 636.0896


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Leishmania spp. em Didelphis albiventris e Micoreus paraguayanus
(Mammalia: Didelphimorphia).

AUTOR: AMANDA PIFANO NETO QUINTAL

ORIENTADOR: Dr.^a CARIS MARONI NUNES


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. WAGNER ANDRÉ PEDRO


Dr.^a WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI


Dr.^a CARIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 05 de março de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a CARIS MARONI NUNES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Amanda Pifano Neto Quintal – nascida na cidade de Juiz de Fora - MG em 26 de outubro de 1982. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul em fevereiro de 2008. Realizou a iniciação científica na área de parasitologia no Laboratório de Parasitologia Veterinária (LAPAVET) na UFSM, e estágios na área de animais silvestres na EMBRAPA Pantanal, Zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e Zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva (CIGS). Possui 04 publicações completas na área de parasitologia e 11 resumos apresentados em congressos nacionais. Possui experiência na área de doenças parasitárias, animais silvestres e biologia molecular.

“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei” (...) “Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz, e ser feliz”.

Almir Sater e Renato Teixeira

“A vontade supera o medo de errar”.

Zé Maria da Silva, Cáceres – MT.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais João e Cida, que sempre me apoiaram e tornaram tudo isso possível.

À minha irmã e melhor amiga, Aline.

Ao André Belico de Vasconcelos, que sempre me apoiou e incentivou.

Ao Carlos Ernando, pelo modelo de professor e irmão mais velho.

Aos meus tios Nininho ("in memoriam") e Marquinhos.

À minha querida Vó Cici.

À Maria, pelas viagens.

À Amy, pela bagunça.

A todos que participaram da minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

A CAPES, Pró-reitoria de Pós-Graduação e FAPESP, pelas bolsas de estudos durante todo o mestrado.

Em especial à Professora Dra. Cárís Maroni Nunes, minha orientadora, pela oportunidade de ter ingressado no programa de pós-graduação, e agora, concluindo este mestrado.

Ao professor e co-orientador Dr. Fernando Pacheco Rodrigues que participou inicialmente cedendo amostras utilizadas e orientando nas dúvidas apresentadas.

Ao apoio do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Professor Dr. José Fernando Garcia; às mestrandas Érica de Souza Ribeiro e Silvana de Cássia Paulan; pelas laboratoristas Fulvia di Pillo, Valquiria Rissato Gazola, Janaína Hernandez e Nayara Aguilera; ao técnico Pedro Florindo (“Tatu”); e as estagiárias Simone e Vanessa Borges Costa Ferreira, que possibilitaram a execução deste trabalho.

À Dra. Elizabeth Herrera e Claudia Huerta pela participação do curso básico de PCR em tempo real.

À Professora Dra. Valéria Felix de Lima, por ceder amostras de cultura de *L. chagasi* e Maria Emilia E. B. Santiago, de Bauru, por ceder amostras de pele de *Didelphis albiventris*.

À Prof. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, por ceder amostras de cultura de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

À Prof. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana por nos auxiliar nos ensaios de diferenciação de espécies de *Leishmania*.

À Prof. Lucile Floeter-Winter e o técnico Ricardo Zamboni pela recepção e auxílio na diferenciação de espécies de *Leishmania* no laboratório de Fisiologia, instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Aos participantes da comissão examinadora, Professora Dra. Juliana Regina Peiró, Professora Dra. Valéria Felix de Lima, Professora Wilma Aparecida Starque-Buzetti, Professor Wagner Andre Pedro pelas correções e sugestões feitas para melhoria deste trabalho.

A todos que participaram deste mestrado direta ou indiretamente.

SUMÁRIO

RESUMO	11
SUMMARY	12
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
LEISHMANIOSES.....	13
PARQUE ESTADUAL MORRO DO DIABO – SP.....	16
RESERVATÓRIOS	18
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	21
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2 – <i>Leishmania</i> spp. em <i>Didelphis albiventris</i> e <i>Micoureus paraguayanus</i> (Mammalia: Didelphimorphia) do Brasil.	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
Área de estudo	34
PCR convencional.....	36
PCR em tempo real.....	37
Sensibilidade e especificidade da qPCR	37
Controles de reação	38
Análise estatística.....	38
RESULTADOS	38
PCR convencional e PCR em tempo real	38
Sensibilidade e especificidade da qPCR	39
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

***Leishmania* spp. em *Didelphis albiventris* e *Micoureus paraguayanus*
(Mammalia: Didelphimorphia)**

RESUMO – As leishmanioses são mantidas na natureza com a participação de várias espécies animais. Este trabalho avaliou a presença de *Leishmania* spp. em amostras de pele de marsupiais de vida livre *Micoureus paraguayanus* (n=95) e *Didelphis albiventris* (n=191) capturados no Parque Estadual Morro do Diabo, e em fragmentos de mata do seu entorno, na região do Pontal do Paranapanema-SP, Brasil. As amostras foram avaliadas para a presença de DNA de *Leishmania* spp. por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional e em tempo real (qPCR). Todas as amostras de *D. albiventris* avaliadas por PCR convencional foram negativas para a presença de kDNA de *Leishmania* spp., entretanto, quando avaliadas por qPCR, a positividade foi de 1,6%. Para *M. paraguayanus*, foi observada positividade de 7,4% e 11,6% por PCR convencional e qPCR, respectivamente. A maioria dos animais positivos estava restrita ao mesmo fragmento de mata. Apesar de *D. albiventris* ser a espécie marsupial mais estudada por seus hábitos mais urbanos, outras espécies marsupiais como *M. paraguayanus* podem ser potenciais reservatórios das leishmanioses e devem ser estudados.

Palavras-chave: Epidemiologia, Leishmaniose e PCR.

***Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus*
(Mammalia: Didelphimorphia)**

SUMMARY – Leishmaniasis is maintained in nature with the participation of several animal species. This research evaluated the presence of *Leishmania* spp. in skin samples of free-living marsupials *Micoureus paraguayanus* (n=95) and *Didelphis albiventris* (n=191) captured at the Parque Estadual Morro do Diabo and forest fragments of its surroundings, in the region of “Pontal do Paranapanema”, São Paulo, Brazil. Skin samples were evaluated for the presence of *Leishmania* spp. DNA by conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR). All samples of *D. albiventris* evaluated by conventional PCR were negatives for the presence of *Leishmania* spp. kDNA however, when assessed by qPCR, the positivity was 1.6%. For *M. paraguayanus* positivity was observed in 7.4% and 11.6% by conventional PCR and qPCR, respectively. Most of the positive animals were restricted to the same forest fragment. Although *D. albiventris* is the most studied marsupial specie, others species as *M. paraguayanus* can be potential leishmaniasis reservoirs and should be studied.

Key-words: Epidemiology, Leishmaniasis and PCR.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os animais selvagens têm sido reconhecidos como potenciais fontes de infecção para doenças em humanos. Historicamente, os impactos das doenças infecciosas nas populações de animais selvagens têm sido ofuscados pelas questões antropocêntricas. No entanto, hoje há maior compreensão da evolução das doenças infecciosas em animais selvagens, incluindo uma nova apreciação dos efeitos que estas podem exercer sobre a dinâmica e a sustentabilidade destas populações. Em particular, a grave ameaça que a doença pode impor sobre as espécies ameaçadas de extinção e geneticamente pobres é cada vez mais reconhecida, assim como a importância da preservação da biodiversidade em ecossistemas de vida selvagem para prevenir e controlar doenças (TOMPSON et al., 2009).

Leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que circulam na natureza entre reservatórios selvagens e domésticos, com transmissão por vetores flebotomíneos (ROTUREAU, 2006a). Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* spp. as quais sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas promastigotas. Estas colonizam o tubo digestório do vetor e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo biológico completa-se com a picada do flebótomo infectado e subsequente inoculação de formas promastigotas do parasita na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, as quais diferenciam-se em formas amastigotas, no interior dos macrófagos (BANETH, 2006).

O gênero *Leishmania* compreende um grande número de espécies, com 22 causando doença em humanos, dentre elas, a forma visceral que representa enfermidade grave e letal, se não tratada (ASHFORD, 2000; CASTILHO et al., 2008). Outras formas clínicas da doença no homem incluem a forma cutânea, a muco-cutânea e a cutânea difusa (RAMOS-E-SILVA e JACQUES, 2002).

A leishmaniose cutânea americana (LC) foi descrita em humanos desde a antiguidade, com relatos durante o primeiro século depois de Cristo. No Brasil, a

existência de lesões cutâneas e nasofaríngea foram confirmadas apenas em 1909 por Lindenberg, que descobriu formas parasitárias presentes nas lesões cutâneas em trabalhadores rurais das cidades do Estado de São Paulo, idênticas à *Leishmania tropica* do Velho Mundo. Seis espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* e *Viannia* foram identificadas no Brasil como causadoras de LC: *L. (V.) braziliensis*, transmitida pelo vetor *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*; *Leishmania (V.) amazonensis*, cujos vetores são *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lu. olmeca*; e *Leishmania (V.) guyanensis*, que são transmitidos por *Lutzomyia umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. squamiventris* (CAMARGO e LANGONI, 2006).

A LC no Brasil tem diferentes aspectos epidemiológicos, de acordo com as características biogeográficas das regiões onde a doença é assinalada. Pode ser encontrada não somente em regiões florestais, com vegetação abundante, propícias à colonização dos vetores e mamíferos silvestres infectados, como também em regiões desmatadas, com adaptação de vetores e reservatórios a ambientes modificados, em áreas rurais e urbanas (TOLEZANO et al., 2001). Acreditava-se, até recentemente, que a incidência de leishmaniose tegumentar tenderia a diminuir no país, acompanhando a das florestas tropicais, até ficar restrita a regiões próximas das matas residuais. Entretanto, o processo de urbanização vem ocorrendo no país, ainda não suficientemente explicado (NEGRÃO e FERREIRA, 2009). A ação antrópica sobre o ambiente não só foi decisiva na alteração da cobertura vegetal, como diversos estudos têm mostrado que esse papel desempenhado pelo homem acabou por determinar uma verdadeira sucessão vetorial, refletindo na disseminação de focos de transmissão de *Leishmania* (TOLEZANO et al., 2001).

A leishmaniose visceral americana (LV) foi primeiramente relatada no Brasil em 1934, quando formas amastigotas de *Leishmania* foram encontradas em cortes histológicos de tecido hepático de pacientes que vieram a óbito com suspeita de febre amarela. Três espécies de *Leishmania* são agentes de LV: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, as quais estão agrupadas no complexo *L. donovani* (CAMARGO e LANGONI, 2006).

Ao longo dos últimos 10 anos, regiões endêmicas foram surgindo e houve um grande aumento do número de casos registrados de leishmanioses. Como a declaração é obrigatória em apenas 32 dos 88 países afetados por leishmaniose, um

número substancial de casos não são registrados. Dos 88 países endêmicos para leishmaniose, 72 são países em desenvolvimento; 90% dos casos de leishmaniose visceral (500 mil/ano) ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão e 90% dos casos de leishmaniose cutânea (1,5 milhões/ano) ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2009).

Na América Latina, os principais vetores de LV são os flebotomíneos peridomésticos do gênero *Lutzomyia*, que possuem a capacidade de invadir novos *habitats*, após o desflorestamento, estabelecendo-se em áreas urbanas (ROTUREAU, 2006b).

No Brasil, o agente etiológico de LV é a *L. chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida mais recentemente, na época da colonização europeia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo ser classificada como *L. chagasi*. Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (GONTIJO e MELO, 2004; LAINSON e RANGEL, 2005).

A Organização Mundial de Saúde relata que historicamente o Brasil tem observado epidemias rurais de LV em ciclos de dez anos, porém, a doença passou a ocorrer na área urbana, enquanto a forma rural persiste. Ondas de seca, a falta de terras agrícolas disponíveis e fome levaram a uma grande migração da população das áreas rurais para os subúrbios periféricos das grandes cidades, criando áreas povoadas com mínima infra-estrutura. Nestes assentamentos, o parasita recém-introduzido encontra um grande número de hospedeiros não-imunes que muitas vezes são mal nutridas e, portanto, com risco ainda maior de adquirirem a doença (WHO, 2009).

Além de mudanças ambientais e climáticas, fatores como a redução dos investimentos em saúde e educação, descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, fatores genéticos pouco estudados ligados aos vetores e novos fatores imunossupressivos dos hospedeiros, como a infecção pelo HIV compõe a complexidade multifatorial desta zoonose (GONTIJO e MELO, 2004).

A expansão e urbanização da LV no Brasil ocorreu com aumento de casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte (GONTIJO e MELO, 2004). Primeiramente, foram descritos casos em Teresina-PI, São Luiz-MA, Santarém-PA, Montes Claros-MG e Corumbá-MS. No centro-sul, pouco depois de aumentarem os casos de LV em Corumbá-MS, a doença atravessou o estado em direção a leste, chegando à divisa com estado de São Paulo. Em seu avanço, acompanhou o caminho do gasoduto Brasil-Bolívia e da rodovia BR-262, que liga Corumbá ao Espírito Santo. Assim, não demorou para que cruzasse o rio Paraná e se espalhasse para o noroeste paulista. Desde a identificação da presença do inseto em 1997, da doença em cães em 1998, e do primeiro caso humano em Araçatuba-SP em 1999, a leishmaniose se estabeleceu no estado e vem se alastrando silenciosamente, seguindo o trajeto da rodovia Marechal Rondon (SP-300), a principal via de conexão entre o Mato Grosso do Sul e a capital paulista. Em quase 10 anos, o Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo registrou 1.258 casos em 49 municípios paulistas e 112 óbitos (ZORZETO, 2008).

Parque Estadual Morro do Diabo – SP

A Mata Atlântica é um dos 34 biótopos mundiais e um dos mais devastados ecossistemas do planeta com cerca de 7% de sua área original ainda íntegra. Perda e fragmentação de *habitat* afetam as taxas de extinção, os tamanhos das populações e os padrões de dispersão, estando entre as maiores ameaças para a viabilidade das populações de animais silvestres (BRITO, 2009).

O Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), que está localizado no município de Teodoro Sampaio, na região do Pontal do Paranapanema, extremo oeste do Estado de São Paulo é um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica de interior, classificada como Floresta Latifoliada Tropical Semidescídua, constituindo a maior amostra desta floresta no Estado de São Paulo e uma das quatro únicas áreas de proteção com mais de 10.000ha contendo esse tipo de vegetação no País (MENEGUETTE, 2001). A área (FIGURA 1) possui como limites: ao norte, espigão divisor dos rios Paranapanema e Paraná; ao sul, lago formado por barragem da UHE de Rosana, limite com o estado do Paraná; a oeste, Ribeirão Bonito e a leste,

espigão divisor das vertentes do Ribeirão Bonito e Ribeirão Cuiabá (MENEQUETTE, 2001).

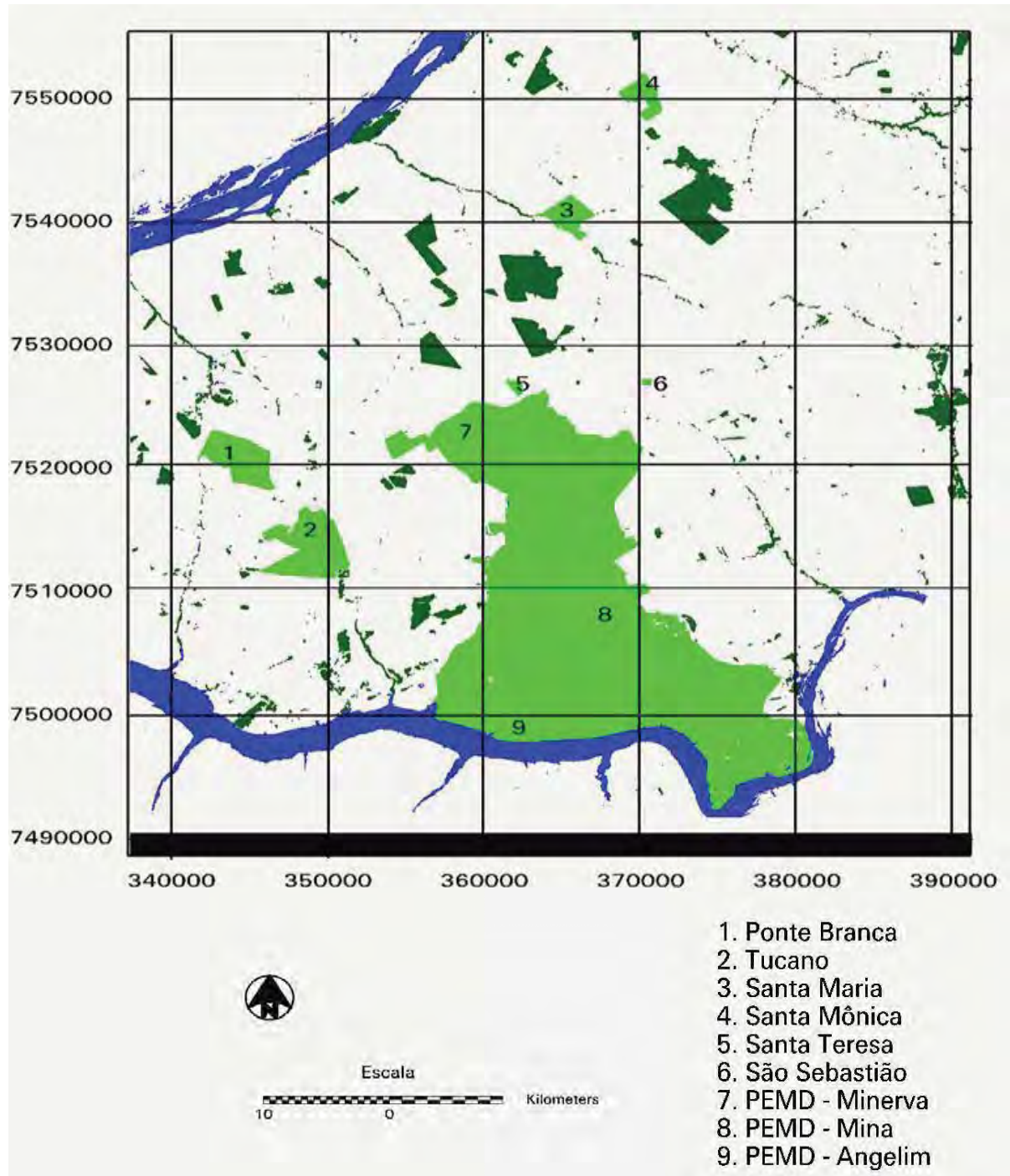


FIGURA 1 – Imagem do satélite Landsat-5 do Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) e os fragmentos florestais remanescentes na região do Pontal do Paranapanema. As áreas amostradas estão numeradas de 1 a 9.

O primeiro Parque Estadual do Pontal do Paranapanema, denominada de Reserva Florestal do Morro do Diabo, com área aproximadamente de 99.220ha, foi criado no final dos anos 30. Ações destrutivas como queimadas, desmatamento e a invasão de posseiros tem sido observadas há mais de 45 anos (ALESSI et al., 2009). A região foi ocupada de forma desordenada a partir da década de 1950 cujos fragmentos florestais existentes encontram-se cercados, principalmente por áreas de pastagens e agricultura, como a cana-de-açúcar e algodão (MENEGUETTE, 2001). A reserva agora denominada Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD), com área de 36.000 ha, situada no município de Teodoro Sampaio (22° 30 'LS e 52° 20' LW; 350 m de altitude) foi criado em junho de 1986 (ALESSI et al., 2009).

As características físicas do solo do Pontal do Paranapanema são determinadas pela presença de estrato de arenito. A área tem clima quente, com inverno seco, temperatura média anual de 23°C e umidade relativa média anual entre 70 e 76%. A precipitação média anual é de 1.131mm, com período seco de abril a setembro. Os ventos predominantes vêm do leste, seguido pelo Norte e Nordeste, com uma velocidade média 1,9m/s. A atividade econômica da região é principalmente a produção de tijolos e telhas e a agricultura (ALESSI et al., 2009).

No PEMD cinco espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* já foram relatadas: *Brumptomyia brumpti*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* e *Pintomyia pessoai* (ALESSI et al., 2009).

Reservatórios

Um reservatório de infecção é melhor definido como o sistema ecológico no qual o agente infeccioso persiste na população (ASHFORD, 1996). A adequação de um determinado mamífero hospedeiro para a manutenção das populações de *Leishmania* spp. depende de muitos fatores como a densidade populacional e longevidade do hospedeiro, a duração da infecção, a localização dos parasitas no interior do hospedeiro, bem como o estado imunológico do hospedeiro (ASHFORD, 2000). Um dos parâmetros usados para avaliar a transmissão de doenças em populações é a taxa de reprodutibilidade (R_0) que indica o número de infecções secundárias produzidas a partir de uma infecção primária. Em locais onde múltiplas espécies de hospedeiros podem ser infectadas é possível se dividir, epidemiologicamente, em reservatórios primários, secundários e acidentais. Um

hospedeiro primário pode manter a taxa de reprodutibilidade (R_0) superior a 1, na ausência de outros hospedeiros, assim o parasita pode persistir indefinidamente neste hospedeiro sozinho e a transmissão se mantém. Hospedeiros secundários podem transmitir a infecção, de modo que R_0 é aumentada, mas não pode manter a transmissão do parasita na ausência do hospedeiro primário. Hospedeiros acidentais podem ser infectados, mas normalmente não transmitem o parasita e, portanto, não têm efeito sobre R_0 . O controle da transmissão do parasita pelo reservatório primário pode eliminar a doença, reduzindo R_0 abaixo de 1; o controle dirigido aos reservatórios secundários podem reduzir R_0 mas não pode levar à eliminação, enquanto que o controle dirigido aos reservatórios acidentais não afeta R_0 (QUINNELL e COURTENAY, 2009). Segundo estes autores, diferenciar reservatórios primários e secundários é notoriamente difícil. Uma evidência direta de que uma espécie é um reservatório primário exige a demonstração de que o parasita pode persistir nas áreas onde apenas esta espécie está infectada, ou que os métodos de controle na prevenção da transmissão são eficazes para interrupção da transmissão. Na ausência de tais dados, a discriminação dos reservatórios dependerá (i) da demonstração da prevalência da infecção em hospedeiros sinantrópicos, (ii) da manutenção da infecção crônica durante o período de não transmissão onde esta for sazonal e (iii) da infecção dos hospedeiros sinantrópicos para o vetor.

Muitas espécies de mamíferos, incluindo animais selvagens como roedores, carnívoros, primatas e marsupiais constituem importantes reservatórios de *Leishmania* spp. (ASHFORD, 1996; TRAVI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2005; MARVULO, 2006; SANTIAGO et al., 2007; GUERRA et al., 2007; SASTRE et al., 2008). As principais espécies de reservatórios no ambiente silvestre para LV são as raposas *Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous* e os marsupiais *Didelphis albiventris* (BRASIL, 2006). Para LC, já foram registrados algumas espécies de roedores como *Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, marsupiais, edentatus e canídeos silvestres que parecem ter importância significativa na epidemiologia desta zoonose (BRASIL, 2007).

Na América latina, existem relatos de *Didelphis* sp. infectados por *Leishmania* sp. na Colômbia (ALEXANDER et al., 1998; TRAVI et al., 1998), Bolívia (TELLERIA et al., 1999), Venezuela e Guianas (ROTUREAU, 2006b). No Brasil, existem relatos

de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca), naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; SANTIAGO et al., 2007). Este animal é encontrado com alta frequência em áreas urbanas, porém ainda não há clareza do seu papel na manutenção e disseminação da leishmaniose visceral (MICHALICK e GENARO, 2005).

Didelphis albiventris (FIGURA 2-A) é um marsupial de hábitos crepusculares e noturnos que se alimenta de frutos, insetos, pequenos répteis e anfíbios, filhotes de aves e pequenos mamíferos (ANTUNES et al., 2005). Apresentam uma boa capacidade de adaptação em ambientes perturbados, vivendo em transição entre a floresta e as residências (GUERRA et al., 2007). O gambá-de-orelha-branca, por ser generalista, mostra-se dominante em diversos ambientes, podendo percorrer área de até 1,5km (ROCHA, 2009).

Estudos realizados com marsupiais detectaram a presença de *Leishmania* spp. em gambás nas cidades de Barra de Guarituba-RJ (CABRERA et al., 2003), em Amaraji-PE (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), Manaus-AM (GUERRA et al., 2007), Belo Horizonte-MG (SCHALLING et al., 2007) e Bauru-SP (SANTIAGO et al., 2007).

Guerra et al. (2007) sugeriram que o gambá possa ter participado como um elo importante na transmissão da doença em Manaus-AM, atuando como reservatório secundário de *L. guyanensis*, uma vez que sua presença foi referida com frequência nos quintais dos moradores, em áreas urbanas.

A cuíca (FIGURA 2-B), *Micoureus paraguayanus*, é uma espécie de tamanho mediano para os marsupiais da família *Didelphidae* e pode ser encontrada na Floresta Atlântica remanescente em toda a costa brasileira e desde Minas Gerais e Espírito Santo até o norte do estado do Paraná (RODRIGUES et al., 2006). Esta espécie é raramente encontrada no solo, estabelecendo-se em áreas de floresta densa, rica em cipós e palmeiras (PIRES e FERNANDEZ, 1999). O maior tempo de vida registrado para as espécies em estado selvagem foi de aproximadamente 24 meses (BRITO, 2009).

PIRES e FERNANDEZ (1999) estudaram *M. paraguayanus* em áreas remanescentes de Mata Atlântica e observaram que os movimentos entre fragmentos florestais foram feitos por machos adultos, durante a estação reprodutiva, e que a grande maioria dos indivíduos (machos e fêmeas) ficaram restritos a um único fragmento durante toda a sua vida. Pires et al. (2002) estimou

uma taxa de dispersão de 1,2% entre fragmentos de Mata Atlântica no sudeste do Brasil, cruzando até 800 metros de hábitat matriz. Brito (2009) observou alcance territorial médio estimado em 350 metros para espécie *M. paraguayanus*, sendo o alcance dos machos superiores aos das fêmeas.



FIGURA 2 - *Didelphis albiventris* (A) e *Micoureus paraguayanus* (B). Fonte: Fernando Pacheco Rodrigues.

Não há relatos de *M. paraguayanus* infectados com *Leishmania* sp. no Brasil, embora na Colômbia, Alexander et al. (1998) já tenham observado a presença de *L. brasiliensis* em *Micoureus demerarae*. A espécie *M. paraguayanus* era anteriormente classificada como *M. demerarae*, quando, análises de DNA mitocondrial revelaram que são espécies distintas (COSTA, 2003).

Métodos Diagnósticos

Classicamente, o diagnóstico de leishmaniose é confirmado com a demonstração direta do parasita intracelular em diferentes tipos de amostras dos hospedeiros como lesões de pele, de baço, fígado, medula óssea e aspirados de linfonodos, cultura *in vitro* de fragmentos ou tecidos aspirados e análises histopatológicas de organismos infectados. Entretanto, estes métodos de diagnósticos são limitados pela baixa sensibilidade e os resultados são frequentemente inconclusivos (GOMES et al., 2008).

O teste intradérmico de Montenegro é utilizado para detectar infecção por *Leishmania* em humanos e consiste numa reação de hipersensibilidade tardia. Apesar da dificuldade de padronizar a produção de antígenos, é um importante

método para o diagnóstico de lesões antigas, onde há dificuldade na visualização do parasita. Entretanto é observado positividade mesmo após a cura, tornando este teste inadequado para acompanhamento da evolução da doença (RAMOS-E-SILVA e JACQUES, 2002). Em estudo experimental, Reis et al. (2008) consideraram que o teste cutâneo pode vir a ser indicado como método auxiliar de diagnóstico em cães infectados por *Leishmania* spp.

Provas sorológicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido rotineiramente utilizadas para inquéritos caninos de LV em saúde pública e expressam os níveis de anticorpos circulantes.

Além destes, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido amplamente empregada com diferentes objetivos, incluindo o diagnóstico, monitoramento de tratamentos e estudos epidemiológicos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; SILVA et al., 2005; ROTUREAU, 2006a; SANTIAGO et al., 2007). Métodos moleculares como PCR e hibridação de DNA para detecção de *Leishmania* em amostras de animais selvagens e sinantrópicos também são usados e promovem uma importante ferramenta para detecção de possíveis reservatórios (ALEXANDER et al., 1998; SILVA et al., 2005).

Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, podemos citar a transcriptase reversa – PCR (RT-PCR), “nested” PCR, multiplex PCR, PCR a partir de “primers randômicos” e PCR em tempo real – qPCR (GOMES et al., 2008). Com os adventos destas tecnologias, especialmente a PCR em tempo real e análise da cinética do fragmento amplificado, é possível quantificar o número inicial de moléculas de DNA (CASTILHO et al., 2008) com demonstração rápida de resultados e redução dos riscos de contaminação (CAVALCANTI et al., 2009).

Na qPCR, o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (Ct). Baseada na fluorescência emitida, este ponto permite a quantificação exata e reprodutível (GIULLIETTI et al., 2001). A intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional a quantidade de DNA presente, é expresso em valores de Ct sendo determinado pelo número de ciclos de PCR requeridos para que o sinal fluorescente exceda as linhas de base e *background* (QUARESMA et al., 2009).

O aumento da emissão de fluorescência pode ser visualizado por um sistema de detecção em “tempo real”, durante o curso da reação e o programa calcula ΔR_n usando a equação $\Delta R_n = \Delta R_n^+ - \Delta R_n^-$, onde R_n^+ é a emissão de fluorescência do produto em cada ponto e R_n^- é a fluorescência das linhas de base, o valor de ΔR_n é plotado de acordo com o número de ciclos realizados (GIULLIETTI et al., 2001).

Para execução confiável da reação, deve-se ter um cuidadoso desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e otimizar as condições da reação visando reduzir a formação de dímeros de iniciadores em baixos níveis de detecção (GIULLIETTI et al., 2001). A otimização se dá pela estabilidade entre duplicatas e triplicatas, formação de uma curva padrão com concentrações de amostras conhecidas e calculadas pela eficiência da reação (BIO-RAD MANUAL, 2005; CAVALCANTI et al., 2009).

Diversos autores utilizaram curva padrão com amostras conhecidas de DNA de cultura de *Leishmania* sp., em diferentes diluições, para caracterização do limiar de detecção da reação, gerando uma carga parasitária relativa baseada nos valores de Ct. A eficiência da reação é obtida de acordo com a regressão linear destas escalas conhecidas, demonstradas em gráficos de plotagem dos valores médios de Ct (eixo Y) e a concentração logarítmica de DNA do parasita (eixo X) (NICOLAS et al., 2002; FRANCINO et al., 2004; PRINA et al., 2007; TUPPERWAR et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2009).

Diferentes possibilidades de fluoróforos estão disponíveis para PCR em tempo real, dentre eles “TaqMan probes”, “Molecular Beacons”, “Scorpions”, “Hybridization probes” e “SYBER Green I” (GIULLIETTI et al., 2001). Os compostos fluorescentes mais utilizados são Syber® Green e TaqMan® (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

As vantagens do Syber® Green em comparação com outros fluoróforos são o baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA de fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do DNA alvo (GIULLIETTI et al., 2001; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). Entretanto, a comparação de curvas de dissociação é uma forma de contornar tal desvantagem (GIULLIETTI, 2001). Assim, quando da utilização do Syber® Green, é essencial a realização da curva de dissociação das amostras após a reação, na qual há o aumento gradual de

temperatura (0 a 100°C), obtendo uma temperatura específica denominada temperatura de “Melting” (T_m), onde 50% dos compostos estão dissociados, promovendo um decréscimo brusco de fluorescência. Quanto maior a temperatura de dissociação, maior é a estabilidade da reação (BIO-RAD MANUAL, 2005).

A temperatura de “Melting”, em qPCR, pode também oferecer uma rápida alternativa para identificação de espécies em diagnóstico ou estudos epidemiológicos de leishmaniose ou parasitismo assintomático (GOMES et al., 2008). A análise desta curva em produtos gerados durante a PCR em tempo real promove uma ferramenta de distinção entre eles, que pode possuir o mesmo tamanho molecular, mas com diferenças na sequência de guanina/citosina (TUPPERWAR et al., 2008).

Métodos de diagnóstico, como a qPCR, estão cada vez mais eficazes e com custo reduzido, podendo ser aplicada em diversos estudos epidemiológicos, incluindo a determinação de populações de hospedeiros, potencialmente reservatórios de leishmanioses (CABRERA et al., 2003). Ferramentas moleculares promovem avanços na compreensão da ecologia das doenças parasitárias, incluindo a disseminação do parasita entre os hospedeiros domésticos, selvagens e humanos, revelando informações valiosas entre os ciclos de transmissão (TOMPSON, 2009).

Pesquisas que integram observações parasitológicas e ecológicas demonstram que informações sobre dinâmica populacional de mamíferos silvestres são essenciais para a compreensão da transmissão de *Leishmania* por hospedeiros naturalmente infectados de ambientes silvestres íntegros ou modificados (TRAVI et al., 1998). O estudo de potenciais reservatórios permite observar a abrangência de animais que podem participar na manutenção e/ou disseminação do parasita no ambiente, uma vez que não estão consideradas esgotadas todas as variáveis envolvidas no processo epidemiológico das leishmanioses.

Considerando-se a hipótese de que não só *D. albiventris*, mas *M. paraguayanus* são reservatórios de *Leishmania* spp. e participam da epidemiologia das leishmanioses, este trabalho buscou identificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em gambás e cuícas utilizando técnicas biomoleculares, a PCR convencional e em tempo real, com o intuito de contribuir para o melhor entendimento do papel destes reservatórios na cadeia epidemiológica desta zoonose.

REFERÊNCIAS

ALESSI, C.A.C.; GALATI, E.A.B.; ALVES, J.R.; CORBETT, C.E.P. American cutaneous leishmaniasis in the Pontal of Paranapanema – SP, Brazil: ecological and entomological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 277-282, 2009.

ALEXANDER, B.; LOZANO, C.; BARKER, D.C.; McCANN, S.H.E.; ADLER, G.H. Detention of *Leishmania (Vianna) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Tropica**, v. 69, p. 41-50, 1998.

ANTUNES, G.M.; BRUM, J.M.W. Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* (Lund, 1841 Marsupialia: Didelphidae). **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 33, p. 335-336, 2005.

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

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

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and the cat**. 3^a ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 685-698.

BIO-RAD LABORATORY MANUAL, INC. **Real-time PCR quick guide**. 2005, 26p.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of

Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 291-296, 2003.

BRASIL, 2006. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, 2007. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRITO, D. Genetic consequences of population subdivision: the marsupial *Micoureus paraguayanus* (Mammalia: Didelphimorphia) as a case study. **Zoologia**, v. 26, p. 684-693, 2009.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.M.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 79-83, 2003.

CAMARGO L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animal Toxins including Tropical Disease**, v. 12, p. 527-548, 2006.

CASTILHO, T.M.; CAMARGO, L.M.A., McMAHON-PRATT, D.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 122-132, 2008.

CAVALCANTI, M.P.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M.; ABATH, F.G.C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 356-358, 2009.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.

FRANCINO, O.; ALTET, E.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUES, A.; SOLANO- GALEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real time PCR assay for diagnosis and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2004.

GIULLIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONE, R.B.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advantages. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GUERRA, J.A.O.; PAES, M.G.; COELHO, L.I.A.R.; BARROS, M.L.B.; FÉ, N.F.; BARBOSA, M.G.V.; GUERRA, M.V.F. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 37, p. 133-138, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

MARVULO, M. F.V. **Zoonoses**. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 1ª Edição. São Paulo: Rocca, 2006. p.1254.

MENEGUETTE, A. A. C. **Atlas interativo do Pontal do Paranapanema: uma contribuição à educação ambiental**. P. Prudente. Tese (Livre –Docência em Cartografia) – FCT – Universidade Estadual Paulista. 2001. CD-ROM. Também disponível em: <www.multimidia.prudente.unesp.br/atlaspontal>.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. **Leishmaniose Visceral Americana**. In: NEVES, D.P.; DE MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p.77.

NEGRÃO, G.N.; FERREIRA, M.E.M.C. Leishmaniose tegumentar americana: aspectos geográficos intervenientes na ocorrência da enfermidade no município de Maringá, Paraná. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 5, p. 115-124, 2009.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical and Microbiology**, v. 40, p. 1666-1669, 2002.

NOVAIS, M.N.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an

endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 219-227, 2005.

PIRES, A.S.; FERNANDEZ, F.A.S. Use of the space by the marsupial *Micoureus demerarae* in small Atlantic Forest fragments in south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 15, p. 279-290, 1999.

PIRES, A.S.; LIRA, P.K.; FERNANDEZ, F.A.S; SCHITTINI, G.M. e OLIVEIRA, L.C. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. **Biological Conservation**, v. 108, p. 229-237, 2002.

PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D.; MILON, G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1307-1315, 2007.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C.; ROCHA-LIMA, A.C.V.M.; XAVIER, A.A.P.; GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania species* by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, p. 289-294, 2009.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915–1934, 2009.

RAMOS-E-SILVA, M.; JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 122–134, 2002.

REIS, S. R.; NAIFF, R.F.; ALMEIDA-CAMPOS, F.F., FRANCO, A.R. Intradermorreação de Montenegro em cães (Mammalia: Canidae) experimentalmente inoculados por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), principais agentes causadores de leishmaniose tegumentar na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 38, p. 593-596, 2008.

ROCHA, F. Os marsupiais brasileiros. **Agência de Notícias de Direitos Animais - ANDA**. 14 set. 2009. Disponível em: <<http://www.anda.jor.br/?p=20482>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2010.

RODRIGUES, F.P.; ROCHA, F.S.; GARCIA, J.E.; GARCIA, J.F.; VIVO, M.; MARTIOLI, S.R. Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia: Didelphimorphia). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p.686-688, 2006.

ROTUREAU, B. Are new world leishmaniasis becoming anthroponoses? **Medical Hypotheses**, v. 67, p. 1235-1241, 2006a.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan Ecoregion Complex. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 81-96, 2006b.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* ssp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283-290, 2007.

SASTRE, N.; FRANCINO, O.; RAMÍREZ, O.; ENSENAT, C.; SANCHÉZ, A.; ALTET, L. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 117-120, 2008.

SCHALLING, H.D.F.H.; DA SILVA, E.S.; VAN DER MAIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M.F. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 387-393, 2007.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 550-552, 2005.

TELLERIA, J.; BOSSENO, M.F.; TARIFA, T.; BUITRAGO, R.; MARTINEZ, E.; TORREZ, M.; LE PONT, F.; BRENIERE, S.F. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kDNA - polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 5-6, 1999.

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ELIAS, C.R.; LAROSA, R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, p. 47-51, 2001.

TOMPSON, A.R.C.; KUTZ, S.J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. **International Journal of Environment Research and Public Health**, v. 6, p. 678-693, 2009.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forest of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 275-278, 1998.

TUPPERWAR, N.; VINEETH, V.; RATH, S.; VAIDYA, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 61, p. 23-30, 2008.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **General aspects of Leishmaniasis in the world**. 2009. Site consultado: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 27 de agosto de 2009.

ZORZETO, R. Uma doença anunciada – infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. **Pesquisa FAPESP**, v. 150, p. 47-52, 2008.

CAPÍTULO 2 – *Leishmania* spp. em *Didelphis albiventris* e *Micoureus paraguayanus* (Mammalia: Didelphimorphia) do Brasil.

RESUMO – As leishmanioses são mantidas na natureza com a participação de várias espécies animais. Este trabalho avaliou a presença de *Leishmania* spp. em amostras de pele de marsupiais de vida livre *Micoureus paraguayanus* (n=95) e *Didelphis albiventris* (n=191), capturados no Parque Estadual Morro do Diabo e em fragmentos de mata do seu entorno, na região do Pontal do Paranapanema-SP, Brasil. As amostras foram testadas para a presença de DNA de *Leishmania* spp. por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional e em tempo real (qPCR). Todas as amostras de *D. albiventris* testadas por PCR convencional foram negativas para a presença de kDNA de *Leishmania* spp., entretanto, quando testadas por qPCR, a positividade foi de 1,6%. Para *M. paraguayanus*, foi observada positividade de 7,4% e 11,6% por PCR convencional e qPCR, respectivamente. Sessenta e quatro por cento (09/14) dos animais positivos estavam restritos ao mesmo fragmento de mata. Apesar de *D. albiventris* ser a espécie marsupial mais estudada por seus hábitos mais urbanos, outras espécies marsupiais como *M. paraguayanus* podem ser potenciais reservatórios das leishmanioses e devem ser estudados.

Palavras-chave: Epidemiologia, Leishmanioses, Marsupial, PCR e PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são zoonoses que circulam na natureza entre reservatórios selvagens e domésticos, com transmissão por vetores e que acometem o homem (DESJEUX, 2004). A adequação de um determinado mamífero hospedeiro para a manutenção das populações de *Leishmania* spp. depende de muitos fatores como a densidade populacional e longevidade, a duração da infecção, a localização dos parasitas seu no interior, bem como seu estado imunológico (ASHFORD, 2000).

Determinar as populações de hospedeiros pode ser de primordial importância para o controle efetivo de leishmanioses (CABRERA et al., 2003). A demonstração da presença de *Leishmania* spp. em diferentes espécies de reservatórios marsupiais pode sugerir a participação destes na disseminação desta zoonose.

Muitas espécies de mamíferos, incluindo animais selvagens como roedores, carnívoros, primatas e marsupiais constituem importantes reservatórios para *Leishmania* spp. (ASHFORD, 1996; OLIVEIRA et al., 2005; CURI et al., 2006; GUERRA et al., 2007; MARVULO et al., 2006; SANTIAGO et al., 2007; SASTRE et al., 2008; TRAVI et al., 1998a). No Brasil, embora existam relatos de *Didelphis* spp. (gambá), naturalmente infectados por *Leishmania* spp. (GUERRA et al., 2007) e estes sejam encontrados com alta frequência em áreas urbanas, ainda não há clareza do seu papel na manutenção e disseminação da leishmaniose. Já se observou a presença de *Leishmania* spp. neste reservatório em diversas cidades brasileiras como Barra de Guarituba-RJ (CABRERA et al., 2003), Amaraji-PE (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), Manaus-AM (GUERRA et al., 2007), Belo Horizonte-MG (SCHALLING et al., 2007) e Bauru-SP (SANTIAGO et al., 2007).

Diferentemente dos gambás, a espécie marsupial *Micoureus paraguayanus* (Cuíca), encontrada na Floresta Atlântica remanescente da costa e do interior do Brasil, entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul e à oeste até o Paraguai e Argentina (COSTA, 2003; PATTON E COSTA, 2003; DIAS et al. 2009), é raramente encontrada no solo, estabelecendo-se em áreas de floresta densa, rica em cipós e palmeiras (PIRES e FERNANDEZ, 1999) e ainda não há relatos da presença de *Leishmania* spp. nesta espécie. Na Colômbia sua ocorrência já foi detectada em *M. demerarae* (ALEXANDER et al, 1998), uma espécie recentemente

considerada distinta de *M. paraguayanus* com base na análise do DNA mitocondrial (COSTA, 2003).

Inovações tecnológicas têm sido realizadas para facilitar o diagnóstico da leishmaniose. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) combina grande sensibilidade e habilidade de avaliar maiores quantidades amostrais simultaneamente, em um curto período de tempo (TUPPEWAR et al., 2008).

Pesquisas que integram observações parasitológicas e ecológicas demonstram que informações sobre dinâmica populacional de mamíferos silvestres são essenciais para a compreensão da transmissão de *Leishmania* spp. por hospedeiros naturalmente infectados de ambientes silvestres íntegros ou modificados (TRAVI et al., 1998b).

Considerando-se a hipótese de que não só *D. albiventris*, mas *M. paraguayanus* são reservatórios de *Leishmania* spp. e participam da epidemiologia das leishmanioses, o objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Leishmania* spp. por PCR convencional e qPCR nestes marsupiais de vida livre no Parque Estadual Morro do Diabo e dos fragmentos do seu entorno.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado no Parque Estadual Morro do Diabo (22°27' a 22°40' de latitude S e 52°10' a 52°22' de longitude W), que está localizado no município de Teodoro Sampaio, região do Pontal do Paranapanema, extremo oeste do Estado de São Paulo, Brasil, e em mais seis fragmentos de Mata Atlântica do seu entorno.

A Mata Atlântica é um dos 34 biomas mundiais e um dos mais devastados ecossistemas do planeta com cerca de 7% de sua área original ainda íntegra (BRITO, 2009). O Parque é um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica de interior, classificada como Floresta Latifoliada Tropical Semidecídua, constituindo a maior amostra desta floresta no Estado de São Paulo e uma das quatro únicas áreas de proteção com mais de 10.000ha, contendo esse tipo de vegetação no País. Desde meados da década de 1940 a Floresta Atlântica desta região vem sendo devastada e substituída principalmente por áreas de pastagens (58%) e agricultura

(18,5%), restando aproximadamente 1,85% da cobertura original (MENEQUETTE, 2001). Deste restante, 36.000ha estão protegidos pelo Parque Estadual do Morro do Diabo, e cerca de 21.000 hectares encontram-se como fragmentos florestais distribuídos pela região (RODRIGUES, 2004). Para o estudo foram selecionadas nove áreas, sendo três dentro do perímetro do Parque Estadual e seis fragmentos de mata do seu entorno (FIGURA 1, Quadro 1).

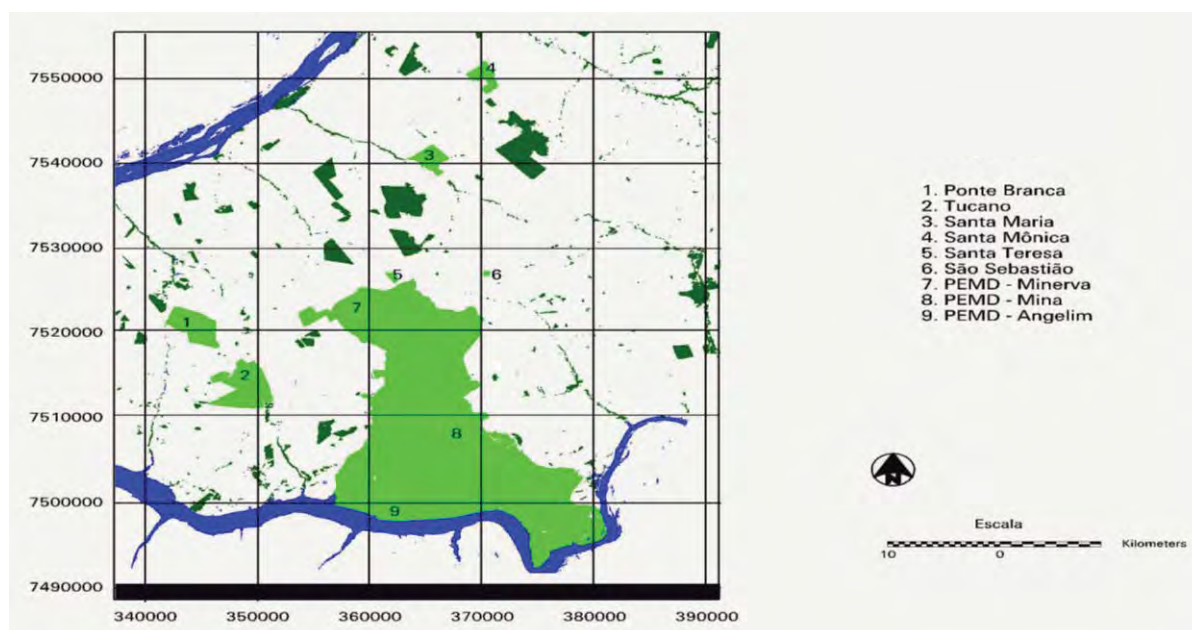


FIGURA 1 – Imagem do satélite Landsat-5 do Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) e os fragmentos florestais remanescentes na região do Pontal do Paranapanema. As áreas amostradas estão numeradas de 1 a 9.

Colheita das amostras e extração de DNA

Os animais foram capturados utilizando-se armadilhas do tipo gaiola (44 x 20,5 x 21,5 cm) e armadilhas Shermans (23 x 9 x 8 cm), dispostas tanto no solo como no estrato arbóreo. O número de armadilhas utilizadas em cada fragmento amostrado variou de 72 a 174, dependendo da quantidade de armadilhas disponíveis. Em todas elas as armadilhas foram colocadas ao longo de trilhas no interior das matas formando uma grade composta por três linhas de 300 metros cada, distantes 200 metros uma da outra. Em alguns fragmentos, como nos fragmentos das Fazendas Santa Mônica e Ponte Branca, trilhas adicionais foram montadas distantes desta grade, aumentando assim o esforço de captura na área amostrada. Todos os animais foram marcados utilizando-se brincos (“ear-tags”)

numerados e, após a coleta das amostras e realização de biometria, foram soltos no mesmo ponto de captura. A colheita das amostras foi realizada com permissão do IBAMA (processo nº 02027.005679/00-42) e a pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista, campus Araçatuba-SP (processo CEEA 2008-000123)

As amostras de pele (0,5mm da ponta da orelha) dos marsupiais capturados na área entre os anos de 2002 e 2003 (Quadro 1), totalizando 191 amostras de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) e 95 amostras de *Micoureus paraguayanus* (cuíca) foram colhidas e o DNA foi extraído conforme Rodrigues et al. (2006) e mantidos a -20°C até o processamento, quando foram quantificadas em aparelho Nanodrop1000[®] ($\lambda 260/280$).

Quadro 1 – Características das áreas de estudo e número de amostras colhidas

Áreas	Tamanho (ha)	Distância (Km)**	Nº de amostras <i>M. paraguayanus</i>	Nº de amostras <i>D. albiventris</i>
Ponte Branca	1195,0	7,9	22	42
Tucano	1990,0	9,0	08	14
Santa Maria	441,0	13,2	12	34
Santa Mônica	584,0	23,0	28	38
Santa Tereza	82,9	0,32	17	16
São Sebastião	30,2	3,0	---	30
PEMD*	36.000,0	---	08	17

* Parque Estadual Morro do Diabo, ** Distância em relação ao PEMD.

PCR convencional

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990) que resultam na amplificação de fragmento de 120 pares de base de cinetoplasto de *Leishmania* spp. (kDNA). A reação foi realizada em tubos de polipropileno de 0,2mL contendo 10mM Tris-HCl, 200 μM de desoxiribonucleosídeo trifosfato, 1,5mM MgCl_2 , 10 μM cada primer, 1U Taq DNA polimerase e 2 μl de DNA (com aproximadamente 20ng/ μl), com volume final de 25 μl . As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems[®]) com desnaturação inicial de 95°C por 5min, 34 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação, 63°C por 45s para anelamento, 72°C por 30s para extensão, e

72°C por 5min para extensão final. As amostras foram visualizadas em gel de policrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata.

PCR em tempo real

As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador iQ5 BioRad® para PCR em tempo real, utilizando-se placas Axygen Scientific® contendo 10µM dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990), somados a 6,25µl do Master mix - Syber Green Rox Plus® (LGC Biotecnologia®) e 2µl de amostras de DNA de marsupial (aproximadamente 30ng de DNA), para um volume final de 12,5µl, em duplicata. Os ciclos de temperatura foram semelhantes aos da PCR convencional, exceto por 40 ciclos para as fases de desnaturação, anelamento e extensão.

Para quantificação absoluta de parasitas das amostras positivas, foi utilizada a fórmula $10^{\Delta Ct - b/m}$, onde ΔCt é a média dos valores do limiar de fase de exponencial (Ct), b é o valor da curva de regressão linear e m é o grau de inclinação da curva (*slope*), conforme descrito no manual do fabricante do termociclador iQ5 BioRad®.

Sensibilidade e especificidade da qPCR

Foram realizadas diluições, na base 10, de promastigotas de *Leishmania chagasi* (10^6 até 10^{-6} parasitas/mL) mantidas em cultura, em volume total de 100µl. Em cada tubo desta diluição, foram adicionados 20mg de pele de um *Didelphis albiventris*, proveniente do município de Bauru-SP e negativo para presença de DNA de *Leishmania* spp., por PCR convencional e em tempo real. A extração de DNA foi então realizada com QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®), segundo orientações do fabricante.

Após o alongamento final da qPCR, foi realizado a análise da “Curva de dissociação”, quando as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 a 95°C, com aumento gradual de 0,5°C/s para obtenção da temperatura de dissociação (T_m) e produtos inespecíficos.

Controles de reação

Como controle interno das reações de PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb de citocromo B (KOCHER et al.,1989) para espécie *D. albiventris* e, para a espécie *M. paraguayanus*, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores DloopMpaF1 e DloopMpaR1 que amplificam um fragmento da região controle do DNA mitocondrial com aproximadamente 450 pb (RODRIGUES, *in press*).

Análise estatística

Foi testado o coeficiente de concordância Kappa entre a PCR convencional e a PCR em tempo real. O teste de duas proporções foi usado para avaliar a diferença dos resultados entre as técnicas. Para o PCR em tempo real calculou-se ainda a eficiência da reação, regressão linear da curva padrão para cada reação e a curva de dissociação, pelo programa do termociclador iQ5 Bio-Rad[®]. Foram ainda calculados a média, o desvio padrão e a variância de cada *Ct* tanto das curvas padrão quanto das amostras. O teste T não pareado foi utilizado para avaliação entre os ensaios de qPCR em amostras de *D. albiventris* e *M. paraguayanus*. Adotou-se nível de confiança de 95%.

RESULTADOS

PCR convencional e PCR em tempo real

Todas as amostras de *Didelphis albiventris* (n=191) foram negativas para a presença de kDNA de *Leishmania* spp. quando avaliadas por PCR convencional. Entretanto, 1,6% (03/191) das amostras foram positivas por qPCR. Para a espécie *Micoureus paraguayanus*, foi observado 7,4% (07/95) de positividade para kDNA de *Leishmania* spp. por PCR convencional e 11,6% (11/95) por qPCR (Tabela 1). Houve concordância entre os resultados da PCR convencional e da qPCR ($Kappa=0,9270$) considerando-se o total de amostras avaliadas (n=286).

Todas as amostras positivas por PCR convencional foram as mesmas encontradas por PCR em tempo real e o teste de duas proporções para PCR convencional e qPCR obteve diferença estatisticamente significativa ($p<0,0001$). A quantificação absoluta revelou entre 3,0 e 8,5 parasitas/20mg de pele para os

gambás e de 8,0 a 406,6 parasitas/20mg de pele para as cuícas, demonstrando maior carga parasitária na segunda espécie estudada.

Tabela 1 – Resultados da PCR convencional e em tempo real para presença de kDNA de *Leishmania* spp em amostras de marsupiais

Espécie	Presença de kDNA de <i>Leishmania</i> spp.	
	PCR convencional	PCR em tempo real
<i>D. albiventris</i>	0 (0/191)	1,6% (03/191)
<i>M. paraguayanus</i>	7,4% (07/95)	11,6% (11/95)

Kappa = 0,9270

Setenta e três por cento (08/11) das amostras de cuíca positivas para *Leishmania* spp. por qPCR eram do fragmento Santa Mônica e 9% (01/11) de cada um dos outros três fragmentos: Santa Maria, Ponte Branca e Tucano. Os três gambás que apresentaram positividade eram dos fragmentos de Santa Maria, Santa Mônica e São Sebastião. Não foram observados animais positivos dentro do perímetro do Parque Estadual.

Sensibilidade e especificidade da qPCR

O limiar de detecção em amostras de peles artificialmente contaminadas com promastigotas de *Leishmania chagasi* da PCR convencional foi de 100 parasitas/20mg de pele. Entretanto, o da qPCR foi estabelecido com 6 logs, com detecção de 10 parasitas/20mg de pele ($r^2=0,98$). O espectro de detecção foi utilizado na curva padrão para controle interno de cada reação (FIGURA 2).

Como controle entre as reações foram utilizadas a média e desvio padrão do limiar de fase de exponencial (Cts) das amostras de culturas de *Leishmania chagasi* em escala de 10^6 a 10^1 (Tabela 2), cujo coeficiente de variação foi de 0,7 a 3,2% para *M. paraguayanus* e de 1,8 a 3,1% para *D. albiventris*. O teste T não pareado demonstrou que não houve diferença significativa entre as médias e desvio padrão entre os ensaios com amostras de *D. albiventris* e *M. paraguayanus* ($p>0,05$).

Picos de temperatura foram determinados pela primeira derivação negativa de fluorescência na temperatura de dissociação (T_m) de cada derivação, sendo a T_m média de 83°C para *Leishmania* spp.

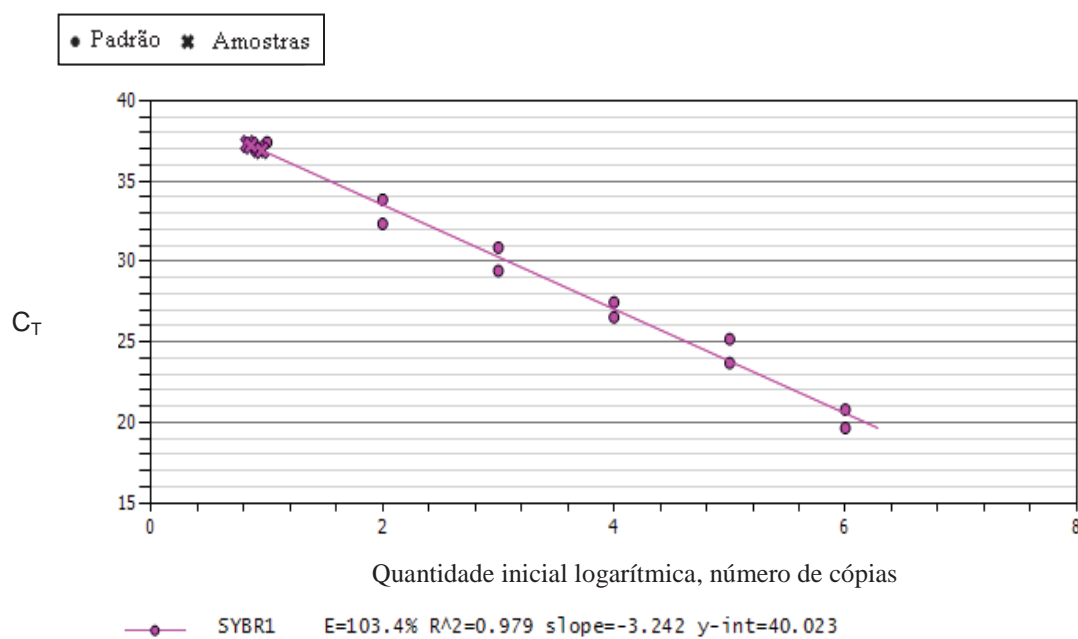


FIGURA 2 – Sensibilidade da PCR em tempo real para kDNA de *Leishmania* spp em amostras de pele de *D. albiventris*. Observa-se a linearidade da curva padrão de acordo com o ciclo, a eficiência da reação, regressão linear (R^2), grau de inclinação da curva (*slope*) e intercepto realizados pelo programa do termociclador iQ5 Bio-Rad®

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos valores de *Cycle threshold* (Ct) segundo a curva padrão das reações de PCR em tempo real (qPCR) e a espécie avaliada

Reações de qPCR	Diluições de cultura de <i>L. chagasi</i> em 20mg de pele de <i>D. albiventris</i>					
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
<i>Micoureus paraguayanus</i>	19,3±0,6	22,3±0,7	25,5±0,9	28,1±0,4	31,8±0,8	33,4±0,2
<i>Didelphis albiventris</i>	19,8±0,6	23,6±0,7	26,3±0,7	29,4±0,7	32,7±0,7	37,2±0,7

$P= 0,6821$

DISCUSSÃO

No presente trabalho observou-se positividade para *Leishmania* spp. em amostras de pele do marsupial *M. paraguayanus* (cuíca), espécie ainda não citada

como reservatório das leishmanioses, inclusive observando-se maior positividade (10,6%) nesta espécie do que em *D. albiventrís* (1,6%), também avaliada.

Estudos na espécie *D. albiventrís* tem sido mais frequentes, visto que esta espécie é reconhecidamente reservatório de leishmanioses e, por seu caráter sinantrópico, exercer papel mais importante no trânsito peridomicílio-mata em áreas degradadas (GUERRA et al., 2006). Cabrera et al. (2003) ao avaliarem amostras de 31 animais relataram soropositividade em 29% de *D. albiventrís*; Já Brandão-filho et al. (2003) avaliaram 37 animais por PCR convencional e observaram positividade em 13,5% de *D. albiventrís*. Schalling et al. (2007) avaliaram 111 animais e observaram positividade em 21,6% por IFI e 25% (5/20) por PCR convencional. No presente estudo, embora maior número de animais da espécie *D. albiventrís* (n=191) tenha sido avaliado, observou-se somente 1,6% positividade. Além do tamanho da amostra, outros fatores como a região estudada (área de mata), os meios diagnósticos (PCR e qPCR) e o material biológico utilizados na presente pesquisa são relevantes para as diferenças de positividade observadas. Áreas urbanas demonstram positividade bastante elevada (SANTIAGO et al., 2007) quando comparada ao ambiente de mata e em condições de naturais, a baixa infecção parece demonstrar ainda o equilíbrio ecológico, sendo favorável ao ecossistema avaliado. Entretanto, ao observar o total de animais positivos entre os diferentes fragmentos, 64,3% (09/14) eram oriundos do fragmento Santa Mônica, para ambas as espécies. Ainda que a avaliação tenha sido por PCR, a amostra biológica (pele) difere de medula óssea avaliada por Schalling et al. (2007), de sangue utilizado por Brandão-filho et al. (2003) e por Cabrera et al. (2003), bem como de biópsia de lesão avaliada por Guerra et al. (2006). Tecidos linfóides como medula óssea e baço, em geral, demonstram maior carga parasitária do que sangue e pele (SOLANO-GALLEGO et al., 2007; TRAVI et al., 1998a). Entretanto, Travi et al. (1998a) ao avaliarem marsupiais experimentalmente infectados observaram que o maior percentual de vetores positivos em xenodiagnóstico foi oriundo de um marsupial com positividade observada na pele, além dos tecidos linfóides. Uma vez o parasita encontrado na pele, a possibilidade do vetor se infectar torna-se superior aos demais tecidos, exceto em parasitemia.

Perda e fragmentação de hábitat afetam as taxas de extinção, os tamanhos das populações e os padrões de dispersão, estando entre as maiores ameaças para

a viabilidade das populações de animais silvestres (BRITO, 2009). Há controvérsias sobre a dispersão de marsupiais do gênero *Didelphis* sp.. Forero-Medina e Vieira (2009) observaram que estes animais podem ficar restritos aos fragmentos de mata, com alcance de até 200 metros destes fragmentos, e que a habilidade de percepção depende da direção dos ventos, altura de pastagem, peso corporal e a distância do fragmento florestal. Em áreas de pastagem e agricultura, o sucesso de um indivíduo de se movimentar entre os fragmentos torna-se reduzido, aumentando seu isolamento (VIEIRA et al., 2009). Por outro lado, Prevedello e Vieira (2010) demonstraram que a linearidade das pastagens pode orientar os animais favorecendo a conexão entre os fragmentos de hábitat.

A cuíca (*M. paraguayanus*), espécie predominantemente arborícola e com baixo poder de dispersão, tem sido objetivo de estudo de vários trabalhos que visam avaliar as consequências da fragmentação florestal sobre a dinâmica populacional e a estrutura genética das comunidades de pequenos mamíferos existentes na Mata Atlântica do sudeste do Brasil (BRITO, 2009; PIRES e FERNANDEZ, 1999; RODRIGUES et al., 2006).

Embora deslocamentos de machos por distâncias entre 80 a 300 metros entre fragmentos vizinhos através de uma paisagem fragmentada já tenham sido observados, a taxa de movimentação dessa espécie entre os fragmentos florestais é muito baixa, sendo de apenas 1,2% em relação a outras espécies de marsupiais (PIRES e FERNANDEZ, 1999). Forero-Medina e Vieira (2009) sugerem que a distância é a variável mais importante para determinar a orientação de *M. paraguayanus* uma vez que observaram que esta espécie se locomoveu apenas 50 metros na floresta e 100 metros da floresta. Assim, no fragmento Santa Mônica, onde se observou maior positividade para *Leishmania* spp. em cuícas, a formação de pequenas “ilhas” territoriais restringiu ainda mais a mobilidade desta espécie aos fragmentos podendo ter influenciado neste achado. Com esta restrição, a espécie pode ter se tornado mais vulnerável às condições adversas, dentre elas as leishmanioses, influenciando não só na epidemiologia desta zoonose, mas também na sobrevivência da espécie. A grave ameaça que a doença pode impor sobre as espécies de fauna ameaçadas de extinção geneticamente pobres é cada vez mais reconhecida e a preservação da biodiversidade em ecossistemas de vida selvagem pode prevenir e controlar doenças emergentes ou re-emergentes (TOMPSON et al.,

2009). Há que se ressaltar o fato de que há mais de 200 espécies de mamíferos no PEMD e que estes se encontram em constante movimentação, podendo atuar como reservatórios e favorecer a disseminação das leishmanioses.

A redução da biodiversidade pode ser associada a mudanças ambientais de origem antrópica como urbanização e desmatamento e subsequente adaptação e interação entre novos vetores, hospedeiros reservatórios e humanos (ROTUREAU, 2006). Por questões logísticas não foi possível avaliar a presença do vetor nas áreas estudadas. Entretanto, em estudo realizado por Alessi et al. (2009), cujo período de coleta coincidiu com a data deste estudo (anos de 2001 e 2002), as três espécies flebótomos mais freqüentes e epidemiologicamente importantes observadas dentro do perímetro do PEMD foram *Lutzomyia (P.) pessoai*, *Lu. (N.) whitmani* e *Lu. P. fischeri*. Neste contexto pode-se associar o alcance de vôo dos vetores (até 500m, segundo MORRISON et al., 1993) aos reservatórios em potencial, o que poderia explicar a positividade observada nos gambás dos fragmentos São Sebastião e Tucano, que são mais próximos ao perímetro do PEMD. *Lutzomyia. whitmani*, presente na área do Parque, pode atuar como vetor de leishmaniose entre diversas espécies de animais favorecendo a disseminação desta zoonose (LAISON e RANGEL, 2005).

Meios diagnósticos como a PCR e suas variantes tem sido validados para elucidação do papel da fauna silvestre como reservatório de zoonoses (ALEXANDER et al., 1998; SILVA et al., 2005). A especificidade do ensaio de qPCR deste estudo demonstrou T_m média de 83°C utilizando oligonucleotídeos iniciadores para região de kDNA de *Leishmania* spp., sendo compatível com relatos de Nicolas et al. (2002) que observaram T_m de 83,2°C e de Prina et al. (2007) que obtiveram T_m de 84°C, ainda que os oligonucleotídeos iniciadores tenham sido diferentes. Além disto, diversos autores utilizam como curva padrão (*standard*) diluições de culturas puras de diferentes espécies de *Leishmania* (BRETAGNE et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2008; FRANCINO et al., 2006; NICOLAS et al., 2002). Neste caso, há redução do Ct da reação quando se utiliza cultura pura, tendo um ciclo mais antecipado quando comparado às amostras avaliadas. A contaminação experimental da pele com culturas de *L. chagasi* e posterior extração de DNA realizada na presente pesquisa possibilitou maior semelhança das condições da curva padrão às amostras avaliadas.

Conforme já citado na literatura, a qPCR demonstrou ter maior sensibilidade na determinação da infecção parasitária quando comparada à PCR convencional (FRANCINO et al., 2006; NICOLAS et al., 2002; TUPPERWAR et al., 2008). A técnica de qPCR e o aprimoramento da curva padrão, com a contaminação experimental de amostras de pele com *L. chagasi*, resultou em uma metodologia eficaz, que pode ser importante ferramenta para diagnóstico em espécies silvestres cuja colheita de material é mais difícil e nem sempre obtida em concentração e/ou volumes adequados.

CONCLUSÃO

A evidência de *Leishmania* spp. nos marsupiais possibilitou observar a manutenção do protozoário na área entorno do Parque Estadual Morro do Diabo, não só em *D. albiventris* mas também em *M. paraguayanus*, ainda não registrada como espécie reservatório em potencial de *Leishmania* spp. no Brasil. Além disto, a técnica de qPCR demonstrou ser mais sensível que a PCR convencional, podendo ser amplamente utilizada em amostras de animais silvestres. Outros estudos devem ser realizados para se relacionar áreas de mata, fragmentos territoriais, presença de vetores e leishmanioses.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Valéria F. M. de Lima pelas amostras de *L. chagasi*; à Maria Emilia E. B. Santiago pela amostra de pele de marsupial *D. albiventris*; à Dra. Elizabeth Herrera e à Fulvia Di Pilo pela assistência técnica na utilização da qPCR. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP nº 2008/07216-0) pelas bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS

ALESSI, C.A.C.; GALATI, E.A.B.; ALVES, J.R.; CORBETT, C.E.P. American cutaneous leishmaniasis in the Pontal of Paranapanema – SP, Brazil: ecological and entomological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 277-282, 2009.

ALEXANDER, B.; LOZANO, C.; BARKER, D.C.; McCANN, S.H.E.; ADLER, G.H. Detention of *Leishmania (Vianna) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Tropica**, v. 69, p. 41-50, 1998.

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

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

BIO-RAD LABORATORY, INC. **Real-time PCR quick guide**. 2005, 26p.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 291-296, 2003.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 828–831, 2004.

BRITO, D. Genetic consequences of population subdivision: the marsupial *Micoureus paraguayanus* (Mammalia: Didelphimorphia) as a case study. **Zoologia**, v. 26, p. 684-693, 2009.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.M.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 79-83, 2003.

CAVALCANTI, M.P.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M.; ABATH, F.G.C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 356-358, 2009.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.

CURI, N.H.A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99-101, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

FORERO-MEDINA, G.; VIEIRA, M.V. Perception of a fragmented landscape by neotropical marsupials: effects of body mass and environmental variables. **Journal of Tropical Ecology**, v. 25, p. 53-63, 2009.

FRANCINO, O.; ALTET, E.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUES, A.; SOLANO-GALEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real time PCR assay for diagnosis and monitoring canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

GUERRA, J.A.O.; RIBEIRO, J.A.S.; COELHO, L.I.A.R.; BARBOSA, M.G.V.; PAES, M.G. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, p. 2319-2327, 2006.

GUERRA, J.A.O.; PAES, M.G.; COELHO, L.I.A.R.; BARROS, M.L.B.; FÉ, N.F.; BARBOSA, M.G.V.; GUERRA, M.V.F. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 37, p. 133-138, 2007.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 86, p. 6196-6200, 1989.

LAISON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

MARVULO, M. F.V. **Zoonoses**. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 1ª Edição. São Paulo: Rocca, 2006. p. 1254.

MENEGUETTE, A. A. C. **Atlas interativo do Pontal do Paranapanema: uma contribuição à educação ambiental**. P. Prudente. Tese (Livre-Docência em Cartografia) – FCT – Universidade Estadual Paulista. 2001. CD-ROM. Também disponível no site: <www.multimidia.prudente.unesp.br/atlaspontal>.

MORRISSON, A.C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R.B.; WILSON, M.L. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medicine Entomology**, v. 30, p. 427-435, 1993.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1666-1669, 2002.

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

PIRES, A.S.; FERNANDEZ, F.A.S. Use of the space by the marsupial *Micoureus demerarae* in small Atlantic Forest fragments in south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 15, p. 279-290, 1999.

PREVEDELLO, J.; VIEIRA, M.V. Plantation rows as dispersal routes: A test with didelphid marsupials in the Atlantic Forest, Brazil. **Biological Conservation** v. 143 , p. 131-135, 2010.

PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D.; MILON, G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1307-1315, 2007.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

RODRIGUES, F.P. **Análise da estrutura genética em populações naturais de pequenos mamíferos, no Parque Estadual Morro do Diabo (SP) e fragmentos de Mata Atlântica adjacentes.** São Paulo. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2004.

RODRIGUES, F.P.; ROCHA, F.S.; GARCIA, J.E.; GARCIA, J.F.; VIVO, M.; MARTIOLI, S.R. Isolation and characterization of microsatellite loci in the woolly

mouse opossum, *Micoureus paraguayanus* (Marsupialia: Didelphimorphia). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 686-688, 2006.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan Ecoregion Complex. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 81-96, 2006.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283-290, 2007.

SASTRE, N.; FRANCINO, O.; RAMÍREZ, O.; ENSENAT, C.; SANCHÉZ, A.; ALTET, L. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 117-120, 2008.

SCHALLING, H.D.F.H.; DA SILVA, E.S.; VAN DER MAIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M.F. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 387-393, 2007.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 550-552, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M.; ZAMPIERON, C.; RAZIA, L.; FURLANELLO, M.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ALBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 315-319, 2007.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; GUARÍN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis*

marsupialis, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, 73-75, 1998a.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forest of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 275-278, 1998b.

TOMPSON, A.R.C.; KUTZ, S.J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. **International Journal of Environment Research and Public Health**, v. 6, p. 678-693, 2009.

TUPPERWAR, N.; VINEETH, V.; RATH, S.; VAIDYA, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, p. 23-30, 2008.

VIEIRA, M.V.; OLIFIERS, N.; DELCIELLOS, A.C.; ANTUNES, V.Z.; BERNARDO, L.R.; GRELE, C.E.V.; CERQUEIRA, R. Land use vs. fragment size and isolation as determinants of small mammal composition and richness in Atlantic Forest remnants **Biological Conservation**, v. 142 , p. 1191–1200, 2009.