

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS HUMANOS DE *Leishmania* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) DO MUNICÍPIO DE RIO PRETO DA EVA, AMAZONAS, BRASIL.

Alana Cristina Vinhote da SILVA¹; Luanda de Paula FIGUEIRA²; Franciemeire Gomes PINHEIRO²; Antonia Maria Ramos Franco³.

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Co-orientadora CPCS/INPA; ³Orientadora CPCS/INPA.

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença infecto - parasitária causada por várias espécies de *Leishmania* de caráter zoonótico que acomete diversas espécies de animais silvestres, domésticos e secundariamente o homem. A transmissão é realizada por um vetor flebotômico, do gênero *Lutzomyia*. As leishmanias são parasitos digenéticos, apresentando duas formas: promastigota, no vetor e amastigota, no hospedeiro vertebrado. Apesar do elevado número de casos da doença no Assentamento Iporá (PA-IPORÁ), localizado em sua maior parte em Rio Preto da Eva, este município continua a representar uma lacuna no conhecimento da dinâmica da transmissão da leishmaniose no Estado do Amazonas (Pereira, 2003), onde *Leishmania* (V.) *guyanensis* é responsável por cerca de 83% dos casos humanos de LTA, existindo também registros de infecções por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* (Naiff, 1998; Romero *et al.*, 2002; Figueira, 2006). 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 doença. Um dos métodos rotineiramente empregados na caracterização de amostras de *Leishmania* e considerado padrão ouro de identificação é a eletroforese de isoenzimas (Cupolillo *et al.*, 1994). Devido à necessidade de melhor conhecer a distribuição das espécies de leishmanias no estado do Amazonas, justifica-se a realização deste estudo, que tem como intuito identificar as espécies de flagelados isolados de indivíduos humanos infectados em Rio Preto da Eva, município considerado como o segundo em número de casos de leishmaniose tegumentar do estado.

Sendo assim, o objetivo deste projeto foi caracterizar amostras de *Leishmania* sp. (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de pacientes deste município, utilizando-se a técnica de eletroforese de isoenzimas, no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (Lab. LDC), INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), comparando-se com perfis de cepas de referência sugeridas pela Organização Mundial de Saúde.

2. Material e métodos

Neste estudo, foram incluídos 28 pacientes, independentes do sexo, oriundos do município de Rio Preto da Eva com suspeita para leishmaniose. Das 28 amostras coletadas, nove foram retroativas ao início do projeto, pertencem ao banco de cepas do Lab. LDC e originárias de mesma área de estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INPA, onde os pacientes que consentiram participar desta pesquisa também forneceram dados epidemiológicos. Foram excluídos, aqueles que não concordaram com a pesquisa e menores de 18 anos. Neste estudo descritivo, foram utilizadas três cepas padrões, comparando-se os perfis das amostras isoladas com os das cepas de referência: *L.(V.) guyanensis* - MHOM/BR/75 /M4147; *L. (L.) amazonensis* - IFLA/BR/67/PH8; e *L. (V.) naiffi* - MHOM/BR/00/IM2773. Os pacientes envolvidos foram submetidos à escarificação e biópsia das lesões, sendo esse material processado no Lab. LDC. Foram realizados os seguintes exames: esfregaço e impressão por aposição em lâmina corada pelo método de Giemsa; cultivo em meio de cultura NNN; inoculação em animais de laboratório e análise bioquímica. Nove das 28 amostras isoladas foram caracterizadas por eletroforese de isoenzimas. As nove cepas dos pacientes foram mantidas em meio NNN. Os estoques estabilizados *in vitro* foram expandidos em meio líquido RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFBi). As amostras foram preparadas segundo protocolo padronizado por Momen e Morel (1984). Os seguintes sistemas enzimáticos foram testados: 6-Fosfogluconato Desidrogenase, Hexoquinase, Glicose-6-fosfato Desidrogenase, Enzima Málica, Fosfo-gluco-mutase, Glicose-fosfo-isomerase, Manose-fosfato-isomerase e Nucleotidase (Cupolillo *et al.*, 1994). As bandas (eletromorfos) visualizadas nos géis foram analisadas de acordo com sua mobilidade eletroforética. Aquele mais próximo do ponto de aplicação foi denominado eletromorfo 1.

As demais cepas serão caracterizadas após isolamento dos hamsters.

3. Resultados e discussão

Através da análise da posição dos eletromorfos nos géis (Fig. 1), oito isolados foram identificados como *Leishmania (V.) guyanensis*: A1 (MHOM/BR/09/IM5536), A2 (MHOM/BR/09/IM5537), A3 (MHOM/BR/09/IM5539), A4 (MHOM/BR/09/IM5540), A6 (MHOM/BR/09/IM5543), A7 (MHOM/BR/09/IM5544), A8 (MHOM/BR/09/IM5545) e A9 (MHOM/BR/09/IM5546) e um outro como *Leishmania (L.) amazonensis*: A5 (MHOM/BR/09/IM5547).

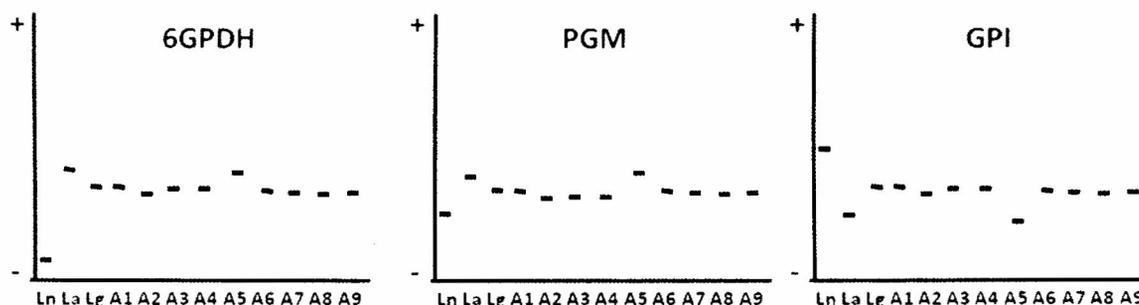


Figura 1. Zimogramas representando os perfis dos alelos observados para as enzimas 6PDH, PGM e GPI em tampão Maléico. Cepas de referência: (Ln) *Leishmania (V.) naiffi*; (La), *Leishmania (L.) amazonensis* e (Lg), *Leishmania (V.) guyanensis*. Amostras: A1 (IM5536); A2 (IM5537), A3 (IM5539), A4 (IM5540), A5 (IM5547), A6 (IM5543), A7 (IM5544), A8 (IM5545) e A9 (IM5546).

Das lâminas confeccionadas para pesquisa de amastigotas, 82% (23/28) foram positivas. Das culturas realizadas, 0,9% (1/11) contaminou por bactérias, impedindo o crescimento parasitário. Dos 21 hamsters inoculados, 8 (38%) apresentaram lesões até o momento. Foram criopreservadas 13 cepas e 11 possuem massa parasitária para isoenzimas (Tabela 1).

Foram atendidos pacientes residentes a Margem da Estrada (7) e dos seguintes Ramais: Santa Maria (3), do Banco (3), Manápolis (2), Barcelona (2), Bom Jesus (1), Pedreira (1), da União (1) e o ramal Cafezal apresentou o maior número de casos (8) (Figura 2). Dos pacientes atendidos, 9 (33%) eram do sexo feminino e 19 do sexo masculino (67%). A maioria apresentou lesão do tipo úlcera típica (20 casos), seguido de pápula (3), impetigóide (2) e linfagite (1). Um caso apresentou tanto úlcera típica quanto papulosa e outro não foi determinado (Figura 3). Os hamsters inoculados com material isolado dos pacientes estão sendo acompanhados quanto a presença de lesões. Os que não apresentarem lesões após seis meses têm possibilidade de estarem infectados com *Leishmania (V.) naiffi*, uma vez que esta espécie raramente produz lesões na pele de hamsters, apesar do parasito poder ser reisolado em cultura até um ano após inoculação (Naiff, 1998; Lainson e Shaw, 2005). Estudos anteriores mostram a circulação desta espécie em Rio Preto da Eva (Naiff, 1998; Figueira, 2006, 2008).

Neste município têm sido notificados diversos casos de LTA, onde cerca de 80% são oriundos de diversos assentamentos ao longo da rodovia AM-010 (Pereira, 2003; Figueira *et al.*, 2008).

Tab. 1- Amostras de pacientes de Rio preto da Eva com exames realizados e técnicas laboratoriais.

AMOSTRAS	EXAME DIRETO	CULTURA	INÓCULO HAMSTER	EM	TEMPO DE INOCULAÇÃO (HAMSTER)	CRIO	ISO
MHOM/BR/09/IM5536	+	+	AL		8 meses e 5 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5537	+	+	NR		NR	+	+
MHOM/BR/09/IM5538	+	-	NR		NR	-	-
MHOM/BR/09/IM5539	+	+	NAL		7 meses e 12 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5540	+	+	AL		7 meses e 4 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5541	+	+	AL		6 meses e 18 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5542	-	-	NAL		7 meses e 4 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5543	+	+	AP		6 meses e 5 dias	+	-
MHOM/BR/09/IM5544	+	+	NAL		6 meses e 5 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5545	+	+	AL		6 meses e 6 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5546	+	+	NAL		6 meses e 6 dias	+	-
MHOM/BR/09/IM5547	+	+	AL		6 meses e 18 dias	+	+
MHOM/BR/09/IM5564	+	-	AL		4 meses e 3 dias	-	-

MHOM/BR/09/IM5565	+	-	NAL	4 meses e 3 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5566	+	-	NAL	3 meses e 12 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5567	+	-	AL	3 meses e 12 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5568	+	-	NAL	3 meses e 12 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5569	+	-	NAL	3 meses e 3 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5570	+	-	NAL	3 meses e 3 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5571	+	-	NAL	1 mês e 9 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5572	-	-	NR	NR	-	-
MHOM/BR/09/IM5573	-	-	NAL	1 mês e 8 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5574	-	-	NAL	NR	-	-
MHOM/BR/09/IM5575	+	+	NR	NR	-	+
MHOM/BR/09/IM5576	-	-	NR	1 mês e 8 dias	-	-
MHOM/BR/09/IM5577	+	-	NR	NR	-	-
MHOM/BR/09/IM5578	+	-	NR	NR	-	-
MHOM/BR/09/IM5579	+	-	NR	NR	-	-

Abreviaturas: CRIO - criopreservação; ISO - massa parasitária para a eletroforese isoenzimática; NR - não realizado; AL - apresenta lesão; NAL, não apresenta lesão.

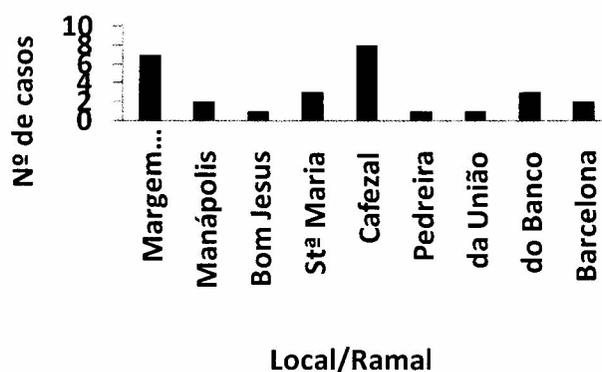


Figura 2. Registro de casos por ramal na área de Assentamento do Iporá, AM.

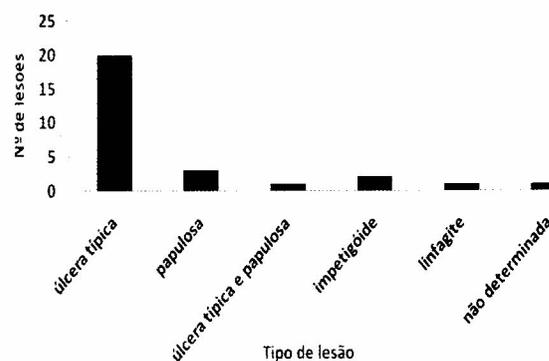


Figura 3. Tipos de lesões cutâneas em pacientes do Assentamento do Iporá, AM.

Neste estudo, 88% (8/9) dos pacientes demonstraram infecção por *L. (V.) guyanensis*. Naiff (1998) examinou 108 pacientes oriundos do Estado do Amazonas (Manaus, Itacoatira, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo), demonstrou infecção por *L. (V.) guyanensis* em 97% (69/71) dos casos. E, Romero *et al.* (2002), analisando a frequência de infecção humana por *Leishmania (V.) braziliensis* em quatro dos municípios ao norte do Rio Amazonas (Manaus, Itacoatiara, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo), demonstraram infecção por *L. (V.) guyanensis* em 97% (69/71) dos casos. Estudos estes que reafirmam maior incidência da espécie na região.

O sexo masculino lidera o maior número de casos. De acordo com a literatura, endemia associada a este patógeno incide em focos rurais e urbanos (75,9% e 24,1% dos casos, respectivamente), sendo a doença comum em jovens do sexo masculino, que trabalham no campo (Grimaldi *et al.*, 1991, Naiff, 1998).

4. Conclusão

O município de Rio Preto da Eva apresenta maior número de infecções por *L. (V.) guyanensis*. Geralmente, deve-se incluir entre os métodos de isolamento parasitário o animal de experimentação, facilitando assim o isolamento das cepas para posterior caracterização bioquímica. A tipagem e caracterização de cepas fornece dados epidemiológicos mais consistentes com a realidade do município além de possibilitar a realização de estudos de variabilidade genética. Esses estudos também favorecem a identificação de possíveis mutações/resistências das espécies que circulam na região, colaborando assim com novas formas de tratamentos.

A execução do diagnóstico imediato e a caracterização do parasito é imprescindível para uma notificação completa de casos e conhecimento da dinâmica da leishmaniose na região.

5. Referências

- Cupolillo, E.; Grimaldi G.Jr.; Momen, H. 1994. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50:296-311.
- Figueira, L. P. 2006. *Caracterização Molecular de Isolados Humanos de Leishmania (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 72pp.
- Figueira, L.P.; Pinheiro, F.G.; Nogueira, R.W.; Nery, L.C.R.; Mota, K.C.; Franco, A.M.R. 2008. 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*, 41:1, 194p.
- Grimaldi, G Jr. e Tesh, R.B. 1991. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Revist*, 3:230-250.
- Laison, R. e Shaw J.J. *New World leishmaniasis*. Disponível em: <http://www.topleyandwilson.com/pdf/Parasitology%20chapter.pdf>. Acesso: 10 de outubro de 2005.
- Momen, H. e Morel C.M. 1984. *Parasite characterization by zymodeme analysis. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. Rio de Janeiro, UNDP/World Bank/WHO-FINEP-CNPq-FIOCRUZ, p.111-120.
- Naiff, M.F. 1998. *Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região*. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Pereira, M.A.S. 2003. *Dinâmica da Leishmaniose Tegumentar Americana na área do Projeto de Assentamento Iporá, Rio Preto da Eva, AM*. Dissertação Mestrado em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 87p.
- Romero, A.S.R.; Ishikawa, E.; Cupollilo, E.; Toaldo, C.B.; Guerra, M.V.F.; Paes, M.G.; Macêdo, V.O.; Shaw, J.J. 2002. Identificatin of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Tropica*, 82:25-29.