

Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas

Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas

Luanda de Paula Figueira¹, Michele Zanotti¹, Francimeire Gomes Pinheiro¹ e Antonia Maria Ramos Franco¹

RESUMO

Foram caracterizados/identificados por eletroforese de isoenzimas 23 isolados de *Leishmania* sp de pacientes dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, analisando-se o grau de similaridade entre os organismos. Os resultados indicaram ocorrência de *Leishmania guyanensis* e *Leishmania naiffi* nestes dois ambientes e a heterogeneidade das amostras de *Leishmania naiffi*.

Palavras-chaves: *Leishmania*. Isoenzimas. Caracterização. Amazonas.

ABSTRACT

Twenty-three isolates of *Leishmania* sp from patients in the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus were characterized and identified by means of isoenzyme electrophoresis and the degree of similarity between the organisms was analyzed. The results indicated that *Leishmania guyanensis* and *Leishmania naiffi* were present in these two environments and that the *Leishmania naiffi* samples were heterogenous.

Key-words: *Leishmania*. Isoenzymes. Characterization. Amazonas.

As leishmanioses compreendem uma gama de doenças encontradas ao redor do mundo em regiões tropicais e subtropicais. Suas diferentes formas clínicas constituem um grave problema de saúde pública¹⁵. A variedade de manifestações clínicas está associada a diferentes espécies do gênero *Leishmania* e à resposta imune do hospedeiro¹⁴. A identificação do parasita é essencial em qualquer estudo clínico patológico da doença, uma vez que há variação específica na sua virulência e resposta terapêutica. A caracterização e comparação de cepas de *Leishmania* isoladas de humanos, reservatórios e vetores são úteis no conhecimento ecológico e epidemiológico da infecção e controle da doença¹⁷. Pela dificuldade em se discriminar estes parasitas com critérios extrínsecos, têm-se utilizado diversos marcadores moleculares capazes de identificar e classificar os organismos de acordo com as características comuns⁷. A eletroforese de isoenzimas é um método considerado como padrão-ouro na caracterização de cepas de *Leishmania*³. Este

estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *Leishmania* sp de pacientes moradores dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus no Estado do Amazonas, e analisar o grau de similaridade entre os organismos isolados comparando com perfis de cepas de referência da Organização Mundial de Saúde, indicando assim as prováveis espécies circulantes nestes ambientes.

A Cidade de Rio Preto da Eva, criada na década de 60, servindo como conexão rodoviária entre Manaus e Itacoatiara, está localizada na orla de um rio com o mesmo nome da cidade, próxima ao Km 80 da Rodovia AM-010 (3°07'06" S, 59°W). Apresenta 5.591km² de área territorial. A população é formada por 24.858 pessoas, segundo o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística realizado em 2007. O Município de Manaus, capital do Amazonas, situa-se à margem do Rio Negro. Tem uma área territorial de 11.401km². Em 2007, apresentou uma população estimada em cerca de 1.646.602 habitantes⁹.

1. Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

Apoio financeiro: INPA, FAPEAM

Endereço para correspondência: MSc Luanda de Paula Figueira. Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/CPCS-INPA. Av. André Araújo 2936, Aleixo, 69060-001 Manaus, AM.

Tel: 55 92 3643-3068; Fax: 55 92 3643-3061

e-mail: luandafigueira@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 23/02/2008

Aceito em 27/08/2008

Foram analisadas 23 amostras isoladas de lesões de pacientes provenientes de diferentes localidades dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva, AM, coletadas durante o período de 1997 a 2005 e criopreservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/CPCS/INPA. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com seres humanos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (protocolo nº 027/2005). As amostras foram selecionadas aleatoriamente, sendo os estoques estabilizados *in vitro* e expandidos em meio líquido Schneider completo⁸, contendo 10% de soro fetal bovino inativado e antibióticos. Os isolados foram identificados pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose conforme protocolo previamente descrito³. Foram utilizados oito sistemas enzimáticos: malato desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), isocitrato desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) utilizando substrato com NAD e NADP, enzima málica (ME, E.C.1.1.1.40), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), aconitato hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1). Os resultados obtidos com os marcadores foram analisados numericamente, utilizando-se o programa de computador NTSYS (versão 1.7, Exeter Software). Foi realizada análise fenética utilizando os coeficientes de similaridade de Jaccard, Simple Matching e Dice. O resultado final da análise numérica foi expresso em um dendrograma representando o relacionamento multivariado entre as OTU'S (Unidade Taxonômica Operacional)². Das amostras analisadas, verificou-se que 18 eram de *Leishmania guyanensis* e cinco de *Leishmania naiffi*, sendo 10 casos de *Leishmania guyanensis* e três de *Leishmania naiffi*, no município de Manaus, e oito de *Leishmania guyanensis* e dois de *Leishmania naiffi*, em Rio Preto da Eva, demonstrando a ocorrência destas espécies nestes municípios (Tabela 1). As lesões cutâneas de *Leishmania guyanensis* se apresentaram como úlceras únicas ou múltiplas, com ou sem crostas e as ocasionadas por *Leishmania naiffi* eram úlceras únicas de pequeno tamanho, papulosas ou pruriginosas, que evoluíam para lesão ulcerada.

Tabela 1- Origem e identificação das leishmanias isoladas de pacientes dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, AM.

Espécies ^a	Designação ^b / Origem geográfica	
	BR, AM, Manaus	BR, AM, Rio Preto da Eva
<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/97/IM4365	MHOM/BR/03/IM5079
	MHOM/BR/99/IM4595	MHOM/BR/04/IM5219
	MHOM/BR/99/IM4641	MHOM/BR/04/IM5221
	MHOM/BR/00/IM4771	MHOM/BR/04/IM5224
	MHOM/BR/99/IM4961	MHOM/BR/04/IM5227
	MHOM/BR/03/IM5013	MHOM/BR/04/IM5237
	MHOM/BR/03/IM5023	MHOM/BR/04/IM5238
	MHOM/BR/03/IM5042	MHOM/BR/05/IM5253
	MHOM/BR/04/IM5225	
	MHOM/BR/05/IM5281	
<i>Leishmania naiffi</i>	MHOM/BR/03/IM5012	MHOM/BR/04/IM5232
	MHOM/BR/03/IM5025	MHOM/BR/05/IM5245
	MHOM/BR/03/IM5039	

a: identificação do estoque foi estabelecida através da análise de isoenzimas de acordo com o padrão isoenzimático e análise numérica^{2,3}. b: designação: hospedeiros [M = Mammalia; HOM: *Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código de origem. BR: Brasil, AM: Amazonas].

A identificação das espécies foi obtida através da comparação dos perfis isoenzimáticos das amostras com as cepas de referência. As amostras analisadas por taxonomia numérica foram agrupadas em cinco zimodemas denominados INPA3, INPA4, INPA5, INPA6 e IOC-23. Este último foi nomeado de acordo com a classificação de Cupolillo³ por apresentar 18 isolados caracterizados como *Leishmania guyanensis* com perfil idêntico ao do IOC-23. As enzimas G6PDH e ME são consideradas como diagnósticas para *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*. Como estas foram utilizadas neste estudo, descarta-se a possibilidade de algum destes isolados ser identificado como *Leishmania panamensis*. Para cada enzima, as bandas com mobilidade eletroforética idêntica foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. Os oito *loci* estudados mostraram-se polimórficos para o subgênero *Viannia*. O número médio de alelos por *locus* foi de 4,8 (variação de 2 a 8) indicando a variabilidade genética do subgênero e o polimorfismo enzimático de *Leishmania naiffi*. Dentre os eletromorfos encontrados, alguns são considerados diagnósticos, ou seja, caracterizam determinados grupos ou zimodemas. Neste caso, a enzima G6PDH é um alelo diagnóstico que possibilita discriminar *Leishmania naiffi*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis* de outras espécies de *leishmania*³. O zimodema INPA-5 reuniu dois isolados de *Leishmania naiffi* de pacientes de Manaus (IM5012 e IM5025). Outros três zimodemas (INPA-3/IM5245, INPA-4/IM5039 e INPA-6/IM5232), desta mesma espécie, podem ser observados no fenograma (Figura 1) representados por isolados únicos. Em

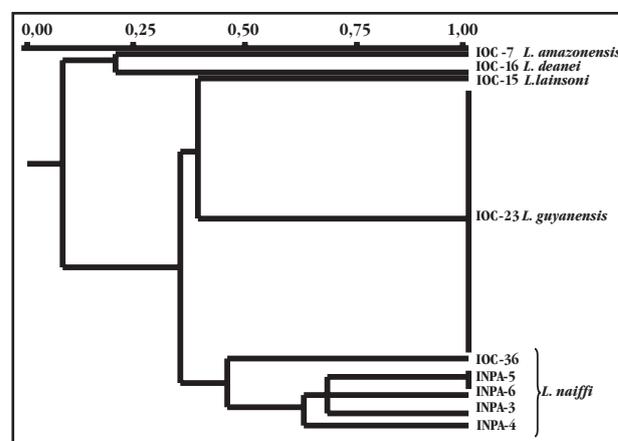


Figura 1 - Fenograma a partir do coeficiente de Jaccard, mostrando o grau de similaridade entre os diferentes zimodemas.

Rio Preto da Eva têm sido notificados diversos casos de leishmaniose, onde cerca de 80% são oriundos de diversos assentamentos ao longo da rodovia AM-010¹². Em 1998, Naiff descreveu a ocorrência de um caso humano diagnosticado como *Leishmania naiffi* no Km 93 da rodovia AM-010 de Rio Preto da Eva. Também foram notificados dois casos de infecção por *Leishmania naiffi* em humanos no município de Manaus. Quanto ao aspecto biológico, Naiff¹¹ e Lainson & Shaw¹⁰, referem-se às raras lesões cutâneas produzidas na pele de hamster por *Leishmania naiffi*, fato também observado neste estudo, apesar do parasita poder ser reisolado em cultura até um ano após

inoculação. Isto dificulta o diagnóstico da leishmaniose quando apenas o isolamento em hamster é realizado. É provável que *Leishmania naiffi* possa também produzir uma infecção benigna e oculta na pele humana e que a transmissão no Amazonas seja mais freqüente do que se tem observado.

Segundo a Fundação de Vigilância em Saúde⁵, Manaus é considerada como o município com maior número de casos da LTA. Naiff¹², examinando um total de 108 pacientes oriundos do Estado do Amazonas, verificou que 86 (77,4%) destes apresentavam a doença causada por *Leishmania guyanensis*. Romero e cols¹³, analisando a freqüência de infecção humana por *Leishmania braziliensis* em quatro dos municípios ao norte do Rio Amazonas (Manaus, Itacoatiara, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo), demonstraram infecção por *Leishmania guyanensis* em 97% (69/71) dos casos. A caracterização bioquímica e molecular de espécies dentro do gênero tem revelado alguns dos mecanismos envolvidos na heterogeneidade populacional de *Leishmania*. Os resultados de eletroforese de enzimas confirmam estudos anteriores^{3 6 11} mostrando a aparente homogeneidade bioquímica dos isolados de *Leishmania guyanensis* oriundos de vários focos endêmicos na Amazônia. Um problema observado em Manaus, assim como em outros grandes centros, diz respeito ao local de origem da transmissão da doença. Frequentemente, não se conseguem correlacionar as informações obtidas pelo paciente com os dados das análises laboratoriais/epidemiológicas, devido à incongruência destes. Em sua maioria, a transmissão da doença em moradores da zona urbana ocorre quando estes visitam sítios nas rodovias AM-010 (Manaus-Itacoatiara) e BR-174 (Manaus - Boa Vista) ou casas de parentes e amigos em áreas endêmicas de ambientes florestais; entretanto, nem sempre estes dados são informados. Além dessas duas espécies, casos de *Leishmania amazonensis* também foram descritos em Rio Preto da Eva⁴.

REFERÊNCIAS

1. Castro EA, Luz E, Telles FQ, Pandey A, Biseto A, Dinsiski M, Sbalqueiro I, Soccol VT. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica* 93: 141-149, 2005.
2. Cupolillo E. Perfil enzimático e análise numérica de variantes do gênero *Leishmania* encontrados no novo mundo. Dissertação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, p. 1992.
3. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311, 1994.
4. Figueira LP, Pinheiro FG, Nogueira RW, Nery LCR, Mota KC, Franco AMR. Dinâmica da Leishmaniose Tegumentar no assentamento Iporá-AM, BR: II – Caracterização isoenzimática de isolados humanos humanos de *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 (supl 1): 194, 2008.
5. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, 2ª edição, Brasília, 2007.
6. Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett T. Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals and sand flies in the amazon region of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 645-661, 1991.
7. Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 230-250, 1993.
8. Hendricks LD, Wood DE, Hadjuk ME. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76: 309-316, 1978.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: [http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 13.02.08.
10. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. Disponível em: <http://www.topleyandWilson.com/pdf/Parasitology20chapter.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2005.
11. Naiff MF. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, p. 1998.
12. Pereira MAS. Dinâmica da Leishmaniose Tegumentar Americana na área do Projeto de Assentamento Iporá, Rio Preto da Eva, AM. Manaus. Dissertação Mestrado em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, p. 2003.
13. Romero GAS, Guerra MVE, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 456-465, 2001.
14. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 239-251, 2004.
15. World Health Organization. Strategic Direction for Research. February, p.1-5, 2002.