

KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI

**ESTUDO MOLECULAR DE CEPAS DE *Leishmania (L.) infantum chagasi*
ISOLADAS DE FLEBOTOMÍNEOS *Lu. longipalpis* DE ÁREA ENDÊMICA DE
LEISHMANIOSE VISCERAL DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Área de concentração em Doenças Infecciosas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Iara J. de Messias-Reasson

Co-orientadora: Prof^a. Dra Edna Aoba Yassui Ishikawa

CURITIBA

2011



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos dezessete dias do mês de junho do ano de dois mil e onze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: Liya Regina Mikami, Eliane Mara Cesário Maluf, e Iara Taborda de Messias Reason, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI**, do Programa de Pós-Graduação em **Medicina Interna e Ciências da Saúde – Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná**, intitulada: "ESTUDO MOLECULAR DE CEPAS DE *Leishmania (L) infantum chagasi* ISOLADAS DE FLEBOTOMÍNEOS *Lu. longipalpis* DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL DA AMAZONIA BRASILEIRA. A Banca examinadora considerou que **KÁRITA CLÁUDIA FREITAS LIDANI**, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado a Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde**, e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 17 de junho de 2011.

Professora Dra. Liya Regina Mikami

Professora Dra. Eliane Mara Cesário Maluf

Professora Dra. Iara Taborda de Messias Reason

Aos meus pais, Alípio e Terezinha, e irmã Carol por me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Ao Rafa pelo amor incondicional e incentivo na minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que estiveram presentes direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial:

A Deus, pela vida e proteção em todos os momentos da minha vida.

A Prof^a Dr.^a Iara Messias, do Departamento de Patologia Médica, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela orientação e por todo apoio para a realização do projeto em seu laboratório, possibilitando a inclusão do mesmo em suas inúmeras linhas de pesquisa.

A Prof^a Dr.^a Edna Ishikawa, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, pelo conhecimento transmitido desde a orientação na minha graduação; o que me impulsionou na pesquisa científica na área de medicina tropical e a seguir estudando as leishmanioses.

A Dra. Angélica Boldt pela amizade e incentivo para o sucesso dos meus experimentos.

Ao Dr. Adelson Sousa (in memoriam), líder do grupo de Entomologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), por gentilmente ceder amostras de flebotomíneos para a pesquisa de leishmanias, assim como a autorização no transporte das mesmas de Belém para Curitiba, para a continuidade do projeto.

Aos técnicos do IEC pela coleta e identificação dos vetores.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), em especial a Marlise e Mieko, que em muitos momentos me viram chegar ao laboratório na companhia de uma pasta de artigos científicos, que viajavam comigo toda semana de Curitiba para São José dos Pinhais.

Às alunas e amigas, Jimena e Jhulie, por acreditarem nos meus ideais e entrarem para a pesquisa por conta das minhas investidas científicas.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença endêmica em vários estados do Brasil. O agente etiológico é o protozoário *Leishmania (L.) infantum chagasi* e o principal vetor é o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Estudos epidemiológicos têm utilizado a PCR convencional para mensurar a taxa de infecção de flebotomíneos, como estratégia para aumentar a sensibilidade diagnóstica. Entre as principais vantagens deste método destaca-se a sensibilidade e especificidade, independente do número, estágio e localização de *Leishmania* no trato digestivo do vetor. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou comparar genes com diferentes números de cópias para detectar *L. chagasi* em área endêmica para LV da Amazônia oriental, no município de Barcarena, estado do Pará. Foram realizadas capturas de 280 fêmeas de flebotomíneos *Lu. longipalpis* utilizando armadilhas de luz tipo CDC, no período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004. O DNA foi extraído a partir do inseto inteiro, sem dissecação prévia, utilizando SDS e KOAc e empregado em reações de PCR para os genes de *Leishmania*: mini-exon, DNA do cinetoplasto (kDNA) e subunidade ribossomal 18S (SSU-rRNA). Foram empregados os seguintes iniciadores: D1 (5'-CCAGTTTCCCGCCCCG-3') e D2 (5'-GGGGTTGGTGTAATAATAG-3') que amplificam 780pb do gene kDNA; R221 (5'-GGTTCCTTCCTGATTTACG-3') e R332 (5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3') que amplificam 600pb do gene da subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA); S1629 (5'-GGGAATTCAATAWAGTACAGAACTG-3') e S1630 (5'-GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA-3') que amplificam 400pb do gene mini-exon. A amplificação do gene da subunidade 28S rRNA (Lu1- 5'-TGAGCTTGACTCTAGTTTGGCAC3' e Lu2 5'-AGATGTACCGCCCCAGTCAA-3') de *Lu. longipalpis* foi utilizado como controle para a extração do DNA do vetor, amplificando um fragmento de aproximadamente 370pb. Do total de 280 amostras de fêmeas *Lutzomyia longipalpis*, 24 (8,6%) apresentaram resultados positivos para o gene kDNA; 20 (7,1%), para o gene mini-exon; e 15 (5,3%) para o gene SSU-rRNA. Assumindo o resultado da taxa de infecção natural para o kDNA, a sensibilidade dos testes para os genes mini-exon e SSU-rRNA foi de 83,3% e 63%, respectivamente. A taxa de infecção foi considerada elevada e preocupante, visto que 62,5% dos vetores infectados foram coletados no intradomicílio; 37,5%, no peridomicílio. Os dados demonstram a importância da PCR como ferramenta para investigação da epidemiologia molecular da leishmaniose visceral para a estimativa de risco de transmissão da doença em área endêmica, com maior confiabilidade para o uso do DNA do cinetoplasto do parasita como marcador.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; *Leishmania (L.) infantum chagasi*; *Lu. longipalpis*.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is endemic disease in the majority of states in Brazil. The causative agent of VL the protozoan *Leishmania (L.) infantum chagasi* and the main vector the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Epidemiological studies have used conventional PCR to measure the ratio of sandfly infection as a strategy to increase the sensitivity of VL diagnosis. The main advantage of this method is the sensitivity and specificity, regardless of number, stage and location of *Leishmania* in the digestive tract of the vector. The aim of the present study was to compare genes with different numbers of copies to detect *L. (L.) i. chagasi* in an endemic area for VL in Oriental Amazon, in Barcarena, Pará State. A total of 280 *Lu. longipalpis* female phlebotomine were captured using CDC light traps, from november 2003 to february 2004. The DNA was extracted from the whole insect (no dissected), using SDS and KOAc. PCR for the genes mini-exon, kinetoplast DNA (kDNA) and 18S ribosomal subunit (SSU-rRNA) of *Leishmania* was used. The following primers were utilized: D1 (5'-CCAGTTTCCCGCCCCG-3') and D2 (5'-GGGGTTGGTGTAAAATAG-3 ') that amplify kDNA gene 780bp; R221 (5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3 ') and R332 (5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3') that amplify 600bp of the gene of the ribosomal small subunit (SSU-rRNA); S1629 (5'-GGGAATTCAATAWAGTACAGAAACTG-3 ') and S1630 (5'-GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA-3') that amplify the 400bp mini-exon gene. The 28S rRNA gene amplification LU1 (5'-TGAGCTTGACTCTAGTTTGGCAC-3') and LU2 (5'-AGATGTACCGCCCCAGTCAAA-3') of *Lu. longipalpis* was used as control for extraction of vectors with amplifies a fragment of approximately 370bp. In a total of 280 samples of *Lu. Longipalpis* females, 24 (8.6%) were positive for the gene kDNA; 20 (7.1%) for the mini-exon gene, and 15 (5.3%) for the SSU-rRNA gene. Assuming the result of natural infection rate for the kDNA, the sensitivity of the tests for the mini-exon and SSU-rRNA genes were 83.3% and 63%, respectively. The infection rate was high and concerning, given that 62.5% of infected vectors were collected intra-household, and 37.5% in the peridomicile. These data show the importance of PCR as a tool for investigating the molecular epidemiology of VL for estimating the risk of disease transmission in endemic areas, with kinetoplast DNA showing better reliability as a marker for the parasite.

Key words: Visceral Leishmaniasis; *Leishmania (L.) infantum chagasi*; *Lu. longipalpis*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1 | - ASPECTO CLÍNICO DA LV, DEMOSTRANDO HEPATOESPLENOMEGALIA. | 15 |
| FIGURA 2 | - ASPECTOS CLÍNICOS DA LTA. | 15 |
| FIGURA 3 | - FORMAS DA <i>Leishmania chagasi</i> | 16 |
| FIGURA 4 | - CICLO DA <i>Leishmania sp.</i> NO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO E MAMÍFERO | 17 |
| FIGURA 5 | - ADULTOS DE <i>Lu. longipalpis</i> | 21 |
| FIGURA 6 | - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DE CADA MINICÍRCULO DE <i>Leishmania</i> . | 24 |
| FIGURA 7 | - ESTRUTURA DO GENE MINIEXON | 25 |
| FIGURA 8 | - GRÁFICO DE CASOS CONFIRMADOS, CASOS CURADOS E LETALIDADE POR LV NO BRASIL, NO PERÍODO DE 2001 A 2009 | 26 |
| FIGURA 9 | - GRÁFICO DA TAXA DE INCIÊNCIA DE LV DE 2001 A 2009, AVALIANDO HOMENS E INDIVÍDUOS MENORES DE 5 E MAIORES DE 60 ANOS | 27 |
| FIGURA 10 | - .GRÁFICO DA TAXA DE INCIDÊNCIA DE LV NO BRASIL, AMAZÔNIA LEGAL E BARCARENA | 27 |
| FIGURA 11 | - CASOS DE LV EM BARCARENA, ESTADO DO PARÁ, DE 2000 A 2008. | 28 |
| FIGURA 12 | - MAPA DO ESTADO PARÁ DESTACANDO A LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE BARCARENA. | 32 |
| FIGURA 13 | - MORADIAS TÍPICAS EM SANTANA DO CAFEZAL, BARCARENA. | 33 |
| FIGURA 14 | - ARMADILHA DE CAPTURA DE LUZ, TIPO CDC. | 34 |
| FIGURA 15 | - PRODUTOS DE PCR (370pb) DO GENE 28S rRNA | 40 |
| FIGURA 16 | - PRODUTOS DE PCR DO GENE MINI-EXON PARA | 41 |

Leishmania sp.

- FIGURA 17 - PRODUTO DE PCR DO GENE MINI-EXON PARA *L.(L.) i. chagasi*. 42
- FIGURA 18 - TESTE DE ESPECIFICIDADE PARA O GENE kDNA. 42
- FIGURA 19 - PRODUTOS DE PCR DOS GENE kDNA e SSU. 43
- FIGURA 20 - TESTE DE SENSIBILIDADE PARA OS GENES kDNA E SSU-rRNA. 44
- FIGURA 21 - PRODUTOS DE PCR PARA O GENE kDNA, UTILIZANDO DNA DE FLEBOTOMÍNEOS NEGATIVOS PARA MINI-EXON. 45
- FIGURA 22 - PRODUTOS DE PCR PARA O GENE kDNA 45
- FIGURA 23 - PRODUTOS DE PCR PARA O GENE kDNA, UTILIZANDO DNA INDIVIDUAL DE FLEBOTOMÍNEOS. 46
- FIGURA 24 - PRODUTOS DE PCR PARA O GENE SSU-rRNA, UTILIZANDO DNA INDIVIDUAL DE FLEBOTOMÍNEOS POSITIVOS PARA OS GENES kDNA E MINI-EXON. 47

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM CAFEZAL | 41 |
| TABELA 2 - RESULTADO DA TAXA DE INFECÇÃO NATURAL PARA OS GENES MINI-EXON, kDNA e SSU-rRNA | 49 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| DAT | Teste de aglutinação direta |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| D.C | Depois de Cristo |
| µm | micrômetros |
| CDC | Centro de Controle e Prevenção de Doenças |
| MAX | Maxadilan |
| KDa | kilodalton |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao Gene da Calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide). |
| Th1 | Linfócito T subtipo 1 |
| Th2 | Linfócito T subtipo 2 |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| DAT | Reação de Aglutinação Direta |
| DNA | Desoxinucleotídeos Trifosfato |
| RAPD | Amplificação <i>aleatória</i> de DNA polimórfico (<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>) |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| rRNA | RNA ribossômico |
| pb | Pares de Base |
| mRNA | RNA mensageiro |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| SVS/MS | Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| SIM | Sistema de Informação sobre Mortalidade |
| SESPA | Secretaria de Estado e Saúde Pública, Pará |
| PA | Pará |
| SSU-rRNA | Subunidade menor do ribossomo |

| | |
|-------------|---|
| Km | Kilômetro |
| ° C- | grau Celsius |
| mm- | Milímetro |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| M | Molar |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetracético de sódio |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| Min | Minuto |
| RPM | Rotações por Minuto |
| TE | Tris-EDTA |
| nM | Nanômetro |
| WHO | Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1. AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO | 14 |
| 2.2. SISTEMÁTICA | 18 |
| 2.3. LEISHMANIOSE VISCERAL | 18 |
| 2.4. VETOR <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 20 |
| 2.4. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA E IDENTIFICAÇÃO DO PARASITA | 22 |
| 2.5. TÉCNICA DE PCR APLICADA NA DETECÇÃO DE <i>Leishmania</i> | 23 |
| 2.6. EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE | 25 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 29 |
| 4. OBJETIVOS | 30 |
| 4.1. OBJETIVO GERAL | 30 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 5.1. ÁREA DE ESTUDO | 31 |
| 5.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS | 33 |
| 5.3. MÉTODOS MOLECULARES | 34 |
| 5.3.1. Extração de DNA | 34 |
| 5.3.2. Determinação da Concentração do DNA Extraído | 34 |
| 5.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 35 |
| 5.3.4. Amplificação do gene mini-exon | 35 |
| 5.3.5. Amplificação do gene kDNA | 35 |
| 5.3.6. Amplificação do gene SSU-rRNA | 36 |
| 5.3.7. Amplificação do gene 28S Ribossomal | 36 |
| 5.4. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE | 37 |
| 5.5. ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR | 37 |
| 5.6. ANÁLISE DE DADOS | 37 |
| 5.6.1. Cálculo da taxa de infecção natural | 37 |
| 5.6.2. Sensibilidade e especificidade entre os marcadores | 37 |
| 6. RESULTADOS | 38 |
| 7. DISCUSSÃO | 47 |
| 8. CONCLUSÃO | 55 |
| 9. BIBLIOGRAFIA | 56 |

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são, depois da malária, as doenças causadas por protozoários que mais afetam a população, sendo que o número de infecções no mundo inteiro chega a 12 milhões. Esta enfermidade é endêmica nos cinco continentes, atingindo 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, sendo 72 países em desenvolvimento, sendo a maioria dos casos em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano surgem 2 milhões de novos casos, sendo 1,5 milhão por leishmaniose cutânea e 500.000 pela forma visceral (WHO, 2009).

O agente etiológico da leishmaniose visceral encontrado nas Américas é o protozoário da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 (PIMENTA *et al.*, 2003), que tem como vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e como reservatório peridoméstico o cão (*Canis familiaris*); sendo o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), o cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) e a raposa (*Vulpes vulpes*), reservatórios em área silvestre (LAINSON, 2010).

A identificação correta desses parasitas é importante não apenas para um melhor entendimento da epidemiologia desses agentes, mas também para que o tratamento adequado seja aplicado ao paciente (SHAW & LAINSON, 1987). No diagnóstico laboratorial, a identificação de formas amastigotas no aspirado de medula óssea, baço, linfonodos ou fígado é considerado padrão ouro, porém são procedimentos invasivos, possuem sensibilidade variável e contra-indicações. Os testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT) e imunocromatografia com o antígeno rk39 apresentam limitações em relação à sensibilidade e especificidade (ATTAR *et al.*, 2001; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2006).

Nesse sentido, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido apontada como técnica alternativa, não invasiva e altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, mostrando sensibilidade de 82% a 100%; e especificidade de 100% (SINGH *et al.*, 1999; LACHAUD *et al.*, 2000; XIAO-SU *et al.*, 2000).

Muitos autores estão associando a pesquisa de campo às técnicas de biologia molecular, devido sua maior sensibilidade, especificidade e rapidez. A PCR tem sido utilizada para detecção e tipagem molecular de *Leishmania*, a partir de

flebotomíneos para detecção da infecção natural (MIRANDA *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 1999), o que tem propiciado melhor compreensão da epidemiologia da doença.

A correta identificação das espécies de *Leishmania* circulantes em vetores de determinadas áreas endêmicas é de suma importância na adoção de medidas de prevenção e controle da parasitose, assim como nas condutas terapêuticas. A utilização de métodos moleculares tem permitido melhor compreensão da distribuição geográfica das espécies e da delimitação dos elos da cadeia epidemiológica, sendo possível conhecer vetores e reservatórios, de cada espécie, com o entendimento da genética de populações de focos endêmicos e epidêmicos. É importante ainda ressaltar que, diferentemente da maioria dos municípios brasileiros, o município de Barcarena apresenta grande parte da sua população (62,91%) vivendo em área rural oferecendo, portanto, condições ecoepidemiológicas favoráveis para manutenção da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

A leishmaniose é uma doença que vem atingindo o homem desde a antiguidade. Descrições sobre leishmaniose tegumentar são encontradas na literatura do primeiro século D.C., na Ásia Central, onde a moléstia era referida como “úlceras de Balkh”, área totalmente endêmica de leishmaniose tegumentar, no norte do Afeganistão. Já no Novo Mundo, existem cerâmicas sul-americanas da época de 400 a 900 anos D.C., que mostram rostos humanos com mutilações bem semelhantes às associadas à leishmaniose cutânea e mucocutânea (LAISON *et al.*, 1997).

As espécies de *Leishmania* no Novo Mundo estão agrupadas e classificadas em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania* e o subgênero *Viannia*. Podem ocorrer lesões nas vísceras (FIGURA 1), trata-se da Leishmaniose Visceral Americana, ou lesões na pele e nas mucosas do nariz, boca e faringe, que é a Leishmaniose Tegumentar Americana (FIGURA 2).



FIGURA 1- ASPECTO CLÍNICO DA LV, DEMONSTRANDO HEPATOESPLENOMEGALIA.

FONTE: <http://www.leishrisk.net> Bridging Research Leishmaniasis Control.

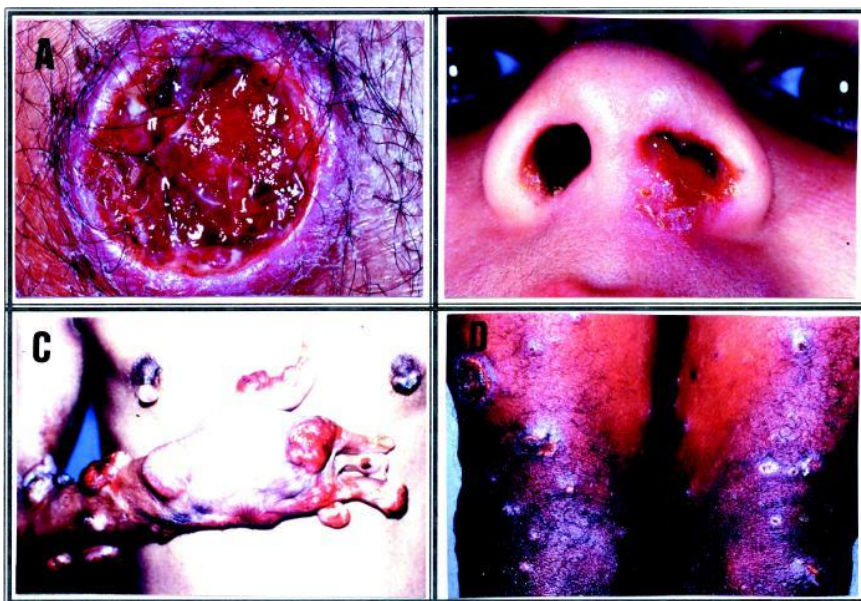


FIGURA 2- ASPECTOS CLÍNICOS DA LTA.

NOTA: (A) Forma Cutânea (Lesão Clássica em Moldura); (B) Forma Mucosa; (C) Forma Difusa; (D) Forma Disseminada.

FONTE: GONTIJO & CARVALHO, 2003.

Nas Américas as espécies de *Leishmania* são transmitidas por flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Psychodopygus* e *Lutzomyia*, dependendo da localização geográfica. Vulgarmente conhecidos como “tatuquira”, “mosquito de palha”, “birigui”, ou “cangalhinha” – da ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-família Phebotominae. Alguns são peridomiciliares, porém a maioria é de hábito silvestre (SILVEIRA *et al.*, 1997).

Nas Américas, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grupos principais, Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). A LTA é transmitida por várias espécies de flebotomíneos e pode variar na sua sintomatologia e na progressão clínica da doença dependendo do agente etiológico (CHAPPUIS *et al.*, 2007). As formas clínicas da LTA incluem a leishmaniose cutânea e a leishmaniose cutâneo-mucosa.

No Brasil, as espécies de parasitas envolvidos com a patogenia das LTA são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Além das espécies citadas, há outras de menor importância médico-epidemiológica, tais como *Leishmania (Viannia) lainsoni*,

Leishmania (Viannia) naiffi, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (LAINSON & SHAW, 1998; SILVEIRA *et al.*, 2002).

Já a LV, por apresentar sintomas semelhantes a outras doenças tropicais, torna-se difícil encontrar referências que possam identificar a ocorrência da mesma na antiguidade, tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo. No entanto, é seguro dizer que a condição clínica dos países da Região Mediterrânea referida como “anemia infecciosa do baço” ou “anemia do baço infantil” tratava-se de LV (LAINSON, 1997).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos (heteroxenos) e apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota (FIGURA 3.A), que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota (FIGURA 3.B), que é intracelular e sem movimentos. As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 μ m e flagelo livre. As amastigotas têm corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2 μ m e flagelo interno (LAINSON & SHAW, 1987).

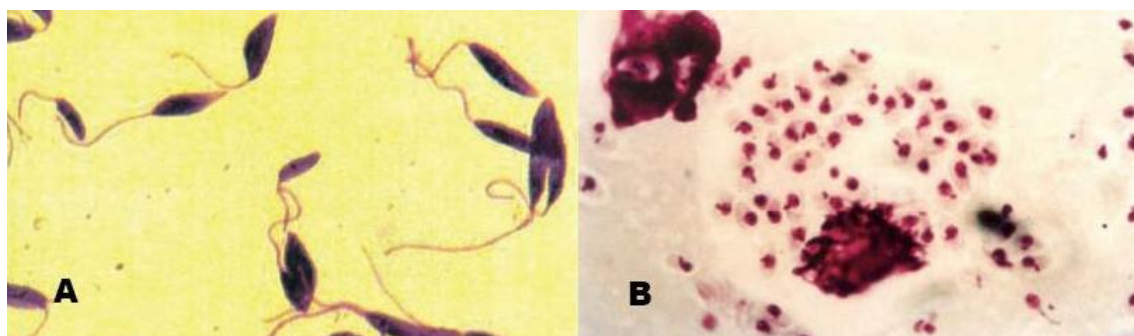


FIGURA 3- FORMAS DA *Leishmania chagasi*.

NOTA: (A) Forma Flagelada Promastigota. (B) Forma Flagelada Amastigota.

FONTE: Manual e Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.

O ciclo biológico desses parasitas no hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo, ao sugar o sangue de um animal infectado ingere junto com o sangue, macrófagos parasitados encontrados na pele ou no sangue periférico (FIGURA 4). No tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas modificam-se e assumem a forma promastigota, que se multiplicam por divisão binária e depois migram para a probóscida, de onde os flagelados podem então ser inoculados durante a próxima alimentação sanguínea do inseto (LAINSON *et al.*, 1986).

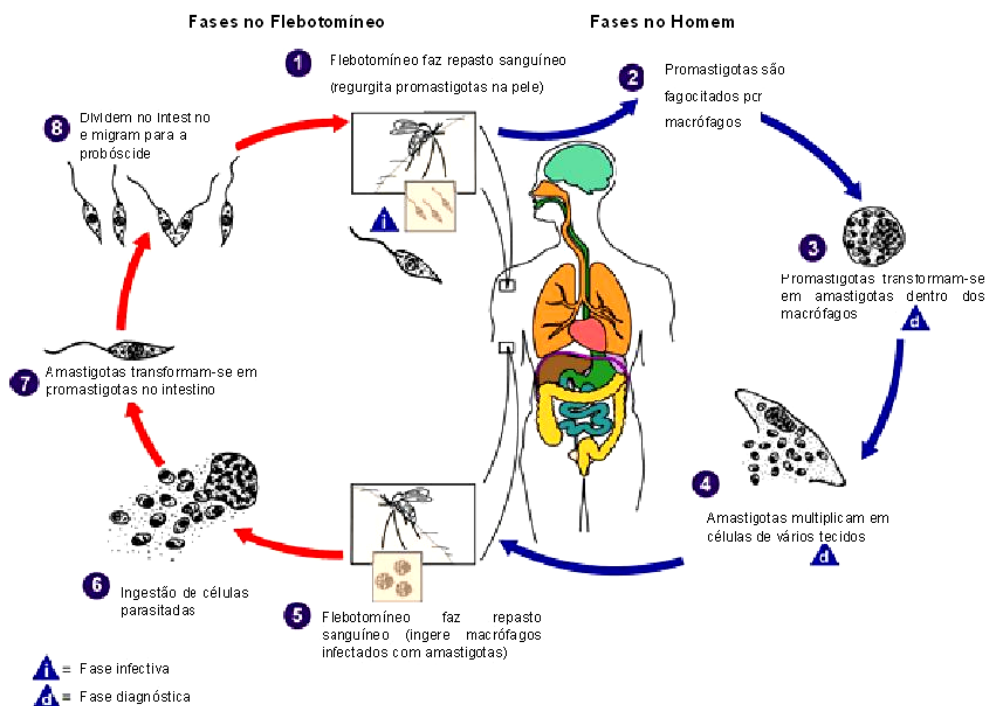


FIGURA 4: CICLO DA *Leishmania sp.* NO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO E MAMÍFERO.

NOTA: 1- Fêmea de flebotomíneo infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo sobre a pele lesionada, 2 – promastigotas são fagocitados por macrófago, 3 – dentro dos macrófagos, no interior dos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas se diferenciam em amastigota, 4 - amastigotas podem ser liberados e são capazes de infectar novos macrófagos, disseminando o parasita, 5 - flebotomíneo se infecta ao exercer sua hematofagia em um reservatório mamífero infectado, 6 - juntamente com o sangue ocorre a ingestão de formas amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo, 7 - amastigotas no trato digestivo do inseto se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, 8 – forma promastigota multiplicando-se por divisão binária e irão migrar para a probóscide do vetor.

FONTE: CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças – com modificações.

O homem e alguns animais domésticos são hospedeiros acidentais, atingidos pelo contato com áreas de mata. A parasitose humana vem sendo relatada em áreas florestais que sofreram modificações ambientais para o desenvolvimento agrícola, mineração, construção de estradas, usinas hidroelétricas etc., fato que representa um sério problema econômico, principalmente para países em desenvolvimento (LAINSON *et al.*, 1994).

2.2. SISTEMÁTICA

Segundo Leedale e Vickerman (2000), o gênero *Leishmania* tem a seguinte posição sistemática:

Reino: Protozoa

Sub-reino: Neozoa

Infra-reino: Discicristata

Filo: Euglenozoa Cavalier - Smith, 1981

Classe: Euglenoidea Bütschli, 1884

Ordem: KINETOPLASTEA Honigberg, 1963

Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903 emend. Saf'janova, 1982

Sub-gênero *Leishmania* Saf'janova, 1982

Sub-gênero *Viannia* Lainson & Shaw, 1982

2.3. LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV, também conhecida como Calazar, Esplenomegalia Tropical, Febre Dundun, dentre outras denominações menos conhecidas, é uma síndrome sistêmica, infecciosa, não contagiosa, de caráter habitualmente crônico, podendo levar o indivíduo a óbito quando não diagnosticado e tratado a tempo. Quanto ao modo de transmissão, a doença pode ser dividida em LV zoonótica quando a transmissão ocorre de um animal para um vetor e deste para uma pessoa; e antroponótica quando a via de transmissão ocorre de uma pessoa para um vetor e deste para outra pessoa (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Embora o Brasil esteja entre os países de notificação obrigatória da doença, devido ao aumento do número de casos e a dificuldade de diagnóstico em áreas isoladas ou menos favorecidas, limitam a precisão de incidência e prevalência da doença, o que torna os índices divulgados distante do grau real de comprometimento dessas populações (LAURENTI, 2010).

A expansão da LV é diretamente influenciada por mudanças ambientais, acarretando em formas adaptativas de vetores mais resistentes, que migram do ambiente silvestre para o peridomiciliar, aumentando o risco de transmissão da doença. Apesar de ser considerada uma doença tipicamente rural, vários surtos urbanos têm sido relatados, devido às condições epidemiológicas favoráveis, em locais com grande densidade populacional e condições sanitárias precárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Segundo Dujardin (2006), as três maiores causas para o aparecimento e reaparecimento das leishmanioses são as mudanças ambientais, condição imunológica humana e falha no tratamento.

Além disso, no Brasil pode ocorrer outro importante meio para a transmissão da doença sem a presença do vetor, pela via clássica, através de transfusão sanguínea. Isso se deve ao fato dos testes sorológicos para LV ainda não estarem incluídos na triagem dos doadores (LAURENTI, 2010).

A patogenia das leishmanioses é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro, como características genéticas e resposta imunológica; por fatores inerentes ao parasita, como a virulência da espécie de *Leishmania* infectante; e ainda por fatores relacionados ao vetor, como sua competência vetorial. Como resultado dessa interação, observa-se uma variedade de manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas no homem. Ocorre um comprometimento dos órgãos que compõem o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), local de multiplicação do parasita que se hiperplasia e se hipertrofia em resposta à infecção (DIETZE & CARVALHO, 2003). Observam-se alterações estruturais orgânicas ou teciduais como a esplenomegalia, hepatomegalia, adenomegalia, anemia, leucopenia e hipergamaglobulina (HUGGINS, MEDEIAS E FARIAS JÚNIOR, 1993; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Segundo Bardaró *et al.* (1986) a LV pode assumir um caráter espectral, que determina diversas formas clínicas, variando de uma forma silenciosa assintomática, às formas sub-clínicas ou oligossintomáticas, agudas, até a forma clássica. A forma

oligossintomática ou sub-clínica é a forma mais freqüentemente observada da doença, caracterizada por febre baixa recorrente, tosse seca, diarreia, sudorese e prostração; com a presença de formas amastigotas no baço, linfonodos e órgãos hematopoiéticos. A forma aguda se assemelha a uma septicemia, com diarreias, febre alta e tosse, na presença de raras alterações hematopoiéticas e discreta hepatoesplenomegalia, com duração de no máximo dois meses, com parasitismo mais freqüente no fígado e no baço. Pode ser confundida clinicamente com febre tifóide, malária, esquistossomose, doença de Chagas aguda, toxoplasmose aguda e histoplasmose. A forma sintomática, crônica ou clássica é uma forma de evolução prolongada da doença, com desnutrição protéico-calórica, edema generalizado e abdome globoso. O emagrecimento é progressivo e leva o paciente a caquexia acentuada. É comum a dispinéia, cefaléia, dores musculares, perturbações digestivas, epistaxes, com evolução para óbito.

Por se tratar de uma doença debilitante de caráter imunodepressivo, infecções bacterianas secundárias são comuns e podem levar o paciente à óbito; e juntamente com os processos hemorrágicos são os principais fatores de risco para a morte na LV. Portanto, a identificação precoce dos pacientes que poderão evoluir mal é de fundamental importância para se reduzir a letalidade por meio da instituição de medidas terapêuticas e profiláticas eficazes.

2.4. VETOR *Lutzomyia longipalpis*

De acordo com Silva *et al.* (1990), *Lutzomyia longipalpis* é uma das espécies de flebotomíneos do Novo Mundo mais bem distribuídas, sendo uma das poucas espécies americanas que se adaptou a ambientes domésticos e peridomésticos (FIGURA 5). No Brasil, *Lu. Longipalpis* tem sido encontrado nos mais variados habitats, estendendo-se de centros urbanos a áreas rurais, com uma ampla variedade de ecótopes em áreas periurbanas (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1998). A espécie foi descrita pela primeira vez por Lutz & Neiva, em 1912, a partir de insetos capturados nas margens do rio Tietê no estado de São Paulo, na gruta de Maquine em Minas Gerais e em uma mata do rio Trombetas no Pará (LUTZ & NEIVA, 1912).



FIGURA 5: ADULTOS DE *Lu. longipalpis* OBSERVADOS EM ESTEREOMICROSCÓPIO.

NOTA: Aumento 80x: A – Macho e B – Fêmea.

FONTE: AMÓRA, 2009

A saliva de *Lu. longipalpis* contém maxadilan (MAX), um peptídeo de 7kDa, vasodilatador potente e com propriedades imunomodulatórias, que inibe a ação dos macrófagos (LERNER *et al.*, 1991). Lerner & Shoemaker (1992) clonaram e produziram MAX recombinante em *Escherichia coli* com as mesmas propriedades da proteína salivar. Sua atividade vasodilatadora é 500 vezes maior que a do CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), até então o mais potente vasodilatador conhecido.

Várias publicações relatam sua capacidade de imunomodulação, implicando-o como fator de promoção da infecção, desviando a resposta Th1 para Th2 e favorecendo a evolução da doença (SOARES *et al.*, 1998; ROGERS & TITUS, 2003; GILLESPIE, MBOW & TITUS, 2000). Esses mecanismos (vasodilatação e imunomodulação) propiciam condições ideais para a inoculação do parasita em seu hospedeiro, com resposta inflamatória mínima, o que sugere a exploração desses mecanismos promovidos pelo MAX no emprego de vacina experimental para leishmaniose.

Segundo Warburg *et al.* (1994), a forma visceral da leishmaniose é afetada pela quantidade de MAX, pois *Lu. longipalpis* que apresentam pouca quantidade desta substância causam somente lesões cutâneas; por outro lado, os vetores encontrados no Brasil e Colômbia têm maior concentração de MAX, ocasionando visceralização dos parasitas, com indução à LV.

2.4. DIAGNÓSTICO DA LV E IDENTIFICAÇÃO DO PARASITA

Tradicionalmente, o diagnóstico da doença tem sido feito pela identificação direta dos parasitas encontrados em punções, em associação com as observações clínicas; Reação Intradérmica de Montenegro (RIM); e cultivos *in vitro* e *in vivo* (ISHIKAWA, 2002). A identificação microscópica direta ainda é um método simples, de baixo custo e seguro para o diagnóstico da doença; porém essas práticas não permitem a identificação das espécies de *Leishmania*, necessários para os estudos epidemiológicos

Entre os métodos imunológicos desenvolvidos e empregados no diagnóstico da doença, estão os testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e reação de aglutinação direta (DAT), que é um teste simples e proporciona rápida detecção de anticorpos e antígenos do parasita em casos de LV. Tais metodologias expressam os níveis de anticorpos circulantes, avaliando os parâmetros imunológicos do hospedeiro, porém podem ocorrer reações cruzadas com anticorpos contra outros patógenos, o que torna difícil a identificação do parasita por espécie (LAINSON *et al.*, 1986).

A caracterização e identificação de amostras de *Leishmania* para determinação de espécie têm sido realizadas por comparação da mobilidade eletroforética de várias isoenzimas, que podem ser analisadas em gel de amido ou acetato de celulose. No entanto, há a necessidade de um grande número de parasitas cultivados e a utilização de cepas padrões de referência em cada gel a ser analisado (GARDENER *et al.*, 1974).

Nos últimos quinze anos, métodos moleculares como hibridação de DNA, eletroforese de isoenzimas, *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) e PCR têm sido desenvolvidos para a identificação de certas espécies de *Leishmania*, isolados de cultura ou de pacientes (RODRIGUEZ *et al.*, 1994), assim como na detecção do parasita em espécimes de flebotomíneo (SILVA & GRUNEWALD, 1999). Entre as principais vantagens da PCR destaca-se a sensibilidade e especificidade, independente do número, estágio e localização da *Leishmania* no trato digestivo do vetor (MICHALSKY *et al.*, 2002).

2.5. TÉCNICA DE PCR APLICADA NA DETECÇÃO DE *LEISHMANIA*

Desde sua concepção em 1985, a técnica de PCR tem tornado seqüências gênicas previamente inacessíveis ou difíceis de serem obtidas, freqüentemente disponíveis para isolamento, análise, clonagem e manipulação *in vitro* (WALKER & RAPLEY, 1999).

A PCR consiste em uma técnica *in vitro* fundamentalmente simples, rápida e sensível, capaz de produzir em poucas horas especificamente milhões de cópias de uma determinada seqüência-alvo. Inicialmente, é necessária a construção por síntese química de dois oligonucleotídeos de DNA (iniciadores) complementares as extremidades de cada fita de DNA, flanqueando a região de interesse. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores da síntese de DNA *in vitro*, que é catalisada pela DNA polimerase.

A aplicação da PCR é bastante abrangente, sendo direcionada para o estudo estrutural e funcional de genes, assim como instrumento diagnóstico espécie-específico para doenças infecciosas, no diagnóstico de defeitos genéticos, estudos evolutivos, polimorfismos de DNA, medicina forense, etc (ANDRADE, 1993).

Métodos diagnósticos para a leishmanioses têm sido desenvolvidos baseados na amplificação de diversos alvos de DNA, como o minicírculo de kDNA, o gene rRNA, mini-exon e seqüências genômicas repetidas (ARANSAY *et al.*, 2000).

O minicírculo de kDNA é considerado um alvo ideal, já que está presente em 10.000 cópias por célula, que estão distribuídas entre dez diferentes classes de seqüências (FIGURA 6). Além disso, a seqüência minicírculo é conhecida para a maioria das espécies de *Leishmania*, possuindo uma região variável que oferece precisão na discriminação entre espécies.

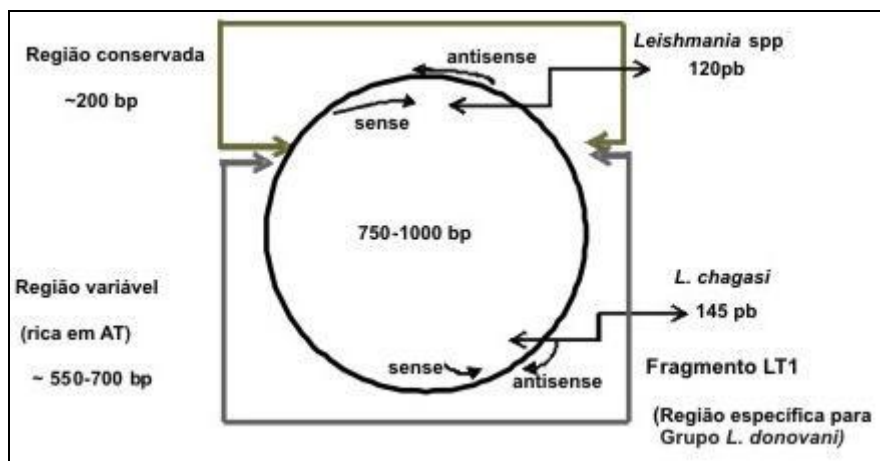


FIGURA 6- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DE CADA MINICÍRCULO DE *Leishmania*.

NOTA: Localização dos iniciadores para gênero (120pb) e *L. donovani* (145pb). Iniciadores descritos por Fernandes *et al.*, 1996

FONTE: www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html, modificado pela autora.

O gene mini-exon está presente no genoma nuclear de Kinetoplastidae em aproximadamente 200 cópias, ordenadas em repetições tandem e consistindo de três diferentes partes: um éxon, um íntron e uma região intergênica (FIGURA 7). O éxon é composto por uma seqüência de 39 nucleotídeos, altamente conservado em todos Kinetoplastidae, que é adicionado pós-transcricionalmente a extremidade 5' dos mRNA nucleares (MARFURT *et al.*, 2003). Através do tamanho do gene e da seqüência da região intergênica do gene mini-exon pode-se agrupar *Leishmania* do Novo Mundo em três grupos: espécies *Viannia* (250pb); espécies dermatrópicas de *Leishmania* (350pb) e *L. chagasi* (400pb) (DEGRAVE *et al.*, 1994).

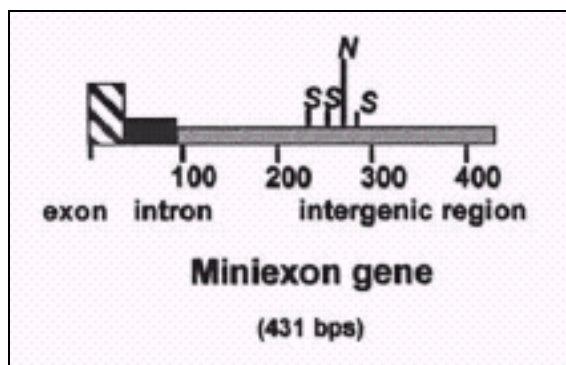


FIGURA 7- ESTRUTURA DO GENE MINI-EXON.

2.6. EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA LV

Estima-se que no mundo inteiro ocorram 59.000 mortes por ano causadas pela LV (DUJARDIN, 2006). Porém, esta taxa pode estar subestimada pelo fato que as notificações são obrigatórias em apenas 33 dos 88 países afetados pela doença (DESJEUX, 2004). Desta forma, dos dois milhões de casos estimados ao ano, somente 600 mil são oficialmente notificados, o que mostra uma elevada taxa de sub-notificação (WHO, 2001).

Nas duas últimas décadas, a LV reapareceu no mundo de forma preocupante. No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS, à semelhança do que se observa no sul da Europa. Além disso, a expansão da epidemia acometendo grupos de indivíduos jovens ou com co-morbidades tem ocasionado número elevado de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O Programa de Vigilância e Controle da LV no Brasil tem como principal objetivo a redução do número de casos e de óbitos por meio do diagnóstico e tratamento precoces (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011). No entanto, no período de 2001 a 2009, no Brasil, o número de casos confirmados variou de 49,9% (2001) a 86,5% (2007); e as maiores taxas de letalidade foram nos anos de 2003 (7,6%) e 2004 (7,8%), decaindo para 5,5% em 2009 (FIGURA 8). Em Barcarena, a letalidade foi de 3,7%, em 2004; enquanto que na Amazônia Legal foi de 6,52% no mesmo período (SINAN/SIM, 2010).

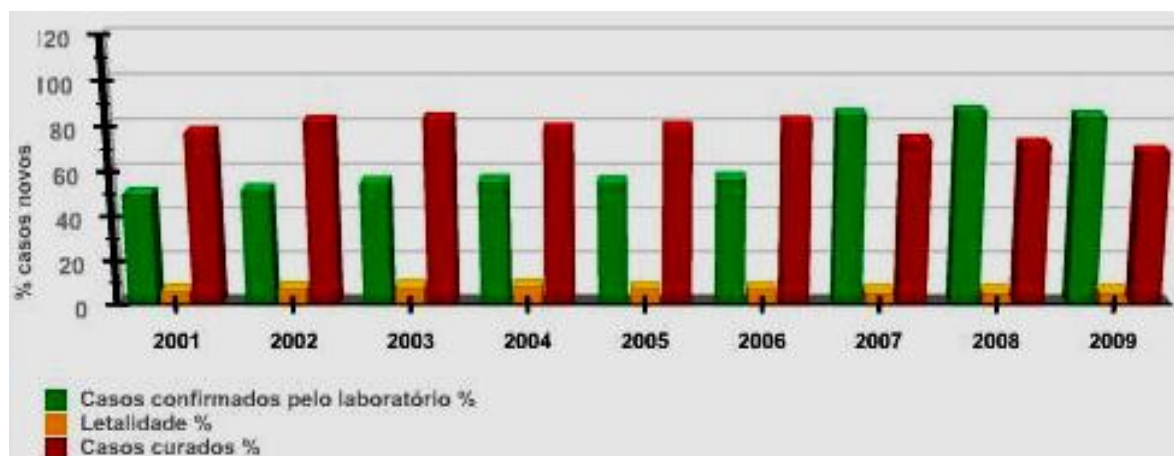


FIGURA 8: GRÁFICO DE CASOS CONFIRMADOS, CASOS CURADOS E LETALIDADE POR LV NO BRASIL, NO PERÍODO DE 2001 A 2009.

FONTE: SINAN/ SIM/ IBGE- junho/2010

A partir de 2002, observou-se um aumento na incidência (taxa/100.000 habitantes) da LV no Brasil, variando de 1,5 para 2,2 em 2004, mostrando-se constante nos anos de 2005 (2,25) e 2006 (2,26), com redução no ano de 2007 para 1,91. Em Barcarena as taxas de incidência foram muito superiores a esse valores para todos os períodos comparados, superando também as estimativas para a Amazônia Legal (SINAN/SIM, 2010). Uma visível expansão da doença ocorreu a partir de 2003 (13,12), com taxas de 76,7 e 82,3 nos anos de 2004 e 2005, e redução para 21,6 somente em 2009, índice considerado ainda elevado (FIGURA 9).

É importante destacar que os homens são mais vulneráveis a doença que as mulheres. Tal fato está associado ao maior contato com as áreas de mata, no trabalho com a agricultura e caça. A taxa de incidência para menores de 5 anos e maiores de 60 anos representa a domesticação do flebotomíneo, que sai do ambiente silvestre para ocupar ambientes domiciliares, mudando a dinâmica do ciclo da doença e aumentando o risco de infecção para a população de área endêmica (SINAN/SIM, 2010).

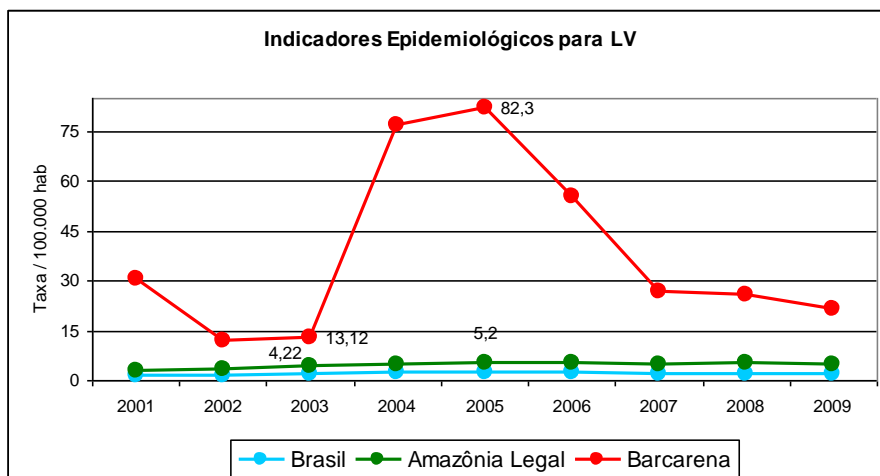


FIGURA 9: GRÁFICO DA INCIDÊNCIA DE LV NO BRASIL, AMAZÔNIA LEGAL E BARCARENA.

FONTE: SINAN/ SIM/ IBGE- junho/2010, modificado pela autora.

O monitoramento da LV em áreas endêmicas é de extrema importância para o controle da doença no intuito de reduzir as taxas de letalidade e aumentar o número de casos curados. Para isso é necessário uma série de medidas bem definidas, entre elas o diagnóstico precoce e tratamento adequados.

Na região Norte, os casos de LV têm aumentado, principalmente nos Estados do Pará, Tocantins, Roraima e Amapá (CRESCENTE, 2008). Um aumento de 26,03% de casos de LV foi registrado na região Norte no período de 1990 a 2008, sendo que no município de Barcarena, esse aumento foi muito expressivo, passando de 9 casos em 2003, para 78 em 2005, como observado na FIGURA 10 (OLIVEIRA, 2009).

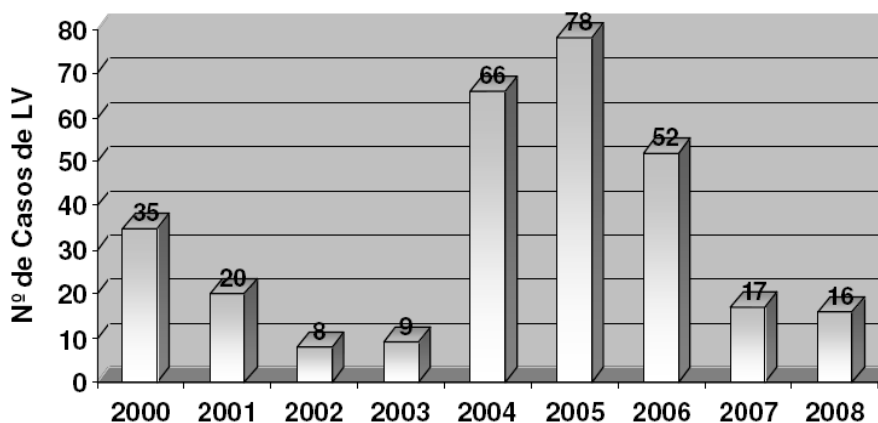


FIGURA 10 – CASOS DE LV EM BARCARENA, ESTADO DO PARÁ, DE 2000 A 2008.

FONTE: SESPA, modificado por OLIVEIRA, 2009.

A expansão da LV no Estado do Pará nas últimas décadas se deve a uma série de fatores, entre eles: o aumento demográfico, resultando em desmatamentos desordenados que propiciam a invasão do ambiente peridomiciliar pelo vetor; o descontrole da população de cães domésticos nas áreas endêmicas, altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania (L.) i. chagasi*, contribuindo para a manutenção do ciclo peridomiciliar; a migração de populações não imune de outras regiões; e a conduta dos profissionais de saúde diante de um paciente com quadro febril, no sentido de incluí-lo como suspeita diagnóstica para LV, principalmente as crianças (LAINSON, 1988; 1989).

No período compreendido entre 2000 a 2004, Barcarena registrou uma incidência média anual de 0,36 casos de LV por 1.000 habitantes (SESPA, 2004), sendo 67% dos casos no sexo masculino e 56% em menores de 15 anos. No mesmo período, foram registrados 14 casos de AVL na localidade de Santana do Cafezal, o que promoveu uma média anual de 2,8 casos por 1.000 habitantes da doença nesse período.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo da biologia de *Leishmania* é de suma importância para o entendimento da interação parasita-hospedeiro entre espécies do Novo Mundo e seus respectivos vetores, principalmente quando se trata do Brasil, responsável por 90% dos casos de LV e com grande incidência da doença nas formas cutânea e mucocutânea (SOARES & TURCO, 2003).

A incidência cada vez mais elevada de leishmanioses no mundo representa um sério problema de saúde pública. Não há dúvida de que existe uma franca expansão do número de casos de LV no Brasil, representando uma das principais endemias no Estado do Pará, com os municípios de Soure e Barcarena ocupando o 11º e 13º lugar, respectivamente, no número de casos da doença no Estado (DOS SANTOS, 2002).

Métodos moleculares têm sido aplicados com sucesso em estudos da competência vetorial de flebotomíneos (RODRIGUEZ *et al.*, 1999), incluindo áreas de baixos índices de infecção (SILVA & GRUNEWALD, 1999). Como a localidade de Cafezal, no município de Barcarena, é caracterizada como uma área endêmica para LV em expansão torna-se importante a utilização de métodos moleculares rápidos e sensíveis, como a PCR para realizar uma avaliação da infecção natural dos flebotomíneos circulantes no local.

Considerando-se que diferentes marcadores para PCR, que detectam distintas regiões gênicas de *Leishmania* causadora de LV que têm sido desenhados, torna-se importante conhecer a eficiência destes marcadores em estudos epidemiológicos. Assim neste estudo pretende-se detectar a infecção natural de flebotomíneos na região de Barcarena e analisar a eficiência de alguns marcadores para PCR.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização molecular de cepas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* isoladas de flebotomíneos *Lu. longipalpis* naturalmente infectados na localidade de Cafezal, área endêmica da leishmaniose visceral, no município de Barcarena, estado do Pará.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a taxa de infecção natural em flebotomíneos, utilizando PCR para amplificar os genes mini-exon, kDNA e SSU-rRNA do genoma de *Leishmania*.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR para identificação de *Leishmania* com os marcadores moleculares: Mini-exon, kDNA e SSU-rRNA.
- Verificar o percentual de flebotomíneos infectados capturados no ambiente intra e peridomicíliar.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDO

A área estudada abrange a região norte do Brasil, no município de Barcarena (FIGURA 12), localidade Santana do Cafezal ($0^{\circ}3'38.38''S/ 47^{\circ}39'3.36'' O$), que compreende uma comunidade de colonos residentes às margens do rio Cafezal. Dista 7 km da sede do município de Barcarena, a qual faz parte da região metropolitana de Belém, capital do Estado do Pará, pertencentes à Amazônia Ocidental. O clima de Barcarena é quente equatorial úmido, sendo, na classificação de Köppen, do tipo Amazônico. A temperatura média anual é de $27^{\circ} C$, com amplitude térmica mínima. Precipitações abundantes, acima de 2.500 mm ano, ocorrem mais nos seis primeiros meses e, menos intensamente, nos últimos seis meses do ano (SEPOF-PA, 2009).

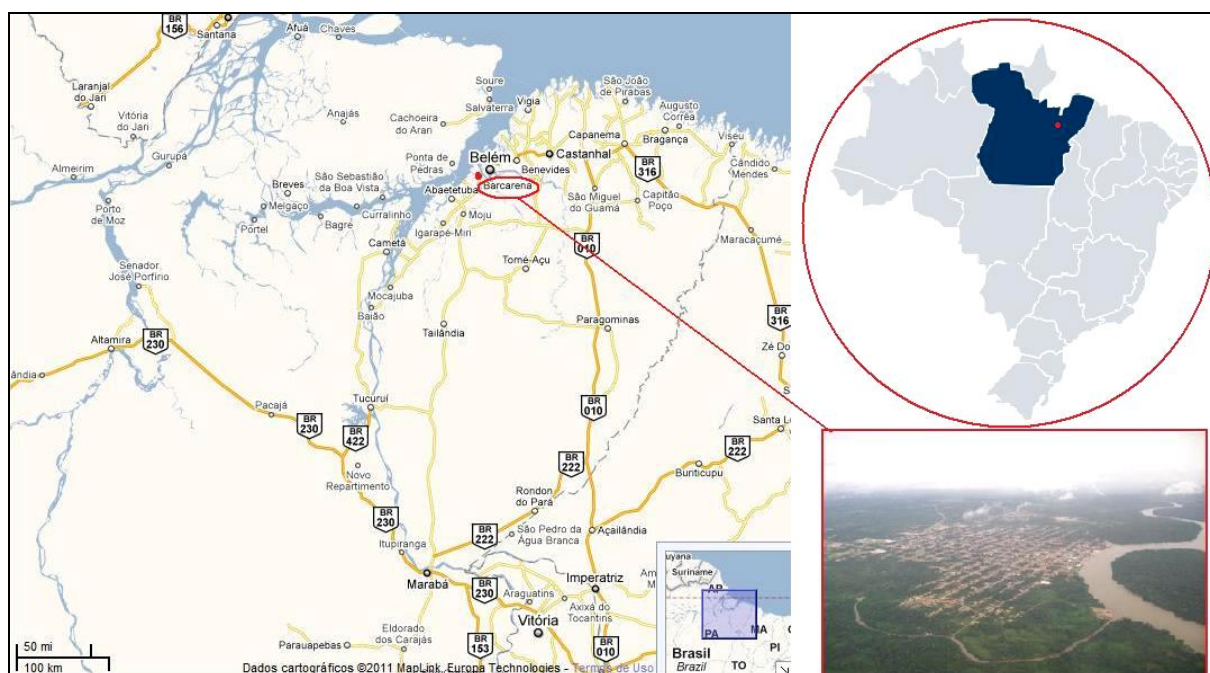


FIGURA 11- MAPA DO ESTADO PARÁ DESTACANDO A LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE BARCARENA.

FONTE: Google Maps, modificado pela Autora, 2011.

O município de Barcarena possui uma área de 1.310,33 Km² com uma população de 99.859 habitantes, sendo 36.297 (36,35%) residentes na zona urbana e 63.562 (63,65%) na zona rural (IBGE, 2010).

5.1.1. Áreas de coleta

Santana do Cafezal é caracterizada como zona rural, onde cerca de 80% da população vive em casas de madeira; e o restante em casas de alvenaria, próximas à vegetação e com presença de abrigos de animais domésticos ao redor. A localidade tem energia elétrica, porém não dispõe de saneamento básico; com utilização de água de poço sem tratamento para consumo. Apresenta um posto de saúde com atendimento médico regular (SESPA, 2004).

A FIGURA 12 representa as moradias típicas das áreas de captura dos flebotomíneos (intra e peridomicílio), demonstrando a presença de matas e criatório de animais próximo às casas.



FIGURA 12 – MORADIAS TÍPICAS EM SANTANA DO CAFEZAL, BARCARENA.

NOTA: A e B- Casas de madeira próximas à mata; C e D- Criatório de animais no quintal das casas.

FONTE: CRESCENTE, 2008.

5.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Foram utilizadas para a realização deste trabalho 280 fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, coletadas no período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004.

Os flebotomíneos foram coletados, utilizando o método de captura de luz tipo CDC (FIGURA 13), pela equipe de entomologia do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas- SVS, em Belém-PA. No laboratório, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, machos e fêmeas foram separados individualmente em tubos estéreis e identificados segundo a espécie, conforme a classificação proposta por Young & Duncan (1994). Após identificação, as espécies foram armazenadas a -70°C .



FIGURA 13: ARMADILHA DE CAPTURA DE LUZ, TIPO CDC.

FONTE: SOUZA *et al.*,2010

5.2.1. Critérios de Inclusão

Amostras encaminhadas pela Equipe de Entomologia do Instituto Evandro Chagas para o Laboratório de Parasitologia Molecular do mesmo centro, com a devida identificação do gênero (fêmeas) e espécie do flebotomíneo (*Lu. longipalpis*).

5.2.2. Critérios de Exclusão

Amostras não identificadas e/ ou mal preservadas.

5.3. MÉTODOS MOLECULARES

5.3.1. Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído individualmente, onde cada flebotomíneo foi tratado com 100 μ L da solução de trituração (0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,6 M NaCl, 0,1 M EDTA, 20x Spermina/spermidina mL, 10% Sucrose) e triturado com a ponta da ponteira até ficar bem disperso no tampão. Em seguida, adicionou-se 100 μ L da solução de lise (10% SDS, 10% sucrose e 17 μ L dietilpirocarbonato), misturando levemente. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 65°C e, em seguida, refrigeradas em gelo por 5 min. Após centrifugação rápida, adicionou-se 30 μ L de 8M de acetato de potássio para a precipitação de proteínas imediatamente, deixando-se os tubos em gelo por 45 minutos.

As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e identificado. O DNA foi precipitado com etanol 96% e dissolvido em 20 μ L de solução TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos antes de estocar a 4°C ou -20°C.

5.3.2. Determinação da Concentração do DNA Extraído

A quantidade e a pureza do DNA genômico tanto das cepas referência bem como dos flebotomíneos, foram feitas pela medida de absorbância a 260nm determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-1000, Estados Unidos).

5.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os ensaios de PCR foram conduzidos inicialmente para amplificar o fragmento de 400pb do gene mini-exon das formas viscerotrópicas de *Leishmania*; em seguida foram avaliados os genes kDNA e SSU 61S rRNA, com fragmentos de aproximadamente 780 e 600pb, respectivamente. Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de flebotomíneo infectado experimentalmente com uma cepa de *L. (L.) i. chagasi* (MCER/BR/1996/M15677) e água, no lugar do DNA, como controle negativo.

Para confirmar o sucesso da extração de DNA, um fragmento de 370pb do gene 28S ribossomal de *Lu. longipalpis* foi amplificado para todas as amostras.

5.3.4. Amplificação do gene *mini-exon*

A reação de PCR foi realizada para um volume total de 10µl, contendo Tampão de *Taq* (10 mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,2mM de dNTPs, 10% DMSO, 1,5mM MgCl₂, 1mM de cada iniciador, 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Estados Unidos) e 2 µl de DNA extraído. Os iniciadores utilizados foram S1629 (5'-GGGAATTCAATAWAGTACAGAACTG-3') e S1630 (5'-GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA-3') que amplificam aproximadamente 400pb do gene mini-exon das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas (DEGRAVE *et al.*, 1994; FERNANDES *et al.*, 1994).

A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 95⁰ C por 3 minutos, seguido de 5 ciclos nas seguintes temperaturas: 95⁰ C por 1 minuto, 45⁰C por 30 segundos e 65⁰C por 1 minuto. Posteriormente, 35 ciclos nas seguintes condições: 95⁰ C por 1 minuto, 50⁰C por 30 segundos e 72⁰ C por 1 minuto.

5.3.5. Amplificação do gene kDNA

A reação de PCR foi realizada para um volume total de 10µl, contendo Tampão de *Taq* (10 mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,4mM de dNTPs, 0,6mM MgCl₂, 0,9mM de cada iniciador, 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl de DNA extraído. Os iniciadores utilizados foram D1 (5'-CCAGTTTCCCGCCCCG -3') e D2 (5'-GGGGTTGGTGGTGTAAAATAG-3') que amplificam aproximadamente 780-

800pb do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) das espécies de *Leishmania* sp causadoras de LV (SMYTH *et al.*, 1992).

A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 94⁰ C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos nas seguintes temperaturas: 94⁰ C por 1 minuto, 60⁰C por 1 minuto e 72⁰C por 1 minuto e 30 segundos.

5.3.6. Amplificação do gene SSU-rRNA

A reação de PCR foi realizada para um volume total de 15µl, contendo Tampão de *Taq* (10 mM Tris-HCl, 50mM KCL), 0,4mM de dNTPs, 0,6mM MgCl₂, 0,9mM de cada iniciador, 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl de DNA extraído. Os iniciadores utilizados foram R221 (5'-GGTTCCTTTCCTTGATTTAGC - 3') e R332 (5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG -3') que amplificam aproximadamente 600pb da subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA) das espécies de *Trypanosomatidae* sp (VAN EYES *et al.*, 1992).

A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 94⁰ C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos nas seguintes temperaturas: 94⁰ C por 1 minuto, 54⁰C por 1 minuto e 72⁰C por 45 segundos.

5.3.7. Amplificação do gene 28S Ribossomal

A reação de PCR foi realizada para um volume total de 15µl, contendo Tampão de *Taq* (10 mM Tris-HCl, 50mM KCL), 0,4mM de dNTPs, 0,6mM MgCl₂, 0,9mM de cada iniciador, 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1 µl de DNA extraído. Os iniciadores utilizados foram Lu1 (5'-TGAGCTTGACTCTAGTTTGGCAC3') e Lu2 (5'-AGATGTACCGCCCCAGTCAAA - 3') que amplificam aproximadamente 370pb da subunidade 28S ribossomal de *Lu. longipalpis* (CABRERA *et al.*, 2002).

A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 95⁰ C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 95⁰ C por 30 segundos, 65⁰C por 45 segundos e 72⁰C por 30 segundos.

5.4. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE

Para estimar a sensibilidade da PCR para diferentes alvos moleculares, diluições seriadas do DNA genômico de *Leishmania (L.) infantum chagasi* contendo 100pg a 1fg foram testados para as mesmas condições de amplificação das amostras de flebotomíneos.

5.5. ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR

Os produtos de PCR foram fracionados em eletroforese horizontal em uma matriz de gel de agarose a 1% em solução de TBE, utilizando-se 2µl de solução indicadora azul de bromo-fenol e 5µl de cada amostra. A eletroforese foi executada a 100V e 50mA por 1 hora.

O DNA foi corado com brometo de etídio 0,5µg/mL e visualizado em transluminador UV para a análise das bandas obtidas. Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de flebotomíneo infectado experimentalmente com uma cepa de *L. (L.) chagasi* (M15677); e água para o controle negativo.

5.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.6.1. Cálculo da taxa de infecção natural

As taxas de infecção natural foram calculadas a partir da relação entre o número de flebotomíneos positivos para cada marcador molecular (mini-exon, kDNA e SSU-rRNA) e o número total analisado (n=280).

5.6.2. Desempenho entre os marcadores

A sensibilidade da PCR foi avaliada a partir de ensaios com DNA de *L. (L.) infantum chagasi* (MCER/BR/1996/M15677), que variou sua concentração de 10ng a 1fg. A especificidade foi avaliada com o uso de cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* para verificar a possibilidade de fragmentos inespecíficos.

6. RESULTADOS

Neste estudo foram analisadas 280 fêmeas de flebotomíneos *Lu. longipalpis*, capturados no período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1 FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM CAFEZAL

| Período de captura | Nº. de amostras testadas | % |
|--------------------|--------------------------|------|
| Novembro/2003 | 34 | 12,1 |
| Janeiro/2004 | 206 | 73,6 |
| Fevereiro/2004 | 40 | 14,3 |
| Total | 280 | 100 |

FONTE: Autora (2011)

A eficiência da extração de DNA foi confirmada pela presença do fragmento de 370pb em todas as amostras de DNA de *Lu. longipalpis* (FIGURA 14), demonstrando que a preservação do material foi adequada, em tubo seco à 4°C, com extração do inseto inteiro, sem dissecação do tubo digestivo.

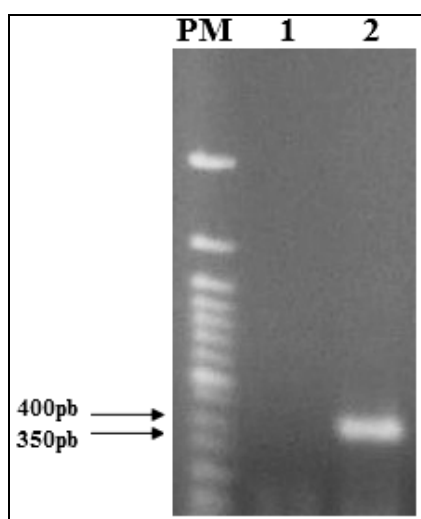


FIGURA 14: PRODUTOS DE PCR (370pb) DO GENE 28S rRNA.

NOTA: PM- Marcador de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience); 1- Controle Negativo; 2- Amostra de DNA extraído de *Lu. longipalpis* coletado em Barcarena.

FONTE: Autora (2011)

Foi realizado um teste de amplificação inicial do gene mini-exon (FIGURA 15) para avaliar a sensibilidade e especificidade do marcador.

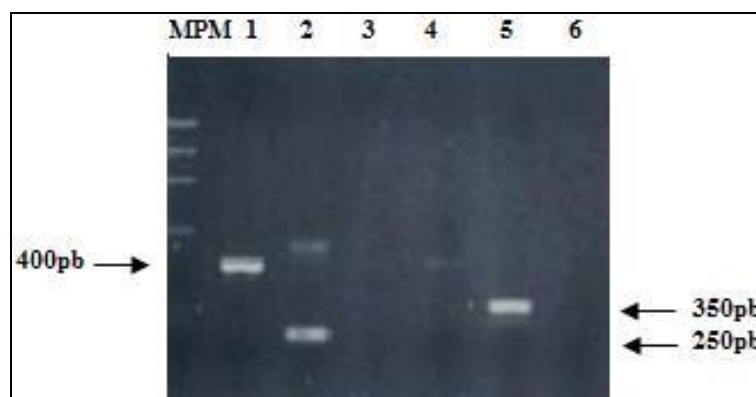


FIGURA 15: PRODUTO DE PCR DO GENE MINI-EXON PARA *Leishmania* sp.

NOTA: MPM- Marcador de Peso Molecular (ϕ X174/HAEIII); 1- Cepa de *L. (L.) i. chagasi* (M15677); 2- Cepa de *Leishmania (V.) braziliensis*; 3 e 4- Teste com flebotomíneos coletados em Barcarena; 5- Cepa de *Leishmania (L.) amazonensis*; e 6- Controle Negativo.

FONTE: Autora (2011)

Para esse gene, com os iniciadores S1629 e S1630, que amplifica um fragmento de 400pb (FIGURA 16), foi possível observar uma taxa de 7,1% (20 em 280) flebotomíneos infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, analisados individualmente. A otimização da técnica permitiu a obtenção de fragmentos únicos, com variação no sinal de amplificação.

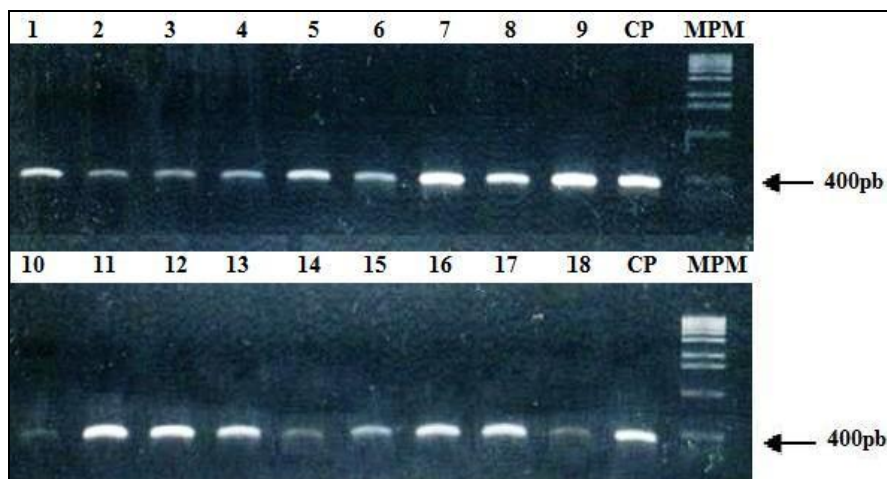


FIGURA 16- PRODUTO DE PCR DO GENE MINI-EXON PARA *L.(L.) i. chagasi*.

NOTA: CP- 1 a 18- Flebotomíneos infectados com *L. (L.) i. chagasi*; CP- Controle positivo utilizando cepa de *L. (L.) i. chagasi* (M15677); MPM- Marcador de Peso Molecular (ØX174/HAEIII).

FONTE: Autora (2011)

Para amplificação dos genes kDNA (FIGURA 17) e SSU-rRNA também foram realizados testes de especificidade, com o uso de cepas padrão de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (L.) i. chagasi*.

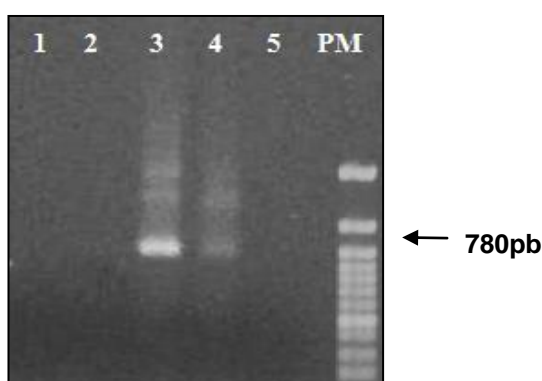


FIGURA 17- TESTE DE ESPECIFICIDADE PARA O GENE kDNA.

NOTA: Gel de agarose 1%. 1- Cepa de *Leishmania (V.) braziliensis*; 2- Cepa de *Leishmania (L.) amazonensis*; 3 e 4- Cepa de *L. (L.) i. chagasi*; 5- Controle negativo. PM- Marcador de Peso Molecular.

FONTE: Autora (2011)

A amplificação dos fragmentos de 780-800 pb para o gene kDNA; e 600pb para o gene SSU, pode ser observada na FIGURA 18, mostrando diferença no

padrão de amplificação a partir da diminuição da quantidade de DNA molde, o que permitiu aumentar a especificidade para kDNA.

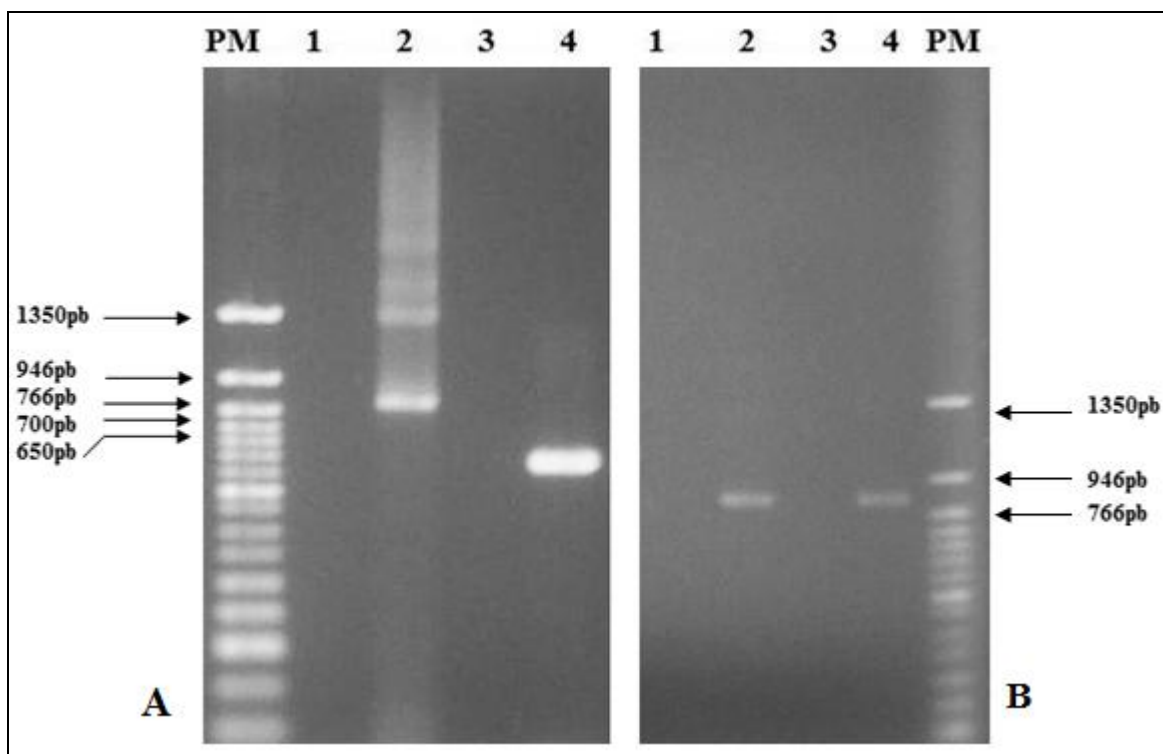


FIGURA 18: PRODUTOS DE PCR DOS GENE kDNA e SSU-rRNA.

NOTA: PM- Marcador de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience). GEL A: 1- Controle negativo para kDNA; 2- Cepa de *L. (L.) i. chagasi* (M15677) a 3,7 ng/μl para kDNA; 3- Controle negativo para SSU-rRNA; 4- Cepa de *L. (L.) i. chagasi* (M15677) a 3,7 ng/μl para SSU-rRNA. GEL B- 1 e 3: Controles negativos; 2 – Cepa de *L. (L.) i. chagasi* (M15677) a 3,7 ng/μl para kDNA; Cepa de *L. (L.) i. chagasi* (M15677) a 2,2 ng/μl para kDNA.

FONTE: Autora (2011)

Para assegurar a inexistência de amostras falso-negativas foram realizados testes de inibição para avaliar a confiabilidade das reações de PCR, que consistiu em analisar 30 amostras negativas, com repetição da reação nas mesmas condições, porém com diluições seriadas até 1fg, e todas confirmaram a ausência de DNA de leishmania. Também foram realizados ensaios de PCR para a cepa padrão de *L. (L.) i. chagasi*, com diluições seriadas que variaram a concentração de DNA de 10ng a 1fg (Figura 19).

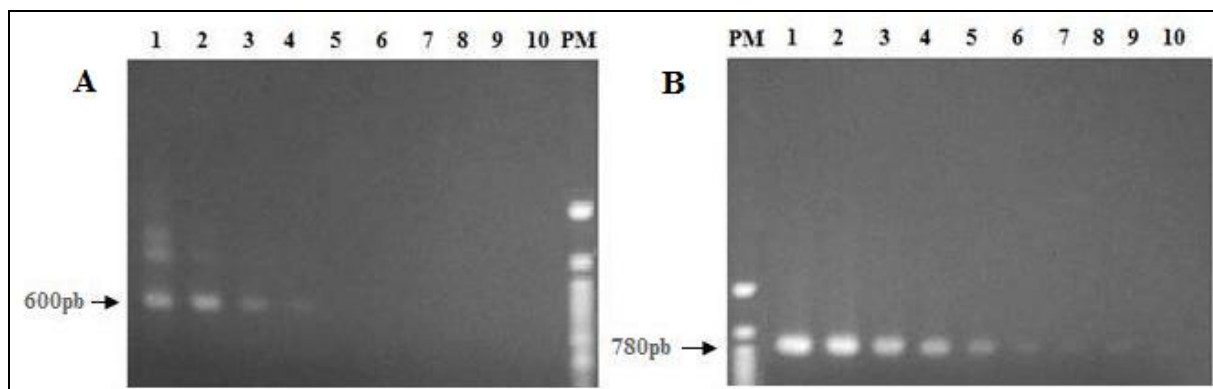


FIGURA 19: TESTE DE SENSIBILIDADE PARA OS GENES kDNA E SSU-rRNA.

NOTA: Gel de agarose (1%) com produtos de PCR, a partir das concentrações de DNA DE *L. (L.) i. chagasi* (M15677): 1- 52,6 ng/μl; 2- 10 ng/μl; 3- 1 ng/μl; 4-100 pg/μl; 5- 10 pg/μl; 6- 1 pg/μl; 7- 100fg/μl; 8- 10 fg/μl; 9- 1fg/μl; 10- Controle negativo. PM: Padrão de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience).

A: Amplificação do gene kDNA (809pb); B: Amplificação do gene SSU-rRNA (603pb).

FONTE: Autora (2011)

Para avaliação das 280 amostras com o marcador kDNA e SSU-RNA, as amostras negativas, n=260, para amplificação com o mini-exon foram analisadas em *pools* contendo DNA extraído de 10 flebotomíneos *Lu. longipalpis* (1μl de cada), totalizando 26 pools.

PCR com os iniciadores para o gene kDNA, contemplou a análise de 26 pools negativos para o gene mini-exon, com sinais de amplificação em 3 amostras (linhas 10, 11 e 13 do gel) da Figura 20; e uma (linha 6) da Figura 21, posteriormente amplificadas separadamente. As amostras positivas para o gene mini-exon foram amplificadas individualmente, conforme a Figura 22 (linhas 7 a 26), confirmando as 20 amostras positivas para os 2 marcadores.

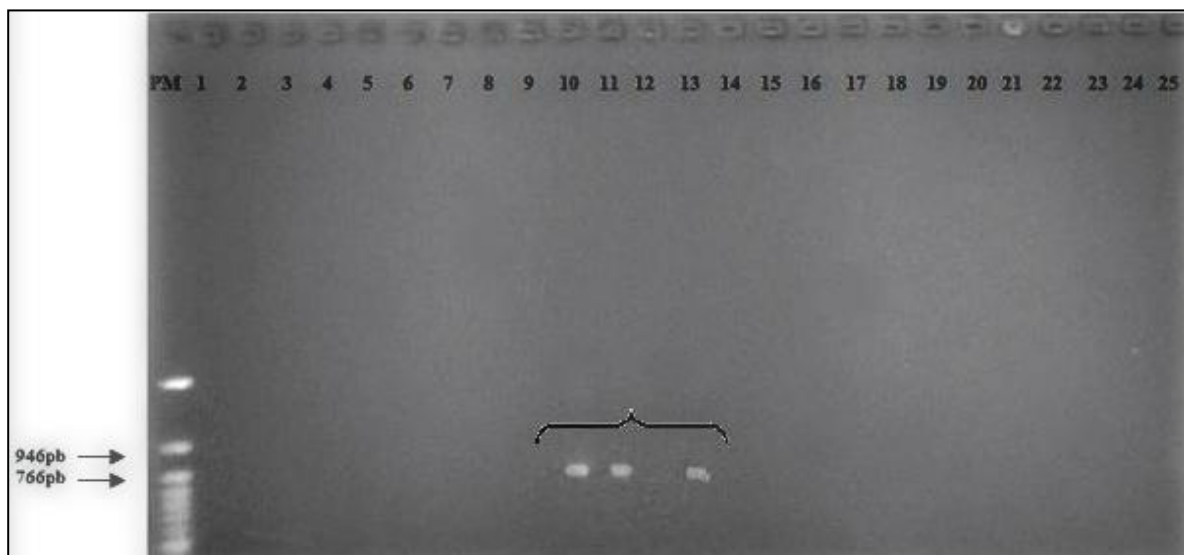


FIGURA 20: PRODUTOS DE PCR PARA O GENE kDNA, UTILIZANDO DNA DE FLEBOTOMÍNEOS NEGATIVOS PARA MINI-EXON.

NOTA: Gel de agarose (1%). 1- Controle negativo; 2 a 21: Pools de DNA de flebotomíneos negativos para infecção por *L. (L.) i. chagasi*, utilizando o gene mini-exon. PM: Padrão de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience).

FONTE: Autora (2011)

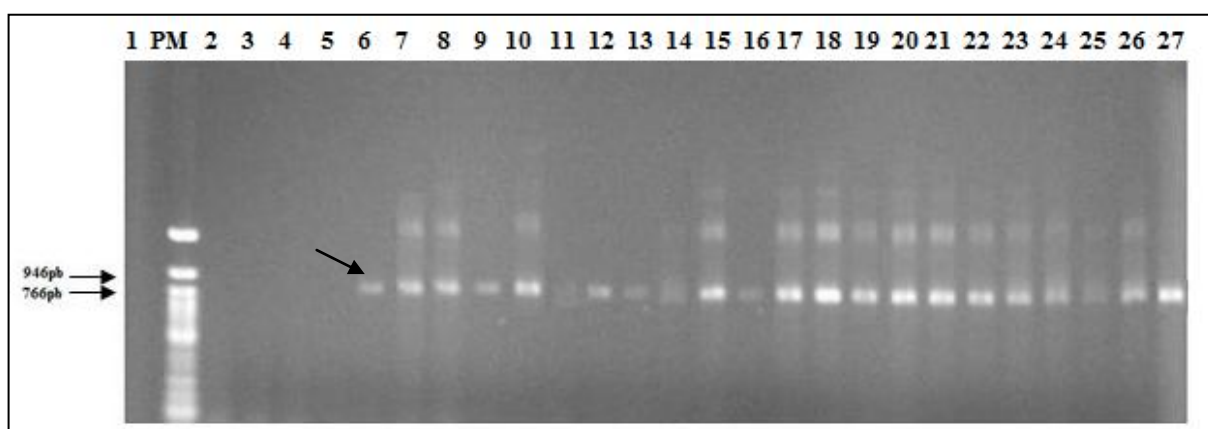


FIGURA 21: PRODUTOS DE PCR PARA O GENE kDNA.

NOTA: Gel de agarose (1%). 1- Controle negativo; 2 a 6- Pools de DNA de flebotomíneos negativos para infecção por *L. (L.) i. chagasi*, utilizando o gene mini-exon; 7 a 26: DNA individual de flebotomíneos positivos para infecção por *L. (L.) i. chagasi*, utilizando o gene mini-exon; 27: Controle positivo de *L. (L.) i. Chagasi* (M15677). PM: Padrão de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience)

FONTE: Autora (2011)

As amostras positivas para os pools de flebotomíneos foram novamente amplificadas para confirmação, levando em consideração que pelo menos um flebotomíneo estaria infectado pelo parasita, porém de forma separada para que a

taxa de infecção real fosse estimada, como mostra a Figura 22. Foi possível observar sinais de amplificação nas linhas 9 e 13 (Figura 22 A); e nas linhas 10 e 17 (Figura 22 B), o que levou a uma taxa de infecção de 8,6% (24/280).

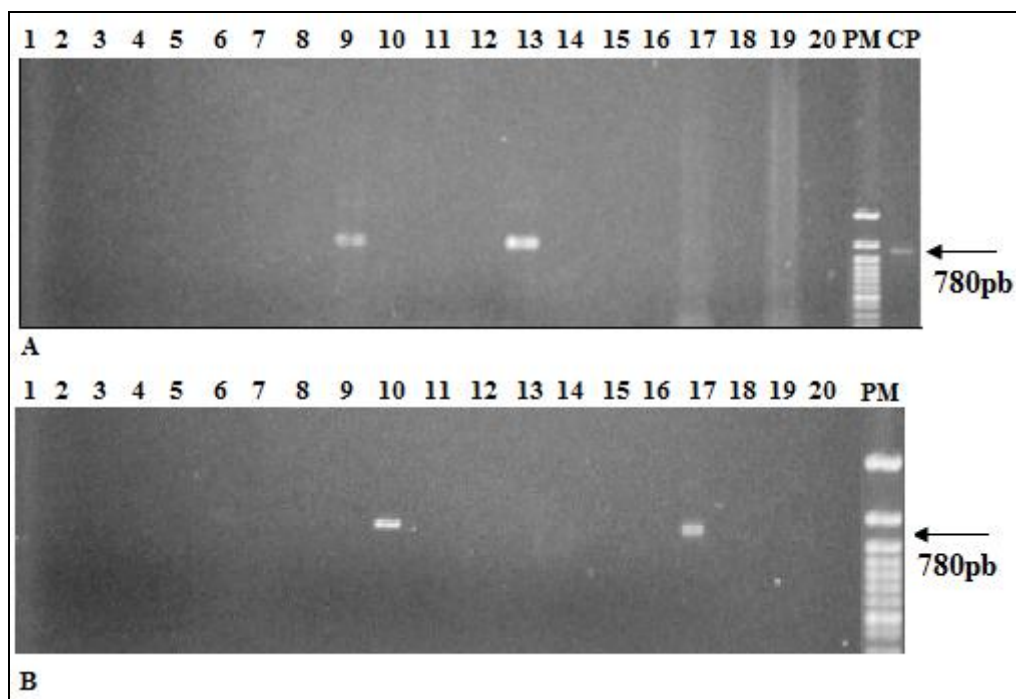


FIGURA 22: PRODUTOS DE PCR PARA O GENE kDNA UTILIZANDO DNA INDIVIDUAL DE FLEBOTOMÍNEOS.

NOTA: Gel de agarose (1%). 1-20: PCR a partir do DNA individual de flebotomíneos. CP: Controle positivo de *L. (L.) i. Chagasi* (M15677). PM: Padrão de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience).

FONTE: Autora (2011)

Os pools de DNA negativos para infecção em mini-exon testados com o gene SSU-rRNA (Figura 23), também se apresentaram negativos; e das 20 amostras positivas para mini-exon e kDNA, 15 foram positivas para a presença de *Leishmania* sp com o gene SSU-rRNA (Figura 24), gerando uma taxa de infecção em 5,3%.

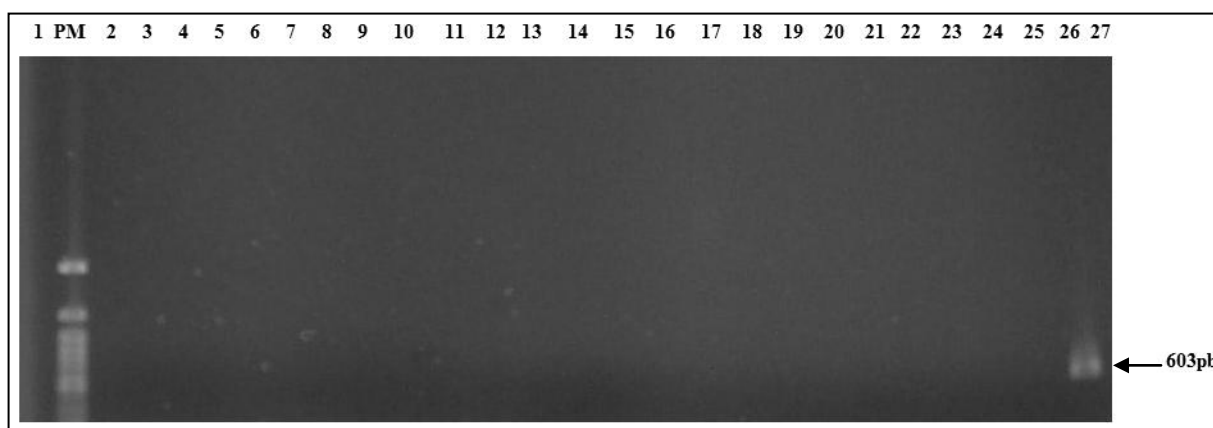


FIGURA 23: PRODUTOS DE PCR PARA O GENE SSU-rRNA, UTILIZANDO POOLS DE DNA DE FLEBOTOMÍNEOS.

NOTA: Gel de Agarose (1%). 1 a 26: DNA individual de flebotomíneos; 27- Controle positivo de *L. (L.) i. chagasi* (M15677); PM: Padrão de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience).

FONTE: Autora (2011)

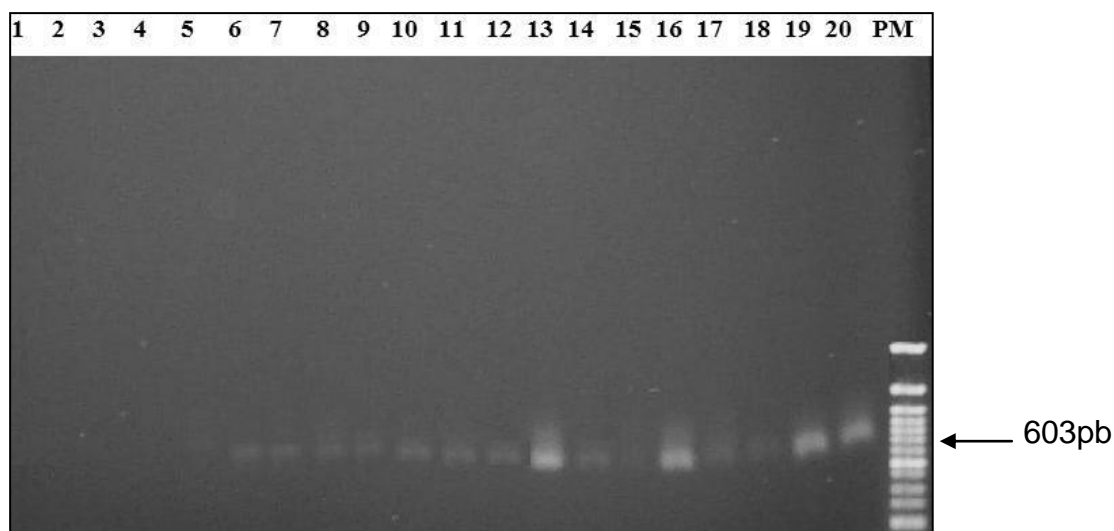


FIGURA 24: PRODUTOS DE PCR PARA O GENE SSU-rRNA, UTILIZANDO DNA INDIVIDUAL DE FLEBOTOMÍNEOS POSITIVOS PARA OS GENES kDNA E MINI-EXON.

NOTA: Gel de agarose (1%). 1 A 15- DNA individual de flebotomíneos positivos para infecção por *L. (L.) i. chagasi*, utilizando o gene mini-exon e kDNA. PM: Padrão de Peso Molecular (50pb DNA Ladder - Uniscience).

FONTE: Autora (2011)

A partir do resultado dos 3 marcadores para as 280 amostras de DNA de flebotomíneos, observou-se a presença de testes falso-negativos, onde o máximo de

amostras positivas foi 24, para o gene *kDNA*; e o mínimo de 15, para o gene *SSU-rRNA*; sendo que 15 das amostras foram positivas para os três genes concomitantemente, conforme a Tabela 2

TABELA 2 RESULTADO DA TAXA DE INFECÇÃO NATURAL PARA OS GENES MINI-EXON, *kDNA* e *SSU-rRNA*

| <i>Gene</i> | <i>Positiva</i> | <i>Negativa</i> | <i>% Taxa de Infecção</i> |
|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| <i>Mini-exon</i> | 20 | 260 | 7,1 |
| <i>kDNA</i> | 24 | 256 | 8,6 |
| <i>SSU-rRNA</i> | 15 | 265 | 5,3 |

FONTE: Autora (2011)

7. DISCUSSÃO

Foram obtidos importantes resultados na estimativa das taxas de infecção natural em flebotomíneos, confirmando a utilidade da técnica de PCR para a identificação de *L. (L.) i. chagasi*. Pelo fato de a comunidade estudada apresentar-se endêmica tanto para LV como LTA, foram empregados marcadores moleculares com alta especificidade para a forma visceral da doença, que geraram fragmentos específicos para *Leishmania*, como é o caso dos marcadores kDNA, mini-exon e SSU-rRNA.

Observamos que de um total de 280 amostras de fêmeas *Lutzomyia longipalpis*, capturadas em diferentes períodos, 24 apresentaram resultados positivos para o gene kDNA, amplificando o fragmento de 780 pb, totalizando 8,6% de flebotomíneos infectados com *L. (L.) i. chagasi*. Quando comparadas taxas de infecção utilizando os genes mini-exon (400pb) e SSU-rRNA (603pb), essa variou para 7,1% e 5,3%, respectivamente.

Combinando os resultados para os três marcadores detectamos 15 amostras positivas, para 256 negativas, sendo que 9 apresentaram-se como falso-negativas para SSU-rRNA; e 4 para mini-exon, o que gerou sensibilidade de 63% e 83,3%, respectivamente, sem a presença de fragmentos falso-positivos. Essa diferença possivelmente deve estar relacionada ao número de cópias por células de cada gene associado à baixa quantidade de parasita; além da influência de possíveis inibidores no processo de amplificação.

A eficiência da extração de DNA foi confirmada pela presença do fragmento de 370pb do gene 28S ribossomal de *Lu. longipalpis* em todas as amostras, demonstrando que a preservação do material foi adequada, em tubo seco à 4^oC, com extração do inseto inteiro, mesmo sem dissecação do tubo digestivo. Pois, a grande preocupação foi a composição do exoesqueleto quitinoso dos insetos que muitas vezes pode gerar resultados falso-negativos. No entanto, da mesma forma como observado por Aransay *et al.* (2000), o procedimento de extração de DNA sem fenol/clorofórmio/álcool isoamílico não afetou a atividade enzimática da *Taq* polimerase.

Em 2007, quando Paiva *et al.* realizaram estudos de padronização para a detecção de DNA de *Leishmania* spp em flebotomíneos, observaram que a extração de DNA a partir do tubo digestivo do vetor foi menos eficiente que a aplicação da técnica no inseto inteiro. Os métodos que incluíram etapas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico demonstraram perda de sensibilidade na amplificação, gerando bandas inespecíficas, o que pôde ser solucionado com o uso de tampão de lise adicionando DTT/Triton X100. Apesar de não termos utilizado os mesmos reagentes de Paiva *et al.*, a reação da PCR demonstrou ser, da mesma forma, capaz de detectar o DNA do parasita no flebotomíneo.

Entre os flebotomíneos infectados pode-se observar que houve diferença na concentração de DNA para todos os marcadores. Algumas amostras apresentaram bandas bem fracas, enquanto outras estavam mais concentradas, o que possivelmente pode está relacionado com a quantidade de parasitas no aparelho digestivo dos mosquitos analisados, pois não sabemos com exatidão o tempo em que os flebotomíneos se encontravam após alimentação e fase do ciclo biológico dos parasitas no seu interior.

Dentre as amostras analisadas algumas apresentaram amplificação de fragmentos bem distintos das descritas para *Leishmania* (FERNANDES *et al.*, 1994; DEGRAVE *et al.*, 1994). No entanto, Neves *et al.* (1991) afirmam que fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota indistinguível das leishmanias o que pode dificultar a identificação correta do protozoário por visualização direta. Este fato constitui uma evidência para a necessidade do desenvolvimento de outros marcadores para identificar de forma mais precisa parasitas que infectam naturalmente os insetos.

Para o presente estudo, o limiar de detecção da técnica pôde ser observado em ensaios com DNA de *L. (L.) infantum chagasi* (MCER/BR/1996/M15677) que variou sua concentração de 10ng a 1fg. A demonstração da reação positiva foi de até 100pg para os genes SSU-rNA e mini-exon e de até 1 fg para o gene kDNA, sendo este último considerado mais sensível. No entanto, quando o material biológico não é originário de cultivo, a sensibilidade pode variar de acordo com os iniciadores, as condições de amplificação e tipo de amostra, demonstrando reação

positiva até 100pg para o gene SSU-rRNA e mini-exon; e até 1fg para o gene kDNA, sendo o último mais sensível.

Realizamos testes de amplificação inicial para avaliar a sensibilidade e especificidade dos marcadores. O gene mini-exon diferenciou espécies de *Leishmania* do Novo Mundo: espécies *Viannia* (250pb); espécies dermatrópicas de *Leishmania* (350pb) e *Leishmania chagasi* (400pb), de acordo como foi descrito por Fernandes *et al.* (1994) e Degraive *et al* (1994). Já o gene kDNA amplificou um fragmento de 780 pb para cepas de *Leishmania chagasi*; enquanto o gene SSU-rRNA amplificou um fragmento de aproximadamente 600pb. A análise combinada dos marcadores permitiu a identificação correta de 9 flebotomíneos verdadeiro-positivos, sem amostras falso-positivas.

O mini-exon está presente nas células de *Leishmania* em número de cópias de 100 a 200 tandem e o gene SSU-rRNA de 20 a 40 repetições. Já o DNA do cinetoplasto representa 20-25% do DNA do parasita, com a vantagem do grande número de cópias do minicírculo por célula (10.000 a 20.000). Por esta razão tem sido o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para diagnóstico de LV. Desta forma, assumimos o resultado gerado com a utilização do gene kDNA, com uma taxa de infecção de 8,6%.

A taxa de infecção calculada no presente trabalho foi realizada a partir da análise individual dos vetores, o que não subestima os dados obtidos. Alguns autores calculam a taxa de infecção mínima ($TIM = \frac{n^0 \text{ de pools positivos}}{n^0 \text{ total de exemplares}} \times 100$) em áreas endêmicas para leishmanioses, que emprega a extração de DNA em pools de vetores, considerando que em uma reação positiva no mínimo um espécime estaria presente. Paiva *et al.* (2006) encontraram uma TIM de 3,9% de infecção natural por *L. (L.) chagasi* no município de Antônio João, no Mato Grosso do Sul, com o gene mini-exon. Em estudo similar no mesmo estado, Silva *et al.*, (2008) encontraram uma taxa de infecção de 1,9% para LV em Campo Grande.

A taxa de infecção encontrada neste estudo, assumindo o valor de 8,6%, foi maior que outros trabalhos realizados no Brasil, que encontraram positividade em torno de 1% (MIRANDA *et al.*,2002). Nascimento *et al.* (2007) encontraram TIM de 2,6% de flebotomíneos infectados com *L. (L.) i. chagasi* em área endêmica para LV no estado do Mato Grosso do Sul, utilizando os marcadores mini-exon e SSU-rRNA.

Empregando o gene kDNA como marcador, Missawa *et al.* (2010) encontraram TIM de 0,71%, admitindo no mínimo 3 vetores infectados em um total de 420, a partir da amplificação de um fragmento de 120 pb; enquanto que Soares *et al.* (2010) observaram taxa de 1,25% para a área de colonização antiga e 0,25% para a área de colonização recente, na Ilha de São Luís (Maranhão), com produtos de amplificação de 145pb.

Rodriguez *et al.* (1999) têm observado excelentes resultados utilizando a técnica da PCR associada com hibridação para identificar flebotomíneos naturalmente infectados. Em estudo de campo realizado na Venezuela, os autores detectaram infecção por flagelados em 2,2% dos flebotomíneos pertencentes às espécies que na classificação de Galati (2003) são denominadas de *Micropygomyia cayennensis*, *Micropygomyia trinidadensis*, *Psychodopygus panamensis* e *Lu. gomezi*. Entretanto, somente as espécies *Ps. panamensis* e *Lu. gomezi* apresentaram na PCR a taxa de 7,7% de infecção para *L. (V.) braziliensis*, sendo possível confirmar o papel destas duas espécies na transmissão do parasita nessa região da Venezuela.

Estudos realizados em localidades com casos de LV na Grécia permitiram detectar por PCR, menos de três parasitas por inseto e identificar 5,4% de infecção por leishmanias em um total de 645 flebotomíneos de diversas espécies capturadas nessas regiões (ARANSAY *et al.*, 2000). De acordo com Fu *et al.* (1998) a sensibilidade e especificidade da PCR para estudos de entomologia molecular está associada à detecção de 0,6 parasita por reação.

Porém, segundo Missawa *et al.* (2010), os índices de infecção natural por *Leishmania* são baixos, mesmo em áreas endêmicas, com média de 3%, o que muitas vezes contrasta com a incidência da doença nessas áreas, sendo raros os casos que chegam a 10%, utilizando métodos de dissecação ou baseados em PCR. Cimerman *et al.* (2003), também corroboram a hipótese de baixas taxas de infecção em áreas endêmicas, e que a transmissão depende da elevada densidade de *Lu. longipalpis*, como se observa durante surtos da doença.

Ready *et al.* (2008) afirmam que os baixos níveis de infecção natural podem ser explicados pelo mecanismo de eficiência da transmissão, pois o parasita manipula de modo adaptativo o comportamento alimentar dos vetores, especialmente *Lu. longipalpis*, estimulando os insetos picarem e se alimentarem em

múltiplos hospedeiros. Isto, no entanto, só ocorre se as leishmanias tiverem produzido formas infectantes e um gel adesivo filamentosso de proteoglicanos na porção anterior do tubo digestivo dos flebótomos.

A escolha de técnicas com diferentes desempenhos de sensibilidade também pode influenciar nos baixos índices de infecção natural. Paiva *et al.* (2006), ao avaliar em 81 espécimes de flebotomíneos, encontraram diferentes taxas de infecção empregando PCR e dissecação, observando um índice de 1,24 com o método de dissecação; e 3,9% através de PCR com o uso do marcador mini-exon. Esses achados corroboram achados de Miranda *et al.* (2002) e Rodriguez *et al.* (1999), que descreveram taxas de infecção bem maiores com o uso de técnicas moleculares, quando comparadas a dissecação de vetores.

Por outro lado, um estudo semelhante ao nosso, que objetivou a detecção de infecção de *Lu. longipalpis* por *L. (L.) i. chagasi*, atingiu índice de 19% (4/21) em Belo Horizonte (SARAIVA *et al.*, 2010), empregando PCR para o gene kDNA na. A alta taxa observada pôde ser associada a três fatores: 1) a maioria das amostras foram coletadas do peri-domicílio quando diversos casos de LV ocorreram um ano antes das coletas para o estudo; b) as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do vetor, assim como a alta prevalência de infecção canina, que representa a fonte de infecção mais importante para o flebotomíneo; e c) especificidade e sensibilidade dos métodos moleculares quando comparados à técnicas tradicionais de visualização do parasita.

Apesar de não haver na literatura dados recentes referentes à infecção por *L. (L.) i. chagasi* no estado do Pará, os níveis de infecção natural relatados estão em torno de 3% (MISSAWA *et al.*, 2010). Portanto, podemos considerar que o índice encontrado, no presente estudo, em Barcarena é alto, o que pode ser explicado pela alta sensibilidade da técnica empregada. Além disso, algumas amostras infectadas foram coletadas no mesmo local, possibilitando que as mesmas tenham se alimentado de uma mesma fonte infectante. Aransay *et al.* (2000) utilizando o gene kDNA em insetos dissecados, para avaliação de competência vetorial, encontraram uma taxa de 6,3% em área endêmica para LV na Grécia. Essa taxa foi considerada alta e foi atribuída também à alta sensibilidade da técnica, pois 5,4% das espécies examinadas não apresentavam sangue no trato intestinal.

Os ambientes peri e intra-domiciliares podem estar diretamente relacionados ao número de vetores infectados, onde os níveis de ação antrópica determinam a disponibilidade de alimento e fonte de infecção para as fêmeas. Além disso, a densidade populacional da espécie gera maior oportunidade de infecção. Tal observação também foi constatada por Pinheiro *et al.* (2008), no estado do Amazonas, verificando maior índice de *Lu. umbratilis* com infecção natural por tripanosomatídeos de 1,66% (12/720), na unidade Marechal Rondon; quando comparada ao assentamento Tarumã-Mirim, 0,42% (3/720), que apresentou menor influência antrópica.

A taxa de infecção natural encontrada no presente estudo é considerada preocupante especialmente porque estes insetos foram capturados fora do ambiente silvestre. Das 24 amostras positivas, 15 (62,5%) foram de flebotomíneos coletados no intradomicílio e 9 (37,5%) no peridomicílio, o que demonstra alto risco de infecção. Segundo Elnaiem *et al.* (1992) uma fêmea de flebotomíneo, observada em condições laboratoriais, é capaz de realizar múltipla realimentação sanguínea para manter os nutrientes balanceados durante a maturação dos ovos.

Quando Crescente *et al.* (2008) realizaram um estudo epidemiológico avaliando 946 indivíduos para caracterização clínica e epidemiológica da LV na localidade de Cafezal, no período de setembro a dezembro de 2003, observaram que a taxa de prevalência de infecção obtida por RIM de 11,26% (106/946) foi significativamente maior que os 3,4% (32/946) obtidos através de IFI, demonstrando a necessidade do uso das duas técnicas para uma estimativa combinada, o que permitiu a identificação da taxa real de prevalência de 12,6% (120/946), com o uso de ambos os testes.

A estimativa acima é particularmente importante para o nosso estudo por se tratar da mesma localidade e mesmo período analisados. Os achados indicam que as máximas taxas de infecção natural (8,6%) e de prevalência (12,6%) encontradas estão diretamente ligadas, em área endêmica; e que para determinadas doenças como a LV são necessários mais de um teste para definição de parâmetros epidemiológicos. Considerando a taxa observada no presente estudo de 8,6% e caso não haja um programa de monitoramento e controle eficiente para LV, provavelmente esta prevalência poderá aumentar cada vez mais nessa área.

O monitoramento da doença é importantíssimo, visto que o município de Barcarena com a maioria da população (63,65%) residindo em áreas rurais, oferece condições eco-epidemiológicas ideais para a manutenção da doença. Ainda, o crescimento desordenado também desempenha papel importante na transmissão do parasita, devido a falta de condições básicas de infra-estrutura próximo a áreas de desmatamento.

Segundo Miranda *et al.* (2002), pequenos setores dentro de uma área mais ampla considerada endêmica para leishmanioses pode ter uma frequência muito alta de flebotomíneos infectados. Sua associação com a doença humana é indicativo de uma distribuição irregular da doença e deve ser considerada uma estratégia de planejamento de controle.

No período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004, 18.271 exemplares de *Lu. Longipalpis* foram dissecados e examinados pela equipe de entomologia do Instituto Evandro Chagas, na localidade de Cafezal. Destes, dois encontraram-se infectados por *Leishmania*, porém o isolamento e identificação da espécie não foi possível devido contaminação das culturas (Adelson Sousa, comunicação pessoal). Confirmando as observações feitas por Rodriguez *et al.* (1999), de maior sensibilidade para detecção do parasita com o uso de marcadores moleculares, o que reforça cada vez mais a importância do uso dessas técnicas para amostras de campo, permitindo melhor entendimento da epidemiologia da leishmaniose em área endêmica.

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de detectar flebotomíneos naturalmente infectados e identificar o parasita por métodos moleculares (RODRIGUEZ, *et al.*, 1999; ARANSAY *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.* 2002). No entanto, detecção de DNA de *Leishmania*, muitas vezes não implica que a espécie de flebotomíneo é um vetor, já que a análise não pode distinguir entre a presença de *Leishmania* amastigota de uma alimentação sanguínea infectada e promastigota. Portanto, a técnica descrita pode ser útil para investigar a presença de *Leishmania* na população, mas não pode ser usada como único instrumento para identificar uma espécie de flebotomíneo como um vetor.

Como nosso estudo teve objetivo de avaliar a sensibilidade da técnica de PCR na detecção de *Leishmania (L.) infantum chagasi* na população de *Lutzomyia longipalpis*, que é o vetor conhecido para esta espécie de parasita na região

amazônica (LAINSON & SHAW, 1987), podemos afirmar que a taxa de infecção observada é realmente significativa dentro do estudo de transmissão da LV. Saraiva et al. (2010) observaram um aumento de 500% no número de resultados positivos utilizando o gene kDNA, quando comparado à microscopia a partir de dissecação intestinal de flebotomíneos, reforçando ainda mais a confiabilidade dos resultados para esse marcador em estudos vetoriais.

Para regiões onde a leishmaniose é endêmica, são necessárias técnicas que apresentem simplicidade, rapidez e conteúdo informativo da análise enquanto retêm a apropriada sensibilidade e especificidade. Harris *et al.* (1998) desenvolveram um sistema de PCR multiplex para identificação dos grupos de *Leishmania* viscerotrópica e dermatotrópica podendo ser utilizadas três marcadores em uma única reação. No entanto, optamos pela análise de três marcadores considerados bons alvos para amostras clínicas, para testar sua aplicação em estudos vetoriais; e confirmamos que o gene kDNA e o mini-exon apresentaram-se como bons marcadores para este tipo de estudo devido sua alta sensibilidade, com a vantagem de utilizar um único par de iniciadores numa PCR tradicional podendo ser detectado tanto *Leishmania* viscerotrópica como dermatotrópica num único teste.

Conforme Aransay *et al.* (2000), o controle de leishmanioses em áreas de endemicidade requer um conhecimento da ecologia e epidemiologia de *Leishmania*. Um dos grandes problemas para os epidemiologistas está na identificação do hospedeiro reservatório e na detecção de vetores. Portanto, a técnica descrita pode ser útil para investigar a presença de *Leishmania* na população, mas não pode ser usada como único instrumento para identificar uma espécie de flebotomíneo como vetor.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados neste estudo concluiu-se que:

- O gene kDNA e o mini-exon apresentaram-se como bons marcadores moleculares para detecção de *Leishmania (L.) infantum chagasi* através da técnica de PCR, com índices de infecção natural de 8,3 e 7,1%, respectivamente, sendo o kDNA considerado o melhor marcador.
- A PCR apresentou-se como uma ferramenta importante para estudos sobre a epidemiologia molecular da LV em área endêmica, demonstrando especificidade de 100% para os três marcadores estudados; e sensibilidade de 83,3% e 63% para os genes mini-exon e SSU-rRNA, respectivamente, quando comparados ao gene kDNA.
- O limiar de detecção de *L. (L.) i. chagasi* em flebotomíneos infectados foi de até 100pg para os genes SSU-rNA e mini-exon; e de até 1 fg para o gene kDNA, demonstrando alta sensibilidade.
- A taxa de infecção natural encontrada representa um sério risco para a população local, visto que os flebotomíneos estão em contato direto com a população, onde foram observados 3,21% (9/280) de *Lu. longipalpis* infectados no intradomicílio.
- Ressalta-se a importância de um programa de monitoramento e controle de LV eficiente na área, com o intuito de melhorar a qualidade de vida da população e prevenção da doença.

9. BIBLIOGRAFIA

AMÓRA, SSA. Vigilância entomológica e controle biológico de *Lutzomyia longipalpis* na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Ceará, 2009.

ANDRADE, LEC. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 39, n. 3, p 175-186, 1993.

ARANSAY, AM.; SCOULICA, E & TSELENTIS, Y. – Detection and identification of Leishmania DN within naturally infected sand flies by PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p 1933 – 1938, 2000.

ATTAR ZJ *et al.* Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropical**, v. 78:, n 1 , p 11-16, 2001

CABRERA, OL; MUNSTERMAN, LE; CÁRDENAS, R; GUTIÉRREZ, R; FERRO, C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. **Biomedica** . v. 22, p. 296–302, 2002.

CIMERMAN, SERGIO; CIMERMAN, BENJAMIM. **Medicina Tropical**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

CRESCENTE, JAB. Estudo seccional sobre o espectro clinico e imunológico da infecção humana por *Leishmania (L.) i. chagasi* na Amazônia brasileira. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews**, v. 2, p 692-693, 2004.

DIETZE, R; CARVALHO, SFG. Medicina Tropical. 1^a ed. Capítulo 5; Editora Atheneu, São Paulo: 2003.

DOS SANTOS, VRC. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral americana no estado do Pará, com ênfase ao município de Igarapé-Miri, no período de 1984 a 2001.[Tese-especialização]. Belém-PA: Universidade Federal do Pará, 2002.

DUJARDIN, JC. Risk Factors in the Spread of Leishmaniasis: Towards Integrated Monitoring? **Trends in Parasitology** , v. 22, 2006.

ELNAIEM, D; MORTON, I; BRASIL, R; WARD, RD. Field and laboratory evidence for multiple bloodfeeding by *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**. v, 6, p 173-174, 1992.

FERNANDES, O; MURTHY, VK; KURAH, U; DEGRAVE, W; CAMPBELL, DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 66, p 261-271, 1994.

FERNANDES, O; BOZZA, M; PASCALE, JM; MIRANDA, AB;LOPES, UG; DEGRAVE, WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (Viannia). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. vol. 91, n.3, 1996.

FU, G; PERONA-WRIGHT, G; BARKER, DC. *Leishmania braziliensis*: characterization of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. **Experimental Parasitology**. v. 90, p 236-243, 1998.

GALATI, EAB. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF, Lainson R, organizador. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 23-51, 2003.

GARCÍA-GARCÍA, JA *et al.* Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p 4455-4458, 2006.

GARDENER, PJ; CHANCE, ML; PETERS, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania* II: Eletrophoretic variation of malate dehydrogenase. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 68, p 317-325, 1974.

GILLESPIE, RD; MBOW, ML; TITUS, RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**. v. 22, p 319-31, 2000.

GONTIJO, B; CARVALHO, MLR. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

HARRIS, E; KROPP, G; BELLI, A; RODRIGUEZ, B; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 7, p 1989-1995, 1998.

HUGGINS, DW; MEDEIAS, LB; FARIAS JÚNIOR, HA. Leishmaniose Visceral-Calazar **Revista Brasileira de Medicina** – Vol. 50 Nº 9, p 1203-1222, 1993.

ISHIKAWA, EAY. Abordagem molecular para a identificação de linhagens de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Pará, 2002.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Sinopse do Censo Demográfico 2010.

LACHAUD, L; DEREURE, J; CHABBERT, E; MAUBOUSSIN, JM; OZIOL, E; DEDET, JP; BASTIEN, P. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p 236-240, 2000.

LAINSON, R; SHAW, JJ; SILVEIRA, FT; BRAGA, RR; RYAN, L; POVOA, MM; ISHIKAWA, EAY. A *Leishmania* e as leishmanioses. In: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. **Fundação Serviço de Saúde Pública**. v. 1, p 83-124, 1986.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 321, p 389–404, 1988.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Service M (ed) Demographic and vector borne disease. **CRC Press, Boca Raton**, p. 85–106, 1989.

LAINSON, R; SHAW, JJ; SILVEIRA, FT; SOUZA, AAA; BRAGA, RR; ISHIKAWA, EAY The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to

the ecoepidemiology of disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p 435-443, 1994.

LAINSON, R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 11, p 29-40, 1997.

LAINSON, R; SHAW, JJ. New World leishmaniasis – the Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FE, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. Hodder Headline Group. p. 241-66, 1998.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 2, p.13-32, 2010.

LAURENTI, MD. Patologia e Patogenia das leishmanioses. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

LERNER, EA; RIBEIRO, JMC; NELSON, RJ; LERNER, MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 266, p 11234-6, 1991.

LERNER, EA; SHOEMAKER, CB. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p 33-7, 1992.

LEEDALE, GF; VICKERMAN, K. Euglenozoa. The Illustrated Guide to the PROTOZOA. 2. ed. Lawrence Kansas: **Society of Protozoologists**, p. 1135-1184, .2000.

LUTZ, A & NEIVA, A. Contribuição para o desenvolvimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 4, p 84-95, 1912.

MARFURT, J; NASEREDDIN, A; NIEDERWIESER, I; JAFFE, CL; HANS-PETER, B; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the Miniexon sequence and subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 7, p 3147-3153, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual e Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília- DF, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília- DF, 2005.

MICHALSKY, EM; FORTES-DIAS, CL; PIMENTA, PEP; SECUNDINO, NEC; DIAS, ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 44, n. 5, p 255-259, 2002.

MIRANDA, JC; REIS, E; SCHRIEFER, A; GONÇALVES, M; REIS, MG; CARVALHO, L; FERNADES, O; BARRAL-NETTO, M; BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and Polymerase Chain Reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p 185-188, 2002.

MISSAWA, NA; MICHALSKY, EM; FORTES-DIAS, CL; DIAS, ES. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* (L.) *chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 26, n. 12, p 2414-2419, 2010.

MUKHOPADHYAY, J; GHOSH, K; RANGEL, EF.; MUNSTERMANN, LE. Genetics variability in biochemical characters of brazilian field populations of the *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 59, n. 6, p 893-901, 1998.

NASCIMENTO, JC; PAIVA, BR; MALAFRONTTE, RS; FERNANDES, WD; GALATI, EAB. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 49, n. 2, p 119-122, 2007.

NEVES, DP. Parasitologia humana. 8a Ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1991.

OLIVEIRA, DMS. Distribuição da fauna flebotomínica (Díptera: Psychodidae) ao longo de um gradiente rural-urbano em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Barcarena-PA, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, 2009.

PAIVA, BR; SECUNDINO, NFC; NASCIMENTO, JC; PIMENTA, PFP; GALATI, EAB; ANDRADE JUNIOR, HF; MALAFRONTTE, RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, p 252–259, 2006.

PAIVA, BR; SECUNDINO, NF; PIMENTA, PFP; GALATI, EAB; ANDRADE, HF; MALAFRONTTE, RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em

cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p 87-94, 2007.

PIMENTA, PFP; SECUNDINO, NFC; BLANCO, EEN. Interação vetor-hospedeiro: Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p 275-289, 2003.

PINHEIRO, FG; LUZ, SL; FRANCO, AMR. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**. v. 38, n. 1, 2008.

READY, PD. *Leishmania* manipulates sandfly feeding to enhance its transmission. **Trends Parasitology**. v. 24, n. 4, p 151-3, 2008.

RODRIGUEZ, N; GUZMAN, B; RODAS, A *et al.* – Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 9, p 2246-2252, 1994.

RODRIGUEZ, N; AGUILAR, CM; BARRIOS, MA; BARKER, DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p 47-49, 1999.

ROGERS, KA; TITUS, RG. Immunomodulatory effects of maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunology**.v. 25, p 127-34, 2003.

SALA DE SITUAÇÃO EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Disponível: <http://189.28.128.178/sage/>. Acesso em março de 2011.

SARAIVA, L; ANDRADE FILHO, JDO, SILVA SO; ANDRADE, ASR; MELO, MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 8, p 1033-1039, 2010.

SECRETARIA EXECUTIVA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ (SESPA). Leishmanioses visceral e tegumentar americana. *Boletim Epidemiológico, Departamento de Controle de Endemias*, Belém, Pará, p 6-8, 2004.

SHAW, JJ; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. *In*: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology. v.1, **Academic Press**: London, p 292-363, 1987.

SILVA, ALFF; WILLIAMS, P; MELO, MN; MAYRINK, W. Susceptibility of laboratory – reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p 453-548, 1990.

SILVA, OS. & GRUNEWALD, J. – Contribution to the sand fly fauna (Díptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil, and *Leishmania* (*Viannia*) infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p 579-582, 1999.

SILVA, EA; ANDREOTTI, R; DIAS, ES; BARROS, JC; BRAZUNA, JCM. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**. v. 119, n. 3, p. 343-348, 2008.

SILVEIRA, FT; SHAW, JJ; BICHARA, CNC; COSTA, JML. Leishmaniose visceral americana. In: LEÃO, RNQ. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: CEJUP/UEPA/ Instituto Evandro Chagas; p 631-44, 1997.

SILVEIRA, FT; ISHIKAWA, EA; SOUZA, AA; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**. v.9, n. 1, p. 43-50, 2002.

SINGH, N; CURRAN, MD; RASTOGIL, AK; MIDDLETON, D; SUNDAR, S. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. **Tropical Medicine and International Health**. v. 4, p 448-453, 1999.

SMYTH, AJ; GHOSH, A; HASSAN, MQ; BASU, D; DE BRUIJN, ADHYA, S; MALLIK, KK; BARKER, DC. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**. v. 105, p 183-192, 1992.

SOUZA, AAA; SILVEIRA, FT; LAINSON, R; BARATA, IR; SILVA, MGS; LIMA, JAN *et al* . Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 1, 2010.

SOARES, MB; TITUS, RG; SHOEMAKER, CB; DAVID, JR; BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **The Journal of Immunology**. v. 160, p 1811-6, 1998.

SOARES, RPP. & TURCO, SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 15, n. 3, p 301-330, 2003.

SOARES, MRA; CARVALHO, CC; SILVA, LA; LIMA, MSCS; BARRAL, AMP; REBÊLO, JMM *et al* . Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** v. 26, n. 12, p. 2409-2413, 2010.

SEPOF-PA. Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará. Estatística Municipal: Barcarena, 2009. Disponível em: <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/georeferenciamento/barcarena.pdf>. Acesso em novembro de 2010.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN)/ Sistema de Informações sobre Mortalidade – (SIM). Ministério da Saúde. Disponível:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383.

Acesso em abril de 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas de Controle - Guia de Bolso. 2ª ed. Revisada e Ampliada. 2000.

WALKER, MR; RAPLEY, R. Guia de rotas na tecnologia do gene. Atheneu editora, São Paulo, 1999.

WARBURG, A; SARAIVA, E; LANZARO, GC; TITUS, RG; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* Sibling Species Differs in Its Composition and Capacity to

Enhance Leishmaniasis. **Philosophical Transactions: Biological Sciences** v. 345, n. 1312, p 223-230, 1994.

World Health Organization. Research to support the elimination of visceral leishmaniasis - 2009 annual report. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/publications/about-tdr/annual-reports/bl10-annual-report/pdf/bl10-annual-report-2009.pdf>> Acesso em: 20/01/2010.

World Health Organization (WHO). The World Health Report 2001, Geneva.

XIAO-SU, H; WEN-TIAN, Y; HONG-GANG, L; HE-PING, Y; JIAN-PING, C; YING, M; BAO-QIAN, J; TAO, Z. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **Journal of Parasitology**. v. 86, p 822-826, 2000.

YOUNG, D; DUNCAN, M. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**. v. 54, p 1-881, 1994.