

FORMAÇÃO DO
CONHECIMENTO

CIENTÍFICO EM

LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR

VOLUME

1



INPA

INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS DA AMAZÔNIA



ORGANIZADORES

Antonia Maria Ramos Franco
Bruno Bezerra Jensen
Erika Oliveira da Silva
Francimeire Gomes Pinheiro
Paula Figliuolo da Cruz Borges



Editora
Poisson

Antonia Maria Ramos Franco
Bruno Bezerra Jensen
Erika Oliveira da Silva
Francimeire Gomes Pinheiro
Paula Figliuolo da Cruz Borges
(Organizadores)

Formação do conhecimento científico em
Leishmaniose Tegumentar no Instituto
Nacional de Pesquisas da Amazônia
Volume 1

A Iniciação Acadêmica em estudos Parasitológicos,
Bioquímicos e Moleculares

1ª Edição

Belo Horizonte
Editora Poisson

2023

Editor Chefe: Dr. Darly Fernando Andrade

Conselho Editorial

Dra. Alexandra Priscilla Tregue (Centro Universitário CEUNI-FAMETRO)

Dra. Antonia Maria Ramos Franco (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA)

Dra. Claudia D. Comandolli Wyrepkowski (Secretaria Municipal de Saúde de Manaus)

Dra. Fabiane Veloso Soares (Centro Universitário FAMETRO)

Me. Juliana Maria (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA)

Dra. Liliane Coelho da Rocha (Universidade do Estado do Amazonas - Escola Superior de Ciências da Saúde).

Dr. Pedro Rael Candido Domingos (Centro Universitário do Norte – UNINORTE)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F724

Formação do conhecimento científico em Leishmaniose Tegumentar no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - A Iniciação Acadêmica em estudos Parasitológicos, Bioquímicos e Moleculares - Volume 1/ Organização: Antonia Maria Ramos Franco et. al - Belo Horizonte MG: Poisson, 2023

Formato: PDF

ISBN: 978-65-5866-310-2

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

1.Ciências biológicas 2.Parasitologia 3. Medicina
I. FRANCO, Antonia Maria Ramos et. al II. Título

CDD-610

Sônia Márcia Soares de Moura - CRB 6/1896

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores



O conteúdo deste livro está licenciado sob a Licença de Atribuição Creative Commons 4.0.

Com ela é permitido compartilhar o livro, devendo ser dado o devido crédito, não podendo ser utilizado para fins comerciais e nem ser alterada.

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

www.poisson.com.br
contato@poisson.com.br

Organizadores

ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO



Diretora desde 05 de dezembro de 2018 (PO no. 1300) e Pesquisadora titular III no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, líder de grupo de pesquisa pelo CNPq. Possui graduação em Licenciatura Plena e Bacharel em Ciências Biológicas pela Fundação Técnico Educacional Souza Marques/RJ (1983), especialização e mestrado em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz/RJ (1990), doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz/RJ (1995) com bolsa de doutorado sanduíche da CAPES (1993), relativo a parte do estudo desenvolvido na Universidade de Yale (EUA). Curso de longa duração (2018 a 2019) em gestão da Inovação pelo Programa Innovation Management Professional-IMP, oferecido pela Steinbeis University-School of International Business and Entrepreneurship (STEINBEIS-SIBE). Foi professora de ensino superior no Centro Universitário do Norte (UNINORTE), Universidade UNINILTON LINS e UNIP. Professora de EAD pelo IFAM na área da Saúde. Com experiência em Parasitologia Humana, ênfase em Protozoologia de Parasitos, atuando principalmente nos seguintes temas: Família Trypanosomatidae, gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum*, estudos de bioprospecção com ensaios *in vitro* e pré-clínicos, caracterização e tipagem de parasitos, epidemiologia molecular, imunologia, tratamento e diagnóstico das Leishmanioses. Orientação de alunos de Pós-Graduação (PG) nas áreas de biotecnologia, parasitologia, entomologia, imunologia e Inovação farmacêutica pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e PG do INPA, Manaus-AM.

BRUNO BEZERRA JENSEN



Doutor em Inovação Farmacêutica (área de concentração em Fármacos e Medicamentos) e Mestre em Biotecnologia aplicada à Saúde pela Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Especialista em Farmacologia Clínica pelo Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU e em Análises Clínicas pela Universidade Paulista - UNIP. Bacharel em Farmácia pela Faculdade Estácio do Amazonas. Realizou estágio de Pós-Doutoral no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA/COSAS e em colaboração com a University of Florida - UF, na área de Ensaios Farmacológicos Pré-clínicos. Atua como Pesquisador Visitante (Bolsista PCI-DB/CNPq) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Colabora também com os Laboratórios de Química de Produtos Naturais (INPA) e de Histologia Funcional (Instituto de Ciências Biológicas-UFAM). Possui mais de dez anos de experiência em desenvolvimento de Produtos Biotecnológicos e Formulações Farmacêuticas (Emulsões e Microemulsões) para o tratamento alternativo/complementar de Doenças negligenciadas: com ênfase na Leishmaniose Tegumentar, avaliados por meio de ensaios pré-clínicos: *in vitro* e *in vivo*.

Organizadores

ERIKA OLIVEIRA DA SILVA



Doutora e Mestra em Imunologia Básica e Aplicada pela Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Especialista em Unidade de Terapia Intensiva pela Singular Educacional- DELTA. Bacharel em Enfermagem pelo Centro Universitário do Norte-UNINORTE. Atualmente realiza o estágio de pós-doutoral no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. No ensino superior trabalhou como docente no Grupo Ser Educacional (UNINASSAU) e no Centro Universitário Fametro, ministrando disciplinas do ciclo básico ao específico. Já atuou como membro do Núcleo Docente Estruturante (NDE) do curso de Enfermagem, comissão de autorização e reconhecimento de curso junto ao MEC e atuou como coordenadora de estágio do curso de graduação em Enfermagem. Recebeu diploma de honra ao mérito pela câmara Municipal de Manaus pelos relevantes serviços prestados à sociedade manauara na área da educação.

FRANCIMEIRE GOMES PINHEIRO



Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Amazonas (1998), Mestrado em Ciências biológicas com ênfase em Entomologia pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (2004) e Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas (2013). Funcionária Pública Federal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Realizou pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane e no Instituto de Ciências Biológicas da USP, Participou e participa de projetos de pesquisa envolvendo estudos com Protozoologia de Parasitos e Entomologia Médica. É Professora do Instituto Metropolitano de Ensino – IME, na qual participa do Núcleo Docente Estruturante (NDE) do curso de Enfermagem, além de ministrar nas disciplinas do curso de Farmácia, Odontologia, Biomedicina, Nutrição e Engenharia Ambiental, nesses cursos atua também na elaboração e execução de projetos científicos.

Organizadores

PAULA FIGLIUOLO DA CRUZ BORGES



Pesquisadora Visitante no INPA - AM, em pesquisa sobre a imunopatogenia da leishmaniose tegumentar americana em populações do Amazonas; tem experiência em Biologia Molecular, vigilância e controle de vetores; Doutorado em Medicina Tropical pelo Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ (2018). Possui graduação (licenciatura) em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário do Norte/Manaus (2008) e mestrado em Biotecnologia pela Universidade do Estado do Amazonas (2011).

Prefácio

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a Leishmaniose tegumentar (LT) está entre as dez principais Doenças tropicais negligenciadas (DTN), com mais de 12 milhões de pacientes infectados. As doenças negligenciadas são um grupo de doenças ocasionadas por patógenos, como, parasitas, bactérias e vírus, que irão acometer pacientes de maior vulnerabilidade social, na qual a pobreza está intrinsecamente relacionada. A LT em especial, é uma enfermidade de transmissão vetorial, pelo flebótomo fêmea infectado com o parasita do gênero *Leishmania*. Após o processo de infecção, o paciente poderá apresentar manifestações clínicas de forma variada, sendo algumas delas, a Leishmaniose cutânea localizada, mucosa cutânea e disseminada.

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde consiste no uso dos medicamentos antimoniatos de meglumina, isetionato de pentamidina e anfotericina B. A escolha da droga, vai depender de um diagnóstico clínico-laboratorial ou pelo menos epidemiológico. Sabe-se que vai depender de um diagnóstico preciso para que se obtenha uma terapia mais assertiva. Contudo, esse é apenas um dos problemas encontrados ao se trabalhar com esta doença. O outro problema de grande relevância é a falta de investimento para o desenvolvimento de novos tratamentos para a LT. Pois, essas substâncias supracitadas podem desencadear inúmeros efeitos indesejados, como, efeitos cardiotoxicos, insuficiência cardíaca e hepática, abortiva, etc.

Diante dessas problemáticas, o grupo de pesquisa do Laboratório de Leishmaniose e Doenças de chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, instituído desde 1975, tem o compromisso de realizar pesquisas interdisciplinares voltadas para as áreas entomológica, epidemiológica, diagnóstico parasitológico e molecular, proteômica, imunologia, fitoquímica, experimentação animal e desenvolvimento de tratamento para doenças tropicais negligenciadas.

Ao adotar uma abordagem interdisciplinar, os integrantes do grupo de pesquisa são capazes de explorar novos caminhos de pesquisa e inovação. A colaboração entre esses especialistas de diferentes formações permite a análise integrada de problemas de saúde, atendimento aos pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar, aplicação de técnicas experimentais e identificação de alvos terapêuticos mais eficazes e menos invasivos.

Dessa forma, é com grande satisfação que apresentamos esta obra, intitulada "Formação do conhecimento científico em Leishmaniose Tegumentar no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Vol. 1: A Iniciação Acadêmica em estudos Parasitológicos, Bioquímicos e Moleculares", direcionada ao público acadêmico, com a organização de uma coletânea de capítulos teorizando assuntos com enfoque em uma das doenças negligenciadas, a leishmaniose tegumentar. Os trabalhos estão distribuídos por temas, como, estado da arte da Leishmaniose, contexto histórico e projetos desenvolvidos pelo Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas do INPA, como, na área de diagnóstico clínico, laboratorial (por técnicas moleculares e bioquímicas) e desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença tegumentar.

*Antonia Maria Ramos Franco
Bruno Bezerra Jensen
Erika Oliveira da Silva
Francimeire Gomes Pinheiro
Paula Figliuolo da Cruz Borges*

SUMÁRIO

Capítulo 1: Estado da Arte da Leishmaniose Tegumentar no Brasil..... 11

Antonia Maria Ramos Franco, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Ana Flávia da Silva Chagas, Anny Maiza Vargas Brasil, Erika Oliveira da Silva, Maria Ivonei Carvalho Albuquerque, Juliana Maria de Moraes

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.01

Capítulo 2: Contexto Histórico do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA..... 28

Antonia Maria Ramos Franco, Aghata Beatriz Bezerra Jensen, Bruno Bezerra Jensen, Francimeire Gomes Pinheiro, Erika Oliveira da Silva, Paula Figliuolo da Cruz Borges

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.02

Capítulo 3: Análise espacial e temporal de casos de Leishmaniose cutânea no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, no período de 2020 a 2021 35

Maria Clara Abreu Mota de Oliveira Ramos Ferro, Bruno Bezerra Jensen, Francimeire Gomes Pinheiro, Juliana Maria de Moraes, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco, Paula Figliuolo da Cruz Borges

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.03

Capítulo 4: Características clínicas e biológicas de lesões satélites em pacientes com Leishmaniose Tegumentar 40

Antonia Maria Ramos Franco, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Erika Oliveira da Silva, Paula Figliuolo da Cruz Borges

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.04

Capítulo 5: Características de lesões em pacientes com leishmaniose cutânea provenientes do município de Rio Preto da EVA, Amazonas, Brasil 50

Nicolle Tayná Brandão dos Santos, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.05

Capítulo 6: Padronização do Diagnóstico de *Leishmania* em lâminas coradas..... 57

Juliana Maria de Moraes, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Liliane Coelho da Rocha, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.06

SUMÁRIO

Capítulo 7: Análise por eletroforese bidimensional do perfil proteico do plasma de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis*..... 73

Sharala Kumari, Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira, Luanda de Paula Figueira, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.07

Capítulo 8: Caracterização bioquímica de isolados humanos de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil..... 82

Alana Cristina Vinhote da Silva, Francimeire Gomes Pinheiro, Luanda Figueira, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.08

Capítulo 9: Detecção e identificação de espécies de *Leishmania* (Kinetoplastida: trypanosomatidae) utilizando a técnica de Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) . 90

Jéssica Sidou Lamarão, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antônia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.09

Capítulo 10: Avaliação “*in vitro*” da infectividade de amostras de *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis e *Leishmania (Viannia) guyanensis* 96

Alana Cristina Vinhote da Silva, Liliane Coelho da Rocha, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.10

Capítulo 11: Caracterização de flagelados do gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) isolados de marsupiais (Mammalia: Edentata, Marsupialia) procedentes do Estado de Rondônia, Brasil 103

Ana Lúcia Souza das Chagas, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Luanda de Paula Figueira, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.11

Capítulo 12: Isolamento e caracterização de protozoários do gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de peixe acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) de água doce 113

Alana Cristina Vinhote da Silva, Sônia Rolim Reis, Francimeire Gomes Pinheiro, Luanda Figueira, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.12

SUMÁRIO

Capítulo 13: Estudo *in vivo* de formulações aplicadas ao tratamento tópico da Leishmaniose Tegumentar Americana 121

Bruno Bezerra Jensen, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.13

Capítulo 14: Formulações tópicas contendo princípios ativos de *Libidibia ferrea* para o tratamento de lesões relacionadas à Leishmaniose tegumentar experimental 127

Bruno Bezerra Jensen, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antônia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.14

Capítulo 15: Estudo *in vivo* de novas formulações contendo drogas padrão contra infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 136

Camila Silva Santos, Fabiane Veloso Soares, Bruno Bezerra Jensen, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.15

Capítulo 16: Fracionamento e Purificação dos metabólitos secundários do extrato de *Libidibia ferrea* e atividade antileishmania 144

Caio Coutinho de Souza, Bruno Bezerra Jensen, Maria da Paz Lima, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, Richaelly Pinheiro dos Santos, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

DOI: 10.36229/978-65-5866-310-2.CAP.16

Estado da Arte da Leishmaniose Tegumentar no Brasil

Antonia Maria Ramos Franco, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Ana Flávia da Silva Chagas, Anny Maiza Vargas Brasil, Erika Oliveira da Silva, Maria Ivonei Carvalho Albuquerque, Juliana Maria de Moraes

1. HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT)

A leishmaniose é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade e existem relatos de estudos arqueológicos demonstrando que, durante a era pré-colombiana, os incas reproduziram figuras humanas mutiladas por diferentes moléstias em vasos de cerâmica, certificando a ocorrência da *uta* e *espúndia* - denominações locais para leishmaniose tegumentar, inicialmente confundida com sífilis (Vale e Furtado 2005). Posteriormente, estudos da paleomedicina apresentaram descobertas a respeito de múmias com lesões na pele e mucosa com características de leishmaniose tegumentar (LT) (Santos e Coimbra 1994; Neves 2009).

No Brasil, no entanto, não foi possível fazer a constatação da presença de leishmaniose através do estudo de cerâmicas antropomórficas produzidas por indígenas, por apresentarem um caráter rudimentar. Sendo assim, a única indicação fidedigna e mais antiga da leishmaniose no Brasil é apresentada em 1908, na tese de Tello, “*Antiguedad de la syphilis em el Peru*”, referente à obra escrita, *Pastoral Religioso-Político Geographico*, editada em 1827, que descreve a viagem de um missionário pela região amazônica. Na obra são descritas observações feitas a respeito de indivíduos que apresentavam úlceras nos braços, pernas e lesões destrutivas na boca e nariz, sendo observado que o mesmo acontecia após a picada de insetos (Vale e Furtado 2005).

Inicialmente acreditava-se que a doença era proveniente do Peru e da Bolívia, apesar de apresentar-se endêmica na Amazônia. A doença teria se disseminado nos estados do norte e no restante do país por indivíduos que para lá se dirigiram em busca de trabalho nos seringais e que retornaram infectados às suas origens. Em 1855, Cerqueira observou fortes evidências da leishmaniose no Brasil, devido a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. No final do século XIX, Breda diagnosticou imigrantes italianos ao retornarem de uma viagem feita a São Paulo com uma doença chamada ‘*buba brasiliana*’ (Vale e Furtado 2005).

O primeiro relato do parasita da *Leishmania* foi feito em 1885, na Índia, por Cunningham. Em 1898, na Rússia, Peter Fokitsch Borovsky fez a primeira descrição, porém, somente em 1903, na Índia, James Homer Wright, William Leishman e Charles Donovan descreveram o protozoário causador do calazar, que inicialmente foi identificado como *Helcosoma tropicum*. Posteriormente, Laveran e Mesnil deram o nome de *Piroplasma donovani*. Mas, logo em seguida, Ronald Ross verificou que não se tratava de um esporozoário e criou o gênero *Leishmania*, chamando a espécie de *Leishmania donovani* (Altamirano-Enciso 2003; Vale e Furtado 2005; Neves 2009).

Em 1904, Rogers constatou que o parasita descrito por Leishman e Donovan desenvolvia-se no sangue humano. Também em 1904, Laveran e Cathoire publicaram estudos sobre casos de calazar em crianças na Tunísia, denominando-a de *Leishmania infantum* (Altamirano-Enciso 2003; Monteiro 2013).

Em 1909, Lindenbergh, descreveu os primeiros casos no Brasil, encontrando formas de *Leishmania* idênticas às encontradas no Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo e sugeriu a denominação “leishmaniose ulcerosa” (Altamirano-Enciso, 2003). Entretanto, devido às manifestações ulcerosas, vegetativas e infiltrantes, Rabello propôs a expressão ‘leishmaniose tegumentar’ (Vale e Furtado 2005).

Em 1911, Gaspar de Oliveira Vianna denominou e descreveu o agente etiológico *Leishmania braziliensis* e em 1912 aplicou o tártaro emético como tratamento pioneiro das leishmanioses (Neves 2009). Até a década de setenta, todos os casos de LT eram atribuídos a *L. braziliensis* e a classificação dos parasitas baseava-se no comportamento clínico-evolutivo, visto que a morfologia dos parasitas à microscopia óptica não permitia sua distinção (Vale e Furtado, 2005). As classificações mais utilizadas na atualidade seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (1987), que dividem as leishmanias nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Os primeiros conhecimentos sobre os transmissores da LT foram em 1921, que Sergent conseguiu transmitir o botão do oriente inoculando triturados de *Phlebotomus papatasi* em soldados. Cerqueira (1920) e Aragão (1922) conseguiram infectar um cão a partir de fêmeas de *Lutzomyia intermedia* que haviam realizado repasto sanguíneo de um paciente com leishmaniose tegumentar. Atualmente, é conhecido muitas espécies de *Lutzomyia* responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas (Neves, 2009).

Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas e as características clínicas e geográficas da doença foram sendo complementadas pelo estudo do comportamento das diferentes espécies de *Leishmania*, dos hospedeiros e vetores, fortalecendo a base para a classificação e compreensão desta enfermidade (Altamirano-Enciso 2003; Monteiro 2013).

2. ETIOLOGIA

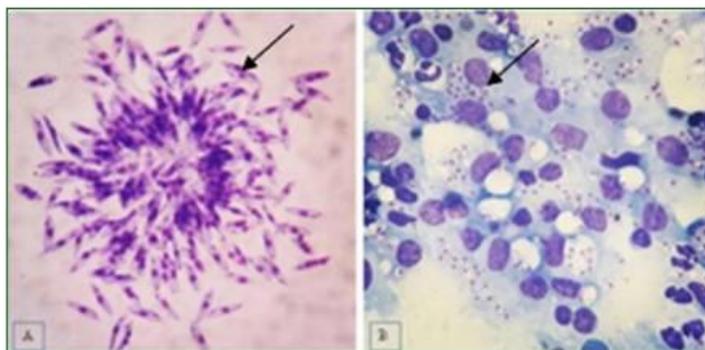
2.1. O GÊNERO *LEISHMANIA*

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam a seguinte posição sistemática: Reino Protista, Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e são caracterizados como parasitas flagelados, unicelulares, com ciclo de vida heteroxênico e transmissão vetorial, capazes de causar um conjunto de doenças infecciosas conhecidas como leishmaniose (Lainson 2010; Akhound *et al.* 2016; Vasconcelos *et al.* 2018). Os parasitas desse gênero apresentam morfologia variada, com dois estágios evolutivos principais, sendo eles:

a) Promastigota: encontrada no inseto vetor, possui forma alongada e elíptica, com núcleo arredondado, flagelo livre e longo emergindo da parte anterior do parasita. O corpo celular possui dimensões de 3 a 8 µm de comprimento (Castellano 2005; Teixeira *et al.* 2013) (Figura 1A).

b) Amastigota: é intracelular obrigatória de células do sistema fagocítico mononuclear, possui morfologia arredondada a ovoide, flagelo curto e interiorizado, cinetoplasto em forma de bastão e núcleo grande e arredondado. Possui dimensões entre 1,5 a 3,0 μm de comprimento e 3,0 a 6,5 μm de diâmetro (Castellano 2005; Neves 2009; Teixeira *et al.* 2013) (Figura 1B).

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



Fonte: Chagas (2020).

O gênero *Leishmania* é classificado em dois subgêneros, que está relacionado principalmente ao local em que as formas promastigotas se desenvolvem no vetor:

- Subgênero *Viannia* (Lainson e Shaw 1987): os parasitas se desenvolvem na parte anterior e média do intestino do vetor, além disso, as amastigotas são menores (2 a 4 μm) e as lesões apresentam poucos parasitas (Teixeira *et al.* 2013).

- Subgênero *Leishmania* (Saf'Janova 1982): os parasitas se desenvolvem nas partes anterior, média e posterior do intestino do vetor, além disso, as amastigotas são maiores (3 a 6 μm) e as lesões densamente parasitadas (Teixeira *et al.* 2013; Brasil 2017).

Atualmente, no Brasil, sete espécies de *Leishmania* são capazes de causar a forma tegumentar da doença, sendo elas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (L.) amazonensis* (Vanconcelos *et al.* 2018). Dentre essas, quatro são as de maior importância no estado do Amazonas sendo elas *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (Figueira 2013).

A *L. (L.) amazonensis* é a única espécie do subgênero *Leishmania*, encontrada de Norte ao Sul do rio Amazonas, é responsável pelos casos de leishmaniose cutânea, mucosa, e por uma forma sem tratamento conhecida por leishmaniose cutânea difusa anérgica (Silveira *et al.* 2008; Brasil 2017).

São poucos os relatos de infecção por *L. (V.) naiffi*, essa apresenta um curso clínico benigno com boa resposta ao tratamento e está associada à baixa taxa de virulência em humanos e é responsável por casos com lesões ulceradas e pequenas (Lainson *et al.* 1990; Naiff *et al.* 1991; Fagundes-Silva *et al.* 2015).

A *L. (V.) guyanensis* é uma das espécies mais comuns na região Amazônica e considerada a segunda espécie mais prevalente no Brasil geralmente causando múltiplas lesões cutâneas e raramente causando lesões mucosas (Figueira *et al.* 2008; Ourives-Neves *et al.* 2011; Brasil 2017).

A *L. (V.) braziliensis* é encontrada em todas as regiões endêmicas do país, descrita como a espécie mais prevalente, causando lesões cutâneas e mucosas (Marzochi e Marzochi 1994; Monteiro 2009; Miranda 2011).

2.2. INSETOS VETORES E HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

Países do Novo Mundo possuem as condições ideais para o desenvolvimento de diferentes espécies de flebotomíneos, através do seu clima tropical e das extensas áreas silvestres. Existem aproximadamente 900 espécies catalogadas, das quais 260 são encontradas no Brasil e dentre essas 120 são descritas na Amazônia, contudo, apenas 32 espécies são responsáveis pela transmissão da leishmaniose em humanos (Rangel e Lainson 2003; Bastos 2012).

São as fêmeas adultas dos flebotomíneos as responsáveis pela transmissão do agente etiológico causador da doença, estes vetores são conhecidos popularmente como mosquito asa dura, birigui, tatuquira, mosquito palha, dentre muitos outros, os flebotomíneos estão divididos em seis gêneros, dentre esses o *Lutzomyia* predomina em países do Novo Mundo. Esses insetos (Figura 2) são de pequeno porte, com corpo piloso e delgado, mede até 0,5 cm de comprimento, possui dois pares de asas permitindo que se desloque por pequenos saltos e apresentam atividade noturna (Bastos 2012; Brasil 2017; Vanconcelos *et al.* 2018).

Figura 1 - Inseto vetor da *Leishmania* sp. causador da leishmaniose, gênero *Lutzomyia* spp.



Fonte: Carvalho (2011).

2.3. CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIA SP

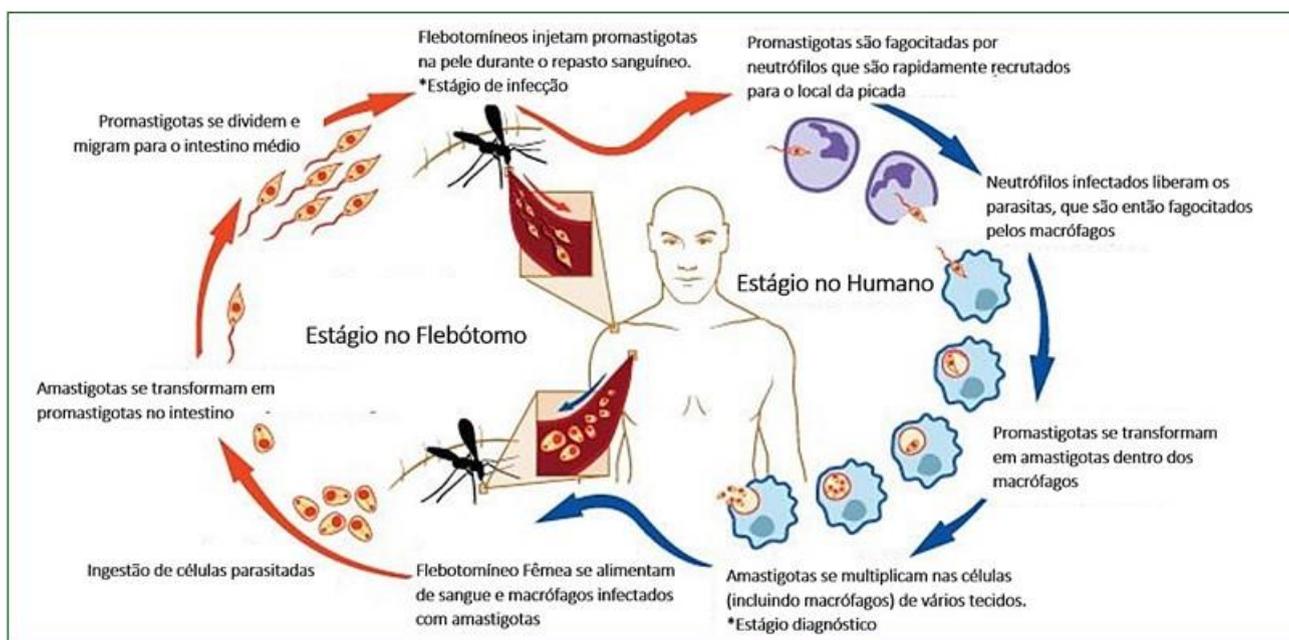
O ciclo de transmissão da *Leishmania* é mantido através dos hospedeiros vertebrados que funcionam como reservatório primário e secundário da doença, os representantes silvestres são principalmente marsupiais (gambá), roedores (paca e rato) e edentados (tatu e tamanduá) e com o advento da urbanização animais domésticos passaram a ser envolvidos na cadeia epidemiológica como canídeos, ungulados e felinos. É caracterizada primariamente como zoonose de animais silvestres, no entanto pode vir a acometer o homem de forma acidental (Vanconcelos *et al.* 2018).

O início desse ciclo é dado quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas com o parasita do gênero *Leishmania* realizam o repasto sanguíneo, inoculando junto com sua saliva, as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado, estimulando-se de 10 a 100 parasitos, que irão ser fagocitados pelas células fagocíticas

mononucleares, bem como células dendríticas (DCs) ou neutrófilos, mas infectando preferencialmente os macrófagos (Schlein 1993; Rittig e Bogdan 2000).

No interior dessas células, as promastigotas transformam-se rapidamente em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, até o rompimento das células fagocíticas e invasão dos parasitas em novas células não infectadas. Na realização de um novo repasto sanguíneo, os flebotomos fêmeas ingerem o parasita na forma amastigota, que passarão por um processo de desenvolvimento, denominado metaciclologênese no interior do intestino do vetor, após passarem por alguns estágios intermediários através de processos enzimáticos, até migrarem para a porção anterior do aparelho digestivo do inseto, aptas a causar a infecção no hospedeiro mamífero (promastigotas metacíclicas), reiniciando um novo ciclo [Figura 3] (Lainson e Shaw 1978; Lipoldová e Demant 2006).

Figura 2. Ciclo de vida do parasita *Leishmania* sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado



Fonte: Modificado Pinterest.

3. ENTOMOLOGIA

Segundo levantamento histórico a respeito dos flebotomíneos, admite-se que a primeira descrição deste inseto ocorreu na Itália, em 1786 por Scopoli, quando citou a espécie *Bibio papatasi*, e que nos anos seguintes alterou sua nomenclatura para *Phlebotomus papatasi* (Dedet *et al.* 2003), espécie de amplo interesse em medicina veterinária e que ocasiona problemas de saúde pública na Europa, Ásia e África (Colacicco-Mayhugh *et al.* 2010). Os primeiros flebotomíneos americanos foram descritos por Coquillett (1907), sendo que no Brasil os responsáveis pela primeira descrição foram Lutz e Neiva (1912).

Os flebotomíneos pertencem a ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, a partir da descoberta de que algumas espécies estariam participando como vetores na transmissão de agentes patogênicos ao homem e a outros animais, os estudos sobre esses insetos ampliaram-se bastante (Galati, 2016; Brasil, 2017). As

leishmanioses são transmitidas através da picada das fêmeas dos flebotomíneos, nestas a hematofagia é indispensável ao desenvolvimento ovariano.

Os flebotomíneos são insetos com ampla distribuição geográfica, ocorrendo sob as mais diversas condições climáticas e de altitude, podendo ser encontrado nos ambientes silvestres, rurais e urbanos. Já foram descritas cerca de 1.003 espécies, das quais 537 podem ser encontradas na Região Neotropical e Neoártica. Destas, 277 foram registradas no Brasil, das quais 18 são consideradas vetores de Leishmaniose (Shimabukuro *et al.* 2017; Chagas 2016; Galati 2016). Da maioria das espécies de flebotomíneos registradas no Brasil, cerca de 52% tem-se registro na Amazônia (Arias e Freitas 1977; Young e Duncan 1994; Rangel e Lainson 2003). Salientando que a maior diversidade é encontrada em floresta primária de terra-firme. Estudos realizados por Freitas *et al.* (2002) em mata de terra-firme no município de Porto Grande (AP/Brasil) corroboram com a afirmação, no qual verificaram um índice de diversidade em torno 6,8 com 46 espécies coletadas de um total 20.008 flebotomíneos.

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Ny. neivai*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (Ready 2013; Diniz *et al.* 2014). No Amazonas, *Ny. umbratilis* que é o principal vetor da *L. (V.) guyanensis*, ao norte do Rio Amazonas, predominando nas florestas primárias dessa região. *Ny. anduzei*, considerada como vetor secundário deste parasito. *B. flaviscutellata*, habita floresta primária, sendo mais abundante próximo ao solo, se adapta bem às florestas secundárias de capoeira, estudos tem comprovado a transmissão da *L. (L.) amazonensis* por este vetor, e *Bichromomyia olmeca nociva*, vetor secundário (Arias e Freitas 1977; Lainson 1983).

Em relação ao tamanho, os flebotomíneos são insetos pequenos de 2 a 4 mm de comprimento, de cor palha ou castanho claro, têm pernas longas e delgadas e apresentam como característica o voo saltitante. Ao contrário dos outros dípteros, esses mantêm a postura ereta das asas, mesmo em repouso e conhecidos, especialmente no Brasil, por diversos nomes populares como, anjinho, cangalhinha, mosquito palha, birigui, flebóti, entre outros. O ciclo vital destes insetos compreende as fases de ovo, larva, que apresentam quatro estádios, pupa e adultos.

O levantamento da fauna dos flebotomíneos, bem como, o monitoramento de espécies transmissoras de leishmânias é realizado com o uso de diversas metodologias para se conseguir abranger o maior número de espécies nos diversos habitats (Figura 4). A armadilha CDC (CDC “miniature” – Hausherr Machine Works, New Jersey, EUA) é o método preconizado pelo Ministério da Saúde no Brasil e amplamente utilizado, pois pode ser instalada no intra ou peridomicílio e em áreas de mata, também descrita como padrão para captura de alguns culicídeos (Alexander e Maroli 2003). A associação de capturas em base árvores, com armadilha CDC modificada, contribui para a captura de espécies que estão adaptadas a ambientes mais próximas ao solo.

Figura 4. Etapas do levantamento da fauna dos flebotomíneos.



Fonte: Acervo do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/INPA.

4. ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS

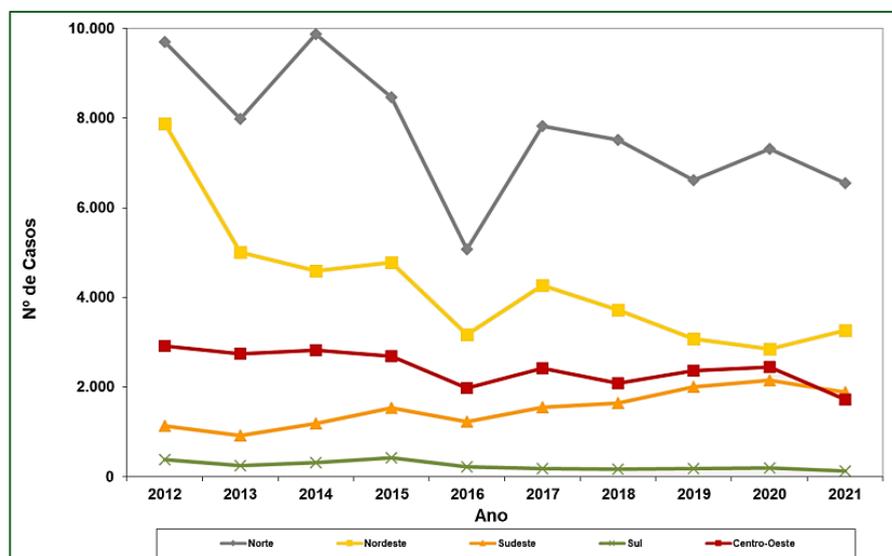
A LT (incluindo a LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, de baixo risco de letalidade (Brasil 2017), considerada um problema de saúde pública por estar associada à pobreza e a condições de vida inadequadas (Alvar *et al.* 2006). A LT pode ser encontrada em 85 países distribuídos nos continentes Americano, Europeu, Africano e Asiático, com elevados índices de registros anuais de casos novos (700 mil a 1,2 milhão). Sobre uma estimativa mundial, um terço dos casos mundiais de LT ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo e na Ásia ocidental do Oriente Médio (Alvar *et al.* 2012).

O Brasil está entre os dez países com as maiores taxas de incidência global estimada para a LTA, com o maior número de casos notificados em toda América do Sul (Alvar *et al.* 2012). No país, a LTA é considerada uma doença endêmica em todas as regiões, ocorrendo em autoctonia em todos estados e Distrito Federal. O Norte é região com os maiores índices epidemiológicos, seguido do Nordeste e Centro-oeste (Brasil 2017).

Entre 2003 e 2018, foram registrados mais de 300.000 casos de LTA, com média de 21.158 casos por ano (SINAN 2023). Como pode ser observado no gráfico da Figura 5, desde o ano de 2012 houve uma considerada redução nos casos notificados nos estados mais prevalentes para a LTA, com dados até o ano de 2021. Apesar da referida redução, vale evidenciar que o Brasil é um país hiperdêmico para a LTA, com elevado coeficiente de detecção - CD ($\geq 7,0$), índice relacionado à exposição de indivíduos à picada de flebotomíneos infectados. Além disso, o período de pandemia da covid-19 provavelmente impactou nas notificações das doenças tropicais.

No ano de 2022, foram notificados 14.271 novos casos de LTA no Brasil (CD 6,5 casos/100.000 habitantes), com maiores notificações de casos no Norte (6.860 casos), seguido do Nordeste (3.728 casos) e Centro-oeste (1.842 casos) (SINAN 2023).

Figura 5. Número de casos notificados de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil e regiões, nos anos de 2012 a 2021.



Fonte: Brasil (2023).

Em 2022, a região Norte continua liderando o ranking de número de casos notificados no Brasil, com 6.860 casos, seguido da região Nordeste (3.728 casos), Centro-oeste (1.842 casos), Sudeste (1.611 casos) e Sul (230 casos). No estado do Amazonas, 881 novos casos de LTA foram notificados somente no ano de 2022, sendo os municípios de maiores notificações: Manaus (168 casos), Boca do Acre (82 casos), Itacoatiara (69 casos), Humaitá (50 casos) e Rio Preto da Eva (42 casos) (SINAN 2023).

Quanto aos aspectos sociodemográficos, o sexo masculino lidera o número de notificações, com 10.536 casos no sexo masculino e 3.732 casos no sexo feminino, no Brasil no ano de 2022. O perfil de escolaridade dos portadores de LTA é em maior proporção distribuídos entre baixa escolaridade e analfabetos (SINAN 2023). Esse cenário é comum às condições eco epidemiológicas da LTA no Brasil, cujo perfil epidemiológico é caracterizado em silvestre e rural/periurbano, onde o padrão de transmissão é associado a exploração da floresta (Brasil 2017). Nesse contexto, as populações mais acometidas pela doença são pessoas que exercem atividades relacionadas à exploração da mata, como agricultura e extrativismo.

No Amazonas não é diferente, o perfil epidemiológico dos portadores de LTA é relacionado a jovens de idade ativa, principalmente do sexo masculino (Naiff Júnior *et al.* 2009; Figueira *et al.* 2017; Silva *et al.* 2021). Exploração de áreas florestadas, como construção de novas estradas, usinas hidrelétricas, extração de madeira, instalação de núcleos residenciais, ecoturismo e os treinamentos militares constituem fatores importantes na epidemiologia da LTA na Amazônia (Guerra *et al.* 2003; Brasil 2017).

A LTA é considerada uma antropozoonose, zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais [mucura/saruê/gambá] e xenartros [Xenarthra] – tamanduás, preguiças e tatus). Portanto, o homem é hospedeiro acidental, adquirindo a infecção por *Leishmania* sp. ao adentrar em áreas florestais onde existem as enzootias das diferentes espécies do protozoário (Brasil 2017).

5. IMUNOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

No continente americano, a LTA é amplamente disseminada e caracterizada como uma doença tropical negligenciada (DTN), que afeta países subdesenvolvidos, principalmente em áreas rurais e desfavorecidas de políticas públicas (Yamey e Torrele 2002). Muitas as DTNs são constituídas por doenças estigmatizantes, principalmente entre populações pobres, sendo consideradas doenças relacionadas a/e perpetuadoras da pobreza (Alvar *et al.* 2006).

A LTA, apesar de ser possível a cura espontânea (da-Cruz *et al.* 2002), pode deixar cicatrizes desfigurantes (Herwaldt 1999), devido as lesões que acometem a pele dos portadores, as quais podem ser únicas ou múltiplas, localizadas ou até disseminadas pelo corpo. A manifestação dos sinais clínicos da doença vai de acordo com o processo infeccioso desencadeado pelo parasita, a qual também dependem de fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro (Sacks e Sher 2002; Brasil 2017).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma clínica mais comum e menos severa da doença e possui período de incubação que pode variar de duas semanas a dois meses. A lesão ulcerada é precedida por uma mácula, que perdura de um a dois dias depois da picada infectante. A mácula evolui formando uma pápula que aumenta progressivamente produzindo, geralmente, uma úlcera. Geralmente é indolor e costuma localizar-se em áreas descobertas do corpo, com lesões ulcerativas ou nodulares, com bordas bem delimitadas, eritematosa, infiltrada e com granulações (Satoskar 2014; Brasil 2017).

O Ministério da saúde (2017) classifica a LC em: a. forma cutânea localizada: lesão é geralmente do tipo ulcerada, com tendência a cura espontânea, podendo ser única ou múltipla; b. forma cutânea disseminada: a forma mais incomum, que pode ser observada em até 2% dos casos. Pode ser considerada uma das formas graves da doença; c. forma recidiva cútis: caracteriza-se por ativação da lesão nas bordas, após cicatrização da lesão, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial; d. forma cutânea difusa: constitui uma forma clínica rara e grave, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões da pele.

O processo infeccioso desencadeado pelas espécies de *Leishmania* é iniciada após a inoculação das formas infectantes do parasita (promastigotas metacíclicas), levando a interação com componentes do sangue e ativação do sistema complemento. A opsonização do parasita pelo sistema complemento ocorre de maneira rápida e eficiente, resultando em lise (destruição) dos parasitas inoculados. No entanto, os parasitas evoluíram com mecanismos de escape que lhes permitem resistir e contornar esse processo de lise, inibindo a ativação do complemento. Um desses fatores ocorre através de moléculas como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa (GP63), que medeiam sua ligação ao C3b inativado (iC3b) e impedindo a lise (CRs) (Dominguez *et al.*, 2003; Regli *et al.*, 2017; Filho *et al.*, 2021). Além do mais, as moléculas C3 e CBbi, em suas formas inativas, atuam ainda na opsonização do parasita, facilitando a fagocitose por meio de ligação dessas moléculas aos receptores do sistema complemento CR3 e CR1 presentes nas células, facilitando a entrada do parasita na célula-alvo e iniciando a fase intracelular da infecção.

Estes parasitas vivem preferencialmente em fagócitos mononucleares (macrófagos), mas podendo também, ser encontrados em células dendríticas e neutrófilos (Rittig e Bogdan, 2000). Uma vez estabelecida a vida intracelular no fagossomo, o parasita

internaliza seu flagelo passando a assumir a forma amastigota- forma mais adaptada ao pH ácido do meio, que possuem enzimas como a catalase em grandes concentrações e pode levar o parasito a explosão oxidativa dos macrófagos. Uma vez reconhecido, patógeno e fagócito se ligam e há a formação do fagossomo que, por sua vez, se unirá com o lisossomo, formando o fagolisossomo (Ndjamen *et al.* 2010). Nesse momento, a partir da apresentação dos antígenos a célula Th₀, a sua diferenciação para subpopulações Th₁ ou Th₂ são relacionadas ao curso clínico da infecção, estando o perfil Th₁ relacionado a cura e o perfil Th₂ a progressão da doença (Novais *et al.* 20114).

A produção local de citocinas como TNF- α e IL-12 impulsiona a resposta imune à secreção de citocinas Th₁, como IFN- γ , que ativam o macrófago para matar *Leishmania* através da produção do óxido nítrico (NO), principal molécula envolvida na morte do parasita. Esse mecanismo de defesa é fundamental no estágio inicial da infecção para prevenir doenças ou impedir a disseminação do protozoário (Machado 2019). Essa via de ativação geralmente induz um processo inflamatório intenso, levando à ativação dos macrófagos e destruição dos parasitas (Hernandez 2006). Em contrapartida, se a resposta for mediada por um padrão Th₂ (IL-4) permitirá que, dependendo da espécie do parasita, ocorra a disseminação local e a progressão da doença (Wilson *et al.* 2002; Murray *et al.* 2006). Em contrapartida, as células que apresentam o perfil Th₂ produzem IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas anti-inflamatórias, onde algumas delas podem inibir a ativação dos macrófagos. O perfil Th₂ está relacionado com a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. (Carvalho 2018).

Contudo, apesar da importância da resposta via Th₁ para cura da doença, uma resposta exagerada, pode desenvolver um quadro clínico de LMC e, em contrapartida, uma baixa indução da resposta Th₁ leva a maior concentração de parasitas nas lesões e pode manifestar um quadro de LCDf, paralelamente a esses extremos, pacientes que apresentam variados níveis de respostas por células T e variada titulação de anticorpos, são pacientes de LCL cujas lesões podem apresentar cura espontânea ou tornarem-se crônicas (Scott e Novais, 2016).

A patogenia da leishmaniose é complexa e está relacionada com diversos fatores, onde precisa ser levado em consideração as diferenças entre as espécies de *Leishmania*, o sistema imunológico do paciente infectado e a espécie do vetor. Como resultado, existe um espectro de manifestações clínicas a ser desenvolvida pelo paciente (Espir 2013; Ministério da Saúde 2017; Carvalho 2018).

6. DIAGNÓSTICO E FARMACOTERAPIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

6.1. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leishmaniose cutânea está relacionado com aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais apresentados pela doença, onde a aplicação e sensibilidade dos métodos vão variar de acordo com a forma clínica, o tempo de evolução da lesão e a espécie de *Leishmania* presente no hospedeiro.

A partir da presença de lesões típicas de leishmaniose, o diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser realizado, especialmente se o paciente reside em área endêmica ou esteve em locais onde há casos registrados da doença. O Ministério da Saúde (MS) preconiza a utilização de métodos de diagnóstico laboratorial que visa não somente a confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações

epidemiológicas, pela identificação da espécie circulante, orientando quanto às medidas a serem adotadas para o controle do agravo (Brasil 2017).

As amostras biológicas para a realização dos testes parasitológicos podem ser obtidas a partir da escarificação, esfregaço, impressão ou biópsia da lesão. O diagnóstico realizado por exame laboratorial direto baseia-se principalmente na pesquisa de parasitas em esfregaços das lesões em lâminas após a coloração de Giemsa. É o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução (Basano e Camargo 2004; Brasil 2017). É possível também realizar o diagnóstico por meio do cultivo *in vitro* em meios de cultivo ágar sangue modificado – Novy, MacNeal e Nicolle (NNN) e *Liver Infusion Triptose* (LIT), ou *in vivo* utilizando hamster dourado. Porém, tais técnicas podem apresentar uma baixa sensibilidade em casos que a lesão apresente uma baixa carga parasitária, dificultando assim o diagnóstico e necessitando de técnicas com maior sensibilidade (Brasil 2017; De Vries *et al.* 2015).

Pode-se realizar o diagnóstico de forma indireta, através da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasita (Intradermorreação de Montenegro – IDR), que deve ser medida em 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de endurecimento maior que 5mm. A IDR é um teste cutâneo que avalia a resposta tardia de hipersensibilidade celular (Basano e Camargo 2004; Skraba *et al.* 2015; Brasil 2017). Porém, a técnica de Intradermorreação de Montenegro não é amplamente utilizada por apresentar a possibilidade de um resultado falso positivo, já que podem ocorrer reações cruzadas com outras doenças parasitárias, como a doença de chagas por exemplo (Gomes *et al.* 2014; Santos *et al.* 2019).

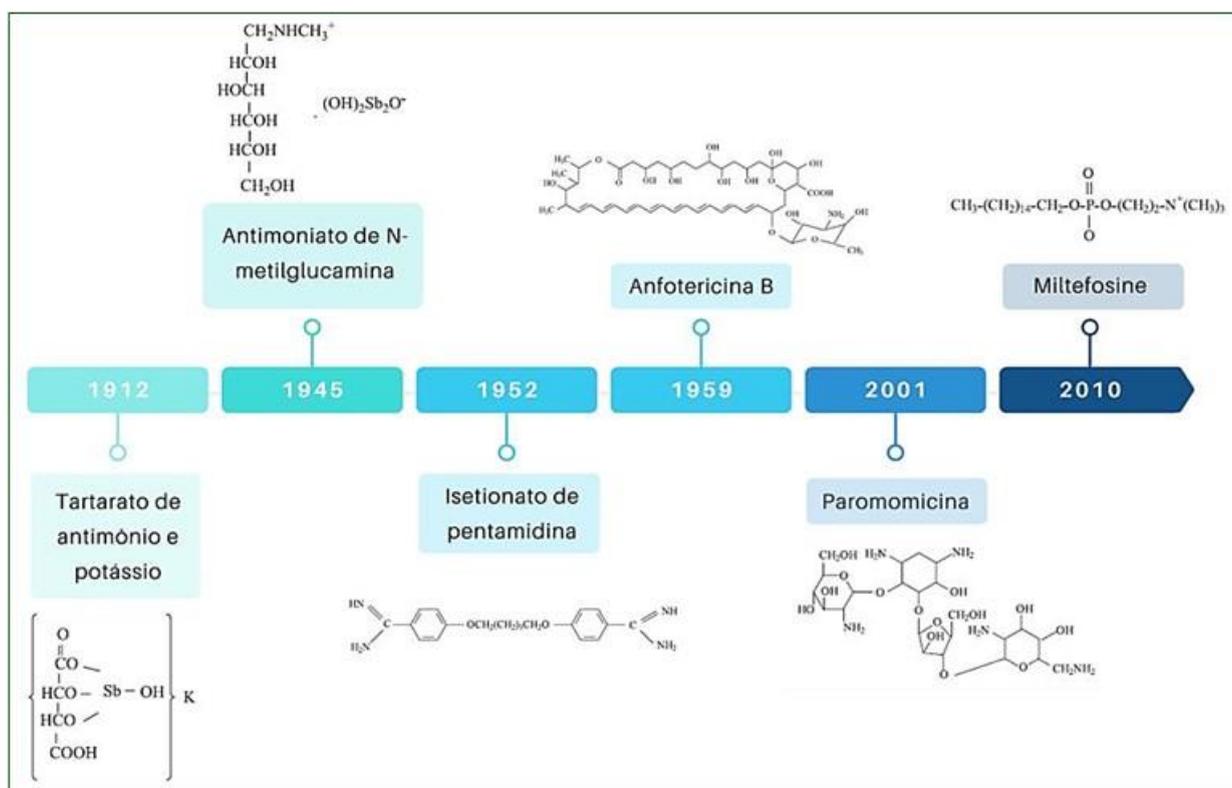
Métodos com maior sensibilidade e especificidade podem ser utilizados para o diagnóstico da leishmaniose cutânea, tais como, métodos sorológicos (imunofluorescência, ELISA e aglutinação direta) e moleculares, como o PCR (reação da polimerase em cadeia), com resultados satisfatórios para o diagnóstico (Savoia 2015; Brasil 2017). Os métodos moleculares permitem a identificação genética a nível de espécie de *Leishmania*, sendo uma alternativa eficaz nos casos que apresentam baixa carga parasitária e em pacientes imunossuprimidos (Gomes *et al.* 2014). A aplicação dessa técnica para identificação das espécies pode facilitar as medidas para controle na proliferação da doença. Porém, seu uso é limitado por ser uma técnica de custo elevado e pela necessidade de centros especializados para executar a técnica, dificultando sua aplicabilidade em áreas endêmicas (Castro *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2014).

6.2. TRATAMENTO CONVENCIONAL

A farmacoterapia da Leishmaniose tegumentar apresenta inúmeros desafios que são inerentes à complexidade das formas clínicas, via de administração invasiva e inúmeras reações adversas. Além disso, essa doença não possui vacinas ou fármacos como medidas profiláticas (Ferreira *et al.* 2012; Charlton *et al.*, 2017; Zulfiqar *et al.* 2017). Os antimoniais pentavalentes foram os primeiros fármacos adotados como terapia das leishmanioses, e em seguida o uso da anfotericina B, pentamidina, pentoxifilina e miltefosina (Figura 6), que ainda estão dentro do protocolo terapêutico indicado pelo Ministério da Saúde (Brasil 2017). Nessa mesma imagem, é possível acompanhar a linha histórica da introdução dos medicamentos utilizados para o tratamento da Leishmaniose tegumentar.

O tratamento para Leishmaniose foi introduzido pelo médico Gaspar Vianna, em 1912, com a administração do tártaro emético (antimônio trivalente). Por apresentar uma alta toxicidade, o seu uso clinicamente foi suspenso, até que o medicamento passasse por várias modificações, apresentando menores efeitos tóxicos ao paciente. No ano de 1947, os complexos de antimônio pentavalentes (Sb^{+5}), com efeitos menos tóxicos, foram introduzidos na farmacoterapia das leishmanioses (Vianna 1912; Rezende 2009; Carvalho *et al.* 2019).

Figura 6. Linha histórica da introdução dos medicamentos para o tratamento da Leishmaniose tegumentar no Brasil.



Fonte: Rath *et al.* 2003; Amato 2006; Arana *et al.* 2001; Lima *et al.* 2007; Machado *et al.* 2010.

O antimoniato de meglumina, conformação do antimoniato pentavalente, é utilizado até os dias atuais para a leishmaniose como uma das drogas de primeira escolha padronizada no Brasil. Contudo, o protocolo terapêutico passou por alterações, considerando hoje em dia a região, as espécies de *Leishmania* circulante e a resposta ao tratamento. Logo, a escolha do antimoniato ou anfotericina B lipossomal se aplica para quase todas espécies circulantes no país, exceto pacientes acometidos com *L. guyanensis*, onde será indicada a pentamidina (Brasil 2017).

O antimoniato pentavalente é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônio e da N-metil-glucamina (obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina), sendo assim, hidrossolúvel e pouco solúvel em compostos orgânicos (Rath *et al.* 2003). O mecanismo de ação dessa droga ainda é pouco elucidado, no entanto, o mais aceito envolve interferência na bioenergética da forma amastigota de *Leishmania*. Tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP (adenosina trifosfato) e GTP [guanina trifosfato] (Berman 1998).

Sugere-se que o antimônio pentavalente (Sb^V) comporte-se como pró-fármaco, sendo convertido ao antimônio trivalente (Sb^{III}), sendo possível explicar a partir da reação de óxido-redução, onde a Glutathione reduzida induz a redução de Sb^V , sendo assim, apresentando atividade antileishmaniana (Frézard *et al.* 2001). Embora o antimoniato pentavalente já seja utilizado há mais de meio século e apresente menor toxicidade que os antimoniais trivalentes, pode desencadear ainda inúmeros efeitos colaterais, como toxicidades cardíaca, pancreática, renal, artralguas, mialgias e dores abdominais (Silva 2012). Esse medicamento é contraindicado, por exemplo, para gestantes e no uso concomitante de beta-bloqueadores ou antiarrítmicos. A hepatotoxicidade também é frequente e pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados (Franke *et al.* 1990; Marzochi 2010).

Há mais de 20 anos vem sendo discutido a possibilidade de tratar os pacientes com Leishmaniose tegumentar por meio de baixas doses de antimoniato de meglumina, para favorecer a redução dos efeitos colaterais, dor no local da injeção e maior adesão dos pacientes ao tratamento (Oliveira-Neto *et al.* 1996). Esses benefícios podem ser observados no trabalho de Oliveira-Neto e Mattos (2006), administrando nos enfermos uma única ampola desse medicamento pela via IM, em intervalos de um dia até a epitelização completa das úlceras e a ausência de qualquer cicatriz eritematosa, períodos estes, com durabilidade de 3 à 10 semanas de aplicação e após seis semanas do tratamento, foram retratados com a dose de 15 mg Sb^V /Kg/dia por 21 dias, mostrando a cura clínica dos pacientes.

Contudo, para os pacientes com contraindicação da administração desse fármaco por via sistêmica, a alternativa terapêutica usual é a administração pela via intralésional (IL), inclusive como descrito nas diretrizes da OPAS desde 2013, recomendando assim, o uso do antimoniato pentavalente a cada 3-7 dias para lesões menores que 3 cm e não localizadas em superfícies articulares ou faciais (OPAS 2013). O estudo de Arboleda *et al.* (2019) mostrou uma série de casos bem sucedidos ao administrar o antimoniato de meglumina pela via IL. Em cada sessão foi infundido de 1 à 5 mL do medicamento, dependendo do tamanho da lesão, com uma média de 4,36 doses nos intervalos de 4 aos 9 dias, onde onze dos doze pacientes com LC tratados apresentaram cura completa.

A anfotericina B é um antibiótico polieno que interage com ergosterol da membrana celular, promovendo alteração da permeabilidade celular e do balanço iônico, causando a morte celular (Robets 2003; Tiunan *et al.* 2011). Considerada droga de primeira escolha para gestantes, sua atuação se dá nas formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* (Marzochi 2010). No entanto, esta droga é contra indicada para pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas. As reações adversas mais frequentes são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (Brasil 2017).

A anfotericina B pode ser encontrada também na forma lipossomal, composta de fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, o fármaco atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Esta droga é registrada para uso no tratamento da leishmaniose visceral, mas também pode ser empregada no tratamento da Leishmaniose tegumentar quando as outras indicações terapêuticas não obtiverem sucesso ou forem contraindicadas (Brasil 2017).

O isetionato de pentamidina faz parte do grupo das amidinas, composto orgânico da guanidina, usado pela via intramuscular, de eliminação lenta, deposita-se principalmente no fígado e nos rins, também é considerada uma droga de segunda escolha

no Brasil (Brasil 2017; Silva 2012). Segundo o trabalho de Neves (2011), a pentamidina apresentou eficácia similar ao antimoniato pentavalente para o tratamento de Leishmaniose tegumentar, para espécie *L. guyanensis*, e tem vantagem de ser utilizada por tempo mais curto e apresentar menos efeitos adversos.

Existem diferentes hipóteses para o mecanismo de ação da pentamidina, dentre elas, a interferência no transporte de aminoácidos, interferência na captação ou função das poliaminas, inibição da síntese de DNA e RNA, proteínas e fosfolipídeos, interferindo assim na respiração aeróbica e anaeróbica dos tripanossomas (Waring 1965; Gale e Folkes 1967; Alchalabi e Gutterrid 1977; Meshnick e Cerami 1984;). Os eventos adversos mais comuns são dor no local da aplicação, vômitos, mialgia, hipotensão, síncope e hipoglicemia (Brasil 2017).

A pentoxifilina vem a ser um fármaco da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas. Embora seja o único medicamento de via oral recomendado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da Leishmaniose tegumentar, o seu uso se dá em combinação com o antimoniato de meglumina, uma vez que não possui indicação como monofarmacoterapia. Esse fármaco é apresentado como comprimido revestido, de liberação prolongada, contendo 400 mg de pentoxifilina. Algumas pesquisas têm demonstrado sucesso no emprego da pentoxifilina como coadjuvante (imunomodulador) no tratamento da Leishmaniose tegumentar, reduzindo a toxicidade do antimônio pentavalente, contribuindo com o desfecho de cura em menor tempo quando comparado ao tratamento convencional e evitando o segundo ciclo da terapia com o medicamento de primeira escolha (Machado *et al.*, 2007; Brasil 2017).

A administração de altas dosagens podem desencadear distúrbios gastrintestinais, náusea, vômito, arritmia cardíaca, entre outros. A sua contraindicação é para pacientes menores de 12 anos, grávidas, lactentes, distúrbios hemorrágicos, entre outros. Apesar de apresentar estudos escassos sobre a sua aplicação, já possui uma PORTARIA (Nº 67, DE 19 DE NOVEMBRO DE 2015), referente à decisão quanto a ampliação do uso da pentoxifilina 400 mg em associação ao antimonial para o tratamento da Leishmaniose tegumentar mucosa no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS (Brasil 2015; Brasil 2017).

Outro medicamento que vem apresentando relevância para o tratamento da Leishmaniose tegumentar é a miltefosina, desenvolvida inicialmente como agente antineoplásico (Almeida e Santos 2011). Este fármaco também é administrado pela via oral e é usado na Índia para o tratamento da Leishmaniose visceral (Soto *et al.* 2004). O estudo de Chrusciak-Talhari *et al.* (2011) mostrou a eficácia da miltefosina contra *L. guyanensis*, resultando eficácia na cura superior ao antimônio.

É estimulado o uso da miltefosina combinada com outros medicamentos, para otimizar o efeito terapêutico. O uso desse fármaco associado com a pentamidina intralesional já apresentou uma taxa de cura de 92% para *L. braziliensis* na Bolívia (Soto *et al.* 2018). Contudo, o mecanismo de ação não é bem esclarecido, mas pode estar relacionado com a interferência no metabolismo de fosfolipídeos, na transdução de sinal, na homeostase de cálcio e na síntese de RNA, induzindo à morte celular (Costa-Filho *et al.* 2008; Alonso *et al.* 2019).

Embora os medicamentos preconizados pelo Ministério da saúde mostrem eficácia relativa para o tratamento da Leishmaniose tegumentar, o seu custo é bem expressivo e, às vezes, dificulta o acesso para os enfermos. Muitos precisam buscar o recurso do Sistema Único de Saúde, onde esses medicamentos convencionais estão na Relação Nacional de

Medicamentos Essenciais - RENAME [Tabela 1] (Nagle *et al.* 2014; ANVISA 2020). Esses fatores estimulam a busca de alternativas terapêuticas para um tratamento da leishmaniose com melhor eficácia e custo mais acessível.

Tabela 1 – Relação da eficácia e custo dos medicamentos padrões para a Leishmaniose Tegumentar.

Droga Padrão	Eficácia	Custo
Anfotericina B	>95%	R\$ 20,21 ^F
Anfotericina B lipossomal	~100%	R\$ 504,79 ^F
Isetionato de pentamidina	70 – 80%	**
Antimoniato de meglumina	35 – 95%	R\$ 290,38 ^C
Pentoxifilina	*	R\$ 35,59 ^C

* Estudo avalia associação com drogas padrões; ** Medicamento não presente na lista de compra de medicamentos. ^F Valor por Frasco; ^C Valor por Caixa.

Fonte: Modificado NAGLE *et al.* 2014; Brasil, 2017; ANVISA, 2020.

REFERÊNCIAS

- [1] Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votýpka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349. DOI: [10.1371/journal.pntd.0004349](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349). Acesso em: 05 jan. 2020.
- [2] Altamirano-Enciso, A. J.; Marzochi, M. C.; Moreira, J. S.; Schubach, A. O.; Marzochi, K. B. 2003. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 10, 853-882.
- [3] Alvar, J.; Yactayo, S.; Bern, C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 12: 552-557.
- [4] Alvar, J. Et Al. 2012. Leishmaniasis Worldwide And Global Estimates Of Its Incidence. *Plos One*, 7(5): 123-134.
- [5] Amato, V. S. 2006. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista*, 3(26), 2-6.
- [6] Arana, B. A.; Mendoza, C. E.; Rizzo, N. R.; Kroeger, A. 2001. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5), 466-470.
- [7] Basano, S. D. A., & Camargo, L. M. A. (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7, 328-337.
- [8] Bastos, T. S. A. 2012. Estudos introdutórios sobre flebotomíneos. *Ciência Animal*. Goiás.
- [9] Brandão Filho, S. P. 2004. Flebotomíneos do Brasil. (org.). Rio de Janeiro: *Editora da Fiocruz*, 368 pp.
- [10] Brasil. 2017. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 ed. Brasília.
- [11] Castellano, L. R. C. 2005. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *Parasite*, p. 1-19.
- [12] de Castro, E. A., Luz, E., Telles, F. Q., Pandey, A., Biseto, A., Dinaiski, M.; Soccol, V. T.; *et al.* 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. *Acta tropica*, 93, 141-149.
- [13] de Oliveira, L. F. G.; Pereira, B. A. S.; Gilbert, B.; Corrêa, A. L.; Rocha, L.; Alves, C. R. 2017. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. *Phytochemistry reviews*, 16, 219-233.
- [14] de Vries, H. J.; Reedijk, S. H.; Schallig, H. D. 2015. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology*, 16, 99-109.

- [15] Fagundes-Silva, G. A.; Romero, G. A. S.; Cupolillo, E.; Yamashita, E. P. G.; Gomes-Silva, A.; Guerra, J. A. D. O.; Da-Cruz, A. M. 2015. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 797-800. Doi: [10.1590/0074-02760150128](https://doi.org/10.1590/0074-02760150128).
- [16] Figueira, L. D. P. 2013.: Figueira, L.P. *et al.* 2017. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. 47(1): 47 -52 *Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional*. 180 f. Dissertação de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- [17] Gomes, C. M.; de Paula, N. A.; Morais, O. O. D.; Soares, K. A.; Roselino, A. M.; Sampaio, R. N. R. 2014.: Guerra, J.A.O. *et al.* 2003. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (5): 587-590. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89, 701-709.
- [18] Lainson, R. 2010. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.
- [19] Lainson, R., & Shaw, J. J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Dendrick R (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine, Biology and Epidemiology*, *Academy Press*, London, 1-20.
- [20] Lainson, R.; Shaw, J. J. 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, 273-5664, 595-600.
- [21] Lainson, R.; Shaw, J. J.; Silveira, F. T.; Braga, R. R.; Ishikawa, E. A. 1990. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 65(5-6), 282-284.
- [22] Lima, E. B. D.; Porto, C.; Motta, J. O. C. D.; Sampaio, R. N. R. 2007. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82, 111-124.
- [23] Lipoldová, M.; Demant, P. 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*, 7, 294-305.
- [24] Machado, P. R.; Ampuero, J.; Guimarães, L. H.; Villasboas, L.; Rocha, A. T.; Schriefer, A.; *et al.* 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLOS Neglected tropical diseases*, 4(12), e912.
- [25] Marzochi, M. C. D. A.; Marzochi, K. B. F. 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(supl 2), S359-S375.. DOI: [10.1590/S0102-311X1994000800014](https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000800014).
- [26] Miranda, L. D. F. C. (2011). *Sensibilidade ao antimônio pentavalente in vitro de amostras de Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas antes e após o tratamento de pacientes*. Dissertação de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro,
- [27] Monteiro, C. M. C. C. 2009. *Leishmaniose Tegumentar Americana: uma abordagem farmacológica*. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Tecnologia Farmacéutica, Goiânia. Goiás.
- [28] Monteiro, L. M. 2013. *Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofurural: preparação, caracterização físico-química e avaliação in vitro da atividade leishmanicida potencial*. Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo).
- [29] Naiff, R. D., Freitas, R. A. D., Naiff, M. D. F., Arias, J. R., Barret, T. V., Momen, H., & Grimaldi Júnior, G. 1991.: Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, 317-321. DOI: [10.1590/S0074-02761991000300006](https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000300006).
- [30] Naiff-Jr., R.D. *et al.* 2009. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose tegumentar americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil.38(2):103-114.
- [31] Neves, D. P. 2003. Parasitologia dinâmica. In *Parasitologia dinâmica*, p. 474-474. Neves, D. P. 2009. *Parasitologia dinâmica*. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu.

- [32] Neves, L. O.; Talhari, A. C.; Gadelha, E. P. N.; Silva Júnior, R. M. D.; Guerra, J. A. D. O.; Ferreira, L. C. D. L.; Talhari, S. 2011. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86, 1092-1101. DOI: [10.1590/S0365-](https://doi.org/10.1590/S0365-)
- [33] Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; Jesús, M. N. D.; Marzal, P. C.; *et al.* 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química nova*, 26, 550-555.
- [34] Rittig, M. G.; Bogdan, C. 2000. Leishmania-hostcell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, 16, p. 292-297.
- [35] Santos, R. V.; Coimbra Jr, C. E. 1994. Saúde & Povos Indígenas. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 336 - 344.
- [36] Santos, T. T.; Cardoso, M. S.; Machado, A. S.; Siqueira, W. F.; Ramos, F. F.; Oliveira-da-Silva, J. A.; Coelho, E. A.; *et al.* 2019. Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: a potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103783.
- [37] Savoia, D. 2015. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *Journal of Infection Developing Countries*.
- [38] Schlein, Y. 1993. Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, 9, 255-258.
- [39] Silva, E.O. *et al.* 2021. Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with *Libidibia ferrea*. *Acta Brasiliensis*. 5(3): 97-102
- [40] Silveira, F. T.; Müller, S. R.; de Souza, A. A.; Lainson, R.; Gomes, C.; Laurenti, M. D.; Corbett, C. E. 2008.: Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina*, 22, 9-20.
- [41] Sinan. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan net/cnv/ltabr.def> (2019). Acesso em: 01 Junho 2023.
- [42] Skraba, C. M.; Mello, T. F. P. D.; Pedroso, R. B.; Ferreira, É. C.; Demarchi, I. G.; Aristides, S. M. A.; Silveira, T. G. V.; *et al.* 2015. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48, 437-444.
- [43] Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Rodrigues, J. C. F.; Crepaldi, P. H.; Pimenta, P. F. P.; de Souza, W. 2013. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*, *Fundação CECIERJ*. 1 ED. Rio de Janeiro. 2013.
- [44] Vale, E. C. S. D.; Furtado, T. 2005. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 80, 421-428.
- [45] Vasconcelos, J. M.; Gomes, C. G.; Sousa, A.; Teixeira, A. B.; Lima, J. M. 2018. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 50, n. 3. DOI: [10.21877/2448-3877.201800722](https://doi.org/10.21877/2448-3877.201800722). Acesso em: 1 out. 2020.

Contexto Histórico do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Antonia Maria Ramos Franco, Aghata Beatriz Bezerra Jensen, Bruno Bezerra Jensen, Francimeire Gomes Pinheiro, Erika Oliveira da Silva, Paula Figliuolo da Cruz Borges

O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) é uma instituição pública de administração federal brasileira criada em 1952, vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Tem como missão de gerar e disseminar conhecimentos, tecnologias e inovações, além de capacitar pessoas para contribuir na formulação de políticas públicas e ações para o desenvolvimento sustentável da Amazônia, executando pesquisas que envolvem diversas áreas de atuação, relacionadas com as mudanças climáticas, biodiversidade, ciências da saúde, tecnologias, sociedade e ambiente. Sua sede é em Manaus-AM, mas possui quatro núcleos de pesquisas localizados nos Estados do Acre, Roraima, Pará e Rondônia.

O INPA ao longo dos anos, vem realizando estudos científicos do meio físico e das condições de vida da região amazônica para promover o bem-estar humano e o desenvolvimento socioeconômico regional. Os primeiros anos do INPA foram caracterizados pelas pesquisas relacionadas aos levantamentos e inventários de fauna e de flora. Hoje, o desafio é expandir de forma sustentável o uso dos recursos naturais da Amazônia. Para cumprir o desafio, o Instituto possui as coordenações gerais de Capacitação, Administração, Ações Estratégicas, Extensão, e quatro Coordenações de Pesquisas atuando nos seguintes focos: Dinâmica Ambiental; Sociedade, Ambiente e Saúde; Tecnologia e Inovação e Biodiversidade.

A Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (COSAS) é a junção de três trajetórias de pesquisas nas áreas de saúde e nutrição, agricultura amazônica, e ciências humanas e sociais, cujo histórico se inicia juntamente com a criação do INPA. Em 2015, essas três trajetórias se unificaram constituindo a atual COSAS.

Antes dessa consolidação, deu-se início pela formação da divisão de Pesquisas Médicas, que depois de quatorze anos, passou a ser Departamento de Patologia Tropical e em seguida denominada como Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde (CPCS). Essa estrutura de pesquisas foi se estruturando com estudos sobre doenças tropicais, especialmente malária, leishmaniose, oncocercose, dermatoses e nutrição infantil, sendo referência em estudos de vetores de doenças associadas com o ambiente.

Atualmente, a COSAS é formada por nove grupos de pesquisas, sendo um deles intitulado “Pesquisas integradas em Leishmaniose e Doença de Chagas na Região Amazônica”, gerenciado pelo Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, lotado na COSAS/INPA.

O laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas está instalado no antigo prédio sede da Coordenação de Ciências da Saúde. O Laboratório foi criado em 1975, logo depois da chegada do Dr. Jorge Ramón Arias (1943-2014), doutor em Entomologia médica pela Universidade da Califórnia e os primeiros técnicos, juntamente com a participação do pesquisador e entomólogo Rui Alves de Freitas que já pertencia ao quadro de funcionários do INPA, formando assim um grupo de pesquisa para estudar a leishmaniose nesta região.

Os integrantes pioneiros do Laboratório contribuíram com estudos realizados no período de 1975 a 1978, na área da Entomologia, estudando os vetores flebotomíneos: realizando levantamento da fauna, dissecação para pesquisa de transmissores, e tentativa de isolamento de *Leishmania* sp. por inoculação dos parasitos em tecidos de hamsters e estudos taxonômicos dos insetos vetores. Esses estudos iniciais foram nas áreas próximas à rodovia AM-010 e nas matas ao redor dos conjuntos Parque 10 de novembro e Parque da Laranjeiras (no município de Manaus).

As coletas dos flebotomíneos eram realizadas por meio de capturas diretas com isca humana ou armadilhas do tipo CDC, importadas dos EUA, com o intuito de coletar espécimes de *Lutzomyia umbratilis* (Peixoto, 2020), vetor da *Leishmania (Viannia) guyanensis*, o principal agente etiológico causador da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na região de amazônica e países fronteiras como Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela (Borges, Gomes e Ribeiro-Dias, 2018). A confirmação de *L. (V.) guyanensis* ser transmitida por *L. umbratilis* foi realizada pelos pesquisadores do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas entre os anos de 1977 e 1982 (Peixoto 2020).

O entendimento sobre a distribuição espacial e ecológica dos flebotomíneos foi o foco de estudos do laboratório, diante da importância da vigilância epidemiológica das leishmanioses. Os pesquisadores Dr. Jorge Arias e Ruy Freitas, entre 1976 e 1977, sugeriram que o complexo fluvial do rio Amazonas atuava como barreira natural na distribuição dos ciclos entre a tríade epidemiológica vetor-parasito-homem, uma vez que encontraram *L. (V.) guyanensis* em moscas capturadas ao norte do rio Amazonas, e não foi capturado flebotomos oriundos da região ao sul do rio Amazonas infectados com o protozoário (Arias e Freitas 1978; Peixoto 2020).

Um marco importante para o laboratório foi atribuído a chegada de três novos pesquisadores, primeiramente o casal Roberto e Maricleide Naiff, discípulos de Lainson e Shaw no Instituto Evandro Chagas (Belém-PA), e do entomólogo britânico Dr. Toby Vincent Barrett. Os novos pesquisadores contribuíram grandemente com a diversificação da produção científica acerca dos protozoários e vetores da LTA. Em 1986, Dr. Jorge Arias deixou o INPA e o Amazonas a convite da representação da Organização Pan-americana em Saúde (OPAS) (Peixoto 2020).

Com a contratação do pesquisador Roberto Daibes Naiff em 1979, foi estabelecido a área de Protozoologia, dando assim início aos trabalhos com animais silvestres, e o isolamento de cepas de *Leishmania* do homem. A ampliação da equipe técnica em 1985 possibilitou a abertura de Convênios e financiamentos de projetos de pesquisas (Eletronorte, Petrobrás, Ministério da Saúde e Organização Mundial da Saúde), facilitou o acesso em novas áreas distintas para pesquisa de campo, compra de veículo e aquisição de equipamentos, o que permitiu instituir o criobanco de parasitos.

No ano de 1990, com a aprovação do projeto de pesquisa junto ao Convênio Fundação Banco do Brasil, foi possível investir na aquisição de equipamentos para melhor consolidação das pesquisas desenvolvidas. Esse fortalecimento do grupo foi dado com as cooperações interinstitucionais, como, o Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, em parceria com a equipe do Dr. Gabriel Grimaldi Jr., onde foi possível desenvolver estudos de caracterização molecular dos parasitos e vetores, o qual resultou uma série de publicações conjuntas.

A Dra. Antonia Maria Ramos Franco é pesquisadora do INPA desde o ano 2000, onde é responsável pelo laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas da Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde (COSAS), da qual foi coordenadora no período de 2015 a 2018. No ano de 2002, a referida pesquisadora bem como os outros integrantes do grupo de pesquisa deram início a cooperação junto ao Centro de Instrução de Guerra na Selva (CIGS), para o desenvolvimento de estudos dos vetores transmissores de *Leishmania* sp. nas bases de instrução do Centro.

De 2007 a 2011 o Laboratório participou dos estudos na região Amazônica do alto rio Negro, explorando os componentes do ciclo da Leishmaniose (Insetos x Reservatórios humanos e silvestres x Parasitas). Esses resultados subsidiaram a publicação do livro “Desvendando as fronteiras do conhecimento na região Amazônica do alto rio Negro” no ano de 2012 pela editora INPA.

Posteriormente, deu início aos projetos de pesquisa envolvendo estudos com compostos nanotecnológicos e produtos naturais em ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, visando estudos com extratos, frações e substâncias de origem natural e sintética com atividade antileishmania, efeitos citotóxicos e mutagênicos. Esses estudos foram realizados por meio dos convênios internacionais, envolvendo diversos países (Finlândia, Itália, Ucrânia, Brasil, Estados Unidos da América e Marrocos) que participaram dos projetos com a comunidade Europeia VAIKUTUS (2012-2016) e o com apoio da FAPEAM – Programa Horizon 2020 – VAHVISTUS (2017-2022).

A pesquisadora também atua em estudos sobre formulações farmacêuticas para doenças negligenciadas, ensaios de imunomodulação e estudos epidemiológicos com insetos vetores, além de orientar alunos de pós-graduação nas áreas de Biotecnologia, Ciências da saúde, Parasitologia, Entomologia, Imunologia e Inovação farmacêutica pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e INPA. Até o corrente ano (2023), já orientou mais de 100 alunos, sendo 58 de iniciação científica, 23 mestres e 21 doutores.

No ano de 2015, o laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, sob coordenação da Dra. Antonia Franco, coordenou com imensa satisfação e entusiasmo a primeira Conferência Internacional em Leishmaniose Cutânea (ICCLEISH) na região norte do Brasil, e com apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), SES-AM (Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas), DNDI (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*), INPA, FIOCRUZ, UFAM e Ministério da Defesa. E em 2017, teve a honrosa oportunidade de coordenar a participação do INPA no AMAZONLOG17.

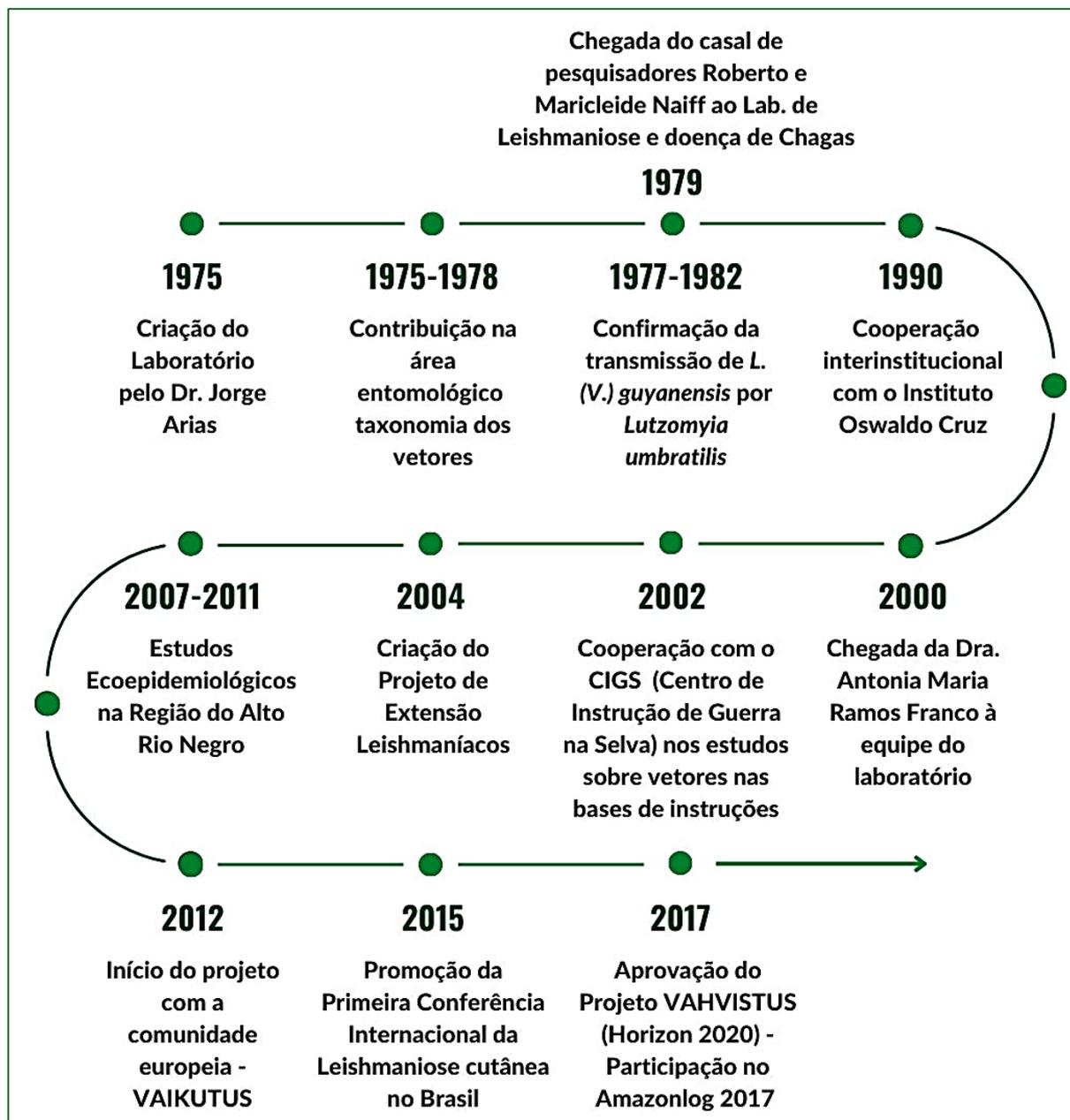
No âmbito da educação em saúde, o laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas participa do “O circuito da ciência”, um projeto de extensão do INPA organizado em eventos mensais no Bosque da Ciência. Este projeto é executado como compromisso com a sociedade por meio da propagação do conhecimento e sensibilizando multiplicadores do conhecimento, principalmente o público infanto-juvenil. Nesse projeto, a participação do laboratório é com a apresentação do teatro de fantoche intitulado *Leishmaníacos*, o qual abordava informações acerca da LTA e seus cenários epidemiológicos, principalmente sobre a endemicidade da doença em comunidades rurais. O enredo do fantoche era protagonizado pela personagem Aninha, uma típica cidadã amazônida, residente em áreas endêmicas da LTA (Figura 1). A primeira apresentação do teatro deu-se no ano de 2004 em comemoração aos 50 anos do INPA, no Amazonas shopping.

Figura 1. Integrantes do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, apresentando o teatro de fantoche “*Leishmaníacos*” no circuito da Ciência, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, ano de 2004.



Na figura 2 é possível acompanhar os principais eventos históricos do Laboratório de Leishmaniose e Doença de chagas – INPA em uma linha de tempo de 1975 até 2017.

Figura 2. Linha histórica do Laboratório de Leishmaniose e Doença de chagas.



Atualmente, o laboratório reúne as instalações experimentais das áreas de biologia molecular, imuno-bioquímica, salas com fluxo laminar (segurança NB2) e capela para cultivo e/ou ensaios com células de linhagem primária e parasitária, setor de Entomologia e de desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Estas instalações são utilizadas para a realização de atividades de ensino e pesquisa, além de estudos de desenvolvimento tecnológico.

O Laboratório de leishmaniose e doença de Chagas reúne um total de 63 publicações e 04 depósitos de patentes, os quais consolidam a expertise técnico-científico de seus estudantes e pesquisadores nas áreas da Parasitologia, Imunologia, Bioquímica, Farmácia e Epidemiologia, para deixar conhecimento e informação à sociedade.

O Laboratório de Leishmaniose e Doença de chagas possui uma equipe multidisciplinar, com integrantes de vários níveis acadêmicos, de graduação à doutores. Entre eles, profissionais da área da Biologia, Biomedicina, Enfermagem, Farmácia, Medicina humana e veterinária. Na figura 3, estão presente alguns colaboradores do referido Laboratório. Acompanhando da direita para esquerda, Paula Figliuolo (Pesquisadora Visitante), Francimeire Pinheiro (Servidora Federal), Juliana de Moraes (Aluna de Doutorado PPGIBA-UFAM), Ana Cleide (Servidora Técnica), Antonia Franco (Pesquisadora Titular), Richaelly Pinheiro, Rebecca Hanada, Luana Raabe e Luanna Garcez (Alunas de Iniciação Científica) e Bruno Jensen (Pesquisador Visitante).

Figura 3. Alguns integrantes da equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de chagas/INPA.



Vale salientar que os principais objetivos do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas são:

- Gerar dados científicos de alta confiabilidade e de aplicá-los ou torná-los disponíveis para a população;
- Prestar serviços de assessoria técnica especializada nas áreas de diagnóstico parasitológico, identificação de vetores, e diagnóstico ambiental em situações onde as parasitoses estudadas apresentam problemas reais ou potenciais de saúde pública.
- Formar recursos humanos altamente qualificados de alunos de iniciação científica aos de pós-graduação;
- Desenvolver novos produtos farmacêuticos com aplicabilidade ao tratamento alternativo da leishmaniose tegumentar, por meio de bioativos (bioprospecção de vegetais), substâncias sintéticas e recursos nanotecnológicos;
- Estudar o perfil imunológico de pacientes diagnosticados com

Leishmaniose tegumentar.

Diante deste contexto histórico, gostaríamos de deixar os nossos agradecimentos aos membros antigos e atuais do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, que realizaram trabalhos de qualidade que puderam transcender os conhecimentos gerados pelo grupo que até chegaram à comunidade.

Nos próximos capítulos será possível acompanhar alguns dos trabalhos produzidos pelos membros da equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, que contemplarão as áreas de diagnóstico clínico, laboratorial (por técnicas moleculares e bioquímicas) e desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença tegumentar.

REFERÊNCIAS

- [1] Arias, J. R.; Freitas, R.A. 1978. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil: incidência de flagelados em flebótomos selváticos. *Acta Amazônica* 8(3): 387-396.
- [2] Borges, A.F.; Gomes, R.S.; Ribeiro-Dias, F. 2018. *Leishmania (Viannia) guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. *Pathog Dis.* 76(4): 1-10.
- [3] Peixoto, C.O. 2020. Saúde, ciência e desenvolvimento: a emergência da leishmaniose tegumentar americana como desafio médico-sanitário no Amazonas. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* 27 (3): 741-761.

CAPÍTULO

03

Análise espacial e temporal de casos de Leishmaniose cutânea no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, no período de 2020 a 2021

Maria Clara Abreu Mota de Oliveira Ramos Ferro, Bruno Bezerra Jensen, Francimeire Gomes Pinheiro, Juliana Maria de Moraes, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco, Paula Figliuolo da Cruz Borges

Resumo: A análise da distribuição espacial de uma doença permite a avaliação das demandas sociais de um município em relação ao atendimento e medicamentos, além de expor focos de contaminação e áreas com maior necessidade de vigilância. Diante disso, este projeto tem como proposta utilizar o geoprocessamento para uma análise espacial e temporal de casos notificados de LC em um dos municípios com maior índice de prevalência e incidência de LTA no Amazonas. A área de estudo foi o município de Rio Preto da Eva. Os dados foram coletados na Unidade Básica de Saúde Ednaide Lopes da Costa, local onde pacientes obtêm diagnóstico e tratamento para leishmaniose, através das fichas de notificação epidemiológica preenchidas pelos profissionais de saúde com as informações dos pacientes. As coordenadas geográficas de cada localidade foram retiradas do GoogleMaps com o endereço constatado nas fichas de notificação, os dados foram utilizados no Software QGIS. Os prováveis locais de infecção dos casos de LC foram em maioria áreas rurais, em ramais, sítios e fazendas próximas ao centro do município, no qual é cortada pela rodovia AM 010 que liga RPE a Manaus e Itacoatiara, podendo estar relacionada o deslocamento de pessoas infectadas entre esses municípios para o alto número de casos nessa área, e a falta de infraestrutura e planejamento da rodovia que aumentam o risco de contaminação. A partir do geoprocessamento é possível mapear focos de contaminação e criar estratégias de prevenção nesses locais, no caso de RPE fragmentos florestais dentro do perímetro urbano, o centro da cidade e áreas isoladas próximas da rodovia. As ferramentas digitais relacionando aos casos a variáveis ambientais também podem indicar qual período é mais ideal para aplicar essas estratégias, sendo o primeiro trimestre do ano o observado no presente estudo como período com maior número de casos e com maior pluviosidade.

Palavras-chave: análise espacial, notificação, diagnóstico.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país hiperendêmico para LTA, com o maior número de casos notificados em toda América do Sul (Alvar *et al.* 2012), destaca-se por sua ampla distribuição no Brasil, com número alto de casos no Amazonas (SINAN/SVS/MS 2020), a capital Manaus apresenta maior incidência de casos (50,6%), seguido por Rio Preto da Eva (12,2%) (Maciel 2012).

O geoprocessamento é definido como um conjunto de tecnologias de coleta de dados que produz informação demográfica e contribui para o reconhecimento das condições de risco no território, importante ferramenta para a identificação, localização, acompanhamento e monitoramento de populações (Rocha 2000; Chiesa 2002).

A análise da distribuição espacial de uma doença permite a avaliação das demandas sociais de um município em relação ao atendimento e medicamentos, além de expôr focos de contaminação e áreas com maior necessidade de vigilância (Lapa *et al.* 2006). Apesar do georreferenciamento ser uma técnica amplamente utilizada na vigilância de endemias no Brasil, ainda são escassos os estudos de monitoramento espacial da LTA na Amazônia.

Diante disso, este projeto tem como proposta utilizar o geoprocessamento para uma análise espacial e temporal de casos notificados de LC em um dos municípios com maior índice de prevalência e incidência de LTA no Amazonas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo foi o município de Rio Preto da Eva. Os dados foram coletados na Unidade Básica de Saúde Ednaide Lopes da Costa, local onde pacientes obtêm diagnóstico e tratamento para leishmaniose, através das fichas de notificação epidemiológica preenchidas pelos profissionais de saúde com as informações dos pacientes. Foram analisadas 56 fichas de atendimento dos anos de 2020 e 2021, sendo recolhidos detalhes da doença, como presença da lesão, histopatologia, forma clínica, droga inicial administrada, quantidade de ampolas do medicamento para o tratamento e o provável local da infecção, e detalhes socioculturais como localidade da residência, idade, sexo, escolaridade, ocupação e etnia.

Os dados foram utilizados para montagem do perfil dos pacientes acometidos pela LC, e para posterior confecção dos mapas epidemiológicos e estatística espacial. As variáveis ambientais de precipitação e temperatura também foram utilizadas para a associação com a notificação dos casos durante todo o período de estudo.

As coordenadas geográficas de cada localidade foram retiradas do GoogleMaps com o endereço constatado nas fichas de notificação, os dados foram utilizados no Software QGIS (disponível em <https://www.qgis.org>) para geração do mapa com os possíveis locais de infecção, os detalhes como relevo e extensão da rodovia AM 010 foram retiradas do banco de dados do IBGE, presentes no próprio software.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pacientes acometidos com LC tiveram ampla variação na idade com registros de pessoas de 2 até 56 anos, com média de 27 anos, sendo a maioria (63%) homens com ocupações relacionadas ao trabalho no campo, caseiros, agricultores, pescadores, etc. A

maioria dos pacientes avaliados nas fichas de notificação foi auto identificada como parda e tem como escolaridade o ensino médio incompleto, expondo se tratar de um grupo com baixo poder aquisitivo e em estado de vulnerabilidade, como geralmente ocorre nos casos de uma doença negligenciada como a leishmaniose (Yamey e Torrele 2002).

O tratamento de todos os casos ocorreu com medicamento Antimonial Pentavalente, comercialmente nomeado de Glucantime®, e preconizado como o medicamento de primeira escolha pelo Sistema único de saúde (SUS) (Brasil 2017). As doses utilizadas para tratamento nos pacientes avaliados foi de acordo com o peso (1 – 30 Kg: 20 ampolas; 30 – 60 Kg: 40 ampolas; ≥ 60 Kg: 60 ampolas), seguindo o protocolo do MS (Brasil 2017). Vale considerar que é importante entender a etiologia da LTA para cada paciente, uma vez que o tratamento medicamentoso deveria ser estabelecido de acordo com a espécie de *Leishmania* infectante. No entanto, esta não é uma condição condizente com realidade dos pacientes da região, pois, em sua maioria, residem longe dos serviços públicos de saúde devido às particularidades locais da região Amazônica. Em RPE tem apenas duas UBS que atendem pacientes com LTA, cuja maioria é encaminhada para atendimento na capital Manaus.

Os prováveis locais de infecção dos casos de LC (Figura 1 e 2) foram em maioria áreas rurais, em ramais, sítios e fazendas próximas ao centro do município, no qual é cortada pela rodovia AM 010 que liga RPE a Manaus e Itacoatiara, podendo estar relacionada o deslocamento de pessoas infectadas entre esses municípios para o alto número de casos nessa área, e a falta de infraestrutura e planejamento da rodovia que aumentam o risco de contaminação (Carvalho *et al.* 2019).

Foi registrado focos de contaminação tanto em locais em volta da UBS Ednaide Costa e em regiões mais distantes (Figura 3), mostrando então a necessidade de expansão desse sistema de saúde para atender a alta demanda nas proximidades e alcançar as mais distantes, que apresentam dificuldade de acesso devido à falta de rotas e rodovias para o local.

Figura 1: Mapa de localização da Unidade básica de saúde (UBS) Ednaide Lopes e o georreferenciamento dos possíveis locais de infecção de leishmaniose cutânea dos pacientes atendidos em Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil, nos anos de 2020 e 2021, próximos a fragmentos florestais.



A maior parte dos casos (72%) avaliados neste estudo foram notificados no primeiro trimestre dos anos de 2020 e 2021, estes caracterizados por concentrar o maior volume de pluviosidade no hemisfério-sul (Franca e Mendonça 2016). Essas condições estão relacionadas à transmissão vetorial de protozoário causador da leishmaniose (Sharma 2008), pois há indícios que a densidade populacional do vetor aumenta nas estações chuvosas, favorecendo seu ciclo de vida e reprodução, devido ao aumento de umidade e estabilidade das temperaturas ideais à espécie (Rey 2008).

O constante acompanhamento do número de casos relacionados à pluviosidade pode ser uma maneira de vigilância da LTA, corroborando com seu controle. Com a maior atenção na época chuvosa do ano, é possível maior prevenção e eliminação de focos dos vetores, desfavorecendo as condições para o desenvolvimento do inseto.

4. CONCLUSÃO

O município de Rio Preto da Eva apresenta diversos fatores que são favoráveis para disseminação e aparecimento de focos de LTA, como alta precipitação, fragmentos florestais ao longo do perímetro urbano, proximidade com a floresta e deslocamento de pessoas infectadas através da AM 010, além de parte da população expostas a zonas florestadas devido ao trabalho no campo.

A partir do geoprocessamento é possível mapear focos de contaminação e criar estratégias de prevenção nesses locais, no caso de RPE fragmentos florestais dentro do perímetro urbano, o centro da cidade e áreas isoladas próximas da rodovia. As ferramentas digitais relacionando aos casos a variáveis ambientais também podem indicar qual período é mais ideal para aplicar essas estratégias, sendo o primeiro

trimestre do ano o observado no presente estudo como período com maior número de casos e com maior pluviosidade.

REFERÊNCIAS

- [1] Alvar, J. Et Al. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates Of Its Incidence. Plos One, 7:5.
- [2] Brasil, Ministério da Saúde. 2017. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. 189p.
- [3] Chiesa AM, Westphal MF, Kashiwagi NM. 2002. Geoprocessamento e a promoção da saúde: desigualdades sociais e ambientais de São Paulo. Revista de Saúde Pública. 36(5):559-67.
- [4] LapaTM, Albuquerque MFPM, Carvalho MS, Silveira Júnior JC. 2006. Análise de demanda de casos de hanseníase aos serviços de saúde através do uso de técnicas de análise espacial. Cadernos de saúde pública. 22(6):2575-83.
- [5] Maciel, M.G. 2012. Distribuição espacial e temporal da leishmaniose tegumentar americana no estado do Amazonas no período de 2001 a 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Amazonas.
- [6] Rey, L. 2008. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.359-412.
- [7] Rocha CHB. 2000. Geoprocessamento: tecnologia transdisciplinar. Ed. Do Autor, 2000. Juiz de Fora (MG). 220 p.
- [8] Teles, Giovana da Costa, Fonseca, Fernanda Rodrigues and Gonçalves, Maria Jacirema. 2019. American Tegumentary Leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo [online]. (<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961022>). Acesso em 21/12/2021.

Características clínicas e biológicas de lesões satélites em pacientes com Leishmaniose Tegumentar

Antonia Maria Ramos Franco, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Erika Oliveira da Silva, Paula Figliuolo da Cruz Borges

Resumo: No presente estudo foram examinados 24 pacientes com lesões suspeitas de leishmaniose, destes, 19 (79,16%) foram detectados após excursões à campo (área endêmica /Rio Preto da Eva) e cinco (20,8%) foram encaminhados ao lab. de Leishmaniose do INPA através de solicitações médicas. Destes 24 pacientes, 16 (66,6%) apresentaram pelo menos um teste positivo para leishmaniose. Todos os casos foram submetidos a exames para detecção de HIV, pelo Lab. de Análises Clínicas/Hospital Universitário Getúlio Vargas. Dentre os casos analisados de leishmaniose, 10 (62,5%) apresentaram positividade para exame direto e para cultivo, três (18,75%) apenas para exame direto e um (6,25%) apenas em cultivo. Do total examinado, sete apresentaram lesões suspeitas de serem do tipo "satélites", com características de pápulas em formação inicial proximais a lesão principal, com presença de parasitos tanto em lâmina corada como em cultivo em cinco dos sete pacientes (71,4%), os outros dois pacientes apresentaram apenas um teste positivo. De acordo com as discussões que envolvem os termos que utilizam as terminologias "ides", no qual podem designar fenômenos de hipersensibilidade que determinam lesões à distância sem a presença do parasito no local da lesão ou em concentrações tão reduzidas que impossibilitam sua detecção, até o momento, o que foi observado nos casos estudados é que as então chamadas "leishmanides" ou lesões satélites, apresentam parasitos. Outro fator de importância foi a presença de casos de co-infecção por HIV, o que sugere uma maior atenção no que diz respeito ao fato que vem colocando a LTA como importante doença oportunista.

Palavras-chave: Diagnóstico, Parasitologia médica, Relatos de casos, Técnicas de laboratório clínico.

1. INTRODUÇÃO

As lesões tegumentares ocasionadas por tipos de *Leishmania* sp. dermatrópicas apresentam características clínicas muitas vezes distintas quanto a espécie de *Leishmania* causadora (Lainson 2010). Após o início das lesões nos locais de inóculo do parasita podem ser observadas lesões satélites proximais ou a distância, muitas destas ricas ou não em formas intracelulares as quais se devem à disseminação hematogênica (Gontijo e Carvalho 2003).

Na literatura especializada não há um consenso em relação às lesões satélites em leishmaniose. Alguns autores definem estas lesões como "leishmanides", caracterizando-as como um exantema, constituído de pequenas pápulas, de localização folicular e aspecto liquenóide, de surgimento concomitantemente ao da úlcera primária típica e com ausência ou presença de poucos parasitas (Furtado 1980; Rodriguez 1988; Saravia *et al.* 1989). Silveira *et al.* (2005), usa o termo "sateliose" para definir estas lesões satélites, sem mencionar a presença ou ausência de parasitas do gênero *Leishmania* nestas lesões. Segundo este mesmo autor, a terminologia "ide" pode designar fenômenos de hipersensibilidade que determinam lesões à distância sem a presença do parasita no local da lesão. Um exemplo clássico seria o das "tuberculides" que são "ides", abacilares ou paucibacilares, nas quais seria extremamente difícil encontrar o bacilo. No caso das "bacterides" que se acreditava serem provocadas por focos bacterianos perderam a denominação "ide" quando se comprovou tratar de lesões estéreis.

Com o intuito de averiguar estas questões quanto às características das lesões cutâneas periféricas (satélites) e a presença/ausência de parasitas nestas lesões, este estudo está sendo realizado em pacientes com leishmaniose tegumentar confirmada, oriundos de diversas regiões do Estado do Amazonas na tentativa de verificar a provável importância na disseminação do parasita pelo organismo do indivíduo infectado através destas lesões satélites.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PACIENTES HUMANOS

Neste estudo foram incluídos pacientes com suspeita clínica de LTA, selecionados a partir da demanda espontânea de consultórios médicos privados na especialidade dermatologia e doentes incluídos através de busca ativa em comunidades de alta endemicidade no estado do Amazonas.

Os pacientes incluídos neste estudo foram notificados da importância do presente projeto de pesquisa e preencheram termo de consentimento informado, além de fornecer dados relevantes ao trabalho de pesquisa.

Os pacientes envolvidos neste estudo foram submetidos à coleta de sangue periférico para exame sorológico para HIV (teste de ELISA e quando necessária a confirmação o método de *Western-Blotting*), realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas. O material coletado foi submetido a técnica Biotest Anti-HIV Tetra Elisa que é um ensaio imunoenzimático realizado em microplaca para a determinação de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1/2) em soro ou plasma. Neste ensaio os anticorpos reagem com os antígenos da fase sólida e com os componentes antígenos solúveis no conjugado. Cada poço da microplaca é revestido com três proteínas recombinantes e um peptídeo do vírus HIV. A técnica consiste em primeiro dispensar o diluente de amostra, e então a amostra e

os controles são pipetados em cada respectivo poço da microplaca ELISA. O fato de uma amostra ter sido pipetada é indicado por uma troca de cor azul para verde (amostra monitorada). Se anticorpos de HIV 1/2 estão presentes na amostra a ser testada, estes ficarão na microplaca. Qualquer material ligado sem especificação é removido pelo processo de lavagem e o conjugado é então adicionado. O conjugado é uma mistura de 2 proteínas recombinantes e 2 peptídeos da GAG/ENV regiões do HIV-1 e do HIV-2. Todos os antígenos do conjugado são marcados diretamente com “horseradish peroxidase” (HRP). A enzima conjugada não ligada é removida na etapa de lavagem. A solução de substrato (TMB, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine) é então adicionada no final da etapa de incubação. A reação da enzima é então interrompida pela adição do ácido sulfúrico e obtemos a densidade óptica (DO) a 450 nm em um espectrofotômetro contra um filtro de referência de 615-690 nm. A especificidade do Biotest Anti-HIV Tetra ELISA é de 99,83 % cujo resultado será considerado de importância relevante e auxiliará na conduta ao tratamento terapêutico (Veronesi 2001).

Outro exame realizado para detecção do vírus HIV é o Western Blot, através do método dispositivo de confirmação para detecção de anticorpos humanos ANTI-HIV1 no soro/plasma por “imunoblotting” (teste New Lav Blot I), a ser realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas.

Segundo a portaria número 59 do Ministério da Saúde, de 29 de janeiro de 2003, o teste assenta no princípio ELISA indireto em tira de nitrocelulose contendo todas as proteínas constitutivas do vírus HIV1 e um controle interno anti-IgG. A banda de controle interno está localizada do lado da extremidade não numerada da tira, antes da reação p18 e permite validar a adição da amostra e dos reagentes, bem como assegurar o correto desenrolar do protocolo operatório. As proteínas e vírus HIV1 inativados são separados em função do referido peso molecular, por eletroforese em gel de policrilamida em meio dissociante e redutor, e depois eletrotransferidas em membrana ou nitrocelulose.

A preparação do teste compreende as seguintes etapas: (i) Re-hidratação das tiras; (ii) Incubação das amostras a confirmar ou dos soros de controle. Se existirem anticorpos anti-HIV, eles ligam-se às proteínas virais reconhecidas, presentes na tira; (iii) Após lavagem, procede-se a incubação dos anticorpos anti-IgG humanos, marcados com fosfatase alcalina. O conjugado liga-se aos anticorpos anti-HIV retidos no suporte sólido; (iv) Após lavagem e eliminação do conjugado excedente, a solução de revelação permite pôr em evidência a atividade enzimática dos complexos ligados à nitrocelulose; (v) O aparecimento de bandas coloridas específicas permite evidenciar a presença de anticorpos anti-HIV1 da amostra.

A tira de controle interno do IgG deve apresentar-se com uma coloração forte. Ela permite validar a adição da amostra e dos reagentes, e o correto desenrolar do protocolo operatório. A ausência ou fraca intensidade da coloração da tira pode traduzir uma ausência de depósito da amostra ou não cumprimento do protocolo operatório.

Os resultados obtidos com o teste *New Lav Blot I* foram englobados e interpretados por meio dos critérios enumerados pela Organização Mundial de Saúde. Todos os pacientes diagnosticados receberam tratamento medicamentoso para leishmaniose conforme as normas do Ministério da Saúde.

O projeto foi submetido ao comitê de Ética do INPA e aprovado em 21 de dezembro de 2004 (Processo n° 009/2004 CEP-INPA).

2.2. CARACTERÍSTICAS DAS LESÕES

Os principais critérios clínicos para pré-seleção e inclusão no estudo foram a presença de lesões satélites associadas a:

- Lesão ulcerada de bordas endurecidas
- Lesões impetigóides
- Lesões verrucosas
- Lesões ectimatóides
- Lesões papulosas

2.3. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA SUGESTIVA DE LTA

2.3.1. CATÁLOGO DE LESÕES

Foi montado um catálogo e depositado no laboratório para consulta, identificando os indivíduos pelo seu número de registro, assim como, todas os tipos de lesões cutâneas foto documentadas e caracterizadas clinicamente.

2.3.2. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO

Do material das bordas das lesões por escarificação, foram preparadas lâminas coradas fixando-se com metanol e corando-se pelo método de Giemsa. Ao final foi feita a leitura da lâmina através da microscopia óptica em busca de formas amastigotas. Biópsias de lesões primárias foram realizadas para cultivo em meio NNN para confirmar a etiologia e definir a espécie envolvida. Para a caracterização destes isolados, uma análise bioquímica (eletroforese de isoenzimas) será realizada após a amplificação das amostras para os testes. Atualmente, estão sendo realizadas as amplificações destas massas (de acordo com protocolo descrito a seguir) no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (INPA/COSAS), para a posterior eletroforese de enzimas.

Também foram realizados testes intradérmicos com antígeno de Montenegro (BIOBRÁS/UFMG) como suporte no diagnóstico imunológico, injetando-se 0,1mL de antígeno, intradermicamente na região anterior do antebraço. Após 48 horas faz-se a medida da área de endurecimento, sendo considerada positiva área maior do que 5mm.

2.3.3. MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DO PARASITA ISOLADO

2.3.3.1. PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA

As amostras foram preparadas segundo protocolo padronizado por Momen (1983). Promastigotas de cultura em fase estacionária deverão ser centrifugadas (3500 rpm, 4 C, 15 min) e o seu sedimento lavado por duas vezes em solução contendo NaCl 0,85% e 0,01M de EDTA, pH 8,0. As amostras estão sendo estocadas em Nitrogênio líquido até a sua aplicação no gel.

2.3.3.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DAS LESÕES

As lesões satélites foram mapeadas em cada um dos indivíduos, assim como, registrada a sua localização e tamanho. Foram selecionadas algumas das lesões satélites realizando-se biópsia utilizando-se “punch” de 3mm. Deste material foi feita impressão por aposição em lâmina corada pelo método de Giemsa e inóculo em meio bifásico de cultivo NNN, acrescido de fase líquida de RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino a 10 %. As culturas foram examinadas semanalmente em busca da presença de parasitas. Tão logo observou-se positividade (exame em até 40 dias) os isolados também foram amplificados para criopreservação em Nitrogênio líquido, além do preparo de massa para eletroforese de isoenzimas (Franco 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram examinados 24 pacientes com lesões suspeitas de leishmaniose, destes, 19 (79,16%) foram detectados após excursões à campo (área endêmica /Rio Preto da Eva) e cinco (20,8%) foram encaminhados ao laboratório de Leishmaniose do INPA através de pedidos médico. Dezesesseis pacientes apresentam diagnóstico de leishmaniose confirmado por pelo menos um dos exames parasitológicos utilizados no estudo.

3.1. RELATO DE CASOS

Segue abaixo informações individuais quanto às características clínicas e exames dos pacientes.

Caso 1: IM 5219, sexo feminino, 30 anos, procedente de Rio Preto da Eva-AM. Apresentava lesão ulcerada, única, em região lateral do cotovelo esquerdo, iniciada há três meses e medindo aproximadamente 1,2 cm. Apresentou Leishmaniose cutânea aos sete anos e encontrava-se grávida de 3 meses. Seu exame direto e cultura em meio NNN mostraram-se positivos. Seus exames laboratoriais pelos métodos ELISA e Western-Blot detectaram o vírus HIV.

Caso 2: IM 5220, sexo masculino, 18 anos, procedente de Rio Preto da Eva-AM. Apresentava cinco lesões ulceradas dispostas no membro inferior esquerdo, medindo a maior 1,5 cm e a menor 1 cm. Seus exames parasitológicos mostraram-se negativos, bem como o ELISA para detecção do HIV.

Caso 3: IM 5221, masculino, 21 anos, procedente do Ramal Monarte (Iporá), Rio Preto da Eva-AM. Apresentava úlcera na mão esquerda, medindo 2,2 cm há 3 semanas. Ambos os exames: direto e cultura, apresentaram-se positivos. O ELISA foi negativo para o HIV.

Caso 4: IM 5223, masculino, 49 anos, procedente de Parintins-AM. Apresentava lesão verrucosa, úmida, em região perianal, medindo aproximadamente 8 cm e com 2 anos de evolução. Foi realizado o teste intradérmico de Montenegro que demonstrou ausência de eritema e endureção. Seus exames para leishmaniose e HIV/ELISA encontravam-se negativos. O paciente foi encaminhado a Fundação Alfredo da Mata e após exames recebeu então o diagnóstico de tuberculose.

Caso 5: IM 5224, feminino, 24 anos, procedente de Rio Preto da Eva-AM. Apresentava há 4 meses úlcera típica na região posterior do braço direito medindo 1,5 cm.

Com a evolução outras 4 lesões surgiram nas proximidades da lesão original (satélites), medindo 1cm; 1,2 cm; 0,9 cm e 0,7cm. Destas, três eram ulceradas e uma era papulosa. Sendo este o primeiro caso de paciente com lesões satélites do estudo, foram coletadas amostras da lesão inicial e das duas lesões satélites mais recentes. O resultado parasitológico foi positivo para lesão inicial e satélite. Tendo sido realizados o teste de Montenegro e exame para detecção de HIV/ELISA, apresentaram-se negativos.

Caso 6: IM 5226, sexo feminino, 24 anos, procedente da estrada AM-010, Km 135, Rio Preto da Eva-AM. Apresentava há 1 mês lesão ulcerada, medindo 1cm, em perna direita, tendo surgido lesão semelhante unida a esta e medindo 0,1 cm. Posteriormente houve o surgimento de nova lesão ulcerada na mão direita, medindo 0,5 cm. A paciente iniciou o tratamento com Glucantime[®], mas o abandonou após a terceira dose. Seus resultados do exame direto mostraram positividade na lesão inicial e satélite da perna e negativo na lesão da mão. As culturas em meio NNN da paciente não obtiveram crescimento. A reação de Montenegro resultou em 1 cm de endureção e o HIV/ELISA foi negativo.

Caso 7: IM 5227, sexo masculino, 27 anos, procedente da estrada AM-010, Km 135, Rio Preto da Eva-AM. Relatou que há um ano atrás apresentou lesão no ombro esquerdo diagnosticada como leishmaniose na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Iniciou o tratamento proposto com 70 injeções de Glucantime[®] e após 7 meses houve o aparecimento de nova lesão no cotovelo esquerdo, a qual foi novamente diagnosticada como leishmaniose. O paciente submeteu-se a novo tratamento com 60 injeções de Glucantime[®]. Na ocasião referia surgimento de lesão papulosa medindo 0,5 cm, seguida pelo surgimento de nova pápula, medindo essa 0,1 cm e distando 2 cm da inicial.

Seu exame direto foi negativo, no entanto a cultura da pápula inicial foi positiva. A reação de Montenegro do paciente resultou em 1,2 cm de endureção e seu exame HIV-ELISA foi negativo.

Caso 8: IM 5230, 50 anos, masculino, procedente de Manaus-AM. Há aproximadamente seis meses surgimento de lesão papulosa que evoluiu com ulceração, em região anterior do ombro direito. Há um mês aparecimento de lesões eritemato-crostosas e purulentas em face e outra lesão em região anterior do hemitórax direito, afastada 5,0 cm da primeira lesão. A úlcera do braço mediu 3,5 x 3,0 cm e a do tórax 1,3 x 0,8 cm em seus maiores diâmetros. Nega ida à mata e fez uso de banha de cobra no local.

O paciente apresentou exame direto positivo e suas culturas sofreram contaminação. A reação intradérmica de Montenegro foi negativa. A primeira amostra submetida ao exame de HIV teve resultado positivo. O paciente veio a falecer na Fundação de Medicina Tropical, com o diagnóstico de histoplasmosse disseminada, antes que pudesse ser realizado teste confirmatório para HIV.

Caso 9: IM 5231, 18 anos, masculino, procedente de Itacoatiara-AM. Há um mês surgimento de uma pápula, que evoluiu com ulceração, em região maleolar lateral do pé esquerdo, seguida pelo aparecimento, dias depois, de lesão semelhante em região lombar. A lesão inicial medindo 2,0 cm e a segunda 0,6 cm em seus maiores diâmetros. Relata ida diária à mata por motivo laboral. Fez uso de macaxeira ralada no local da ferida. Seu exame sorológico para HIV e exames parasitológicos para leishmaniose foram negativos.

Caso 10: IM 5232, 20 anos, masculino, procedente de Santarém-PA. Há aproximadamente três semanas aparecimento de úlcera em região anterior da perna direita. A lesão mede 3,5 cm em seu maior diâmetro. Fez uso de Rifocina[®] no local da

ferida. Relata ida à mata por motivo de trabalho. Seu exame para detecção de HIV/ELISA foi negativo e seus exames parasitológicos para detecção de leishmaniose (direto e cultura) foram positivos.

Caso 11: IM 5233, 20 anos, masculino, procedente do ramal ZF9, na estrada AM-010, Km 105, em Rio Preto da Eva-AM. Há duas semanas surgimento de lesão ulcerada em região anterior da perna esquerda, que evoluiu com infecção secundária. Nega qualquer tipo de tratamento. Relata ida à mata por motivo laboral. Exame sorológico HIV-ELISA foi negativo. Suas culturas foram negativas, no entanto, o exame direto mostrou presença de parasitas.

Caso 12: IM 5234, 20 anos, masculino, procedente do ramal ZF7, em Rio Preto da Eva-AM. Há um ano e quatro meses apresentou lesão papulosa que evoluiu com ulceração e surgimento de mais seis lesões semelhantes ao redor da principal (satélites), em região lateral do braço direito (Figura 1). Iniciou tratamento com Glucantime[®], chegando a tomar oitenta injeções. Interrompeu o tratamento várias vezes, abandonando-o definitivamente em agosto de 2004. Atualmente encontram-se as mesmas lesões, com aspecto de úlcera fechada e/ou pápulas. No momento do surgimento das lesões o paciente exercia atividade laboral na mata. Seu exame sorológico HIV/ELISA foi não reativo. Seus exames parasitológicos mostraram parasitas nas lesões inicial e satélite.

Caso 13: IM 5235, 18 anos, feminino, procedente da estrada AM-010, Km 119, em Rio Preto da Eva-AM. Há duas semanas surgimento de pápulas na coxa direita e barriga, que evoluíram com formação de úlcera. Ao redor da úlcera da coxa surgiram três pápulas semelhantes à primeira (satélites) e ao redor da úlcera da barriga, duas pápulas de mesmo aspecto. A paciente apresenta ainda várias pápulas na perna direita e face. Não fez uso de qualquer tratamento. Relata ida ocasional à mata. Seu exame sorológico HIV/ELISA foi negativo. Suas culturas não mostraram parasitas. Seu exame direto mostrou parasitas na lesão inicial e satélite.

Caso 14: IM 5236, 39 anos, feminino, procedente de Autaz-AM. Há quinze dias lesão ulcerada em região maleolar medial esquerda, medindo 5,0 cm e com sinais de infecção. Há três dias surgimento de lesão semelhante em região anterior da coxa direita medindo 1,3 cm (Figura 2). Nega qualquer tipo de tratamento e relata ida à mata por motivo de lazer. O resultado do exame HIV/ELISA foi negativo. Seu exame direto e cultura foram negativos.

Caso 15: IM 5237, 54 anos, masculino, procedente da estrada AM-010, Km 120, em Rio Preto da Eva-AM. Em um intervalo de duas semanas, houve o surgimento de lesões papulosas em joelho esquerdo, perna esquerda, fossa poplíteia esquerda, barriga e cotovelo direito, medindo a maior 1,5 cm e a menor 1,0 cm, respectivamente. A lesão da fossa poplíteia apresentou duas pápulas em sua proximidade (satélites), surgindo dois dias após a lesão primária. Nega qualquer tratamento e relata ida diária à mata. Seu exame sorológico para HIV/ELISA foi negativo. Suas culturas e exame direto mostraram parasitas em lesão principal e satélite.

Caso 16: IM 5238, 31 anos, feminino, procedente da estrada AM-010, Km 149, em Rio Preto da Eva-AM. Há duas semanas surgimento de duas lesões ulceradas em tornozelo esquerdo, medindo 1,1 cm e 1,0 cm. Apresenta ainda úlcera típica em perna direita. Relata Leishmaniose há um ano e ida diária à mata. Realizou tratamento com Glucantime[®], num total de setenta injeções. O resultado do exame sorológico para HIV/ELISA foi negativo. Sua cultura e exame direto foram positivas.

Caso 17: IM 5239, 18 anos, feminino, procedente da estrada AM-010, Km 149, em Rio Preto da Eva-AM. Há uma semana surgimento de lesão ulcerada em cotovelo direito, medindo 0,5 cm. Apresenta lesão papulosa medindo 0,1 cm e distando da lesão principal 0,3 cm (Satélite). Relata leishmaniose há um ano. Realizou tratamento com Pentacarinat[®]. O resultado do exame sorológico para HIV/ELISA foi negativo. Suas culturas foram positivas na lesão principal e satélite e o exame direto é positivo apenas para lesão principal.

Caso 18: IM 5242, 29 anos, masculino, procedente da estrada AM-010, km 105, em Rio Preto da Eva-AM. Relata aparecimento de lesão ulcerada, medindo 1,0 x 1,0 cm, em membro inferior esquerdo há três semanas. Refere Leishmaniose há 2 anos em membro superior, tendo feito uso de Glucantime[®] (13 doses) para tratamento. Seus resultados de exame direto e cultura mostraram ausência de parasitas. O exame sorológico para HIV/ELISA foi negativo e o teste de Montenegro positivo com 1 cm de endureção.

Caso 19: IM 5243, 30 anos, feminino, procedente da estrada AM-010, km 104, Comunidade Divino Espírito Santo, em Rio Preto da Eva. Refere aparecimento de lesões ulceradas em face e membros superiores, diagnosticadas como leishmaniose há três meses em Rio Preto da Eva. Fez uso de Glucantime[®] (120 doses) para tratamento. Atualmente relata aparecimento de nova úlcera em membro superior direito no local de cicatriz anterior medindo 0,4 x 0,4 cm, ulcerada, com três dias de evolução. Apresenta ainda lesão em membro superior há três meses, verrucosa, medindo 1,0 x 1,0 cm. Seus exames parasitológicos para leishmaniose, HIV/ELISA e Teste de Montenegro foram negativos.

Caso 20: IM 5244, 57 anos, feminino, residente em Manaus-AM. Refere ida frequente à Rio Preto da Eva (AM-010, km 118), onde possui um sítio próximo a mata. Refere aparecimento de lesão ulcerada na perna esquerda (Figura 3), medindo 4,5 x 3 cm, com evolução de 15 dias. Seu exame para HIV/ ELISA encontra-se em análise, seus exames parasitológicos e Teste de Montenegro foram negativos.

Caso 21: IM 5245, 24 anos, masculino, procedente de Rio Preto da Eva-AM. Observou há 30 dias surgimento de lesão papulosa, pruriginosa em região sacral, que evoluiu com ulceração. Atualmente a lesão ulcerada mede 3 cm. Nega tratamento anterior, fez uso de Neomicina tópica. Seu exame para HIV encontra-se em análise. Seu exame direto e cultivo indicam presença de parasitas.

Caso 22: IM 5246, 38 anos, feminino, residente em Manaus-AM, no bairro da Praça 14. Foi encaminhada ao Laboratório de Leishmaniose do INPA por seu dermatologista. Nega história pregressa de ida à mata. Refere surgimento de lesão papulosa no cotovelo direito (Figura 4) e antebraço esquerdo há 45 dias. Atualmente as lesões encontram-se ulceradas e medindo 2 x 2 cm a do cotovelo e 0,8 x 0,7 cm no antebraço. Nega tratamento anterior. Seu exame para HIV encontra-se em análise. Seu exame direto foi positivo, no entanto, a cultura não evidenciou o crescimento de parasitas e o Teste de Montenegro foi negativo.

Caso 23: IM 5250, 44 anos, feminino, procedente do ramal do Bom Jesus, km 149 da estrada AM- 010. Relata surgimento de 25 lesões papulosas concomitantes ao longo do corpo há 8 meses. Realizou exame parasitológico em Lindóia com resultado positivo para leishmaniose. Fez uso de remédios caseiros, Penicilina Benzatina, andiroba e finalmente Glucantime[®] endovenoso (50 ampolas). Atualmente as lesões estão cicatrizadas, apenas uma lesão na coxa apresenta-se eritematosa e plana. Nega surgimento de outras lesões. Foi coletado material da borda da lesão eritematosa. Seu exame para HIV/ ELISA

encontra-se em análise. Seu exame direto foi positivo e sua cultura não mostrou parasitas. Teste de Montenegro foi negativo.

Caso 24: IM 5252, 19 anos, masculino, procedente do Ramal do Bom Jesus, km 149. Paciente relata surgimento de 4 lesões ulceradas em membro superior direito há 8 meses. Recebeu o resultado de leishmaniose após realização de exame direto em Rio Preto da Eva. Fez tratamento com Glucantime® endovenoso, porém com interrupções (40 ampolas). Atualmente apresenta duas lesões eritematosas em membro superior, das quais foi coletado material para análise. Seu resultado para HIV/ ELISA encontra-se em análise. Seu exame direto, cultura e Teste de Montenegro foram negativos.



Figura 1. Paciente IM 5234.
Lesões ulceradas em braço.



Figura 2. Paciente IM 5236.
Lesão ulcerada em tornozelo.



Figura 3- Paciente IM 5244.
Lesão ulcerada na perna esquerda.



Figura 4- Paciente IM 5246.
Lesão ulcerada em cotovelo.

REFERÊNCIAS

- [1] Franco, A.M.R.; Momen, H.; Moreira, C.F.S.; Mayrink, A. N.; Deane, M. P.; Grimaldi Jr, G. 1995. Enzyme polymorphism in *Endotrypanum* and numerical analysis of isoenzyme data. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90 (1): 273.
- [2] Furtado T. 1980. Critérios para diagnóstico de LTA. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 65: 51-86.
- [3] Lainson, R. 2010. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua*. (2) p. 13-32.
- [4] Momen, H. 1983. Identification of new world leishmania isolates by agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel soelectrofocusing. *J. Cell. Biochem.* 70(7): 29.
- [5] Rodriguez, L.V., Uzquiano F.C., Desjeux P., Valle S.W.C. 1988. Leishmaniose recidivante com alterações ósseas-relato de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 63: 31-34.
- [6] Saravia, N.G.L.; Valderrama, M., Labrada, A.F., Holguín, C., Navas, G., Palma, A.; Weigle, K.A. 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New

World leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 159: 725-735.

[7] Silveira, F.T.; Lainson, R., Corbett, C.E. 2005. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem do Inst Oswaldo Cruz*. Aug; 100 (5): 525-34.

Características de lesões em pacientes com leishmaniose cutânea provenientes do município de Rio Preto da EVA, Amazonas, Brasil

Nicolle Tayná Brandão dos Santos, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: A *Leishmaniose Tegumentar Americana* (LTA) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos. No Brasil existem atualmente seis espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana, e mais de 200 espécies de flebotomíneos implicados em sua transmissão. A *Leishmaniose Cutânea* pode ser classificada entre várias formas clínicas, incluindo as seguintes: forma cutânea localizada, que pode ser caracterizada por uma lesão única ou múltipla, podendo ser ulcerosa, apresentando boa resposta ao tratamento com tendência a cura espontânea; e forma cutânea disseminada onde as lesões são numerosas e distantes do local da picada do inseto, pequenas e ulceradas, distribuídas por várias partes do corpo podem ter diversos tamanhos e costumam responder bem ao tratamento. Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento clínico das lesões cutâneas de LTA de pacientes provenientes do município de Rio Preto da Eva, Amazonas. Foi realizado o levantamento de dados clínico-epidemiológicos quanto a sexo, idade, tempo de infecção, exame direto, cultivo, tamanho e número de lesões cutâneas de 11 indivíduos com diagnóstico confirmado de *Leishmaniose* cutânea. Sete dos 11 indivíduos inclusos no estudo são do sexo masculino, e quatro do sexo feminino, com idades variando entre 19 e 46 anos (média de idade de 28 anos). As variadas apresentações das formas cutâneas de LTA estão ligadas a fatores como: espécie do parasito, vetor e resposta imune do hospedeiro. Existem lesões típicas de LTA, mas também existem lesões atípicas que fogem do contexto de “lesão característica da LTA”.

Palavras-chave: Doença tropical, *Leishmaniose* tegumentar, Diagnóstico.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que acometem pele ou mucosas (Gontijo 2003). Esses parasitos são transmitidos aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas do gênero *Lutzomyia* (Killick-kendrick 1999). As características do parasito, do vetor e da resposta imune do hospedeiro definem as várias manifestações clínicas da infecção (Arenas *et al.* 2017).

No Brasil, a LTA destaca-se por sua ampla distribuição, ocorrendo em todos os Estados da Federação (Alvar *et al.* 2012; Brasil 2017). O Estado do Amazonas notificou 2.435 novos casos da doença somente no ano de 2011 e a transmissão ocorreu principalmente nos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva (SINAN 2012).

Na Amazônia, a LTA é causada por sete espécies de *Leishmania*, seis do subgênero *Viannia*, incluindo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* do subgênero *Leishmania* (Silveira 2004). A espécie mais prevalente na Região Amazônica contribuindo com 80% dos casos é a *L. (V.) guyanensis* (Figueira *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2011).

A forma clínica mais comum da Doença é a Leishmaniose Cutânea (LC) e em alguns casos pode evoluir para a cura clínica espontânea (Costa *et al.* 1986). O processo infeccioso inicia-se no local em que as formas promastigotas infectantes do parasito são inoculadas e pode ser apresentada nas formas localizadas, onde a lesão é geralmente única ou disseminada pelo corpo apresentando numerosas lesões em virtude de múltiplas picadas de insetos ou disseminação hematogênica; e na forma cutânea-difusa (Reis *et al.* 2006).

As lesões cutâneas caracterizam-se por úlceras rasas com bordas elevadas, fundo granulomatoso, com ou sem exsudato (Da Rocha; CampoS, 2006). Também podem ser observados outros tipos de lesões como úlcero-crostoso, impetigóide, úlcero-vegetante, verrucosa ou tuberosa (Naiff *et al.* 2009; Brasil 2017). Apresentam tempo de incubação entre quatro semanas a vários anos se manifestam (Da-Cruz *et al.* 2002; Gontijo 2003).

A Leishmaniose Cutânea pode ser classificada entre várias formas clínicas, incluindo as seguintes: Forma cutânea localizada que pode ser caracterizada por uma lesão única ou múltipla, podendo ser ulcerosa, apresentando boa resposta ao tratamento com tendência a cura espontânea (Silveira *et al.* 2004). Forma cutânea disseminada onde as lesões são numerosas e distantes do local da picada do inseto, pequenas e ulceradas, distribuídas por várias partes do corpo podem ter diversos tamanhos e costumam responder bem ao tratamento (Costa *et al.* 1986). Forma recidiva cútis caracteriza-se por bordas infiltradas, difícil localizar parasitos nas lesões (Gontijo 2003; Costa *et al.* 2009; Brasil 2017). Forma cutânea difusa é considerada rara e grave, com formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não-ulceradas, cujo tratamento é difícil e ineficaz (Basano e Camargo 2004).

É importante um diagnóstico diferencial tendo em vista que a LTA pode simular várias doenças como a piodermite ou micoses superficiais, daí as denominações impetigóide, ectimatóide e outras manifestações que podem dificultar o diagnóstico clínico (Naiff *et al.* 2009). Existem outros aspectos clínicos de LTA que incluem lesões em placas, lesões verrucosas, lesões vegetantes e lesões atípicas (Brasil 2017).

A Região Norte do Brasil possui a maior taxa de incidência de leishmaniose cutânea do país, sendo a espécie *L. (V.) guyanensis* responsável pelo maior número de casos (Grimaldi *et al.* 1991; Lainson 2010; Guerra *et al.* 2019). Raras são as literaturas que demonstram as características de lesões de pacientes com leishmaniose cutânea na Região Amazônica, devido a isto é de extrema importância conhecer as diferentes formas, tamanhos e números de lesões envolvidas no processo infeccioso de acordo com o tempo de infecção na LTA.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento clínico das lesões cutâneas de LTA de pacientes provenientes do município de Rio Preto da Eva, Amazonas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. TIPO DE ESTUDO

Tratou-se de um estudo transversal descritivo, no qual foi realizada a avaliação das características e foto-documentação dos vários tipos de lesões cutâneas de LTA, em pacientes provenientes do município de Rio Preto da Eva, Amazonas.

2.2. CASOS CLÍNICOS

Foram incluídos 11 pacientes diagnosticados com LTA. O diagnóstico dos casos suspeitos de Leishmaniose foi baseado nos dados epidemiológicos e exame clínico, associados com a positividade de um dos exames laboratoriais. Os pacientes foram atendidos na Unidade Básica de Saúde (Dr. Hamilton Cidade) localizada no município de Rio Preto da Eva/AM.

2.3. ANÁLISE DA LESÃO

A avaliação do tamanho da lesão foi realizada com o auxílio de um paquímetro, medindo o diâmetro da lesão em duas direções ortogonais, juntamente com o levantamento de dados clínico-epidemiológicos como o tempo da infecção ativa. Foi feita a foto documentação da lesão, para analisar suas características: nodular, ulcerada, número, forma, localização, entre outros aspectos relevantes para o diagnóstico clínico das lesões cutâneas.

2.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Todos os pacientes foram submetidos a exame direto por escarificação da borda das lesões cutâneas para a pesquisa das formas amastigotas em lâminas, foi utilizado o kit Panótico (Laborclin®) para coloração e análise por microscopia óptica.

O material que foi escarificado da borda das lesões também foi semeado em meio de cultivo bifásico Agar sangue NNN (Neal e Novy 1904; Nicolle 1908) e posteriormente expandido em meio líquido completo RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino Inativado (SFBi) para preparo da massa parasitária a ser utilizada na caracterização bioquímica e para a criopreservação dos flagelados em nitrogênio líquido.

2.4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, residentes do Estado do Amazonas, maiores de 18 anos, que apresentaram sintomas característicos da doença, com tempo de evolução da lesão entre 15 e 90 dias, que aceitaram participar do estudo assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e que responderam ao questionário padrão. Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: menores de 18 anos, mulheres grávidas, pacientes em tratamento para LTA e indivíduos que não e indivíduos que não assinaram o TCLE. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INPA sob o número 014/2015.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi realizado o levantamento de dados clínico-epidemiológicos quanto a sexo, idade, tempo de infecção, exame direto, cultivo, tamanho e número de lesões cutâneas de 11 indivíduos com diagnóstico confirmado de Leishmaniose cutânea. Sete, dos 11 indivíduos inclusos no estudo são do sexo masculino, e 4 do sexo feminino, com idades variando entre 19 e 46 anos (média de idade de 28 anos) (Tabela 1). Nossos resultados corroboram com os achados por Costa *et al.* (1986), onde estudando pacientes com diagnóstico confirmado de LTA no Estado da Bahia, observaram que a maioria eram do sexo masculino.

Já no estudo de Guerra *et al.* (2003), os 48 pacientes estudados foram do sexo masculino, porém a faixa etária mais acometida foi de 19 a 20 anos. Em um estudo realizado por Figueira *et al.* (2014), também observaram que a maioria dos pacientes eram do sexo masculino, correspondendo a 70% da população estudada, e a faixa etária com maior número de casos foi de 11 a 20 anos (31,7%).

As lesões apresentadas mostraram variações entre todos os pacientes quanto ao número, tamanho e forma. Dos indivíduos, 6 pacientes apresentaram uma única lesão cutânea, no entanto, houve variação de 1 a 4 lesões apresentadas entre os 11 indivíduos.

O tamanho das lesões cutâneas variou entre 0,6 x 0,4 cm a 3,6 x 3,3 cm, e a evolução teve tempo médio de 60 dias (variação entre 15 e 210 dias). Foram observadas as diferentes características de lesões cutâneas e que podem ser confundidas com outras doenças dermatológicas.

No estudo de Figueira *et al.* (2014), os pacientes infectados por *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma única lesão, o que difere do nosso estudo, onde não foi realizada a caracterização das espécies. Do total de 90 cepas que foram caracterizadas, 89% foram de *L. (V.) guyanensis*. Conforme já descrito na literatura, é a espécie responsável pelo maior número de casos de LTA na região metropolitana de Manaus (Figueira *et al.* 2008; Espir *et al.* 2016).

Guerra *et al.* (2003), demonstrando os aspectos clínicos e diagnósticos da LTA em militares expostos à infecção na Amazônia, 50% dos indivíduos em seu estudo apresentaram duas lesões e o período de incubação foi de 27,6 dias.

Tabela 1. Dados clínicos e epidemiológicos de pacientes portadores de LTA.

Isolados	Idade (anos)	Sexo	Tempo de infecção (dias)	Exame direto	Cultivo	Tamanho da lesão (cm)	Nº de lesões
MHOM/BR/2014/IM6128	19	M	210	+	+	*1,5 x 1,2	3
MHOM/BR/2014/IM6129	19	M	120	+	+	*3,6 x 3,3	2
MHOM/BR/2014/IM6134	46	F	30	+	+	0,6 x 0,4	1
MHOM/BR/2014/IM6135	20	M	30	+	+	*1,1 x 1,3	4
MHOM/BR/2015/IM6144	38	F	33	+	+	1,2 x 0,8	1
MHOM/BR/2015/IM6150	19	M	30	+	+	1,6 x 2,3	1
MHOM/BR/2015/IM6151	41	F	15	+	+	0,6 x 0,5	1
MHOM/BR/2015/IM6152	31	M	30	+	+	*0,95 x 1,3	3
MHOM/BR/2016/IM6156	30	F	30	+	+	1,0 x 1,1	1
MHOM/BR/2016/IM6157	19	M	120	+	+	*2,2 x 2,0	2
MHOM/BR/2016/IM6159	30	M	21	+	+	1,4 x 1,3	1

Legenda: Isolados: M- mamífero; HOM- *Homo sapiens*; BR-País de origem (Brasil)/ Ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; Sexo: M- masculino; F- feminino. *lesão de maior tamanho.

As lesões cutâneas apresentam diferentes características clínicas e morfológicas. A importância da anamnese, análise clínica, laboratorial e epidemiológica asseguram o diagnóstico diferencial para outras infecções com outros patógenos causadores de lesões cutâneas. A forma predominante das lesões foi a úlcera franca, segundo a literatura, a forma úlcera franca se destaca por possuir maior número de casos em relação aos outros tipos de lesões associadas a LTA (Naiff *et al.* 2009).

Segundo Guerra *et al.* (2003), as lesões ulcerosas foram as manifestações mais frequentes, ocorrendo em 66,7% dos pacientes. E outros aspectos clínicos como, impetigóides, papulosas, ectimatóides e verrucosas, observadas em 30% dos indivíduos. Naiff *et al.* (2009) também verificaram predomínio de lesões do tipo úlcera franca, com 41,5% evoluíram para este aspecto clínico de lesão e 23,7% de lesões tipo placa. Esses estudos corroboram com os nossos resultados.

Figura 1. Características clínicas da forma cutânea da LTA em Rio Preto da Eva – AM.



Na figura 1, mostra os tipos de lesões cutâneas de LTA, onde pode-se observar que a maioria apresentou o aspecto de úlcera franca. Entretanto, duas lesões apresentaram o aspecto verrucoso. Durante o período estudado no município de Rio Preto da Eva confirmamos a lesão úlcera franca como a mais incidente nos pacientes atendidos. Essas lesões são caracterizadas por: úlceras únicas ou múltiplas, de formato arredondado, infiltradas com consistência firme, bordas bem delimitadas e elevadas, e base eritematosa o que sugere características compatíveis com distintas espécies de *Leishmania* circulantes na região.

4. CONCLUSÃO

As variadas apresentações das formas cutâneas de LTA, estão ligadas a fatores como: espécie do parasito, vetor e resposta imune do hospedeiro. Existem lesões típicas de LTA, mas também existem lesões atípicas que fogem do contexto de “lesão característica da LTA”. É importante um diagnóstico diferencial, visto que essas lesões simulam outras doenças. Diante disso, sugerimos a continuidade de estudos onde possamos avaliar os diferentes aspectos das lesões junto com um diagnóstico diferencial que contribua no diagnóstico da LTA.

REFERÊNCIAS

- [1] Alvar, J. et al. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7 (5): 1-12.
- [2] Torres-Guerrero, R. et al. 2017. Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6: 1-15.
- [3] Basano, S.D.A.; Camargo, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Eídemiol.*, 7 (3): 328-337.
- [4] Costa, J.M.L., Saldanha, A.C.R.N.D. et al. 2009. Modalidades Clínicas, Diagnóstico E Abordagem Terapêutica Da Leishmaniose Tegumentar No Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*, 143 (79): 70-83.
- [5] Costa, J.M.L. et al. 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89 (6): 319-323.
- [6] Da-Cruz, A.M. et al. 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9 (2): 251-6.
- [7] Da Rocha, F.F.; Campos, M.G. 2006. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Assoc Med Bras*, 52(6): 389.
- [8] Espir, T.T. et al. 2016. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Experimental Parasitology*, 167: 1-6.
- [9] Figueira, L.D.P. et al. 2008. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41 (5): 512-514.
- [10] Gontijo, B. 2003. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. *Medicina Tropical*, 36 (13): 71-80.
- [11] Grimaldi, G. et al. 1991. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44 (6): 645-661.
- [12] Guerra, J.A. De O. et al. 2019. Socioenvironmental aspects of the Purus Region - Brazilian Amazon: Why relate them to the occurrence of American Tegumentary Leishmaniasis? *PLoS ONE*, 14 (2): 1-15.
- [13] Guerra, J.A.O. et al. 2011. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85 (3): 524-527.
- [14] Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3): 279-289.
- [15] Lainson, R. 2010. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1 (2): 13-32.
- [16] Brasil, Ministério da saúde. 2017. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar.
- [17] Naiff, R.D. et al. 2009. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana No Município De Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 38 (2): 103-114.
- [18] Reis, L.D.C. et al. 2006. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, 35 (2): 103-115.
- [19] Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (3): 239-251.

**Padronização do Diagnóstico de
Leishmania em lâminas coradas**

Juliana Maria de Moraes, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Liliane Coelho da Rocha, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: Uma doença infecciosa, a leishmaniose afeta seres humanos e animais ocasionando lesões na pele, nas mucosas e/ou nas vísceras. A partir da presença de lesões típicas de leishmaniose, o diagnóstico clínico e epidemiológico pode ser realizado, especialmente se o paciente reside em área endêmica ou esteve em locais onde há casos da doença. O Ministério da Saúde (MS) preconiza a utilização de métodos de diagnóstico laboratorial que visa não somente a confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas, pela identificação da espécie circulante, orientando quanto às medidas a serem adotadas para o controle do agravo. 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. Realizar a padronização do diagnóstico de lâminas, coradas pelo método de Giemsa, com *L. amazonensis* utilizando PCR-RFLP. As lâminas foram submetidas a um pré-tratamento, as quais foram umedecidas com tampão de lise seguidos por solução SDS 10%, para assim serem raspadas com lâmina de bisturi e depositadas em tubos tipo Eppendorf. Em seguida foram aplicadas duas variações do método fenol-clorofórmio: Variante 1 (overnight) e Variante 2 (filtração direta). A partir dessas diferentes variações, foi possível compará-las de acordo com a qualidade e concentração dos DNAs obtidos. Além das análises quantitativas, a qualidade do DNA obtido foi avaliada utilizando a reação da PCR, tendo como alvo a região de ITS. Após a amplificação do DNA, as amostras foram submetidas à digestão com três enzimas de restrição HpaII, HaeIII e TaqI separadamente, para verificar a possibilidade de obter um diagnóstico específico a nível de espécie. Os resultados demonstraram que o método padrão segundo SAMBROOK et al. (1989) rendeu melhores concentrações de DNA. O segundo melhor resultado foi a extração em overnight, onde o material foi exposto diretamente a uma temperatura de 37°C por 24 horas. A partir das amostras extraídas foi observada a amplificação da região de ITS de apenas quatro amostras extraídas pelo método padrão e três das amostras extraídas pela variação em overnight. É possível que a ausência de amplificação do DNA das demais amostras possa ter ocorrido devido à presença de inibidores na reação ou mesmo pelas diferentes concentrações de DNA parasitário contidas nas impressões das lâminas utilizadas. O produto da PCR realizada nas amostras obtidas pelo método padrão e pela variação de overnight, foram submetidas à digestão pelas enzimas de restrição HpaII, HaeIII e TaqI. A digestão pela enzima HpaII apresentou dois fragmentos de 1100 e 100pb, enquanto as amostras digeridas pela HaeIII apresentaram, também, digestão em dois fragmentos, 200 e 800pb. A TaqI apresentou três fragmentos de 200, 300 e 500pb. A digestão das amostras pelas enzimas de restrição apresentou o mesmo padrão de corte, confirmando que ambas pertencem a mesma espécie, *L. amazonensis*. Este estudo demonstrou que é possível realizar extração de DNA e amplificação de alvos genômicos, a partir de lâminas coradas, onde o material é escasso chegando a um diagnóstico específico para leishmaniose.

Palavras-chave: Método molecular, Leishmaniose, Material fixado em lâminas.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, com prevalência global estimada de 12 milhões de casos e incidência de 1,5 a 2 milhões, sendo 1 a 1,5 milhão de leishmaniose tegumentar e 500 mil de leishmaniose visceral (Figueiredo 2009). Essas infecções apresentam distribuição geográfica cada vez mais abrangente, com presença de casos em áreas que anteriormente não eram consideradas endêmicas (Who 2002). Isso decorre principalmente de fatores ecológicos e demográficos, sendo a migração de pessoas e reservatórios provenientes de regiões endêmicas para centros urbanos, associado às precárias condições sanitárias, desnutrição da população e a grande capacidade de adaptação do vetor (Costa 2007). Fatores estes que contribuem para o incremento do número de casos da doença.

Esta zoonose é causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. A *Leishmania* é transmitida para o vertebrado através da picada de fêmeas hematófagas pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos, sendo os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* distribuídos no Novo e no Velho Mundo, respectivamente (Lima 2010). No Novo Mundo, a leishmaniose humana apresenta duas formas clínicas básicas: a Leishmaniose Visceral (LV) que é causada por *Leishmania chagasi* (Maurício *et al.* 2000; Lukes *et al.* 2007), e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que é causada por várias espécies de *Leishmania* que parasitam principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear.

A LTA é uma doença não contagiosa de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosas da nasofaringe, de forma localizada ou difusa. A doença engloba uma ampla gama de severidade e manifestações clínicas, e pode estar presente como a leishmaniose cutânea ou mucosa (Ministério da Saúde 2007). As características clínicas da LTA variam dependendo da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune do hospedeiro. No Brasil, como em outras partes da América Latina, esta doença foi inicialmente associada a áreas florestadas, mas já está adaptada ao ambiente urbano, devido ao desmatamento e urbanização desordenada (Reithinger e Davies 1999; Desjeux 2004).

Atualmente, cerca de 30.000 novos casos de LTA são relatados ao Ministério da Saúde anualmente. Em 2009, foi observado que a região norte tem o maior índice dos casos do país, com 8.272, seguido da região nordeste com 6.910 casos, região centro-oeste com 4.492 casos. Regiões sudeste e sul apresentam os menores índices com 1.605 e 464 casos, respectivamente.

Na região norte, os estados com os maiores números de casos são Pará com 3.347 casos, Amazonas com 1.439 e Rondônia com 1.035 casos no ano de 2009. Segundo dados do SINANNET (2010), os municípios de Rio Preto da Eva (207 casos) e Manaus (648 casos) contribuíram com 54,98% dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Amazonas.

As *Leishmania* spp. apresentam-se em seu ciclo de vida principalmente sob a forma amastigota e promastigotas. As amastigotas são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelos livres, que parasitam o hospedeiro vertebrado em seu sistema linfomonocitário, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos onde vivem e multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos gerando um ciclo vicioso (Basano e Camargo 2010).

A forma promastigota é alongada e apresenta um flagelo livre, sendo encontrada no sistema digestivo de seus vetores, onde se multiplica por aparente divisão simples e assexuada e migram para a probóscide do inseto após aproximadamente 4 a 5 dias (Marzochi 1992).

1.1. AGENTES ETIOLÓGICOS

A LTA é causada por espécies de *Leishmania* dermatrópicas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, que inclui um grupo de doenças comumente referidas por suas características clínico-patológicas como forma cutânea, mucocutânea e cutânea difusa (Lima 2010).

Nas Américas, atualmente, são reconhecidas atualmente 13 espécies causadoras de *Leishmania* causadoras de doença humana (Tab. 1).

Tabela 1 - Principais espécies de *Leishmania* causadoras da doença em humanos nas Américas.

Subgênero <i>Viannia</i> Lainson & Shaw, 1972	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>Leishmania (V.) peruviana</i> Velez, 1913	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> Floch, 1954	Predominantemente lesões cutâneas	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sulamericano.
<i>Leishmania (V.) panamensis</i> Lainson & Shaw, 1972	Predominantemente lesões cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> Silveira et al., 1987	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Norte do Estado do Pará
<i>Leishmania (V.) shawi</i> Shaw et al., 1991	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) naiffi</i> Lainson et al., 1990	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) colombiensis</i>	Lesões cutâneas, únicas ou múltiplas	
<i>Leishmania (V.) lindenberg</i> Silveira et al., 2002	Lesões cutâneas	Região do Estado do Pará
Subgênero <i>Leishmania</i> (Safjanova, 1982)	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (L.) mexicana</i> Beagi, 1953	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	México e América Central
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	América Central e regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i> Bonfante-Garrido, 1980	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i> Medina & Romero, 1959	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	Venezuela

1.2. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

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 (Figueira *et al.* 2008).

A principal metodologia de diagnóstico utilizada atualmente é a observação direta de amastigotas em esfregaços corados ou culturas de material obtido a partir de lesões de pele. Os métodos de cultura tradicionais consistem em um sistema de cultura bifásico de meio de cultura (ágar sangue) acrescido de fase líquida (Marzochi *et al.* 1993; Berman 1997).

Pela dificuldade em se discriminar estes parasitas com critérios extrínsecos, têm-se utilizado diversos marcadores moleculares e bioquímicos capazes de identificar e classificar os organismos de acordo com as características comuns (Grimaldi e Tesh 1993). Atualmente a eletroforese de isoenzimas é um método considerado como padrão-ouro na caracterização de cepas de *Leishmania* (Figueira *et al.* 2008).

1.3. MÉTODOS MOLECULARES

O DNA, quimicamente mais estável do que enzimas e anticorpos, têm sido objeto de intensas pesquisas (Ellis e Crampton 1988; Guevara *et al.* 1992). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* que consiste na amplificação de sequências específicas do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou do ácido ribonucleico - RNA (Andrade 2007). Sua aplicação permite rápida detecção e identificação do DNA, mesmo que degradado (Saiki *et al.* 1988), dos parasitos sem a necessidade de isolamento (Andrade 2007). No diagnóstico de leishmaniose, um dos principais alvos das técnicas moleculares desenvolvidas é o DNA do cinetoplasto - kDNA (Rodgers *et al.* 1990).

Várias abordagens moleculares têm sido utilizadas na caracterização de variantes genéticas em espécies do gênero *Leishmania*: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (Toledo *et al.* 2002), análise por polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de regiões ITS de DNA ribossomal (Cupolillo *et al.* 2003) e de DNA do cinetoplasto (Laurent *et al.* 2007); análise de regiões amplificadas de sequência confirmada (Lewin *et al.* 2002); análise por hibridização de sondas de DNA (Southern blotting) (Sreenivas *et al.* 2004), e análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites (Jamjoom *et al.* 2002; Bulle *et al.* 2002; Schwenkenbecher *et al.* 2004; Ochsenreither *et al.* 2006; Kuhls *et al.* 2007).

Na PCR-RFLP, para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas (Ferreira 1998). Assim, esta técnica difere sensivelmente as espécies de *Leishmania*. No entanto, os inconvenientes dessa abordagem incluem o custo, a disponibilidade de reagentes e equipamentos, e a adaptação às pobres condições de campo.

Em estudos moleculares, a etapa de extração de DNA é muito importante e necessita de uma padronização para cada organismo estudado. Para tanto, pesquisar métodos alternativos de extração de DNA que sejam rápidos, com pouco custo, livres de contaminação e eficazes, pode possibilitar a aplicação da pesquisa em outros estudos, como diagnósticos retrospectivos e populacionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PREPARO DAS LÂMINAS

Foram utilizadas 42 lâminas contendo células infectadas com amastigotas que foram obtidas pela impressão de biópsia das lesões de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (MHOM/BR/08/IM5584). As lâminas foram coradas pelo método Giemsa.

2.2. EXTRAÇÃO DO DNA

As lâminas foram submetidas a um pré-tratamento, as quais foram umedecidas com tampão de lise num volume de 500 µL (NaCl 5M, sucrose, Tris 2M, EDTA 0,5M pH 9,1, H₂O dd) seguidos por 100 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%, para assim serem raspadas com lâmina de bisturi e depositadas em tubos tipo Eppendorf (de 1,5mL). Em seguida foram aplicadas duas variações do método fenol-clorofórmio (Sambrook *et. al* 1989):

- método padrão: As amostras pré-tratadas foram processadas conforme Sambrook *et al.* (1989), sendo adicionado a solução 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL RNase (10mg/mL).
- variação 1 - Overnight -37°C: O material foi exposto a uma temperatura de 37°C, overnight (24 horas) sendo acrescentado 10 µL de proteinase K (10mg/mL) e 10 µL RNase (10mg/mL) a solução;
- variação 2 - Filtração direta: Após o pré-tratamento o material foi filtrado com uma membrana de 0,22µm (Milipore) sendo adicionado a solução 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL RNase (10mg/mL), após a filtração;

O material extraído utilizando as variações foi submetido em seguida ao método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA - MÉTODO FENOL-CLOROFÓRMIO

Pelo método fenol-clorofórmio, o material biológico foi deixado em banho-maria por 2 horas a 56°C. Após está etapa, acrescentou-se 500 µL de fenol ao material que foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos.

Em seguida, foi retirado o sobrenadante e, em um novo tubo, adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio na proporção de 1:1 sendo novamente centrifugado. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, no qual foram adicionados outros 500 µL de clorofórmio e centrifugados a 14.000 rpm, por dois minutos à 4°C.

Após esta etapa, o sobrenadante foi colocado em um novo tubo, adicionando 500µL de etanol absoluto à 4º C e incubado em freezer a -20°C durante toda a noite (overnight). Após este período o material foi centrifugado a 14.000 rpm, por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol a 75%. Em seguida, o material ficou em temperatura ambiente para completa evaporação do etanol, sendo então o sedimento hidratado com 30 µL de TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, H₂O pH 7,4).

2.3. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Após extração, o DNA foi observado em gel de agarose a 1% e realizada a quantificação das amostras em espectrofotômetro (Spectrophotometer Thermo Scientific Nanodrop 2000®). No espectrofotômetro com amplitude variando de 220 a 750nm, verificou-se a concentração de DNA em ng/μL (260/280nm), assim como a pureza e a presença de compostos fenólicos.

2.4. PCR - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DE ITS DO RDNA (RRNA GENE)

Além das análises quantitativas, a qualidade do DNA obtido foi avaliada utilizando a reação da PCR, tendo como alvo a região de ITS. A região de ITS do rRNA foi amplificada utilizando os seguintes iniciadores IR1 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3') e IR2 (5'-GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3'), utilizado por CUPOLILLO *et al.* (1995). Um total de 50ng de DNA da amostra foi adicionado na reação do mix contendo: 10pmol de cada um dos iniciadores; tampão (10mM Tris-HCl, pH 8.0/50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂; 100mM de cada dNTP; 1U Taq polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25μL em termociclador (Thermo Px2 Thermal Cycler) de Gradiente. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 min. e 35 ciclos de 94°C por 1 min., 58°C por 1 min., 72°C por 2 min., seguida por extensão de 72°C por 5 min.

2.5. ELETROFORESE

Os fragmentos de amplificação foram observados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com TAE 1X (Tris-Base 40mM, Ácido acético 20mM, EDTA 1mM pH 8,0) 1% e corado com GelRed® (Biotium).

2.6. RFLP

Após a amplificação do DNA, as amostras foram submetidas à digestão com três enzimas de restrição *HpaII*, *HaeIII* e *TaqI* separadamente com os seguintes protocolos: A *HpaII* e *HaeIII* em um volume final de 25μL da reação foram adicionados 20μL de água estéril, 2μL de tampão 10x, 1μL da enzima de restrição (10U/μL) e 2μL do produto da PCR. A reação foi exposta a 37°C por uma hora.

A *TaqI* reagiu em um volume final de 27μL onde foram adicionados 20μL de água estéril, 2μL de solução tampão de reação 10x, 2μL de BSA (1%), 1μL da enzima de restrição e 2μL do produto da PCR. A reação foi exposta à 65°C em banho-maria por uma hora.

Decorrido o tempo de digestão, o produto foi aplicado em gel de agarose em solução de TAE 1X. Após a corrida a 125V por uma hora as bandas foram visualizadas em transluminador UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das 42 lâminas que foram submetidas à extração de DNA (sendo 14 para cada uma das variações e o método padrão), foi possível comparar as variações do método

fenol-clorofórmio de acordo com a quantidade e a qualidade do DNA obtido (Fig. 1, 2 e 3 e Tab. 2).

Através da observação em gel de agarose do DNA extraído pelo método padrão (Fig. 2), foi possível visualizar a presença de oito bandas fortes (1, 2, 6, 7, 11, 12, 13 e 14), ou seja, 57,14% das amostras apresentaram quantidade e qualidade aceitável do DNA. Utilizando a variação Overnight (Fig. 3), do método de Sambrook *et al.* (1989) a qualidade e quantidade do DNA extraído foi inferior a obtida pelo método padrão, apresentando seis (42,86%) com bandas fortes e uma com presença de rastro (poço 7), indicando que esta pode estar parcialmente degradada. Não se verificou presença de DNA do material extraído pela variação 2, provavelmente devido a perda do DNA durante a filtragem das amostras (Fig. 4).

Figura 1: Gel de agarose a 1% para avaliação da qualidade das amostras extraídas pelo método padrão segundo Sambrook et al. (1989).

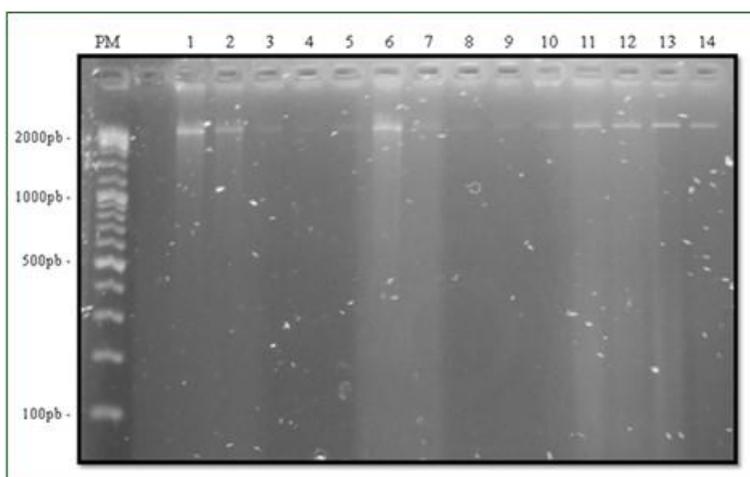


Figura 2: Gel de agarose a 1% para avaliação da qualidade das amostras extraídas pela variação em Overnight do método Fenol-Clorofórmio segundo Sambrook et al. (1989).

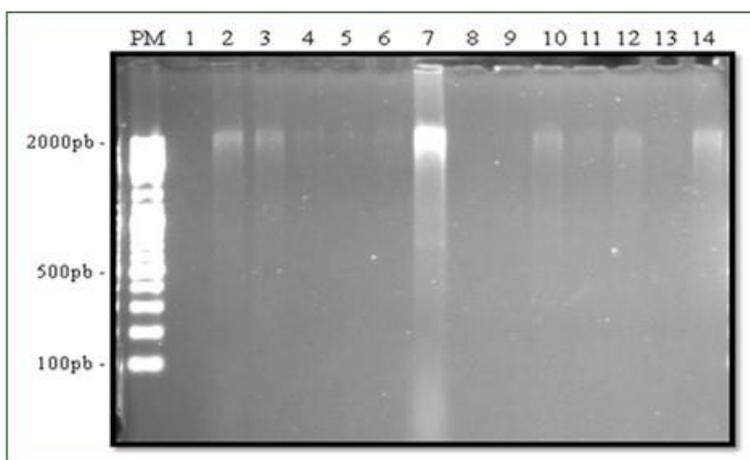
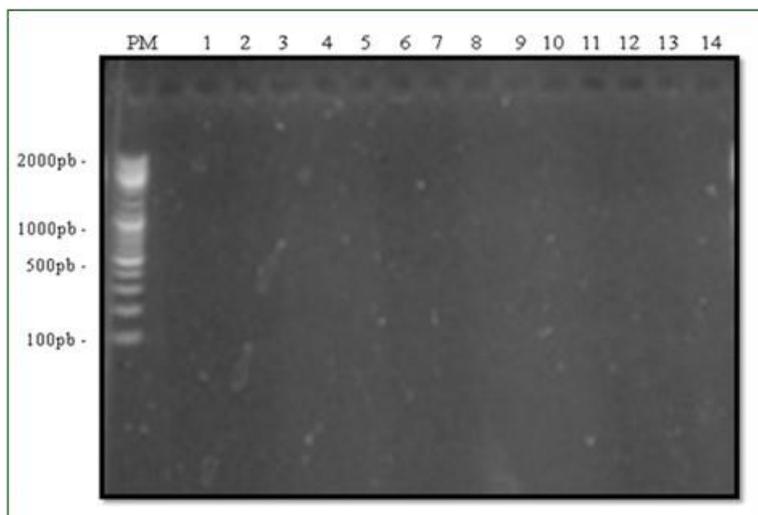


Figura 3: Gel de agarose a 1% para avaliação da qualidade das amostras extraídas pela variação por filtração direta do método Fenol-Clorofórmio segundo Sambrook et al. (1989).



Os resultados obtidos pela extração demonstraram que o método padrão rendeu melhores resultados de acordo com as concentrações de DNA visualizadas em gel de agarose, corroborando com estudo realizado por Barea (2001), no qual obteve resultados na extração de DNA a partir de fontes escassas, com digestão por proteinase K seguido do método padrão fenol-clorofórmio. Porém os melhores resultados apontados por seus estudos foram com maior tempo de incubação (Overnight), o qual foi o segundo melhor resultado obtido em nosso estudo.

Tabela 2: Quantificação do DNA no espectrofotômetro Nanodrop (ND2000®) das amostras de amastigotas, extraídas pelas variações do método de Sambrook et al. (1989).

Amostras	Método Padrão		Variação 1		Variação 2	
	Concentração (ng/μL)	Pureza (260/280)	Concentração (ng/μL)	Pureza (260/280)	Concentração (ng/μL)	Pureza (260/280)
1	17,4	2,78	5,1	2,43	10,1	3,19
2	6,6	3,30	42,8	1,90	4,9	3,12
3	4,8	4,80	5,0	6,25	3,6	4,87
4	5,3	1,60	6,3	2,72	49,1	1,58
5	16,8	2,21	98,6	1,49	11,6	3,53
6	18,2	2,19	121,3	1,55	3,5	4,24
7	8,7	2,26	51,4	1,57	4,1	1,80
8	8,4	1,79	55,5	1,64	4,8	1,58
9	9,5	2,08	40,0	1,64	7,9	2,08
10	12,5	1,71	19,0	1,63	4,2	8,50
11	57,3	2,14	19,7	2,48	17,6	2,51
12	811,0	2,02	8,2	2,32	23,3	2,97
13	67,1	2,11	370,5	1,93	28,7	2,44
14	19,1	2,22	122,9	1,97	96,3	2,12

A quantidade de DNA obtida em cada variação do método de extração, demonstrou que os resultados espectrofotométricos não são parâmetros muito confiáveis para

direcionar os procedimentos técnicos de extração, pois mesmo quando as medidas espectrofotométricas revelaram a presença de DNA, não havia, no entanto, presença de bandas em gel de agarose para quantificação e amplificação bem sucedidas.

Esta discordância dos resultados das quantificações obtidas pela visualização em gel de agarose, e em espectrofotômetro Nanodrop (ND2000®), pode ser decorrente da presença de substâncias residuais do corante utilizado nas lâminas ou também por reagentes utilizados na extração, alterando assim a leitura do espectrofotômetro.

Após a extração do DNA, foi realizada a PCR da região de ITS (Fig. 4, 5 e 6). Houve amplificação desta região em apenas quatro (28,57%) das amostras extraídas (amostras 11, 12, 13 e 14) pelo método padrão (Fig. 4) e três (21,43%) das amostras extraídas (amostras 2, 3 e 7) pela variação 1 (Fig. 5). Entre as extraídas pela variação por *Overnight*, a amostra que apresentou rastro no gel de quantificação, demonstrou que tanto o rastro apresentado no gel quanto o grau pureza encontrado não interferiram nos resultados da PCR. E corroborando com os resultados da quantificação, o DNA das amostras extraídas pela variação 2 não foram amplificadas (Fig. 6). É possível que a ausência de amplificação do DNA das outras amostras extraídas pelo método padrão e pela variação em *Overnight*, possa ter ocorrido devido à presença de inibidores na reação ou mesmo pelas diferentes concentrações de DNA parasitário contidas nas impressões das lâminas utilizadas.

Figura 4: Resultado da PCR em gel de agarose a 1% utilizando DNA das amostras extraídas pelo método padrão. **PM:** Peso Molecular; **C-:** Controle negativo; **1 a 14:** Amostras amplificadas.

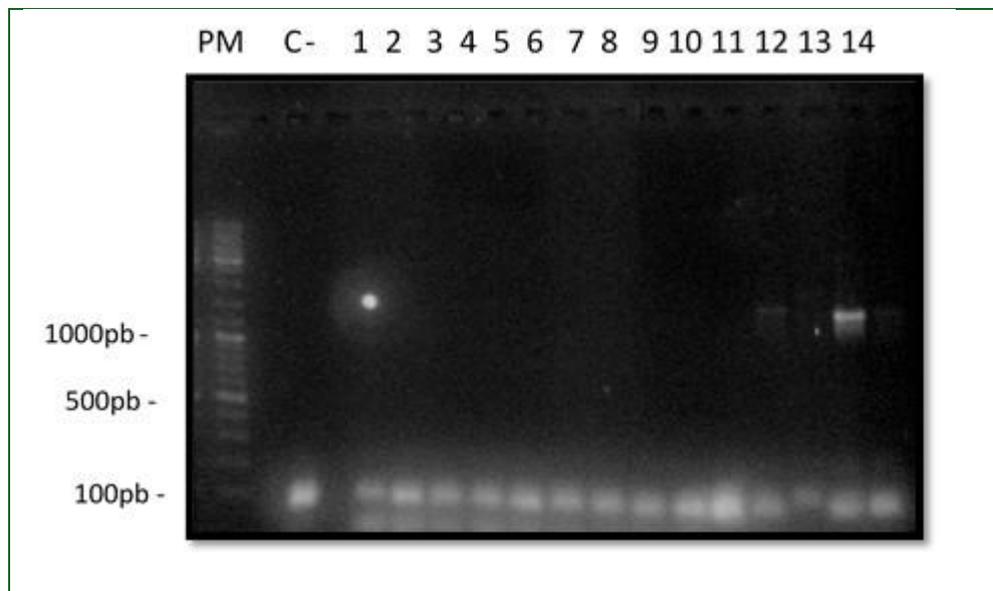


Figura 5: Resultado da PCR em gel de agarose a 1% utilizando DNA das amostras extraídas pela variação em Overnight. **PM:** Peso Molecular; **C-:** Controle negativo; **1 a 14:** Amostras amplificadas.

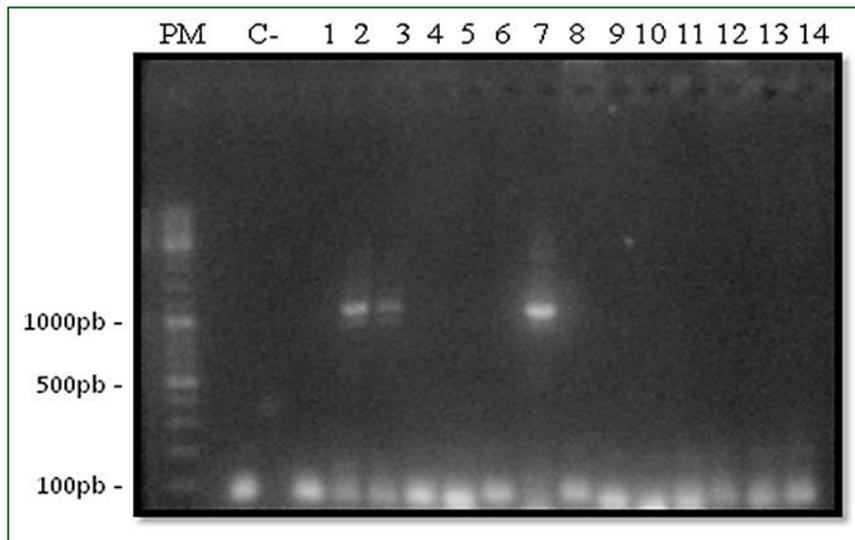


Figura 6: Resultado da PCR em gel de agarose a 1% utilizando DNA das amostras extraídas pela variação por filtração direta. **PM:** Peso Molecular; **C-:** Controle negativo; **1 a 14:** Amostras amplificadas.

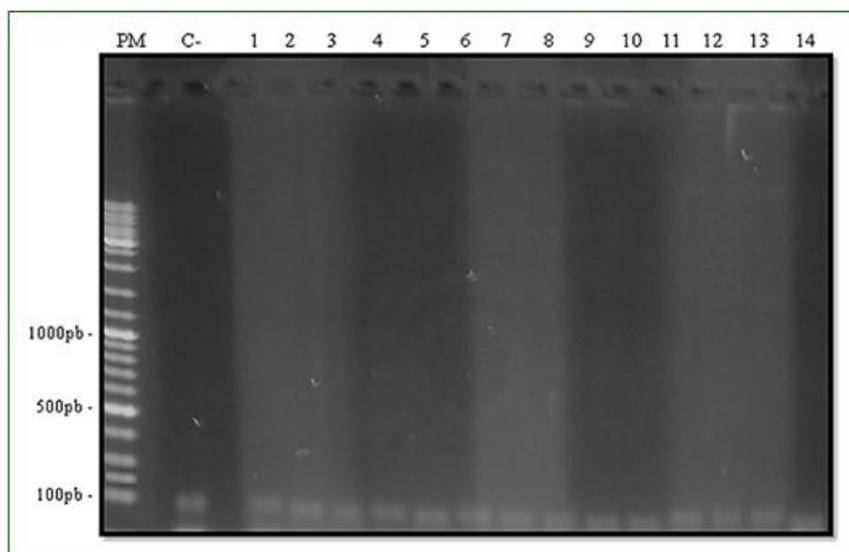
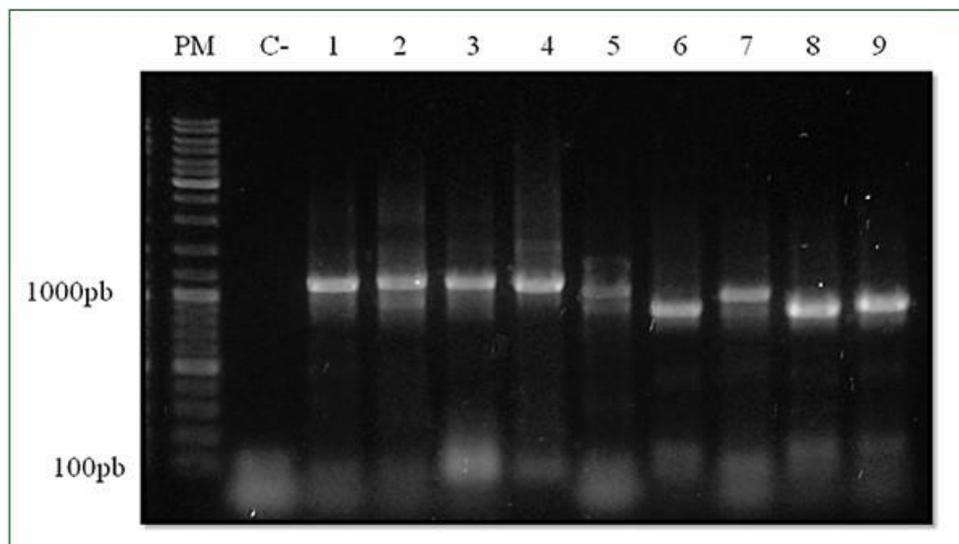


Figura 7: Resultado da PCR em gel de agarose a 1% utilizando DNA das cepas de referência. **PM:** Peso Molecular; **C-:** Controle negativo; **1:** *L. amazonensis*; **2:** *L. braziliensis*; **3:** *L. colombiensis*; **4:** *L. donovani*; **5:** *L. guyanensis*; **6:** *L. lansoni*; **7:** *L. naiff*; **8:** *L. shawi*.



Todas as amostras que sofreram amplificação da região de ITS, apresentaram o mesmo padrão da cepa de referência (Fig. 7) da *L. amazonensis* (poço 1), com bandas com aproximadamente 1000pb.

Estudos com amastigotas de lâminas coradas por Giemsa amplificando a região de ITS foram realizados por Kazemi-Rad *et al.* (2008), corroborando com os nossos resultados, a possibilidade de diagnóstico com formas amastigotas de lâminas coradas. Além disso, tais informações também são importantes em estudos epidemiológicos onde a distribuição das espécies de *Leishmania* em hospedeiros humanos e animais, bem como em insetos vetores, é um pré-requisito para a implantação de medidas apropriadas de controle (El Tai *et al.* 2000; Schönian *et al.* 2003).

O produto da PCR realizada nas amostras obtidas pelo método padrão e pela variação de overnight, foram submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *HpaII*, *HaeIII* e *TaqI* (Fig. 8). A digestão pela enzima *HpaII* apresentou dois fragmentos de 1100 e 100pb, enquanto as amostras digeridas pela *HaeIII* apresentaram, também, digestão em dois fragmentos, 200 e 800pb. A *TaqI* apresentou três fragmentos de 200, 300 e 500pb, cujo os melhores resultados foram visualizados nas amostras 1 e 3. A amostra 2 não apresentou boa definição. A digestão das amostras pelas enzimas de restrição apresentou o mesmo padrão de corte, confirmando que ambas pertencem a mesma espécie, *L. amazonensis*.

Os produtos da amplificação extraídos pelo método padrão não mostraram boa definição após a digestão pelas enzimas de restrição (Fig. 9), apresentando então um perfil duvidoso para a caracterização da espécie.

Figura 8: Resultado da digestão pelas enzimas de restrição em gel de agarose a 1% utilizando produto da PCR do teste 1 (Overnight). **PM:** Peso Molecular; **1A, 2A e 3A:** Amostras digeridas pela HpaII; **1B, 2B e 3B:** Amostras digeridas pela HaeIII; **1C, 2C e 3C:** Amostras digeridas pela TaqI.

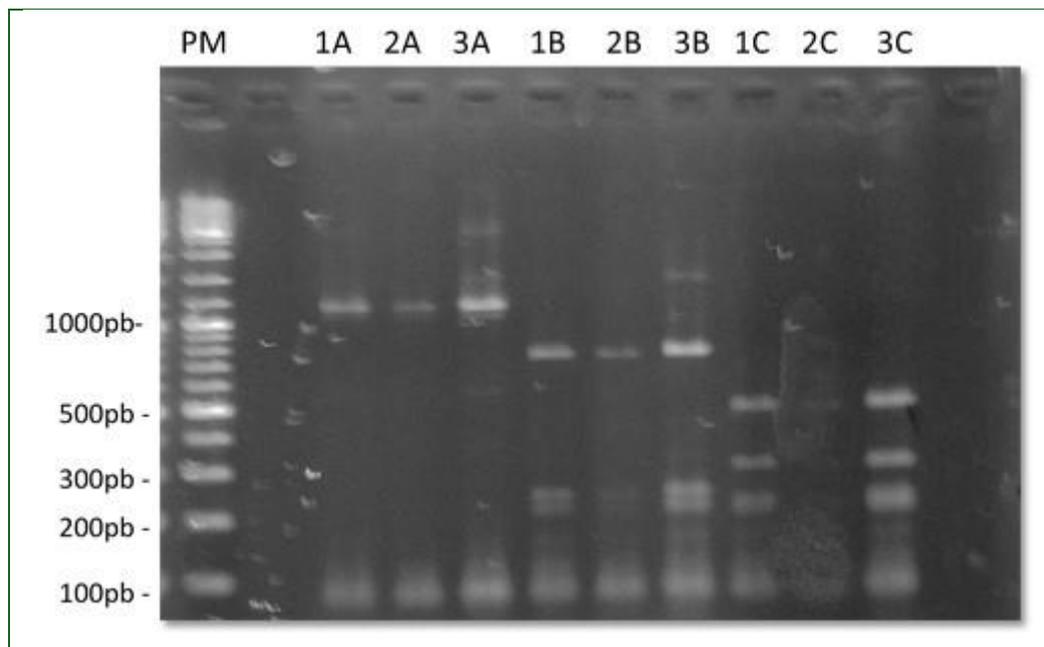
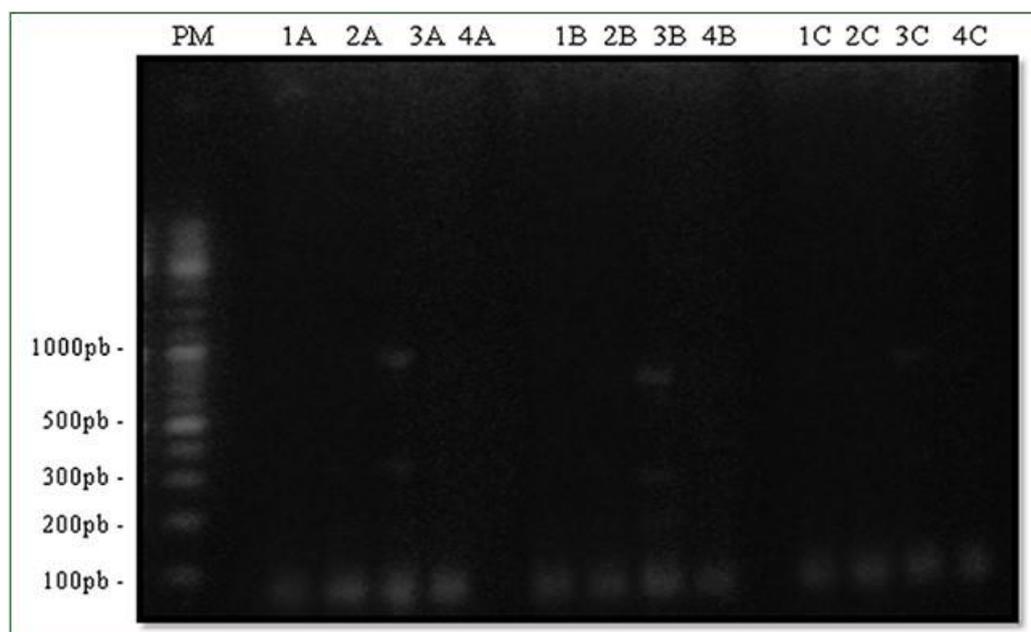


Figura 9: Resultado da digestão pelas enzimas de restrição em gel de agarose a 1% utilizando produto da PCR do método padrão. **PM:** Peso Molecular; **1A, 2A, 3A e 4A:** Amostras digeridas pela HpaII; **1B, 2B, 3B e 4B:** Amostras digeridas pela HaeIII; **1C, 2C, 3C e 4C:** Amostras digeridas pela TaqI.



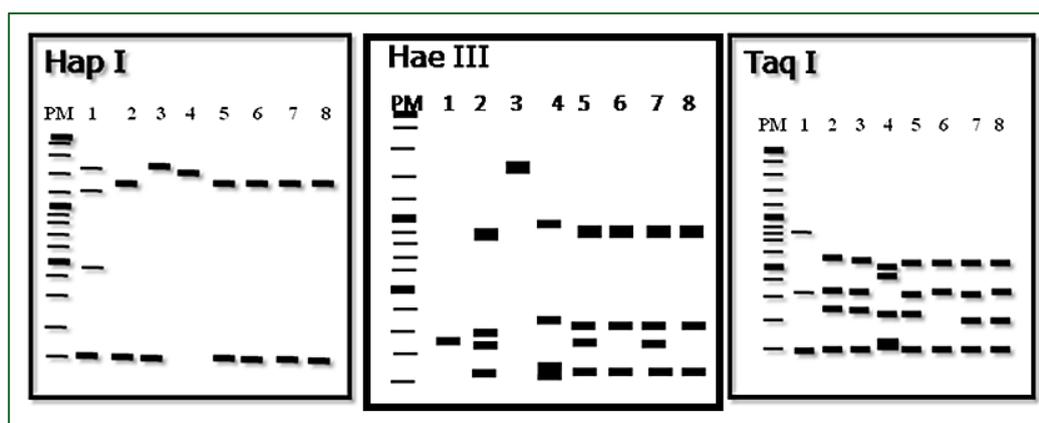
Recentemente, tem-se estudado a técnica PCR-RFLP para discriminar as espécies de *Leishmania* devido a sua alta sensibilidade para discriminar em nível de espécie. Estudos realizados por Alonso (2011), onde utilizou a RFLP com a região ITS-1 para

certificar que o genótipo observado era isolado de *L. infantum chagasi*, comparando com o padrão esperado pela espécie.

A heterogeneidade genética encontrada nas amostras extraídas comparadas com as cepas de referência (Fig. 10), pode ser associada com as diferentes manifestações e formas clínicas, ou até mesmo pela mudança do ambiente. Nesse sentido, Berzunza-Cruz *et al.* (2000) ao analisarem o DNA de cinetoplasto (kDNA) por RFLP demonstraram a heterogeneidade genética apresentada nos isolados pertencentes ao complexo *L. mexicana*, obtendo padrões diferentes das cepas de referências.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que a extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio padrão, a partir de lâminas coradas de biópsia de lesão de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, indicam que esta abordagem pode ser um método alternativo para a detecção de parasitos em exames diretos.

Figura 10: Resultado da digestão pelas enzimas de restrição HapI, HaeIII e TaqI em gel de agarose a 1% utilizando cepas de referência. **PM:** Peso Molecular; **1:** *L. amazonensis*; **2:** *L. braziliensis*; **3:** *L. colombiense*; **4:** *L. guyanense*; **5:** *L. lansoni*; **6:** *L. naiffi*; **7:** *L. panamensis* e **8:** *L. shawi*.



4. CONCLUSÃO

A evolução na área da biologia molecular modificou e aperfeiçoou o diagnóstico de uma forma geral, e ainda é um processo que está em andamento. As técnicas, rotineiramente utilizadas no diagnóstico de diversas doenças possuem limitações, como a construção de iniciadores espécie - específica.

Concomitantemente, com os avanços no emprego e na realização da técnica de polimerização em cadeia, os métodos de extração de DNA também passaram por um processo de aprimoramento, melhorias e adequações, de forma a serem empregados nos mais diferentes tipos de fontes de DNA potenciais, ampliando o campo de utilização da PCR. Esses avanços técnicos têm contribuído para o desenvolvimento de grande número de formas efetivas de "screening" e descobertas de mutações pontuais, antes desconhecidas.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Nossos estudos confirmaram que é possível obter DNA a partir de lâminas coradas;

- Variações do método padrão fenol-clorofórmio melhoram a qualidade do DNA extraídos;
- Que o DNA extraído pode ter a região de ITS amplificada utilizando primers específicos para o gênero *Leishmania*;
- E que é possível especificar as espécies alvo com a técnica PCR-RFLP.

REFERÊNCIAS

- [1] Alonso, D.P. 2011. Utilização de marcadores moleculares no estudo populacional de *Leishmania infantum* chagasi no Brasil. Tese (Doutorado. Instituto de Biociências) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- [2] Andrade, R.V. 2007. Reação em Cadeia de Polimerase em biópsias de pele emblocadas em parafinas compatíveis com Leishmaniose Tegumentar Americana. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- [3] Barea, J.A. 2001. Extração de DNA de material de arquivo e fontes escassas para utilização em Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Dissertação (Mestrado. Departamento em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- [4] Basano, S.A.; Camargo, L.M.A. 2004. Leishmaniose Tegumentar Americana: Histórico, Epidemiologia e Perspectivas de Controle. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, N. 3.
- [5] Berman, J. D. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis. v. 24, p. 684-703.
- [6] Berzunza-Cruz, M., B.; Bricaire, G.; Romero, Z.; Becker, R., P.; Lira, E., S.; Montfort, R., P.; Rossi, M., C.; Castrejon, O., V.; Becker, I. 2000. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. Experimental Parasitology. v. 95, p. 277-284.
- [7] Bulle, B., Millon, L., Bart, J.M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M., Piarroux, R. 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. Journal of Clinical Microbiology. v. 40, p. 3391-7.
- [8] Costa, S.; Cechinel, M.; Bandeira, V.; Zannuncio, J.C.; Lainson, R.; Rangel, E.F. 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 102, p. 149-153.
- [9] Cupolillo, E.; Grimaldi, G. Jr.; Momen, H.; Beverley, S. M. 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. v. 73. p. 145-155.
- [10] Cupolillo, E.; Brahim, L.R.; Toaldo, C.B.; Oliveira-Neto, M.P.; Brito, M.E.F.; Falqueto, A., Naiff, M.F. & Grimaldi Jr., G. 2003. Genetic Polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. Jour. Clin. Microbiol. v. 41, p. 3126-3132.
- [11] Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis. Nat. Rev. Microbiol. v. 2, p. 692-693.
- [12] Disch, J.; Pedras, M. J.; Orsini, M.; Pirmez, C.; Oliveira, M. C.; Castro, M.; Rabello, A. 2005. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. Diagn. Microbiol. Infect. v. 51, p. 185-90.
- [13] El Tai, N.O., Osam, O.F., Elfari, M., Presber, W., Schönian, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans. R. Trop. Med. Hy. v. 5, p. 575-79.
- [14] Ellis, J.; Crampton, J. 1988. Characterization of a simple, highly repetitive DNA sequence from the parasite *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. v. 29, p. 9-17.
- [15] Figueira, L.P., Zanotti, M., Pinheiro, F. G., Franco, A.M.R. 2008. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da

Eva e Manaus, Estado do Amazonas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.41, p. 512-514.

- [16] Figueiredo, M. M. 2009. Análise histológica, parasitológica e morfométrica da pele de orelha de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Dissertação (Mestrado. Programa de Pós-graduação em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- [17] Ferreira, M. E; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3ª edição. Embrapa-Cenargen: Brasília.
- [18] Grimaldi, G. Jr. Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. Clin. Microbio. Rev. v. 6, p. 230-250.
- [19] Guevara, P.; Alonso, G.; Da Silveira, J. F.; De Mello, M.; Scorza, J. V.; Anez, N.; Ramirez, J. L. 1992. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. Mol. Biochem. Parasitol. v. 56, p. 15-26.
- [20] Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Kemp, S.J., Noyes, H.A. 2002. Polymorphic microsatellite repeats are not conserved between *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. Molecular Ecology Notes. v. 2, p. 104-106.
- [21] Kazemi-Rad, E., Mohebbali, M., Hajjaran, H. 2008. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. Iranian J. Publ. Health. Vol. 37, p. 54-60.
- [22] Kuhls, K., Keilonat, L., Ochsenreither, S., Schaar, M., Schweynoch, C., Presber, W., Schonian, G. 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. Microbes and Infection. v. 9, p. 334-43.
- [23] Laurent, T.; Rijal, S.; Yardley, V.; Croft, S.; De Doncker, S.; Decuypere, S.; Khanal, B.; Singh, R.; Schönian, G.; Kuhls, K.; Chappuis, F.; Dujardin, J. 2007. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. Inf. Gen. Evol. v. 7, p. 206-212.
- [24] Lewin, S., Schonian, G., El Tai, N., Oskam, L., Bastien, P., Presber, W. 2002. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. International Journal for Parasitology. v. 32, p. 1267-76.
- [25] Lima, A.C.M. 2010. Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil. Tese (Doutorado. Departamento de Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- [26] Lukes, J.; Maurício, I.L.; Schönian, G.; Dujardin, J.C.; Soteriadou, K.; Dedet, J.P.; Kuhls, K.; Tintaya, K.W.Q.; Jirku, M.; Chocholová, E.; Haralembous, C.; Pratlong, F.; Oborník, M.; Horák, A.; Ayala, F.J.; Miles, M.A. 2007. Evolutionary and Geographical History of the *Leishmania donovani* Complex with a Revision of Current Taxonomy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 104, p. 9375-9380.
- [27] Ministério da Saúde. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição. Editora MS: Brasília.
- [28] Marzochi, M. C.; Teixeira, P. C.; Marzochi, K. B.; Conceição, N. F.; Coutinho, W.; Brito, D. B. 1993. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 35, p. 301-303.
- [29] Maurício, I.L.; Stothard, J.R.; Miles, M.A. 2000. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. Parasitol. Today. v. 16, p. 188-189.
- [30] Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schonian, G. 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. Journal of Clinical Microbiology. v. 44, p. 495-503.
- [31] Pirmez, C.; Silva Trajano, V.; Paes-Oliveira Neto, M.; Cruz, A. M.; Gonçalves-da-Costa, S. C.; Catanho, M.; Degraeve, W.; Fernandes, O. 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. J. Clin. Microbiol. v. 37, p. 1819-1823.
- [32] Reed, S. G. 1996. Diagnosis of leishmaniasis. Clin. Dermatol. v. 14, p. 471-478.
- [33] Reithinger, R.; Davies, C. R. 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am. J. Trop. Med. Hyg. v. 61, p. 530-534.

- [34] Rodgers, M.R.; Popper, S.J.; Wirth, D.F. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* v.71, p. 267-275.
- [35] Romero, G. A.; Guerra, M. V.; Paes, M. G.; Macêdo, V. O. 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 65, p. 456-465.
- [36] Saiki, R.K. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* v. 239, p. 487-491.
- [37] Salinas, G.; Valderrama, L.; Palma, G.; Montes, G.; Saravia, N. G. 1989. Detection of amastigotes in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis using the immunoperoxidase method, using polyclonal antibody: sensibility and specificity compared with conventional methods of diagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 84, p. 53-60.
- [38] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [39] Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Infect.* v. 47, p. 349-58.
- [40] Schwenkenbecher, J.M., Wirth, T., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Schallig, H., Al-Jawabreh, A., Hamarsheh, O., Azmi, K., Pratlong, F., Schonian, G. 2004. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology.* v. 36, p. 237-46.
- [41] Sreenivas, G.; Raju, B.V.S.; Singh, R.; Selvapandiyani, A.; Duncan, R.; Sarkar, D.; Nakhasi, H.L.; Salotra, P. 2004. DNA Polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmania donovani* that cause kala-Azar from those that cause post-kala-azar dermal leishmaniasis in humans. *J. Clin. Microbiol.* v. 42, p.1739-1741.
- [42] Toledo, A., Martín-Sánchez, J., Pesson, B., Sanchiz-Marín, C., Morillas-Márquez, F. 2002. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol Biochem Parasitol.* v. 119, p. 257-264.
- [43] Weigle, K. A.; Labrada, L. A.; Lozano, C.; Santrich, C.; Barker, D. C. 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J. Clin. Microbiol.* v. 40, p. 601-606.
- [44] World Health Organization (Who). 2002. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly epidemiological record.* v. 44, p. 365-372.

Análise por eletroforese bidimensional do perfil proteico do plasma de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Sharala Kumari, Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira, Luanda de Paula Figueira, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: As leishmanioses são antropozoonoses com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. O tripanossomatídeo do gênero *Leishmania* é o agente etiológico transmitido através da picada das fêmeas hematófagas de flebotomíneos. As manifestações clínicas variam de acordo com o estado imunológico do hospedeiro e as características da espécie de *Leishmania*. A identificação de marcadores proteicos da infecção por *Leishmania* em seres humanos tem importância para o diagnóstico, confirmação da cura da doença, além da busca de alternativas de tratamento e vacinas. Os biomarcadores são moléculas detectáveis associadas a processos biológicos normais, patogênicos ou a resposta farmacológica após intervenção terapêutica. Os objetivos deste estudo foram confeccionar géis de poliacrilamida 12,5% para obter mapas proteômicos de plasma de cinco indivíduos não infectados (controle) e dez pacientes, de ambos os sexos, infectados com *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente; determinar os perfis proteicos, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional, e compará-los, a fim de averiguar se existem diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas nessas condições e identificar os possíveis candidatos a marcadores proteicos que possam indicar evolução da doença ou cura parasitológica da infecção por *L. (V.) guyanensis*. Os pacientes são oriundos dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva, AM, Brasil. A identificação da espécie de *Leishmania* foi baseada na eletroforese de isoenzimas. Para se buscar esses marcadores foi realizada uma análise comparativa entre mapas bidimensionais de plasma dos indivíduos.

Palavras-chave: leishmaniose, proteínas, plasma.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido a seres humanos e animais habitualmente por picada de flebotomíneos. Embora o predomínio seja em regiões tropicais e subtropicais, já foram detectadas em várias localidades do mundo. No continente americano, estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, a doença tem sido assinalada em todos os estados; no Amazonas, é endêmica (Funasa 2000; Brasil 2007; Coelho *et al.* 2011).

As leishmanioses são referidas como um grupo de doenças, pelo amplo espectro de manifestações clínicas, associadas à interação entre a resposta imune do hospedeiro e as diferentes espécies do gênero *Leishmania*, com características próprias de invasividade, tropismo e patogenicidade (Ashford *et al.* 1992; Rodriguez-Bonfante *et al.* 2003; Silveira *et al.* 2004; Reithinger *et al.* 2007).

Embora, no Brasil, a LTA possa ser causada por sete espécies de *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, no Amazonas, o maior número de casos (83%) é por *L. (V.) guyanensis* (Naiff *et al.* 1988; Grimaldi *et al.* 1991; Lainson 1997; Naiff 1998; Silveira *et al.* 2004).

O diagnóstico clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) baseia-se nas lesões cutâneas, que podem caracterizar as formas localizada (lesão única ou múltipla), disseminada (lesões muito numerosas em várias regiões do corpo) e difusa (lesões nodulares ou verrucosas em extensas áreas da pele) da doença (Funasa, 2000).

Pesquisadores do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz vem desenvolvendo pesquisa com objetivo de comparar os mapas proteicos de diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes com distintas formas clínicas de leishmaniose cutânea. O principal objetivo é, através de eletroforese, identificar proteínas que, diferencialmente expressas pelas cepas, possam estar associadas à severidade das manifestações clínicas da doença (Cuervo *et al.* 2009).

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração das moléculas carregadas, numa solução, em função da aplicação de um campo elétrico. A velocidade de migração das proteínas no gel de poliacrilamida, uma matriz sólida, depende da força do campo aplicado, da carga, do tamanho e da forma das moléculas, da força iônica e da temperatura do meio (Rocha *et al.* 2005).

Diversos autores (Schubach *et al.* 1998 a,b) tem demonstrado que no tratamento para as leishmanioses cutâneas ocorre a cura clínica com a cicatrização das lesões, o que não coincide com a cura parasitológica pois o parasita continua quiescente nos locais destas cicatrizes. Este fato corrobora para a necessidade de estudos relacionados à obtenção de marcadores proteicos da infecção que possam indicar o processo de cura ou eliminação do parasito em formas cutâneas da leishmaniose.

O proteoma (*the protein complement expressed by a genome*), definido como todas as proteínas presentes em uma determinada célula num determinado momento, reflete a expressão de genes específicos em situações pontuais. Engloba conhecimentos e técnicas capazes de não só identificar um conjunto de proteínas produzidas por uma célula, mas também de revelar as interações e interdependência dos processos biológicos,

constituindo uma nova linguagem para desvendar o significado do complexo mapa da síntese proteica (Abbott 1999; Trayhurn 2002).

Este estudo apresenta importância para a saúde pública do estado do Amazonas, onde há alta incidência de leishmaniose causada por *L. (V.) guyanensis* e a resposta variável ao tratamento com antimonial pentavalente. A avaliação do mapa proteômico do plasma de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* pode permitir a detecção de marcadores da infecção causada por esse parasita, que podem ser usados para a confirmação da cura clínica da doença e impulsionar a busca de alternativas de tratamento e vacinas.

Diante do exposto, os objetivos da pesquisa foram determinar o perfil proteico do plasma de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* antes e após tratamento com Antimonial Pentavalente, pela técnica de eletroforese bidimensional; confeccionar géis 2D-SDS-PAGE e obter mapas proteômicos de plasma de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* antes e após tratamento; comparar os diferentes perfis proteicos obtidos por eletroforese bidimensional e averiguar se existem diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas nessas condições; identificar os possíveis candidatos a marcadores proteicos da infecção por *L. (V.) guyanensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil, como subprojeto do projeto intitulado “Caracterização de Proteínas diferencialmente expressas em Plasma de Pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* antes e depois do tratamento e identificação de marcadores proteicos da infecção”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INPA, sob o protocolo de número 193/08 do CEP/INPA.

2.2. AMOSTRAGEM EXPERIMENTAL

Plasma de 10 pacientes com LTA cutânea, causada por *L. (V.) guyanensis*, com tempo de evolução da doença entre 15 e 40 dias obtidos nas fases antes e pós-tratamento com antimonial pentavalente, após confirmação de cura clínica (cicatrização das lesões); e plasma de cinco pacientes saudáveis (controle), de área endêmica de LTA, mas que nunca tiveram contato com o parasita. Todos os pacientes são adultos (acima de 18 anos) oriundos dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, AM, locais onde o laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas desenvolve projetos de pesquisa. Foi realizada coleta de sangue, do grupo controle e doentes antes do tratamento e após cura clínica, com anticoagulante e centrifugado, para a obtenção de plasma, o qual foi alíquotado e estocado a -80°C. Somente foram incluídos neste estudo pacientes infectados que tiveram cepas de suas lesões isoladas e caracterizadas por análise de isoenzimas.

2.3. EXAME DIRETO E CULTURA DE PARASITAS

Através da escarificação da borda da lesão, coletou-se material para a confecção de lâmina coradas por kit Panótico® para pesquisa de amastigotas no exame direto. Fragmentos da lesão foram semeados em meio de cultura para obtenção de massa parasitária para análise de isoenzimas e criopreservação.

2.4. ANÁLISE DE ISOENZIMAS

O isolamento primário das amostras de cepas dos pacientes foi realizado semeando-se fragmentos de biópsia de lesões, em meio de cultura ágar-sangue modificado (Marin *et al.* 1982). Os estoques estabilizados *in vitro* foram expandidos em meio líquido Schneider (Hendricks *et al.* 1978). Para a eletroforese de isoenzimas, foram utilizados oito sistemas enzimáticos (Cupolillo *et al.* 1994) e as amostras foram preparadas segundo protocolo estabelecido por Momen (1994).

2.5. MAPAS PROTEÔMICOS E OBTENÇÃO DOS GÉIS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-SDS-PAGE)

Inicialmente foram removidas IgG e albumina das amostras de plasma, utilizando a coluna Hitrap Albumin & IgG Depletion e o equipamento ÄKTA purifier UPC 900 (GE Healthcare). Este sistema é constituído de coluna de afinidade capaz de reter estas duas proteínas em até 60% do total de proteínas do plasma humano, permitindo que as proteínas normalmente obscurecidas pela albumina e IgG sejam visualizadas.

A eletroforese bidimensional ocorre em duas etapas. Na primeira dimensão (focalização isoeletrica) as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico na fita de IPG com gradiente de pH imobilizado (13-cm pH 3-10 Não linear) para reidratação no gel de forma gradual, usando o aparato IPGphor 3 (GE Healthcare®), conforme Haudek *et al.* (2009). Para a corrida de segunda dimensão, a fita é posicionada sobre o gel de poliacrilamida a 12,5% utilizando-se a técnica de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS - duodecil sulfato de sódio) descrita por Laemmli (1970), onde a separação das proteínas é de acordo com a massa molecular.

Após a focalização isoeletrica, as fitas foram equilibradas durante 15 minutos, em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, uréia 6M, 30% glicerol, 2% SDS, azul de bromofenol) contendo 65mM de DTT reação de redução) e, em seguida, durante 15 minutos no mesmo tampão contendo 25 mg/mL de iodoacetamida (reação de alquilação).

Após equilíbrio das fitas, a segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5% (2D-SDS-PAGE) num sistema vertical.

Os géis foram corados com Comassie Blue Colloidal. Inicialmente foram fixados em solução contendo 40% etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos. Em seguida, os géis foram corados por sete dias. Para revelação dos spots nos mapas proteicos, os géis foram descorados com água destilada durante três dias.

2.6. ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens dos géis bidimensionais foram documentados e digitalizadas a partir dos géis corados usando *ImageScanner III (GE Healthcare®)*. As imagens geradas foram analisadas usando o programa *ImageMaster 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare®)*.

Os pontos apresentando pelo menos a diferença de duas vezes no volume foram considerados como diferencialmente expressos. A análise da expressão dos spots foi processada usando parâmetros percentuais de volume pelo programa *ImageMaster 2D Platinum v6.0*. A autenticidade e relevância de cada *spot* foram validadas por inspeção visual e editadas quando necessário.

A intensidade de cada spot proteico foi normalizada relativa à abundância total de todos os *spots* válidos. Após a normalização e a subtração do background, um grupo de géis consenso foi criado para cada condição (três réplicas de cada amostra). A análise diferencial foi feita comparando-se a quantidade de *spots* em cada condição (Grupo controle x Antes do Tratamento x Pós-Tratamento).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram atendidos pelo grupo do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas 208 pacientes com suspeita de leishmaniose, nos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus. Destes, 56 (27%) eram adultos, de primeira infecção. As espécies de *Leishmania* foram caracterizadas através da técnica de eletroforese de isoenzimas: duas *L. (L.) amazonensis*, três *L. (V.) braziliensis*, cinco *L. (V.) naiffi*, vinte e seis tiveram *L. (V.) guyanensis* e vinte não tiveram suas cepas isoladas por dificuldades técnicas ou tiveram suas culturas contaminadas.

Foi realizada a coleta de sangue de cinco indivíduos saudáveis (grupo controle) e dos dez pacientes selecionados para o desenvolvimento do projeto, os quais foram acompanhados desde o diagnóstico ao final do tratamento com coletas de sangue antes do tratamento e após a cura clínica. O sangue foi submetido à centrifugação com anticoagulante, sendo o plasma aliquotado e armazenado a -80°C até o momento da utilização e preparo das amostras para a execução da técnica de SDS-PAGE.

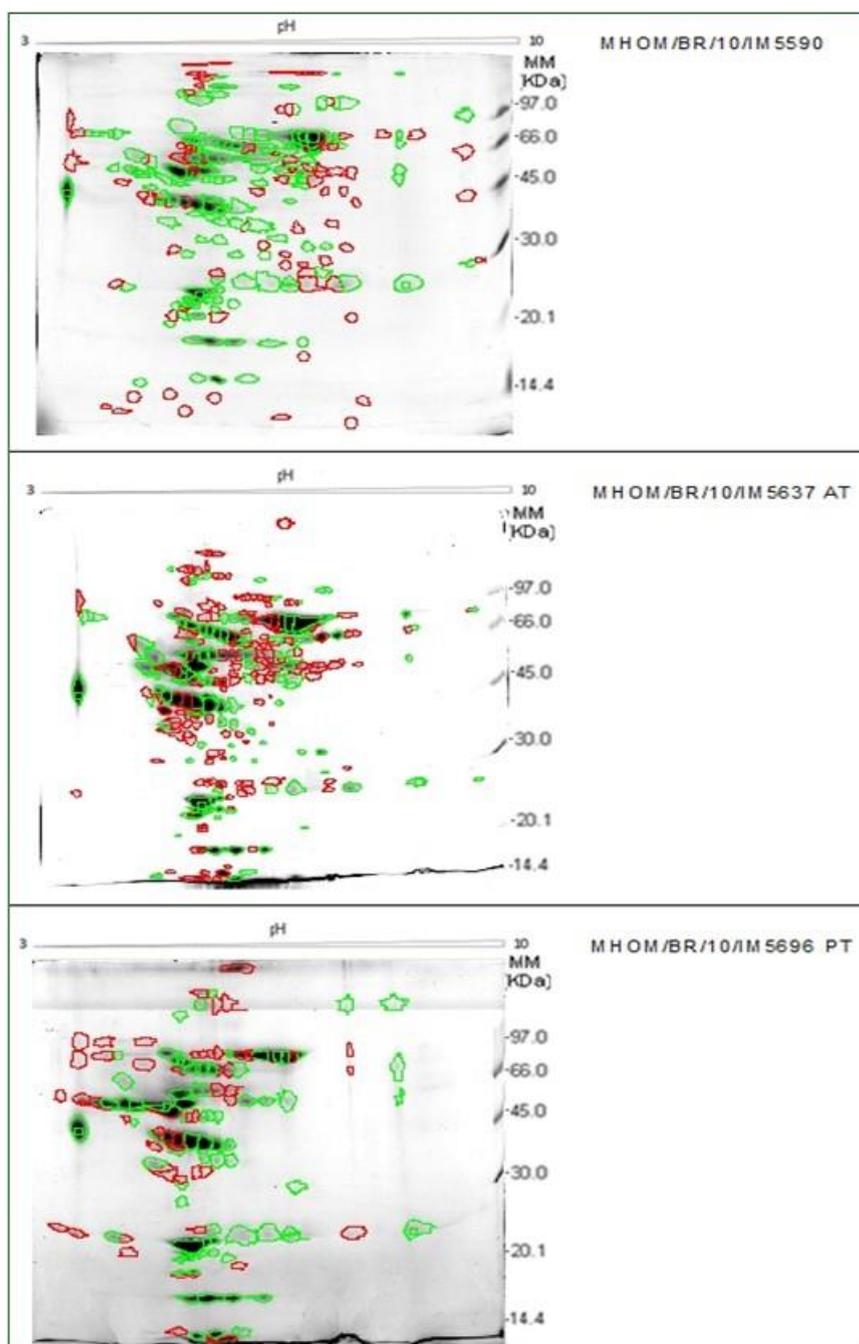
Para a análise proteômica da infecção por *L. (V.) guyanensis*, foram realizadas eletroforeses bidimensionais (2D-PAGE) das proteínas do plasma de 10 pacientes nas condições antes e pós-tratamento e do grupo controle.

As imagens dos géis bidimensionais digitalizadas, dois grupos consenso de géis foram analisados. O grupo 01 foi composto por três géis, sendo um de plasma de controle feminino (MHOM/BR/10/IM5590) e dois, de duas pacientes: MHOM/BR/10/IM5637 AT (Antes do Tratamento) e MHOM/BR/10/IM5696 PT (Pós-tratamento). O grupo 02 formou-se a partir de géis de plasma de um controle (MHOM/BR/10/IM5685) e de dois pacientes masculinos: MHOM/BR/08/IM5520 AT e MHOM/BR/11/IM5775 PT.

A média do número de *spots* expressos nas três condições foi de 235, sendo um maior número observado em paciente com infecção ativa (294 em homem e 271 em mulher). A maioria dos spots proteicos foi expressa na região ácida entre 77 e 30 kDa.

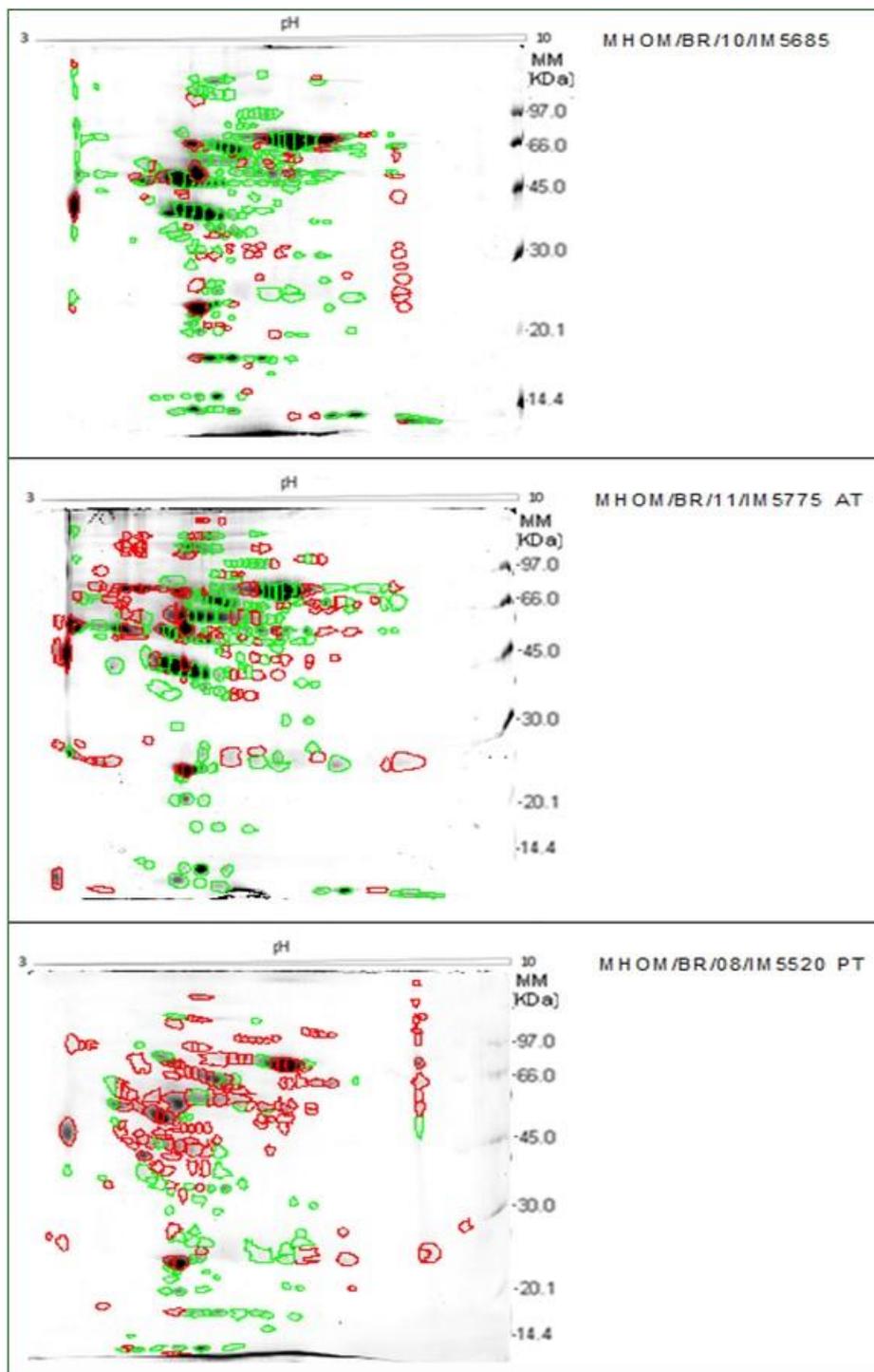
No perfil proteico do grupo 01, foi revelado um total de 232 *spots* do controle (MHOM/BR/10/IM5590) frente a 271 da paciente MHOM/BR/10/IM5637 AT e 140 da paciente MHOM/BR/10/IM5696 PT.

Figura 01. Imagens dos géis bidimensionais do grupo 01, analisados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare®)*. Em verde, *spots* semelhantes entre os géis. Em vermelho, *spots* diferencialmente expressos.



O grupo 02 revelou um total de 256 *spots* do controle MHOM/BR/10/IM5685 frente a 222 e 294 dos pacientes MHOM/BR/08/IM5520 AT e MHOM/BR/11/IM5775 PT, respectivamente.

Figura 02. Imagens dos géis bidimensionais do grupo 02, analisados pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare®)*. Em verde, *spots* semelhantes entre os géis. Em vermelho, *spots* diferencialmente expressos.



4. CONCLUSÃO

O melhor conhecimento da fisiopatologia tem permitido a identificação de marcadores genéticos, bioquímicos e imunológicos que contribuem não só com diagnósticos de doenças, mas também com a atividade e remissão dos processos patológicos. A identificação de marcadores proteicos pela técnica do gel 2D consiste em contrastar diferenças no gel de indivíduos portadores da patologia em estudo em relação ao de indivíduos saudáveis.

O estudo do plasma humano é um dos caminhos para a busca destes marcadores, pois o proteoma do plasma é suscetível de conter, se não todas, quase todas as proteínas humanas, bem como proteínas derivadas de diversos microrganismos; algumas introduzidas em baixas concentrações provenientes de tecidos, enquanto outras, como albumina, em grandes concentrações.

Na comparação entre os pacientes infectados antes e após tratamento com o grupo controle, o número de *spots* diferencialmente expressos foi de 19 nos homens e 50 nas mulheres. A expressão de um maior número de *spots* nas amostras de pacientes infectados antes do tratamento indica a existência de grupos de proteínas e peptídeos expressos especificamente nesta condição, que deixam de ser expressos após o tratamento, podendo ser indicados como marcadores proteicos da infecção por *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- [1] Abbott, A. 1999. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*, 402 (6763): 715-720.
- [2] Ashford, R.W.; Desjeux, P.; Deraadt, P. 1992. Estimation of populations at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol. Today*, 8 (3): 104-105.
- [3] Coelho, L.I.C.; Paes, M.; Guerra, J.A.; Barbosa, M.G.; Coelho, C.; Lima, B.; Brito, M.E.; Filho, S.P.B. 2011. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol. Res.*, 108: 671-677.
- [4] Cuervo, P.; Jesus, J. B.; Saboia-Vahia, L.; Mendonça-Lima, L.; Domont, G. B.; Cupolillo, E. 2009. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes. *J. Proteomics*, 73 (1): 79-92.
- [5] Cupolillo, E.; Grimaldi, G. JR.; Momen, H. 1994. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50 (3): 296-311.
- [6] Funasa, Fundação Nacional de Saúde. 2000. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da saúde. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 5ª edição, 62p.
- [7] Grimaldi, G.JR.; Momen, H.; Naiff, R.D.; McMahan-Pratt, D.; Barrett, T. V. 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals and sand flies in the Amazon Region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 645-661.
- [8] Haudek, V. J.; Slany, A.; Gundacker, N. C.; Wimmer, H.; Drach, J.; Gerner, C. 2009. Proteome maps of the main human peripheral blood constituents. *Journal of Proteome Research*, 8 (8): 3834-3843.
- [9] Hendricks, L.D.; Wood, D.E.; Hadjuk, M.E. 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitol.*, 76: 309-316.
- [10] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 228 (5259): 680-685.
- [11] Lainson, R. 1997. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência a região amazônica no Brasil. *Revista Paraense de Medicina*, 11 (1): 29-40.
- [12] Marin, F.; Lomas, G.J.; Penarrubia, M.P.; Penalver, J. 1982. Cultivation of *Leishmania*: comparison of different media for promastigote cultivation. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 76 (6): 607-613.

- [13] Brasil. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 180p.
- [14] Momen, H.; Cupolillo, E.; Grimaldi, G.JR. 1994. A general classification of the New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50 (3): 296-311.
- [15] Naiff, R.D.; Talhar, I.S.; Barrett, T. 1988. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of nasal mucosa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83: 529-530.
- [16] Naiff, M.F. 1998. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Rio de Janeiro: Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ.
- [17] Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.*, 7: 581-96.
- [18] Rodriguez-Bonfante, C.; Bonfante-Garrido, R.; Grimaldi JR, G.; Momen, H.; Cupolillo, E. 2003. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect. Gen. Evol.*, 3 (2): 119-124.
- [19] Rocha, T. L.; Costa, P. H. A.; Magalhães, J.C.C.; Evaristo, R. G. S.; Vasconcelos, E.A.R.; Coutinho, M.V.; Paes, N.S.; Silva, M.C.M.; Grossi-De-Sá, M.F. 2005. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. Comunicado Técnico. Brasília, DF.
- [20] Schubach, A.; Haddad, F.; Oliveiraneto, M.P.; Degrave, W.; Pirmez, C.; Grimaldi, G.JR.; Fernandes, O. 1998a. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *Journal Infection Disease*, 178 (3): 911-914.
- [21] Schubach, A.; Marzochi, M.C.A.; Cuzzimaya, T.; Oliveira, A.V.; Araújo, M.L.; Oliveira, A.L.C.; Pacheco, R.S.; Momen, H.; Silva, F.C.; Coutinho, S.G.; Marzochi, K.B.F. 1998b. Cutaneous scars in American Tegumentary Leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Journal de Medicina Tropical*, 58 (6): 824-827.
- [22] Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil- A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99 (3): 239-251.
- [23] Trayhurn, P. 2000. Proteomics and Nutrition – A science for the first decade of the new Millennium. *British J. of Nutrition*. 83: 1-2.

CAPÍTULO 08 Caracterização bioquímica de isolados humanos de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil

Alana Cristina Vinhote da Silva, Francimeire Gomes Pinheiro, Luanda Figueira, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: A manutenção de endemias em determinada área, particularmente aquelas transmitidas por vetores, depende da presença de populações de espécies envolvidas na cadeia de transmissão (agentes etiológicos, reservatórios e vetores) e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento. Tais condições são naturalmente encontradas, como podem ser propiciadas pelas alterações causadas pelo homem, levando à adaptação de espécies às novas condições criadas. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi caracterizar amostras de *Leishmania* sp. (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) isoladas de pacientes humanos do município de Rio Preto da Eva, Estado do Amazonas - Brasil, comparando-se com perfis de cepas de referência sugeridas pela Organização Mundial de Saúde. Neste estudo, foram incluídos todos os pacientes independentes do sexo, oriundos do município de Rio Preto da Eva com suspeita de leishmaniose. Os pacientes incluídos neste estudo foram notificados da importância do presente projeto de pesquisa e preencheram termo de consentimento informado, além de fornecer dados relevantes ao trabalho de pesquisa. Foram excluídos do estudo aqueles que não concordaram em participar do trabalho, pacientes de 0 a 18 anos e com o material de coleta eventualmente contaminado ou nos quais ocorresse crescimento de parasitas. Através da análise preliminar da posição dos eletromorfos nos géis, das 12 amostras isoladas de humanos, oito isolados foram identificados como *Leishmania (V.) guyanensis* e uma como *Leishmania (L.) amazonensis*. “A presente pesquisa contribuiu para a compreensão mais profunda das espécies de *Leishmania* e revelou a notável variabilidade entre as populações de isolados em circulação na natureza, enfocando especialmente aquelas que têm impacto na infecção humana.”

Palavras-chave: Parasitologia médica, *Leishmaniose* cutânea, pacientes.

1. INTRODUÇÃO

A manutenção de endemias em determinada área, particularmente aquelas transmitidas por vetores, depende da presença de populações de espécies envolvidas na cadeia de transmissão (agentes etiológicos, reservatórios e vetores) e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento. Tais condições são naturalmente encontradas, como podem ser propiciadas pelas alterações causadas pelo homem, levando à adaptação de espécies às novas condições criadas.

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária de caráter zoonótico que acomete diversas espécies de animais silvestres e domésticos (roedores, marsupiais, edentados e primatas) e secundariamente o homem, causada por várias espécies de *Leishmania* (Gontijo *et al.* 2003; Amim e Manisali 2000).

É uma infecção intracelular, sendo a transmissão realizada por um vetor flebotomíneo, do gênero *Lutzomyia* (Costa *et al.* 2003). As leishmanias são parasitos digenéticos, completando seu ciclo biológico em dois hospedeiros (invertebrado, na forma promastigota; e no vertebrado sob a forma amastigota) e se multiplica por divisão binária e clonal. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro, podendo apresentar as formas: tegumentares, a forma mucosa e as leishmanioses viscerais (Carvalho *et al.* 1994; Levine *et al.* 1980).

No Amazonas, a incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) aumentou significativamente no rastro da abertura de novas estradas e do estabelecimento de novos núcleos residenciais em regiões previamente cobertas por densa floresta tropical (Talhari *et al.* 1988; Pinheiro *et al.* 2008). Em áreas de assentamento próximo às rodovias o índice de casos é relevante. Esse aumento corresponde a dois padrões epidemiológicos distintos, um relacionado à expansão das fronteiras agrícolas e outro ao crescimento de regiões periurbanas, com possível adaptação dos parasitos a reservatórios extra-silvestres (OMS 1998).

Até o ano de 2008, o Estado do Amazonas contabilizava um total de 19.603 famílias assentadas, distribuídas em 42 projetos de assentamento, conforme os registros da Superintendência Regional do INCRA no Estado. Entre esses inúmeros projetos de assentamentos, destacamos o Assentamento Iporá (PA-IPORÁ) localizado, em sua maior parte, no município de Rio Preto da Eva. Este, no período entre 1991 a 2003, foi responsável pelo segundo maior número de casos de LTA no estado do Amazonas. Apesar do elevado número de casos da doença, este município continua a representar uma lacuna no conhecimento da dinâmica da transmissão das leishmânias no Estado do Amazonas (Pereira 2003), onde *Leishmania (Viannia) guyanensis* é responsável por cerca de 83% dos casos humanos de LTA, existindo também registros de infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) naiffi* (Naiff 1998; Figueira 2006).

A identificação do parasito é essencial em qualquer estudo clínico patológico da doença, desde que haja variação específica na sua virulência e resposta terapêutica. Um dos métodos bioquímicos rotineiramente empregados na caracterização de amostras de *Leishmania* é a eletroforese de isoenzimas (Hatam *et al.* 1999), além de métodos por características biológicas e imunológicas. Este método já foi amplamente reconhecido por sua eficácia na caracterização de cepas de *Leishmania* (Cupolillo *et al.* 1994). tem-se mostrado efetivo na caracterização de cepas de *Leishmania* (Cupolillo *et al.* 1994). As principais limitações da técnica decorrem da necessidade de um grande número de

células (massa parasitária) para preparar o lisado a ser analisado (Da-Cruz e Pirmez 2005), e da não utilização de tecidos. Para tal, é necessário o isolamento do parasito e a consequente expansão em cultivo. Os municípios próximos a Manaus, como Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo e Itacoatiara demandam importante número de casos de LTA para diagnóstico e tratamento na FMTAM. Em 2004, o registro de casos de Rio Preto da Eva superou o registro de casos de Manaus (Guerra *et al.* 2004).

A caracterização das espécies de *Leishmania* e a evidência da variabilidade existente entre as populações de isolados que circulam na natureza, principalmente das espécies que infectam o homem, são de grande importância em estudos epidemiológicos e terapêuticos. Isso justifica a realização deste estudo de caracterização, que tem como intuito identificar as espécies de *Leishmania* isoladas de humanos do município de Rio Preto da Eva, segundo município em número de casos de leishmaniose do estado do Amazonas, utilizando-se como técnica a eletroforese de isoenzimas, método já padronizado no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (Lab. LDC) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ORIGEM DOS ISOLADOS HUMANOS E CEPAS DE REFERÊNCIA

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 Morei (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. O eletromorfo 1 foi designado como aquele mais próximo do ponto de aplicação. As demais cepas foram caracterizadas após isolamento dos hamsters.

2.2. MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As cepas dos pacientes foram mantidas em meio de cultura ágar-sangue modificado - meio NNN (Marin *et al.* 1982) contendo sangue de coelho a 15% e antibióticos (200U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina) (Arias e Naiff 1981). O sobrenadante das culturas consiste de soro fisiológico (0,5mL). Os estoques estabilizados "*in vitro*" foram expandidos em meio líquido RPMI (Hendricks *et al.* 1978) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). O material foi criopreservado utilizando-se glicerina a 10% em meio Schneider contendo 30% SFB (Jaffe *et al.* 1984). O material criopreservado foi mantido a temperatura de - 80°C.

2.3. MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO

2.3.1. PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA

As amostras foram preparadas segundo protocolo padronizado por Momen (1984). Promastigotas de cultura em fase estacionária foram centrifugadas (3.500 rotações por minuto (rpm), 4° C, 15 minutos) e o seu sedimento foi lavado por duas vezes em solução contendo NaCl 0,85% e 0,01M de EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético), pH 8,0. Estocaram-se as amostras em freezer a - 80°C até a sua aplicação no gel de agarose.

2.3.2. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

2.3.2.1. PREPARO DE GÉIS

Foi preparado cada gel de agarose a 1% em água destilada e solução tampão (1:2, v/v) específica, similar à usada na corrida eletroforética. Após a dissolução da agarose, aqueceu-se a solução e o gel derramado ainda quente sobre um filme de poliestireno (GelBond®) sendo utilizado após duas horas ou estocado em geladeira por até 48 horas. Antes da corrida, o gel foi absorvido com papel de filtro e as amostras aplicadas em sua superfície, com o auxílio de uma fita plástica (fita de aplicação). Aplicou-se também, uma solução corante, que indicará a velocidade e o tempo de corrida.

2.3.2.2. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

Os géis foram colocados em cuba de eletroforese horizontal e a corridas feitas durante um período de no mínimo 4 horas, em condições adequadas de corrente e temperatura (10°C), mantida constante por um sistema de refrigeração (Sistema Multiphor II/General Electric). Uma corrente de aproximadamente 15V/cm foi aplicada em cada gel para induzir a migração.

2.4.2.3. ANÁLISE DOS GÉIS

Revelaram-se as bandas alélicas (eletromorfos) separadas nos géis com sistemas específicos, constituídos de substratos e cofatores em solução tampão adequada. Foram utilizados os seguintes sistemas enzimáticos: 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Fosfo-gluco-mutase (PGM, E.C.1.4.1.9), Glicose-fosfo-isomerase (GPI, E.C.5.3.1.9), Manose-fosfato-isomerase (MPI, E.C.5.3.1.8),

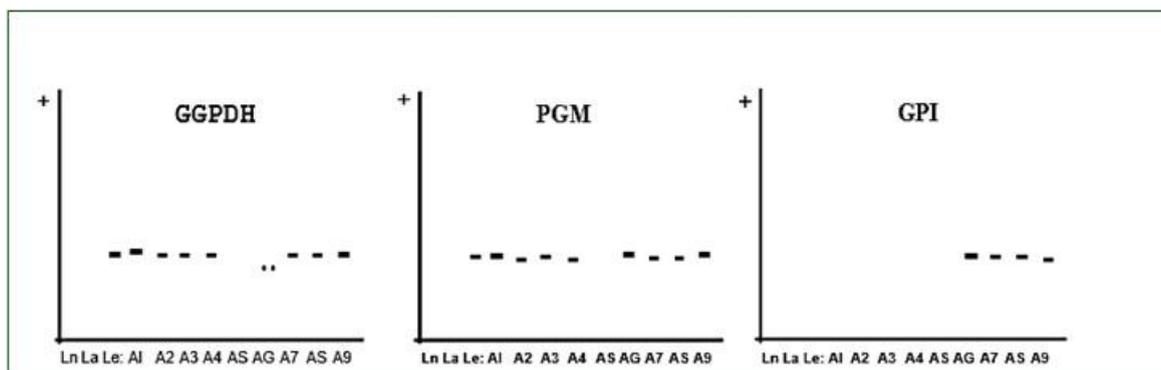
Nucleotidase (NH, E.C.3.2.2.1), posteriormente foram utilizados: Malato Desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Isocitrato Desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) utilizando substrato com NAD e NADP, Aconitato hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) (Cupolillo *et al.* 1994), e cada gel foi incubado em estufa a 37° C a fim de facilitar a revelação das bandas. A reação enzimática foi interrompida com ácido acético glacial a 5%. Realizou-se lavagens sucessivas com essa solução até a remoção completa do excesso de corante não precipitado.

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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise da posição dos eletromorfos nos géis (Figura 1), oito isolados foram identificados como *L. (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*: AS (MHOM/BR/09/IM5547).

Figura 1. Zimogramas representando os perfis dos alelos das enzimas 6PDH, PGM e GPI em tampão Maleico, indicando as espécies de *Leishmania* responsáveis por infecções no município de Rio Preto da Eva. As cepas de referência incluem *Leishmania (V.) naiffi* (Ln), *Leishmania (L.) amazonensis* (La) e *Leishmania (V.) guyanensis* (Lg). As amostras apresentadas são: A1 (IM5536), A2 (IM5537), A3 (IM5539), A4 (IM5540), A5 (IM5547), A6 (IM5543), A7 (IM5544), A8 (IM5545), 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), Manapolis (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 foram acompanhados quanto a presença de lesões. Os que não apresentarem lesões após seis meses tem possibilidade de estarem infectados com *L. (V.) naiffi*, uma vez que esta espécie raramente produz lesões na pele de hamsters, apesar do parasita 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, Rio Preto da Eva, foram 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).

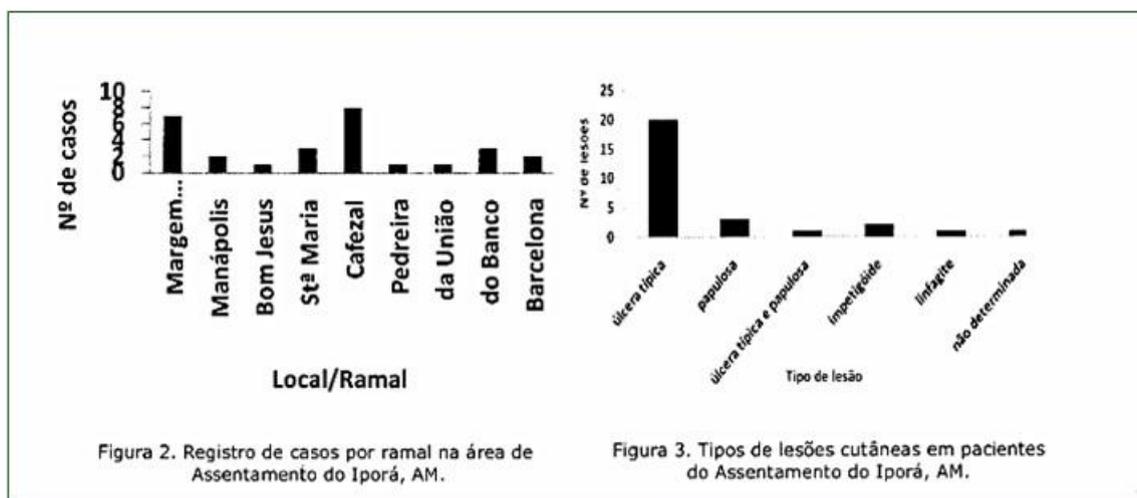
Tabela 1. Amostras de *Leishmania* de pacientes do município de Rio Preto da Eva, com detalhes dos exames realizados e técnicas laboratoriais empregadas

AMOSTRAS	EXAME DIRETO	CULTURA	INÓCULO EM HAMSTER	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.

Neste estudo, 88% (8/9) dos pacientes demonstraram infecção por *L. (V.) guyanensis*. Naiff (1998) examinou 108 pacientes oriundos do Estado do Amazonas (Manaus, Itacoatiara, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo), demonstrou com infecção por *L. (V.) guyanensis* em 97% (69/71) dos casos. Já Romero *et al.* (2002), analisando a

frequência de infecção humana por *L. (V.) braziliensis* em quatro dos municípios ao norte do Rio Amazonas (Manaus, Itacoatiara, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo), apresentaram infecção por *L. (V.) guyanensis* em 97% (69/71) dos casos. Estudos estes que reafirmam maior incidência da espécie na região.



O sexo masculino liderou o maior número de casos. Conforme evidenciado pela literatura científica, a endemia relacionada a esse patógeno manifesta-se predominantemente em áreas rurais (75,9% dos casos) e urbanas (24,1% dos casos). Esta doença tende a afetar principalmente jovens do sexo masculino que estão envolvidos em atividades agrícolas (Grimaldi et al. 1991; Naiff 1998).

4. CONCLUSÃO

O município de Rio Preto da Eva apresenta maior número de infecções por *L. (V.) guyanensis*. Normalmente, é recomendável incluir o animal de experimentação como um dos métodos de isolamento parasitário. Isso facilita a obtenção das cepas para uma subsequente caracterização bioquímica. A tipagem e caracterização das cepas fornecem dados epidemiológicos mais robustos, que estão mais alinhados com a situação real do município. Além disso, permitem a condução de estudos sobre a variabilidade genética. Essas pesquisas também desempenham um papel crucial na identificação de possíveis mutações ou resistências nas espécies presentes na região, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

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

REFERÊNCIAS

- [1] 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.
- [2] 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.

- [3] 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 Ipora-AM, BR: II - Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41: 1. 194p.
- [4] Grimaldi, G.J.R; Tesh, R.B. 1991. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Revist*, 3:230-250.
- [5] Laison, R.; Shaw J.J. 2005. New World leishmaniasis. Disponível em: <http://www.topleyandWilson.com/pdf/Parasitology%20chapter.pdf>. Acesso: 10 de outubro de 2005.
- [6] 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.
- [7] Naiff, M.F. 1998. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- [8] Pereira, M.A.S. 2003. Dinâmica da Leishmaniose Tegumentar Americana na área do Projeto de Assentamento Ipora, Rio Preto da Eva, AM. Dissertação Mestrado em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 87p.
- [9] Romero, A.S.R.; Ishikawa, E.; Cupollilo, E.; Toaldo, C.B.; Guerra, M.V.F.; Paes, M.G.; Macedo, 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.

CAPÍTULO 09 Detecção e identificação de espécies de *Leishmania* (Kinetoplastida: trypanosomatidae) utilizando a técnica de Reação da Cadeia em Polimerase (PCR)

Jéssica Sidou Lamarão, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antônia Maria Ramos Franco

Resumo: O diagnóstico parasitológico da leishmaniose cutânea (LC) é realizado pela observação dos parasitos das lesões, visualizados ao microscópio óptico, pelo isolamento do parasito em meio de cultivo, ou infecção em animais de laboratório. Portanto, é necessária a busca de métodos mais confiáveis, específicos e rápidos para o diagnóstico da LC, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Diante da problemática, o objetivo da pesquisa foi utilizar a técnica de PCR-RFLP a partir de amplificação da região de ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) utilizando enzimas de restrição e iniciadores espécie-específicos patenteados no diagnóstico da *Leishmania (V.) guyanensis* em materiais biológicos de diversas origens (parasitos isolados em meio de cultivo, flebotomíneos infectados, biópsias de lesão animal), com o intuito de avaliar a eficácia destes marcadores moleculares. O DNA das amostras foi extraído, de acordo com protocolo modificado pelo método de Sambrook. Inicialmente a região de ITS foi amplificada, que é conservada e variavelmente franqueada entre os vários tripanosomatídeos, como *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Crithidia*. Das amostras estudadas, observou-se que os ensaios de PCR da região de ITS amplificaram e com o peso molecular esperado (~1.2 kb). Nos ensaios utilizando os iniciadores patenteados, foi possível discriminar as espécies de leishmanias, obtendo-se produtos reativos para *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, além de outras espécies de *Leishmania*. Não houve diferença quanto à amplificação da região do rDNA do ITS utilizando-se os iniciadores P2 e REVGUY, quanto a origem das amostras testadas.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, Diagnóstico parasitológico, técnicas moleculares.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença caracterizada por lesões de pele, cartilagem e mucosas do trato respiratório superior, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem pela picada de insetos flebotômíneos (Gontijo e Carvalho 2003).

Na região Amazônica a forma mais comum da leishmaniose é a cutânea, causada por várias espécies de *Leishmania*, sendo a *Leishmania (Viannia) guyanensis* a espécie predominante. As lesões apresentam bordas salientes, podendo ser únicas ou múltiplas (Rey 2001).

No Estado do Amazonas, foi notificado em 2009 pelo Serviço de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde 1.439 casos (17,3%) de LTA de 8.272 casos totais na região norte do Brasil. O maior número de casos autóctones notificados de leishmaniose pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas ocorreu na cidade de Manaus, seguido pelo município de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva. A LTA pode ser, portanto, considerada como uma endemia de importância na região Amazônica (SINAN 2009).

O diagnóstico parasitológico da leishmaniose cutânea é feito pelo encontro dos parasitos nas lesões, que são visualizados ao microscópio após coloração pelo método de Giemsa; pelo isolamento do parasito em meio de cultivo (Walton *et al.* 1977; Hendricks *et al.* 1978; Jaffe *et al.* 1984) ou infecção em animais de laboratório como o hamster (*Mesocricetus auratus*) e posterior isolamento do parasito a partir das lesões nesses animais. Testes imunológicos intradérmicos como a reação de Montenegro, a pesquisa de anticorpos para *Leishmania*, também auxiliam no diagnóstico. No entanto, são métodos genéricos que não identificam especificamente o agente etiológico e que demandam tempo e profissionais treinados para a visualização e pesquisa do parasito. Portanto, é necessária a busca de métodos mais confiáveis, específicos e rápidos para o diagnóstico desta doença, como é o caso da reação em cadeia da polimerase (Coura *et al.* 1996).

Este estudo baseia-se na aplicação da PCR e utilizando a PCR-RFLP a partir de amplificação da região de ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) utilizando enzimas de restrição e também o uso de iniciadores espécie-específicos patenteados (no. PI0505330-7) pela equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (Sibajev 2005) no diagnóstico da *L. (V.) guyanensis* em materiais biológicos de diversas origens (parasitos isolados em meio de cultivo, flebotômíneos infectados, biópsias de lesão animal), com o intuito de avaliar a eficácia destes marcadores moleculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo, amostras de origens diversas (lesões de hamsters experimentalmente infectados, flebotômíneos naturalmente infectados e cultivo de tripanosomatídeos), bem como espécies representativas do gênero *Leishmania* como controle das reações, estocadas e mantidas no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA. Formas promastigotas de cultura em fase estacionária, cultivadas em meio completo RPMI (SIGMA®) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) a 25°C foram amplificadas em frascos de 250 mL, lavadas em PBS (0.15M phosphate-buffered saline pH 7.4), centrifugadas (2500 g, 4 °C, 15 minutos) e mantidas a -80 °C até o processamento de extração de DNA. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética do INPA (nº 001/2010).

O DNA das amostras foi extraído, de acordo com protocolo modificado pelo método de Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. Após a extração, as amostras foram mantidas a temperatura de -80°C . Foi realizada a quantificação do DNA das amostras utilizando espectrofotômetro (*Spectrophotometer Thermo Scientific Nanodrop 2000*[®]), com amplitude variando de 220 a 750 nm verificando-se sua concentração em ng/ μL . Inicialmente a PCR foi realizada amplificando-se a região de ITS, que é conservada e variavelmente franqueada entre os vários tripanosomatídeos, como *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Crithidia* (Hernandez *et al.* 1990). As condições para a realização da reação de cadeia em polimerase para a amplificação do fragmento ITS foram de $94^{\circ}\text{C}/3\text{ min}$; $94^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$, $55^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$, $72^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$ (32 vezes); $72^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$. O produto desta reação foi submetido a uma segunda PCR, utilizando-se a metodologia e iniciadores patenteados pelo Dr. Alexander Sibajev e Dra. Antonia M R Franco (patente no. PI0505330-7). A reação foi feita em 40 ciclos da amplificação com temperatura de anelamento de 58°C (Sibajev 2005). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen[®] utilizando-se os iniciadores P2 e REVGUY (Invitrogen[®]) seguindo protocolo de acordo com o descrito na patente.

Os produtos das reações (PCR) de amplificação da região de ITS foram também submetidos à digestão com enzimas de restrição (*Hae* III, *Taq* I, *Hpa* II e *Eco* RI). O protocolo de utilização das enzimas foi seguido conforme a recomendação do fabricante (Invitrogen[®]). Também foram digeridas cepas de referência de *Leishmania* controles da reação. Os produtos amplificados e digeridos enzimaticamente foram comparados com os obtidos com as cepas de referência. Aliquotas dos produtos amplificados foram adicionadas ao tampão azul de bromofenol (0,25 % (v/v) e xilenocianol 0,25 % (v/v) em 40% de solução aquosa de sacarose e fracionadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão de corrida TAE (40 mM de Tris-Acetato e 1 mM de EDTA em pH 8,0) sob voltagem constante (90 V) durante aproximadamente 1 hora. Utilizou-se o marcador de peso molecular/ DNA ladder 100 pb (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) para a averiguação do peso molecular dos amplicóns. Os géis corados com GelRed (Sigma) foram visualizados através de luz ultravioleta em transiluminador e documentados utilizando o sistema fotográfico “Eagle Eye System” (Stratagene, La Jolla, USA) no Laboratório de Biologia Molecular do INPA. Após o registro dos géis estes foram analisados, comparando-se com os controles e o tamanho dos amplicóns. Essa análise foi feita em conjunto ao trabalho desenvolvido por Sibajev (2005).

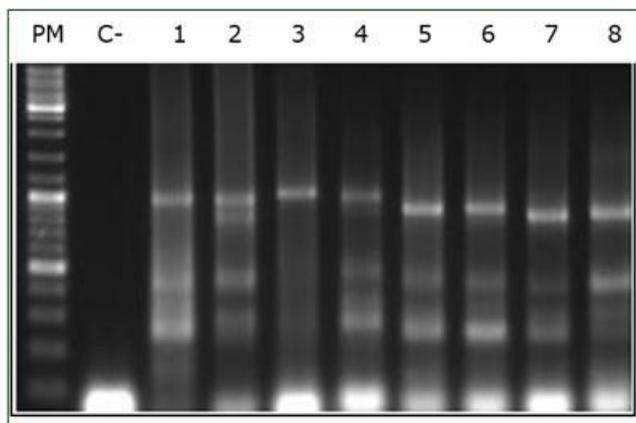
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 39 amostras de origens diversas, sendo quatro de lesões de hamster experimentalmente inoculados, três com *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/93/IM3919, MHOM/BR/06/IM5344, MHOM/BR/08/IM5554) e uma com *L. (L.) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584); 15 amostras de flebotomíneos infectados com *Leishmania (Viannia) sp.* da espécie *Lutzomyia umbratilis*, oito cepas padrões de cultivo de *Leishmania spp.*, sendo: *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) colombiensis* (IGOM/PA/85/E582.34), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *L. (V.) lainsoni* (MCOE/BR/82/1367), *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/93/M3936), *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) e *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) e 12 amostras de cultivo de isolados humanos, sendo: uma com *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/03/IM5039) e onze com *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/97/IM 4365, MHOM/BR/99/IM 4595, MHOM/BR/00/IM 4771, MHOM/BR/04/IM 5219, MHOM/BR/04/IM 5224, MHOM/BR/04/IM 5225, MHOM/BR/04/IM 5227,

MHOM/BR/04/IM 5237, MHOM/BR/04/IM 5238, MHOM/BR/05/IM 5253, MHOM/BR/05/IM 5281).

Das amostras estudadas observou-se que a amplificação da região de ITS nos ensaios de PCR, estas amplificaram dentro do peso molecular esperado com cerca de 1.2 kb. Nos ensaios utilizando os iniciadores patenteados foi possível discriminar as espécies de leishmanias obtendo-se produtos reativos para *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, além de outras espécies de *Leishmania*. Na figura 1, observa-se o resultado da amplificação e diferenciação de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis*, obtendo-se produtos amplificados com tamanhos distintos da reação de amplificação para a espécie *L. (V.) guyanensis*, comprovando a especificidade dos iniciadores para a identificação de *L. (V.) guyanensis*.

Figura 1. Reação da PCR utilizando 40 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 58°C. Teste com DNA extraído de amostras de cultivo de cepas de referência. PM: marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder; C-: Controle negativo. Identidade das amostras: 1- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; 2- *L. (Viannia) braziliensis*; 3- *L. (V.) colombiensi*; 4- *L. (V.) guyanensis*; 5- *L. (V.) lainsoni*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (V.) panamensis*; 8- *L. (V.) shawi*.



Após amplificação pela PCR da região de ITS foi realizada a digestão do produto utilizando-se as enzimas *Hae* III, *Taq* I, *Hpa* II e *Eco* RI, das amostras de DNA amplificadas de cepas de referência e isolados humanos com a técnica PCR-RFLP. Todas as amostras testadas foram inicialmente caracterizadas por análise isoenzimática. De acordo com o padrão dos fragmentos obtidos pela PCR/RFLP, verificou-se a distinção entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Quanto ao padrão obtido pela enzima *Eco* RI, verificou-se heterogeneidade entre os diferentes isolados de *L. (V.) guyanensis*, fato também observado entre as diferentes espécies do subgênero *Viannia* (cepas de referência) com esta enzima (Figura 2).

Figura 2. Reação de digestão com a enzima *Eco* RI dos produtos de PCR amplificados da região ITS. (A) Amostras de cultivo de cepas de referência: PM marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder. Identidade das amostras: 1- *L. (L.) amazonensis*; 2- *L. (V.) braziliensis*; 3- *L. (V.) colombienseis*; 4- *L. (V.) guyanensis*; 5- *L. (V.) lainsoni*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (V.) panamensis*; 8- *L. (V.) shawi*. (B) Amostras de isolados em cultivo de indivíduos humanos. PM marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder. Identidade das amostras: (1-8) *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/97/IM 4365, MHOM/BR/99/IM 4595, MHOM/BR/00/IM 4771, MHOM/BR/04/IM 5219, MHOM/BR/04/IM 5224, MHOM/BR/04/IM 5225, MHOM/BR/04/IM 5227, MHOM/BR/04/IM 5237); 9- *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/03/IM5039).

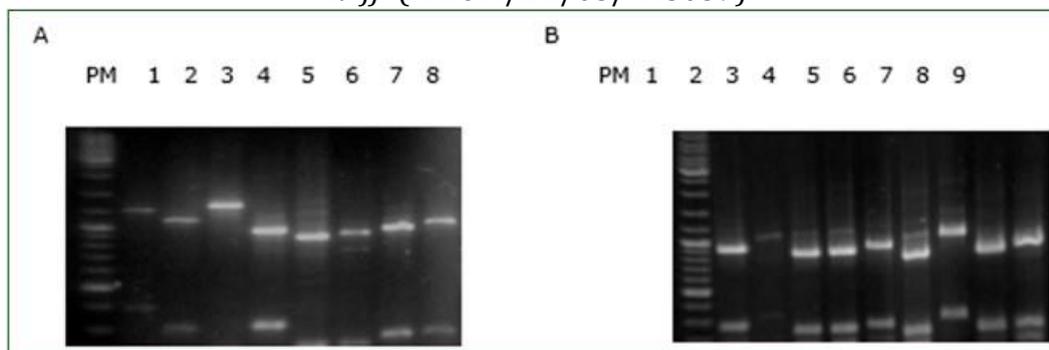
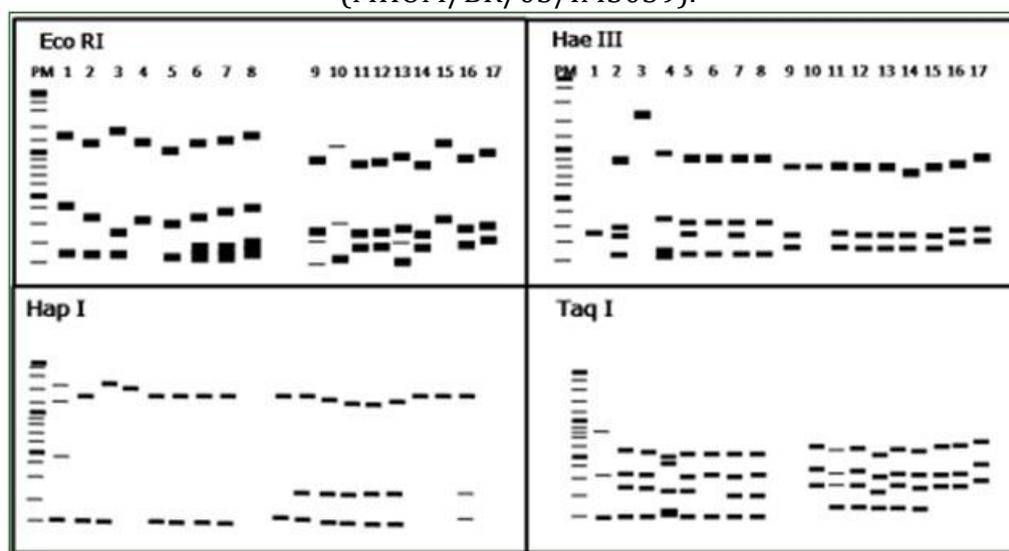


Figura 3. Comparação dos perfis de fragmentos de ITS, digeridos pelas enzimas de restrição (*Eco* RI, *Hae* III, *Hap* I, *Taq* I). Identidade das amostras: (1-8) Amostras de cultivo de cepas de referência. PM: marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder. 1- *L. (L.) amazonensis*; 2- *L. (V.) braziliensis*; 3- *L. (V.) colombienseis*; 4- amostra de *Leishmania* sp.; 5- *L. (V.) lainsoni*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (V.) panamensis*; 8- *L. (V.) shawi*. (9-17): Amostras de isolados em cultivo de indivíduos humanos; (9-16): *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/97/IM 4365, MHOM/BR/99/IM 4595, MHOM/BR/00/IM 4771, MHOM/BR/04/IM 5219, MHOM/BR/04/IM 5224, MHOM/BR/04/IM 5225, MHOM/BR/04/IM 5227, MHOM/BR/04/IM 5237); 17- *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/03/IM5039).



Naiff (1998) demonstrou que ao contrário da aparente homogeneidade bioquímica dos isolados de *L. (V.) guyanensis* ocorre uma variação de fragmentos de ITS detectada entre os isolados revelando 10 perfis distintos, fenômeno ligado provavelmente a

diversidade de hospedeiros. Quanto a padrão dos fragmentos obtidos com as outras enzimas de restrição observa-se uma aparente homogeneidade tanto entre os diferentes isolados humanos de *L. (V.) guyanensis* como entre as espécies representantes do subgênero *Viannia* (Figura 3).

4. CONCLUSÃO

Não houve diferença quanto à amplificação da região do rDNA do ITS utilizando-se os iniciadores P2 e REVGUY, quanto a origem das amostras testadas. A variação de fragmentos de ITS observada através da técnica de PCR-RFLP confirmou a existência de variabilidade genética dentro das populações de *L. (V.) guyanensis* (micro-heterogeneidade populacional demonstrada pela enzima *Eco* RI) além da variabilidade entre amostras de subgêneros distintos. Entre as espécies do subgênero *Viannia* apenas foi possível distinguir pelas enzimas *Hae* III e *Hap* I a *L.(V.) colombiensis* quando comparado com as demais.

REFERÊNCIAS

- [1] Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde (SVS). Sistema de Informações de Agravos de Notificação. LTA, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. Brasília, Ministério da Saúde, 2009.
- [2] Coura J.R., Fernandes O., Arboleda M., Barrett T.V., Carrara N., Degraive W. & Campbell D.A. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 90: 278-279.
- [3] Gontijo B.; De Carvalho M.L. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:71-80.
- [4] Hendricks, L.D., Wood, D.E. & Hadjuk, M.E. 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology*, 76: 309-316.
- [5] Hernandez R., Rios P., Valdes AM., Pinero D. 1990. Primary structure *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other *Trypanosomatids*. *Mol Biochem Parasitol*, 41: 207-212.
- [6] Jaffe, C.L., Grimaldi JR., G.; McMahon-Pratt, D. 1984. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel, C.M- (ed.), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Fundação Oswaldo Cruz, RJ, pp. 47-91.
- [7] Naiff, M.F. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1998.
- [8] Rey, L. *Parasitologia 2001* Rio de Janeiro, R.J. Ed. Guanabara Koogan, 3^a Ed., 856 p.
- [9] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [10] Sibajev, A. 2005. Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para o Diagnóstico de Variedades de *Leishmania* Circulantes na Região Norte do Brasil. Tese (Doutorado) – UFAM, Manaus, Am.
- [11] Volpini, A. C.; Passos, V. M. A.; Oliveira, G. C.; Romanha, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis, *Acta Trop.*, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.
- [12] Walton, B.C.; Shaw, J.J.; Lainson, R. 1977. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.* 63: 118-119.

CAPÍTULO 10 Avaliação “*in vitro*” da infectividade de amostras de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Alana Cristina Vinhote da Silva, Liliane Coelho da Rocha, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: O estudo das proteínas envolvidas na infectividade de *Leishmania* é um campo importante para fornecer dados para estudos proteicos mais avançados. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro*, a infectividade de duas espécies: *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva (*Lvg ni*) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva (*Llai*) e não infectiva (*Lla ni*), utilizando macrófagos da linhagem J774G8. O experimento foi dividido em quatro grupos, de acordo com as diferentes cepas e concentrações: Grupo I - 5×10^6 de *LLai* e *Lla ni*; II - 1×10^8 de *Lla ni*; III - 5×10^6 de *LVg ni*; e no IV - 1×10^8 de *LVg ni*. Após 24 hs de infecção, foi realizada a contagem dos macrófagos (grupo I e II 400 M ϕ /amostra; III e IV - 100 M ϕ /amostra) e o número de formas amastigotas interiorizadas. Os resultados demonstram que não houve diferença quanto a percentagem de infecção entre as espécies estudadas, enquanto que as diferenças foram vistas dentro da espécie entre cepas infectivas e não infectivas. Isso reforça as informações presentes na literatura, as quais indicam que, que fatores específicos e inespecíficos da resposta imune do hospedeiro estão envolvidos no controle ou progressão da doença. A partir do estabelecimento do cultivo *in vitro* de macrófagos no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas é possível a recuperação da infectividade de parasitas que devido cultivos sucessivos perderam esta característica. A compreensão dessa complexa interação entre hospedeiro e parasito poderá influenciar no desenvolvimento de novas estratégias de profilaxia e terapia.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar, Ensaio biológico, Virulência.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* comporta um grupo de protozoários parasitos que causam um amplo espectro de doenças humanas desde lesões localizadas na pele e/ou mucosa (Leishmaniose Tegumentar) até viscerais (Leishmaniose Visceral) (Handman 2001). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Levine *et al.* 1980).

No ciclo de vida do parasito existem duas formas morfológicas: os promastigotas e os amastigotas. Os promastigotas são formas alongadas com flagelo na região anterior, reproduzem-se por divisão binária no hospedeiro invertebrado, produzindo formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas. Estes parasitos migram para a probóscide do inseto e no momento do repasto sanguíneo são inoculados no tecido celular subcutâneo do hospedeiro vertebrado. No vertebrado são fagocitados por macrófagos e transformam-se na forma amastigota. As amastigotas são esféricas com um flagelo interno rudimentar (pequena invaginação na superfície do parasito) e reproduzem-se por divisão binária dentro dos macrófagos, causam lise celular, e infectam outros macrófagos (Hepburn 2000; Handman 2001). Durante sua migração pelo trato digestivo do inseto vetor, as promastigotas passam por uma série de transformações morfológicas e moleculares como as nectomonas, haptomonas e paramastigotas que culminam em sua transformação da forma procíclica (não-infectiva) para a forma metacíclica – infectante para o hospedeiro vertebrado (Walters *et al.* 1993; Vivenes *et al.* 2005). Esse processo, conhecido como metaciclogênese, pode ser mimetizado “*in vitro*”. Observa-se que durante o cultivo “*in vitro*”, as promastigotas em fase estacionária apresentam-se diferenciadas em sua forma metacíclica (Sacks e Perkins 1984; Bates 1994).

Os macrófagos possuem uma diversidade de linhagens, utilizadas para pesquisas em diferentes áreas da saúde. As culturas de macrófagos mais utilizadas são as de humanos e peritoneais de camundongos (Albuquerque 2006).

Diversos estudos de recuperação da infectividade de *Leishmania* mantidas por sucessivas passagens em cultivo foram conduzidos utilizando diversas metodologias. A perda da infectividade está muitas das vezes associada a diversas proteínas/enzimas que podem alterar a expressão de carboidratos de superfície do parasito (Bhaumik *et al.* 2003) levando a perda de sua virulência. A presença de gp63 na superfície dos promastigotas também podem influenciar em sua interação com os macrófagos. Pan e Honigberg (1985), estudaram a interação “*in vitro*” e “*in vivo*” de *Leishmania mexicana pifanoi* com macrófagos e verificaram que o número das formas amastigotas interiorizadas em macrófagos da linhagem MJ774, estava diretamente relacionado ao número das formas promastigotas apresentadas aos macrófagos. Os autores não observaram diferenças quanto a produção de lesões cutâneas *in vivo* utilizando amastigotas originárias de cultivo *in vitro* e de cultivo axênico, fato não observado quando foram utilizadas formas promastigotas, que se apresentaram menos virulentas.

A partir de infecções “*in vitro*”, vários estudos podem ser direcionados para o melhor conhecimento dos fatores ligados a infectividade das espécies de *Leishmania* (interação parasito e célula hospedeira). Um melhor conhecimento da biologia e bioquímica dos tripanosomatídeos, não apenas auxilia a compreensão do mecanismo de ação das drogas atualmente usadas, como também pode identificar novas moléculas que podem ser utilizadas como alvo de novos agentes quimioterápicos (Beverley 2003). Entre os alvos mais desejáveis para o desenvolvimento de drogas, estão proteínas e enzimas de

superfície do parasito, envolvidas no processo de infecção, e que não apresentam homologia estrutural e funcional significativa com moléculas do hospedeiro vertebrado.

A tecnologia proteômica também tem se mostrado uma interessante abordagem no desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas. Essa tecnologia pode ser utilizada na identificação mais rápida de novas proteínas, na avaliação de seu padrão de expressão e de suas funções, possibilitando a identificação de potenciais alvos para drogas (Cunningham 2000). Sendo assim, se justifica a realização do mapeamento e identificação de proteínas/peptídeos envolvidos na infectividade de espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar “*in vitro*” a infectividade de duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, utilizando macrófagos da linhagem MJ774.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS E LEISHMANIA

Foram utilizadas as seguintes cepas de referência: *L. (V.) guyanensis* (MHO/BR/95/IM4143) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e os macrófagos de origem murina da linhagem MJ774 - G8.

2.1.1. MANUTENÇÃO DE MACRÓFAGOS E CEPAS DE LEISHMANIA

Os macrófagos obtidos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram mantidos em meio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Germany) em garrafas de 40ml, a 37°C com 5% de CO₂. A cada dois dias foi verificado o estado das células e feito o repique retirando-se o meio RPMI antigo, lavando as células com RPMI sem a suplementação de 10% de soro fetal bovino (Biosul). Após a lavagem era complementado com RPMI com soro fetal bovino inativado (SFBi).

As amostras de *Leishmania* sp. foram mantidas no mesmo meio a 25°C em BOD (Mohetson Scientific®). O repique dos parasitos foi realizado de cinco em cinco dias, do qual 5 ml do meio com as células foi retirado e adicionado 15ml de meio RPMI novo.

2.2 PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA DE CEPAS DE REFERÊNCIA E DE MACRÓFAGOS MJ774

2.2.1 CEPAS DE REFERÊNCIA

Os parasitos foram mantidos em meio RPMI e criopreservados da seguinte maneira: centrifugou-se 50mL da cultura a 3500 rpm por 15 min., o *pellet* foi lavado com solução de criopreservação (glicerina, Merck®) a 10% em meio Schneider (SIGMA®) contendo 30% SFBi e colocado em temperatura de 8°C por 20 min, em seguida a -20°C por mais 30 min e após esse processo foi estocado em -80°C.

2.2.1.1. MACRÓFAGOS

As células eram mantidas em meio RPMI e criopreservadas da seguinte maneira: as células aderidas no frasco foram raspadas com rodo, e 50 ml da cultura foram

centrifugadas a 3500 rpm por 15 min. O *pellet* foi lavado com solução de criopreservação e colocado em temperatura de 8°C por 30 min, em seguida a -20°C por mais 30 min e após esse processo, foi estocado em -80°C (Jaffe *et al.* 1984).

2.3. INFECÇÃO “*IN VITRO*”

2.3.1. PLAQUEAMENTO DOS MACRÓFAGOS MJ774

As células foram raspadas dos frascos e centrifugou-se 50 mL a 4400 rpm por 10 min., com a diluição de 1:1000 usando 1µL de macrófagos e 990 µL de PBS 1x, na câmara de Neubaer (W - Germany®) foi realizado uma contagem de 10 µL da diluição, ajustou-se as células para 1x10⁶ por ml. Em placas com 6 poços (Nuclon®), cada um contendo lamínulas de 24x24 mm, mais 2 ml de RPMI e células. Foram esperadas 24 h para que todos os macrófagos aderissem à lamínula.

2.3.2. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *LEISHMANIA*

Após 24 h esperadas para o plaqueamento dos macrófagos, iniciou-se a infecção com as cepas: *L. (V.) guyanensis* não infectiva (parasitas mantidos por no mínimo 30 passagens em cultura *in vitro*, sem produção *in vivo* de lesões cutâneas) e *L. (L.) amazonensis* infectiva e não infectiva. O experimento foi dividido em quatro grupos, de acordo com as diferentes cepas e concentrações. No Grupo I foi usada a concentração de 5x10⁶ dos parasitos de LLa infectiva (LLai) e não infectiva (Lla ni); Grupo II, apenas a Lla ni na concentração de 1x10⁸; Grupo III foi utilizada a concentração de 5x10⁶ de LVg não infectiva (LVg ni); e no Grupo IV a concentração de 1x10⁸ de LVg não infectiva (LVg ni). Após 4 h de infecção, retirou-se o sobrenadante de todos os poços, renovando-se o meio RPMI. Com 24 hs de infecção, os sobrenadantes foram transferidos para tubos de NNN (Novy *et al.* 1904; Nicolle 1908) e as lamínulas coradas pelo Kit Panótico (Laborclin®). Foi realizada a contagem de macrófagos e o número de formas amastigotas interiorizadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de macrófagos (Mφ) contados por grupo foram: I e II - 400 Mφ/amostra; III e IV- 100 Mφ/amostra. Dos macrófagos contados para cada condição (grupos I, II, III e IV), foi verificado que no grupo I, 15,25% estavam infectados com amastigotas de Llai e nenhum macrófago foi encontrado infectado com amostra de Lla ni. No II, apenas 0.5% foram encontrados infectados, enquanto que no III 11% de macrófagos apresentaram amastigotas interiorizadas e no IV apenas 18% encontraram-se infectados por LVg ni (Tabela 1 e Figura 1). Nos resultados de amastigotas por macrófago, no grupo I, foi constatada uma média de 1,6 para Llai e ausência de detecção para Lla ni. Já no grupo II, a média foi de um amastigota por macrófago e ainda no grupo III, de 1,77 e no IV grupo 3,47 parasitas por macrófagos (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Porcentagem de macrófagos infectados por cepas de cepas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva e não infectiva.

Espécie/Grupo		Mφ infectados (%)	Amastigotas por Mφ (média)
Lla	Grupo I	15.25	1.6
Lla	Grupo II	0.5	1
LVg	Grupo III	11	1.77
LVg	Grupo IV	18	3.47

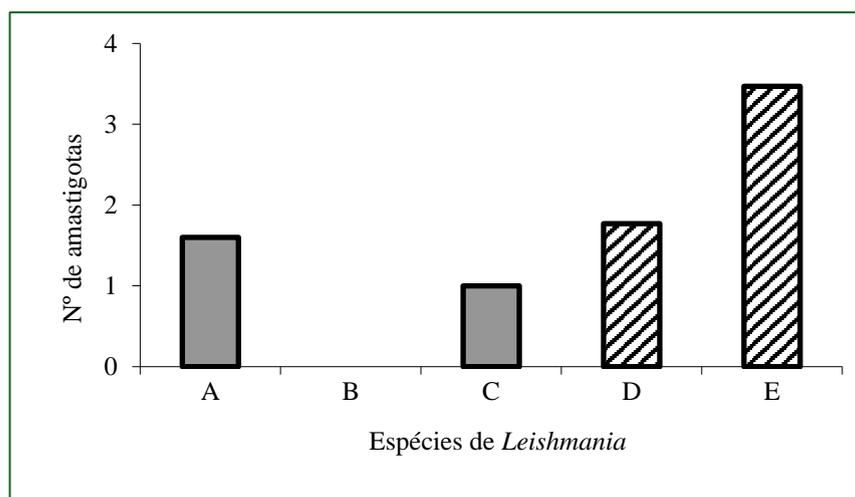
Grupo I: concentração de 5×10^6 dos parasitos de LLai - *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva e Lla ni - *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não infectiva;

Grupo II: concentração de 1×10^8 apenas a Lla ni - *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não infectiva;

Grupo III: concentração de 5×10^6 de LVg ni - *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva;

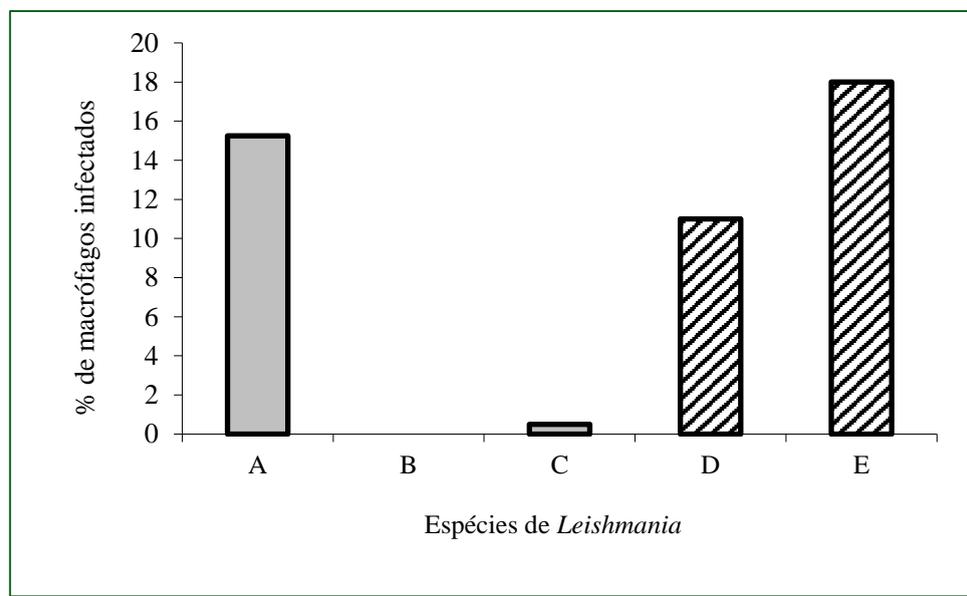
Grupo IV a concentração de 1×10^8 de LVg ni - *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva.

Figura 1. Média de formas amastigotas de *Leishmania* spp. observadas por macrófago. A: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva (concentração 5×10^6); B: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não infectiva (concentração 5×10^6); C: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não infectiva (concentração 5×10^8); D: *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva (concentração 5×10^6); E: *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva (concentração 5×10^8)



Esses resultados demonstram que não houve diferença quanto a percentagem de infecção entre as espécies estudadas, enquanto que as diferenças foram vistas dentro da espécie entre cepas infectivas e não infectivas fato que confirma dados da literatura que apontam que fatores específicos e inespecíficos da resposta imune do hospedeiro estão envolvidos no controle ou progressão da doença, dessa forma, sabe-se que a sobrevivência do parasito depende da capacidade de promastigotas e amastigotas evadirem-se de mecanismos adaptativos do hospedeiro vertebrado (Cunningham 2000), assim para se estabelecer a infecção, já foi comprovada a necessidade de haver a existência de moléculas superficiais (LPG e gp63) do parasito com interação de receptores celulares do macrófago.

Figura 2. Percentual de macrófagos infectados por cepas de *Leishmania* spp. A: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva (concentração 5×10^6); B: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não infectiva (concentração 5×10^6); C: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não infectiva (concentração 5×10^8); D: *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva (concentração 5×10^6); E: *Leishmania (Viannia) guyanensis* não infectiva (concentração 5×10^8)



No estabelecimento da infecção por *Leishmania*, o parasito recorre a diversos mecanismos para evadir-se da resposta imune protetora, incluindo a inibição de apoptose da célula hospedeira, observada tanto em experimentos *in vitro* (Moore e Matlashewki 1994), como *in vivo*.

Outra molécula de superfície do parasito, a GIPL (glicoinositolfosfolipídeo), ao que tudo indica tem um importante papel na ligação do parasito ao macrófago, uma vez que, em estudos anteriores, anticorpos contra essa molécula bloquearam a internalização do parasito (Bogdan e Rollinghoff 1998). Portanto, para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa sobreviver ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo seguras, a inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos através do LPG, a inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo pela gp63, a transformação em amastigotas que são mais resistentes às enzimas óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ao pH ácido do fagolisossomo (Reis *et al.* 2006).

A compreensão dessa complexa interação entre hospedeiro e parasito poderá influenciar no desenvolvimento de novas estratégias de profilaxia e terapia.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo têm uma significativa contribuição para a compreensão da virulência das diferentes cepas de *Leishmania* spp., as quais são

elementos essenciais no âmbito do projeto mais amplo sobre Estudos Proteômicos de Tripanosomatídeos.

REFERÊNCIAS

- [1] Albuquerque, M.E.L. 2006. Infecção de macrófagos originados de monócitos primários humanos com parasito *Leishmania amazonensis* em micro ambientes normóxico e hipóxico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo. 76.
- [2] Bates, P.A.; Robertson, C.D.; Tetley, L.; Coombs, G.H. 1994. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*, 105:193-202.
- [3] Beverley, S.M. 2003. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet*, 4:11-19.
- [4] Bhaumik, S.; Basu, R.; Roy, S.; De, T. 2003. Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes II: Association of the loss of parasite infectivity with the terminal galactosylation of precursor acceptors present in virulent parasites by the developmentally regulated galactosyltransferase. *Parasite Immunology*, 258:517-520.
- [5] Cunningham, M.J. 2000. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44:291-300.
- [6] Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:71-80.
- [7] Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current Status of vaccine Development. *Clinical Microbiological Revist*.14:229-234.
- [8] Hepburn, N.C. 2000. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical. Experimentol. Dermatologic*, 25:363-370.
- [9] Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain J.; Ronigberg, B.M.; Lieedale, G.F.; Leoblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vávra, J.; Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal Protozoology*, 27:37-58.
- [10] Moore, K.J, Matlashwki, G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal Immunologic*, 152:2930-2937.
- [11] Nicole, G.L. 1908. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Academic Science*, 146:842-843.
- [12] Novy, F.G, Macneal, W.J. 1904. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. *Journal Infectologyc Dis*, 1:1-3.
- [13] Pan, A. A.; Honigberg, B. M. 1985. *Leishmania mexicana* pifanoi in vivo and in vitro interactions between amastigotes and macrophages. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 71:3-13.
- [14] Rittig, MG, Bogdan, C. 2000. *Leishmania*-host cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, 16:292-297.
- [15] Sacks, D.L.; Perkins, P.V. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223:1417-1419.
- [16] Sacks D, Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*, 3:1041- 1047.
- [17] Vívenes, M.A.L.; Oviedo, M.; Márquez J.C. 2005. Desarrollo de *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine). *Rev Colomb de Entomol*, 31:71-74.
- [18] Walters, L.; Irons, K.; Chaplin, G.; Tesh, R. 1993. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medic Entomol*, 30:699-718.
- [19] Zambrano-Villa, S; Rosales-Borjas, D; Carrero, JC; Ortiz-Ortiz, L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*, 18:272-278.

Caracterização de flagelados do gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) isolados de marsupiais (Mammalia: Edentata, Marsupialia) procedentes do Estado de Rondônia, Brasil

Ana Lúcia Souza das Chagas, Fracimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, Luanda de Paula Figueira, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: A detecção precoce e a notificação de doenças, bem como o compartilhamento de informações e de agentes patogênicos entre países, são postos-chaves para uma pronta resposta no âmbito nacional e global. Para a contingência de doenças emergentes, as autoridades locais das áreas de saúde, agricultura e meio ambiente devem colaborar de forma transparente, e os governos devem utilizar a colaboração internacional para prevenção, vigilância, biossegurança, controle da infecção em hospitais e tratamento de doenças infecciosas. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi de caracterizar por análise isoenzimática 10 cepas de tripanosomatídeos (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) isoladas de marsupiais (Mammalia: Edentata, Marsupialia) do Estado de Rondônia, Brasil. Além disso, foram utilizadas cepas de referência (*Trypanosoma cruzi*) e seu perfil isoenzimático foi comparado com os das amostras isoladas. Foram utilizados seis sistemas enzimáticos: Glicose-6-fosfato desidrogenase-G6PDH (E.C.1.1.1.49), Glicose-6-fosfato isomerase-GPI (E.C.5.3.1.9), Malato desidrogenase-MDH (E.C.1.1.1.37), 6-fosforo-gluconato desidrogenase-6PGDH (E.C.1.1.1.44), Fosfoglucomutase-PGM (E.C.2.7.5.1) e Enzima málica - ME (E.C.1.1.1.40). Todas as amostras apresentaram perfil bioquímico compatível com *T. cruzi*, agrupando-se em cinco zimodemas com características de populações que circulam em ambientes de transmissão domiciliar/peridomiciliar e silvestre. Observou-se heterogeneidade populacional entre as cepas silvestres dos animais (mucura e cuíca) procedentes das localidades de Jirau, Morrinhos e Abunã em Rondônia.

Palavras-chave: Zoonoses, Perfil isoenzimático, hospedeiros vertebrados.

1. INTRODUÇÃO

Zoonoses são enfermidades transmitidas naturalmente dos animais ao homem. O conceito de zoonoses é bastante complexo, envolvendo o homem, em alguns casos outro vertebrado, um artrópode, o agente causador da doença e o ambiente como um todo, formando um conjunto biológico que é ativado por ações recíprocas entre todas as partes (Jorge *et al.* 2000). Os pequenos mamíferos são considerados hospedeiros de diversas espécies de endoparasitos, sejam estes protozoários ou helmintos. Muitos participam de ciclos zoonóticos de parasitos patogênicos ao homem. Entre os protozoários flagelados que podem ser isolados de roedores e marsupiais, encontram-se as leishmânias e os tripanosomas.

Deane (1964) investigou a presença de hemoflagelados em animais silvestres da região amazônica, entre eles, formas que caracterizou como *Trypanosoma cruzi*. Hoje é sabido que os reservatórios de *T. cruzi* incluem mais de cem espécies de mamíferos pertencentes a várias ordens e gêneros, cuja distribuição geográfica vai dos Estados Unidos até a Argentina (Hoare 1972).

Diversas espécies de mamíferos estão envolvidas no ciclo de transmissão das zoonoses. Um exemplo seria a mucura (*Didelphis marsupialis*) considerada como reservatório de várias espécies de leishmânias – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, e de tripanosomas como o - *Trypanosoma cruzi* (Zanella 2016).

Os marsupiais tiveram sua importância ressaltada após o achado de Deane *et al.* (1984), quando evidenciaram a ocorrência de um ciclo completo do *T. cruzi* nas glândulas anais de mucuras naturalmente infectadas.

A equipe de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA, no período de 1985 a 1986, teve a oportunidade de examinar diversos mamíferos (com a mesma metodologia utilizada neste estudo) para isolamento de protozoários na região da Usina Hidrelétrica de Samuel, em Rondônia, quando foi possível verificar a presença de flagelados como *Endotrypanum* sp. de preguiças (*Choloepus juruanus*), *Leishmania (Viannia)* sp. de ouriço/*Coendou* sp. e homem, *L. deanei* de ouriço/*Coendou* sp. e *T. cruzi* de mucura (*D. marsupialis*). Além dessas, outras espécies de leishmânias de mamíferos (*L. naiffi* e *L. lainsoni*, respectivamente) foram isoladas de tatu (*Dasybus novemcinctus*) e de ouriço (*Coendou prehensilis*) [Naiff *et al.* 1991; 1992].

Atualmente, sabe-se que os reservatórios naturais são organismos bem adaptados ao parasitismo, sem lesões notáveis, ou mesmo, sem processos visíveis, e busca-se descobri-los por métodos como a hemocultura ou a semeadura em meios de cultura, de material obtido da pele aparentemente normal.

A caracterização bioquímica de cepas de animais e do homem, através de análise de isoenzimas, feitas por Miles *et al.* (1977; 1978 e 1980) e os testes moleculares Morel *et al.* (1980), constituem-se nas melhores ferramentas empregadas nos últimos anos, não somente para verificar as variações intra e interespecíficas de *T. cruzi*, mas, em especial, como perspectivas na utilização em estudos epidemiológicos e na eficiência do diagnóstico (Dias e Coura 1997). Zimodemas são grupos de cepas que apresentam perfis eletroforéticos isoenzimáticos comuns, representando padrões genéticos fenotípicos e permitindo uma caracterização filogenética dos parasitas.

O estudo isoenzimático de cepas isoladas por Miles *et al.* (1977) de área endêmica na Bahia, de animais silvestres e de pacientes humanos, permitiu a estes autores

demonstrarem a circulação nesta área de cepas com dois diferentes perfis isoenzimáticos, correspondendo aos zimodemas Z1 (ciclo silvestre) e Z2 (ciclo doméstico). Em cepas isoladas na Amazônia por Miles *et al* (1978, 1981) verificaram a presença de dois zimodemas (Z1 e Z3) no Pará.

Nesse contexto, o levantamento dos hemoparasitas vem agregar conhecimento sobre a circulação de protozoários flagelados nestas espécies animais, principalmente os patogênicos ao homem, como o *T. cruzi*, fator de extrema importância para os estudos de distribuição e circulação de parasitos, correlacionando seus hospedeiros naturais e seu provável envolvimento em ciclos zoonóticos de infecção humana.

Diante da exposição, o objetivo do estudo foi caracterizar e tipar hemoparasitas isolados (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de mamíferos (Mammalia: Edentata, Marsupialia) do Estado de Rondônia, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ORIGEM DOS ISOLADOS

No ano de 2004, com apoio de FURNAS, foi realizado um inventário de roedores e marsupiais (Mammalia: Rodentia & Marsupialia) e seus endoparasitas (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) do rio Madeira (área de aproveitamento hidrelétrico no trecho que envolve a localidade da Cachoeira de Santo Antônio e Jirau) em Rondônia. Dos animais examinados, foram isoladas 10 amostras de tripanosomatídeos que fazem parte deste estudo, além destas foi utilizada cepa padrão de *T. cruzi* (Tabela 1). Permissão para captura, coleta e transporte: IBAMA licença número 02/2004 NUFU/IBAMA –RO, processo IBAMA 02024000293/04-14.

Tabela1 - Origem e identificação de estoques de *Trypanosoma* sp. e cepa de referência utilizada neste estudo para identificação das amostras isoladas

Nº do estoque	Designação ^a	Espécies	Origem Geográfica
Cepa de Referência			
Y	M/HOM/VE/53/Y	<i>T.cruzi</i>	Venezuela
Isolados da Amazônia			
3590	MDAS/BR/89/IM3590		BR, RO, Samuel
5151	MDID /BR/04/IM5151		BR, RO, Jirau
5152	MMIC/BR/04/IM5152		BR, RO, Jirau
5157	MMIC/BR/04/IM5157		BR, RO, Jirau
5158	MDID /BR/04/IM5158		BR, RO, Abunã
5161	MMIC/BR/04/IM5161		BR, RO, Jirau
5163	MDID/BR/04/IM5163		BR, RO, Jirau
5177	MDID/BR/04/IM5177		BR, RO, Abunã
5188	MMIC/BR/04/IM5188		BR, RO, Morrinhos
5197	MMIC/BR/04/IM5197		BR, RO, Morrinhos

Legenda: (a): designação: hospedeiros [M=Mammalia: HOM: *Homo sapiens*; DID: *Didelphis*; MIC: *Micoureous demerarae*; (DAS): *Dasyus kapleri* /país de origem/ano de isolamento/código de origem].

2.2. MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram mantidas em intervalos semanais em meio de cultura ágar-sangue modificado - meio NNN (Marin *et al.* 1982) contendo sangue de coelho a 15% e antibióticos (200U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina) [Arias e Naiff 1981]. O sobrenadante das culturas consiste de soro fisiológico (0,5 mL). Os estoques estabilizados *in vitro* foram expandidos em meio líquido LIT contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFBi). O material foi criopreservado, utilizando-se glicerina a 10% em meio Schneider contendo 30% SFBi (Jaffe *et al.* 1984). A criopreservação das amostras foi realizada em Nitrogênio líquido.

2.3. MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO

2.3.1. PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA

As amostras foram preparadas segundo protocolo padronizado por Momen (1984). Promastigotas de cultura em fase estacionária foram centrifugadas (3500 rotações por minuto (rpm), 4 °C, 15 minutos) e o seu sedimento lavado por duas vezes em solução contendo 0,85% NaCl e 0,01M de EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético/Sigma), pH 8,0. As amostras foram estocadas em Nitrogênio líquido até a sua aplicação no gel de agarose. A análise das amostras estudadas foi realizada comparando-se o perfil isoenzimático obtido da cepa de referência com o dos isolados.

2.3.2. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

- **Preparo de géis:** O gel de agarose foi preparado a 1% em água destilada e solução tampão (1:2, v/v) específica, similar àquela a ser usada na corrida eletroforética. Antes da corrida, os géis foram absorvidos com papel filtro e as amostras aplicadas em sua superfície, com o auxílio de uma fita plástica (fita de aplicação). Também foi aplicada uma solução corante, que indicará a velocidade e o tempo ideal da corrida.

- **Corrida de eletroforese de isoenzimas:** O gel foi depositado em cuba de eletroforese horizontal e a corrida realizada durante no mínimo duas horas, em condições adequadas de corrente e temperatura (10 °C), mantida constante por um sistema de refrigeração (Sistema Multiphor II/General Eletric).

- **Análise dos géis:** As bandas alélicas (eletromorfos) separadas foram reveladas no gel com sistemas específicos, constituídos de substratos e cofatores em solução tampão adequada. Foram utilizados seis sistemas enzimáticos: Glicose-6-fosfato desidrogenase G6PDH (E.C.1.1.1.49), Glicose-6-fosfato isomerase GPI (E.C..5.3.1.9), Malato desidrogenase MDH(E.C.1.1.1.37), 6-fosforo-gluconato desidrogenase 6PGDH (E.C.1.1.1.44), Fosfoglucomutase PGM (E.C.2.7.5.1) e Enzima málica ME (E.C.1.1.1.40).

A reação enzimática foi interrompida com ácido acético glacial a 5% e o gel posteriormente deixado para secar a temperatura ambiente (TA) para posterior análise. Amostras contendo os mesmos perfis isoenzimáticos das cepas de referência foram classificadas no mesmo zimodema, representando assim uma determinada espécie ou variante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de tripanosomas analisadas através de eletroforese de isoenzimas (N=10), isoladas de marsupiais e roedores capturados na área de aproveitamento hidrelétrico no trecho que envolve a localidade da Cachoeira de Santo Antônio e Jirau em Rondônia apresentaram perfil bioquímico compatível com *T. cruzi* (Tabela 2), agrupando-se em cinco zimodemas, (Figura 1) com características de populações que circulam em ambientes de transmissão domiciliar/peridomiciliar-Z2 (zimodema a, isolado de (*Dasyus kapleri*, Figura 2c) e silvestre (Figura b-e). Observou-se heterogeneidade populacional entre cepas silvestres dos animais (mucuras [Figura 2a] e cuíca [Figura 3b,c]) procedentes das localidades de Jirau, Morrinhos e Abunã em Rondônia.

Tabela 2 - Origem e identificação de estoques de *Trypanosoma. sp* e cepa de referência utilizada neste estudo.

Nº Estoque	Designação ^a	Espécies/zimodema	Origem Geográfica
Cepa de Referência			
Y	M/HOM/VE/53/Y	<i>T.cruzi</i>	Venezuela
Isolados da Amazônia			
3590	MDAS/BR/89/IM3590	<i>T.cruzi</i> /INPA Tc a	BR, RO, Samuel
5151	MDID /BR/04/IM5151	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc c	BR, RO, Jirau
5152	MMIC/BR/04/IM5152	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc c	BR, RO, Jirau
5157	MMIC/BR/04/IM5157	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc c	BR, RO, Jirau
5158	MDID /BR/04/IM5158	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc b	BR, RO, Abunã
5161	MMIC/BR/04/IM5161	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc c	BR, RO, Jirau
5163	MDID/BR/04/IM5163	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc e	BR, RO, Jirau
5177	MDID/BR/04/IM5177	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc d	BR, RO, Abunã
5188	MMIC/BR/04/IM5188	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc c	BR, RO, Morrinhos
5197	MMIC/BR/04/IM5197	<i>T.cruzi</i> / INPA Tc c	BR, RO, Morrinhos

Legenda: (a): designação: hospedeiros [M=Mammalia; HOM: *Homo sapiens*; DID: *Didelphis*; MIC: *Micoureous demerarae*; (DAS): *Dasyus kapleri* /país de origem/ano de isolamento/código de origem].

Figura 1 - Zimograma obtido pela análise fenética segundo método de Jaccard (UPGMA) representando os perfis dos alelos observados para as enzimas G6PDH, GPI, 6PGDH, ME, MDH e PGM. Observa-se a formação de cinco zimodemas. Quatro destes (b, c, d, e) apresentam características de cepas silvestres, sendo que no zimodema c agruparam-se seis isolados.

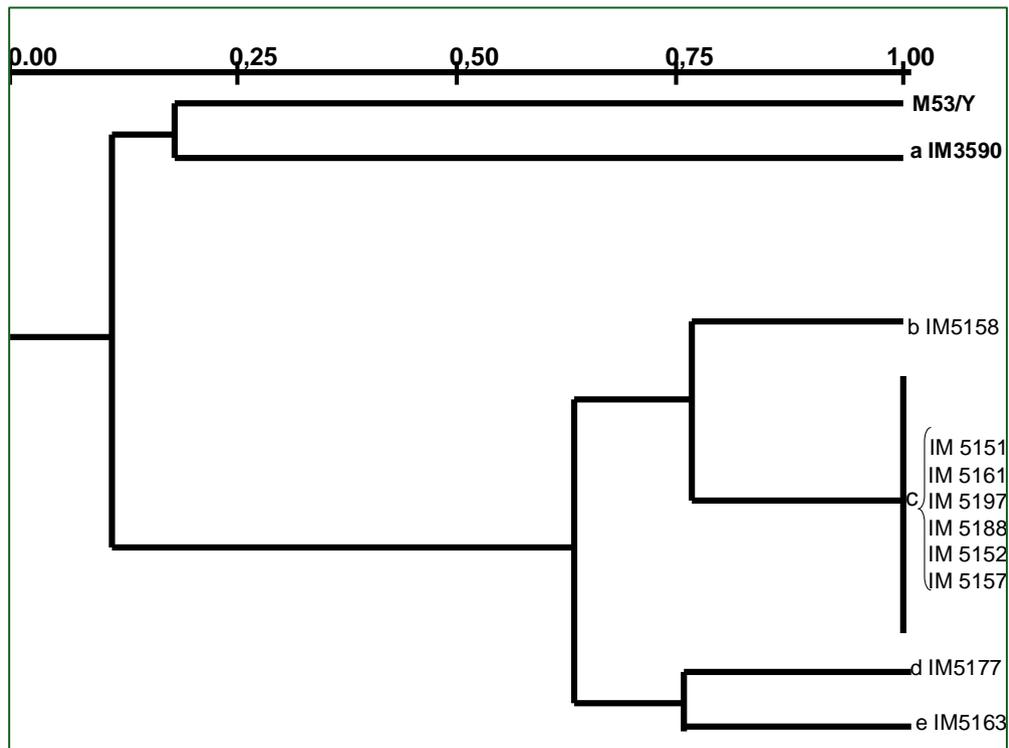


Figura 2 - a. *Didelphis marsupialis*; b. *Micoureus demerarae* (Mammalia: Marsupialia); c. *Dasyus kapleri* (Mammalia: Edentata).



Fonte: M. Santos-Filho, M & D.J. Silva (a e b)

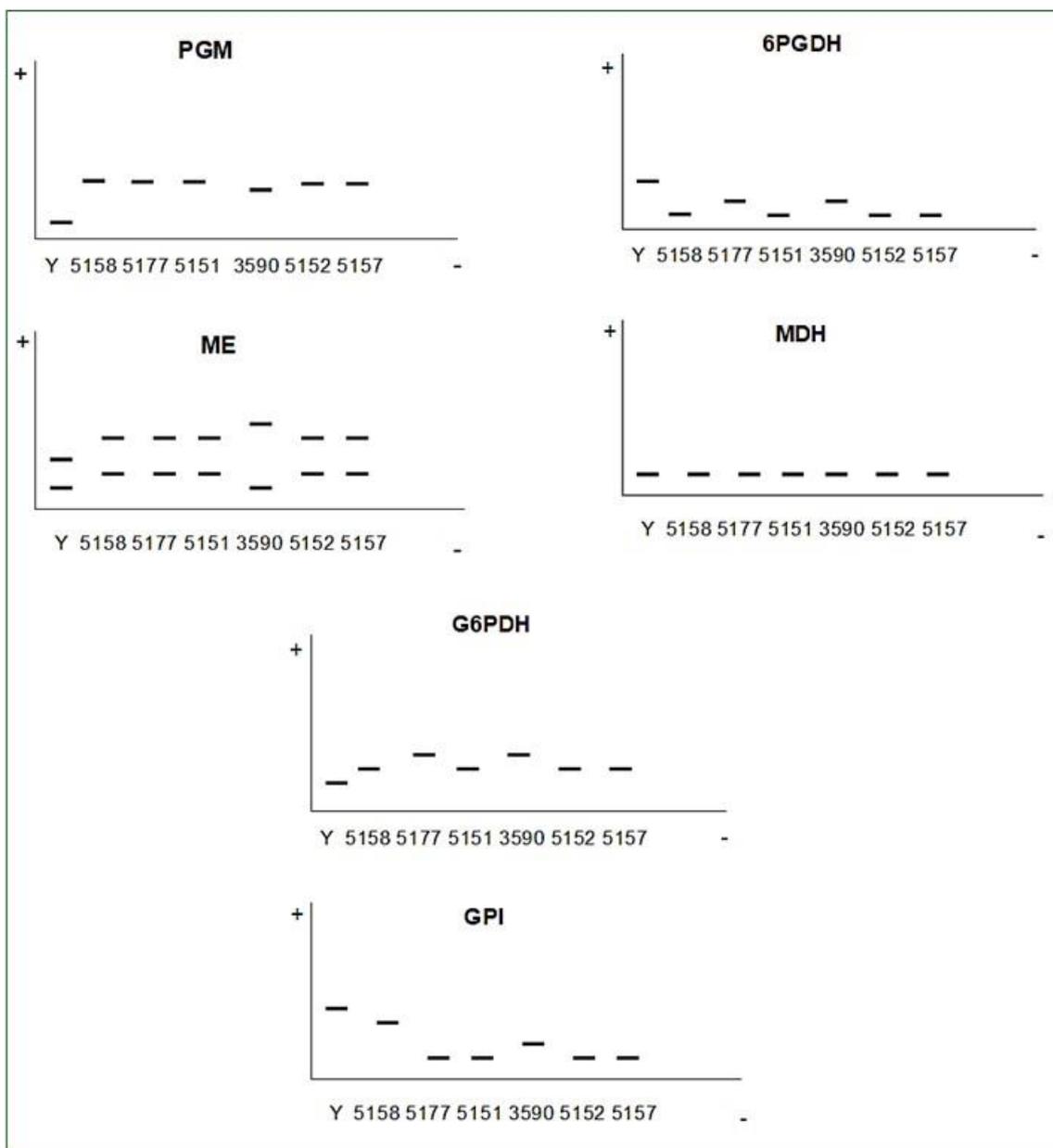
Foram analisadas seis enzimas: G6PDH, PGM, GPI, 6PGDH, MDH e ME (Figura 3) Para cada enzima, as bandas com a mesma mobilidade eletroforética foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. Com exceção do loci MDH, todos os outros demonstraram ser polimórficos (Tabela 3).

Para a análise numérica foram considerados os perfis dos 10 isolados e a cepa de referência de *T. cruzi*. A análise fenética foi feita a partir dos coeficientes de similaridade de Jaccard, Dice e "Simple Matching". Os comentários que seguem foram feitos de acordo com o dendrograma resultando da análise pelo coeficiente de Jaccard. Através do dendrograma obtido, as 10 cepas foram agrupadas em cinco zimodemas (a, b, c, d, e), sendo que o zimodema c agrupou seis cepas de *T. cruzi* (IM5151, IM5161, IM5197, IM5188, IM5152 e IM5157).

Tabela 3 - Alelos presentes em cada zimodema de *Trypanosoma cruzi*.

ENZIMAS							
Amostra	Zimodema	G6PDH	PGM	GPI	6PGDH	MDH	ME
Y	M53/Y	2	1	4	3	1	1,3
3590	a	4	4	2	2	1	1,5
5151	c	3	5	1	1	1	2,4
5152	c	3	5	1	1	1	2,4
5157	c	3	5	1	1	1	2,4
5158	b	3	5	3	1	1	2,4
5161	c	3	5	1	1	1	2,4
5163	e	3	5	1	2	1	2,4
5177	d	4	5	1	2	1	2,4
5188	c	3	5	1	1	1	2,4
5197	c	3	5	1	1	1	2,4

Figura 3 - Padrão de isoenzimas de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de roedores e marsupiais capturados na área de aproveitamento hidrelétrico no trecho que envolve a localidade da Cachoeira de Santo Antônio e Jirau em Rondônia. Diagramas representando os perfis obtidos nas enzimas 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), Malato desidrogenase (MDH), Fosfoglucomutase (PGM), Enzima málica (ME), Glicose-6-fosfato isomerase (G6PDH) e Glicose-6- fosfato isomerase (GPI). Códigos dos isolados: M53/Y, IM 5158, IM5177, IM5151, IM3590, IM5152 e IM5157.



5. CONCLUSÃO

A análise de isoenzimas demonstrou que das 10 amostras testadas pelo perfil isoenzimático todas são de *T. cruzi*. A maioria das amostras agrupadas por análise numérica apresentaram perfis de cepas silvestres, sendo apenas uma das amostras isoladas - a de tatu (zimodema a) com característica de cepa domiciliar/peridomiciliar. Observou-se heterogeneidade populacional entre as cepas silvestres dos animais (mucura e cuíca) procedentes das localidades de Jirau, Morrinhos e Abunã em Rondônia,

demonstrando-se a possibilidade de ciclos epidemiológicos distintos nos diversos ambientes estudados, verificando-se como exemplo, na área de Abunã, a circulação de pelo menos dois zimodemas silvestres, num ambiente com características de baixa ação antrópica.

REFERÊNCIAS

- [1] Ayres, J.M. 1986. Uakaris and Amazonian flooded forests. Ph.D. diss. University of Cambridge, Cambridge.
- [2] Ayres, J.M.; Clutton-Brock, T.H. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140:531-537.
- [3] Deane, L.M. 1964a. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Bras. Mal. D. Trop* 1| 27-48.
- [4] Dias, J.C.P.; Coura, J.R. 1997. Epidemiologia. In Dias, J.C.P.; Coura, J.R. (orgs), *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem para o clínico geral*. 20 ed., FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 33-65.
- [5] Franco, A.M.R. Leishmaniose Tegumentar em *Didelphis marsupialis*, Linnaeus 1758 (Marsupialia: Didelphidae): Estudo da infecção Experimental por *Leishmania* spp. Tese de mestrado apresentada à Coordenação dos Cursos de Pós-Graduação do Instituto Oswaldo Cruz, RJ, para obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária. 1990.
- [6] Hoare, C.A. 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Sc. Publ, Oxford.
- [7] Huang, Z.Y.X., Van Langevelde, F., Estrada-Peña, A., Suzán, G.; De Boer, W. F. 2016. The diversity-disease relationship: evidence for and criticisms of the dilution effect. *Parasitology*, 143(9), 1075–1086.
- [8] Jansen, A. M., Xavier, S. C. C., Roque, A. L. R. 2020. Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1–15.
- [9] Jorge, T. C. A. 2000. Doença de chagas. Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz/ Instituto Oswaldo Cruz. 368p.
- [10] Marin, F.; Garcia, L. J.; Penarrubia, M.P.; Penalver, J. 1982. Cultivation of *Leishmania*: comparison of different media for promastigote cultivation. *Ann Trop. Med. Parasitol*, 76(6): 607-613.
- [11] Miles, M.A.; Toye, P.J.; Oswald. S.C.; Godfrey, D.G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:217-225.
- [12] Miles, M.A.; Souza, A.A.; Póvoa, M.; Shaw, J.J.; Lainson, R.; Toye, P.J. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272:819-821.
- [13] Miles, M.; Lanham, S.M.; Souza, A.; Póvoa, M. 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74:221-237.
- [14] Miles, M.A.; Póvoa, M.M.; Souza, A.A.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ketteridge, D.S. 1981. Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75:667-674.
- [15] Morel, C.M.; Chiari, E.; Camargo, E.P.; Mattei, D.M.; Romanha, A.J.; Simpson, L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6810-6814.
- [16] Naiff, R.D.; A. D.; Naiff, M.F. Arias, J.R.; Barret, T. V.; Momen, H.; Grimaldi JR., G. 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86: 317-321.
- [17] Naiff, R.D.; Barrett, T. V.; Arias, J.R.; Naiff, M.F.; Freitas, R.A.; Momen, H. 1992. Leishmânia e outros parasitos isolados de Coendu (Rodentia: Erithizontidae) de Rondônia. In: XXIX Congresso da Soc. Brasil. Med. Trop., Belém, PA., 5: 132-133.
- [18] Naiff, M.F. 1998. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes

etiológicos na região. Tese de mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ,60p.

[19] Naiff, R. D, Barrett, T. V, Arias, J. R., Naiff, M. F., Freitas, R.A., Momen, H. 1992. Leishmânias e outros parasitos de coendous (rodentia: erethizontidae) do estado de rondônia. In: XXVIII Congresso Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 1992, Belém, PA. Programa e Resumos do XVIII Congresso da SBMT. 25: 132-133.

[20] Patton, J.L.; Da Silva, M.N.F. e Malcolm, J.R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution* 48(4):1314-1323.

[21] Patton, J.L.; Da Silva, M.N.F.; Malcolm, J.R. 1996. Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. *Journal of Molecular Ecology*, 5:229-238.

[22] Van Roosmalen, M.G.M.; Van Roosmalen, T.; Mittermeier, R.A.; Fonseca, E.G.A.B. 1998. A new and distinctive species of marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower rio Aripuanã, state of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia*, 22, 27 pp.

[23] Peres, C.A.; Da Silva, M.N.F.; Patton, J.L. 1996. Riverine barriers and gene flow in Amazonian saddle-back tamarin monkeys. *Folia Primatologica*, 67:113-124.

[24] Santos, P.M.S., Silva, S.G.N. Da, Fonseca, C.F., Oliveira, J.B. 2015. Parasitos de aves e mamíferos silvestres em cativeiro no estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(9): 788-794.

[25] Silva, M.N.F.; J.L. Patton. 1993. Patterns of evolutionay divergence in arboreal Amazonian echimyid rodents: the perspective of mtDNA sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2(3):243-255.

[26] Zanella, J. R. C. 2016. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* [online]. 51(5): 510-519.

[27] World Health Organization (WHO). 2017. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: Fourth WHO report on neglected tropical diseases. In World Health Organization.

CAPÍTULO 12 Isolamento e caracterização de protozoários do gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de peixe acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) de água doce

Alana Cristina Vinhote da Silva, Sônia Rolim Reis, Francimeire Gomes Pinheiro, Luanda Figueira, Bruno Bezerra Jensen, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: O acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) é um pescado de baixo valor comercial. Sua carne apresenta baixo teor lipídico e elevado percentual proteico e faz parte da dieta do amazônida, que o consome assado ou cozido. Este peixe apresenta uma característica peculiar por apresentar um rápido processo de degradação após a sua morte, portanto, é comercializado vivo dentro de embarcações com o porão parcialmente inundado ou de canoas. Atualmente, estão descritas mais de 140 espécies *Trypanosoma* em peixes de água doce em todo o mundo, sendo cerca de 40 registradas em peixes naturais de bacias hidrográficas brasileiras. Sem conhecimentos mais específicos deste hemoflagelado quanto a sua taxonomia e ciclo biológico (vetores, reservatórios e outros) ou a possível ameaça à saúde pública, este estudo tem como objetivo principal o seu isolamento e consequente caracterização biológica e bioquímica. O tripanossomatídeo encontrado no sangue do acari-bodó foi descrito morfometricamente e a partir das mensurações de formas tripomastigotas, foi possível descrevê-lo como *Trypanosoma* (Megatrypanum) sp. n. Neste estudo não foi possível o isolamento do hemoflagelado. Verificou-se 88,70% (55/62) de taxa de infecção dos 62 peixes examinados pelo exame a fresco (direto) de sangue, sendo confirmado pelos esfregaços corados. Os peixes apresentaram maior número de flagelados na circulação sanguínea na época da seca (agosto a novembro de 2009). As características biológicas em conjunto com outras informações possibilitaram a descrição morfológica deste hemoparasito encontrado no acari-bodó.

Palavras-chave: Parasitologia animal, Diagnóstico direto, saúde pública.

1. INTRODUÇÃO

O *Pterygoplichthys pardalis* (Castelnau 1855) é um peixe de água doce, da ordem Siluriformes (bagres), família Loricariidae (Bonaparte 1831), que agrupa as espécies de cascudos. Essa família representa o clado mais diversos e especializado da superfamília Loricarioidea ou subordem Loricarioidei, incluindo mais de 600 espécies agrupadas em 70 gêneros e seis subfamílias (Isbrücker 1980).

Popularmente conhecido como acari-bodó, esse animal apresenta uma característica peculiar, por apresentar um rápido processo de degradação após a sua morte. É comercializado vivo dentro de embarcações com o porão parcialmente inundado ou de canoas. A degeneração origina um odor repugnante que inviabiliza o consumo da carne do peixe. Este fato habituou o consumidor a comprá-lo somente quando vivo (Brito 1981; Castro 1999). Sendo assim, o acari-bodó se destaca dentre os pescados de baixo valor comercial. Sua carne apresenta baixo teor lipídico e elevado percentual proteico e faz parte da dieta do amazônida, que o consome assado ou cozido (SENAC 2000; Jung 2004).

O acari-bodó possui distribuição restrita na bacia do Amazonas. Vivem em lagos e o período de safra é de setembro a março, quando o nível das águas baixa (período de seca) na região e fica fácil sua captura.

O grupo de espécies detritívoras, segundo Goulding *et al.* (1988), destaca-se por devido à sua considerável abundância nos ecossistemas de várzea, devido ao grande aporte de material orgânico particulado, formado por plantas decompostas e restos de animais mortos. Sua dieta constitui principalmente de materiais mortos (lignina e celulose) e uma pequena parte de materiais vivos como algas, bactérias, fungos e micro-invertebrados (Yossa e Araújo-Lima 1998).

A reprodução ocorre entre os meses de outubro até maio (Brito 1981). De aspecto forte e resistente, apresenta dupla respiração, aquática (branquial) e estomacal (acessória), adotando a respiração aérea facultativamente, subindo a superfície para respirar apenas quando o oxigênio disponível na água torna-se escasso (Brito 1981; Val e Almeida-Val 1995; Brauner e Val 1996; Bailey *et al.* 1999; West *et al.* 1999).

Os endoparasitos presentes neste animal são pouco conhecidos. Foram descritos tetramatódeos digenéticos, metacercárias do gênero *Odhneri trema* e trematódeos da família Strigeoidea (Thatcher 1981). Uma nova espécie de *Gorytocephalus* Nickol e Thatcher, 1971 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) foi descrita por Thatcher (1979) no intestino do acari-bodó. Moroni (2005) identificou o hemoparasita *Trypanosoma* sp. no sangue de acari-bodó comercializado em feiras livres de Manaus. Estes parasitos são facilmente visualizados no exame direto de lâminas de sangue, sendo de extrema importância o seu cultivo e caracterização.

Os tripanosomatídeos, amplamente distribuídos nos diferentes continentes, são capazes de parasitar uma grande variedade de hospedeiros, de plantas, animais vertebrados e invertebrados.

No grupo dos protozoários o gênero *Trypanosoma* encontra-se na ordem Kinetoplastida e na família Trypanosomatidae. Tem como característica apresentar-se como um protozoário flagelado, monofilético com um único flagelo, DNA no interior de uma mitocôndria e uma membrana ondulante numa de suas formas evolutivas.

O *Trypanosoma grayi*, parasito de crocodilos africanos, é a espécie melhor conhecida em répteis, com infecção adquirida de moscas Tsé-tsé (*Glossina morsitans*)

infectadas. Em jacarés do pantanal, foi descrita a presença de *Trypanosoma* sp. (Nunes e Oshiro 1990), morfologicamente distinto de *T. grayi* e *T. cecili*, parasitos de *Crocodylus niloticus* e *Caiman crocodilus*, respectivamente. A diferenciação foi feita baseando-se apenas em estudos biométricos, no entanto, não foi atribuído nome específico a este organismo, quando da descrição.

Atualmente, estão descritas mais de 140 espécies *Trypanosoma* em peixes de água doce em todo o mundo, sendo cerca de 40 registradas em peixes naturais de bacias hidrográficas brasileiras. Destas, pelo menos 18 registradas em cascudos (Pomini *et al.* 2000). O número relativamente elevado de espécies de tripanosomas em cascudos é atribuído por Fróes *et al.* (1979) aos hábitos semi-sedentários destes peixes que favorece a susceptibilidade à parasitose por sanguessugas (*apud* Rego e Pavanelli 1989).

O acari-bodó é um peixe parasitado pelo *Trypanosoma* sp., comercializado vivo para seu posterior consumo. Sem conhecimentos mais específicos deste hemoflagelado quanto a sua taxonomia e ciclo biológico (vetores, reservatórios e outros) ou a possível ameaça à saúde pública, este estudo tem como objetivo principal o seu isolamento e consequente caracterização biológica e bioquímica.

Diante da problemática, o objetivo deste estudo foi de isolar e caracterizar o hemoparasita *Trypanosoma* sp. de acari-bodó (*P. pardalis*), adquiridos em feiras livre em Manaus, Amazonas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AQUISIÇÃO DOS PEIXES

Foram adquiridos 62 peixes vivos, em feiras livres de Manaus-AM, encaminhados para o Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (CPCS/INPA), sendo aclimatados (25°C) e mantidos em caixas de isopor. Cada peixe recebeu uma numeração única e uma ficha foi preenchida com informações detalhadas sobre o ambiente de onde foi capturado, suas características biológicas e os procedimentos laboratoriais realizados. Os animais foram fotodocumentados e feito a observação externa e avaliação dos opérculos para busca de ectoparasitas.

2.2. COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS DOS PEIXES

O sangue foi coletado assepticamente por punção (vaso caudal, artéria cardíaca e do artéria hepática), realizando-se o exame a fresco para a detecção do tripanosomatídeo. Independente da positividade, eram confeccionados os esfregaços sanguíneos e corados com o Kit Panótico Rápido.

Segundo normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária, os peixes foram submetidos à eutanásia por percussão cerebral, para em seguida realizar a coleta dos seguintes tecidos: fígado, coração e músculos. Os tecidos foram processados de acordo com os itens descritos a seguir.

2.3. ISOLAMENTO DE *TRYPANOSOMA* SP.

Das amostras positivas para *Trypanosoma* sp., coletou-se sangue com seringas de 3 ml rinsadas com anticoagulante e posteriormente foram armazenados em frascos de

vidro a vácuo contendo anticoagulante EDTA (Vacuntainer, BD®), enquanto os tecidos coletados foram fragmentados e armazenados em salina com antibiótico (Gentamicina). Em seguida, estes materiais foram levados à capela de fluxo laminar, para inoculação nos meios de cultura; utilizou-se o meio líquido LIT semeados em garrafas de 20ml e, em meio bifásico NNN em tubos de ensaio, mantidos a 25°C.

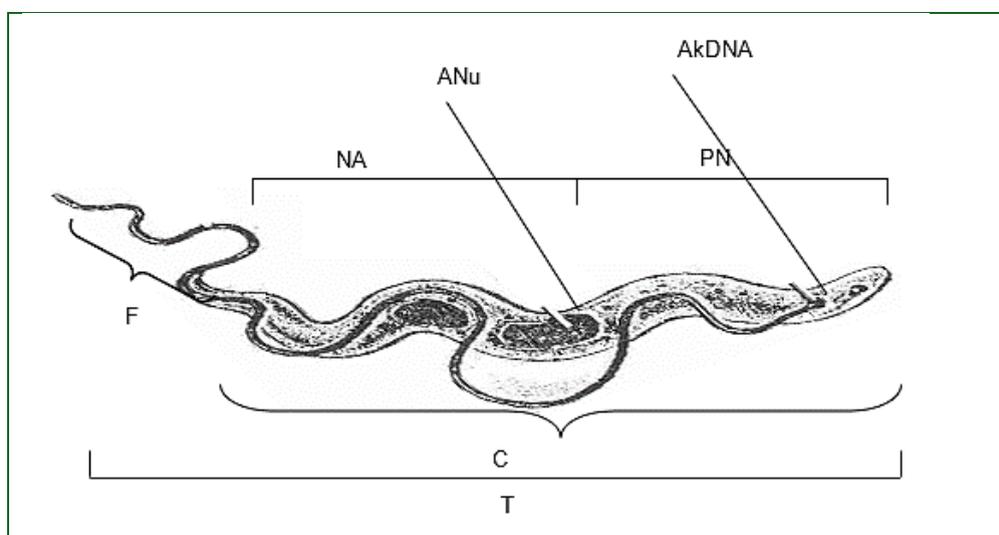
2.3.1. PARASITEMIA

O sangue coletado foi mantido em Vacuntainer^{BD} sem anticoagulante, foi reservado e após a separação das hemácias e do soro, foi feito sem diluição a contagem dos hemoflagelados na câmara de Neubauer.

2.3.1.1. MORFOMETRIA DO PARASITO

Após a observação das lâminas, realizou-se a mensuração dos tripanosomas, através de microscópio (Olympus®) óptico acoplado a um sistema para digitalização de imagens. Utilizou-se o programa de computador CellD para obter medidas em micrômetros (μm) das formas tripomastigotas. Os parâmetros avaliados (Figura 1) foram: Comprimento total (T), corpo celular sem flagelo (C), comprimento da porção livre do flagelo (F), distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo (PN), distância do meio do núcleo à extremidade anterior (NA), largura do corpo na porção mais larga (L), razão comprimento/largura do corpo (C/L), índice nuclear: razão PN/NA (IN), área do núcleo (ANu) e área do kDNA (AkDNA).

Figura 1. Medidas da morfometria do hemoparasita do gênero *Trypanosoma* encontrado no peixe *Pterygoplichthys pardalis*, vendido em feiras de Manaus, Amazonas. T: comprimento total; C: corpo celular sem flagelo; F: comprimento da porção livre do flagelo; PN: distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo; NA: distância do meio do núcleo à extremidade anterior; L: largura do corpo na porção mais larga; ANu: área do núcleo; e AkDNA: área do kDNA



3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Taxa de infecção: Verificou-se um total de 88,70% (55/62) de taxa de infecção dos 62 peixes examinados pelo exame a fresco (direto) de sangue, sendo confirmado pelos esfregaços corados. Destes animais em apenas quatro espécimes não foi observada infecção para *Trypanosoma* sp. De acordo com o local no qual se obtinha o sangue (coração, fígado e cauda) para a realização dos exames sanguíneos, verificaram-se diferenças quanto a carga parasitária. O maior número de flagelados observados ao exame direto foi nas lâminas com sangue de punção hepática, seguido pela artéria caudal e por último o coração, órgão que apresentava poucas formas tripomastigotas ao exame direto. Foram analisados animais coletados durante os meses de agosto e setembro de 2009, bem como nos meses de janeiro, fevereiro, maio e junho de 2010, abrangendo tanto o período de seca quanto o de cheia do rio. Não foram identificadas variações significativas na taxa de infecção entre esses animais em relação às flutuações no nível da água.

Parasitemia: os hemoflagelados foram quantificados e os melhores resultados foram sem a diluição do sangue. Os valores calculados de 25 peixes de parasitemia ocorrem de $6,25 \times 10^2$ a $1,25 \times 10^4$ /mL; houve também peixes que apresentaram parasitemia igual a zero, nas diferentes diluições (Tabela 1). Ao contrário do que foi observado quanto a taxa de infecção natural, verificou-se variação quanto a parasitemia nas diferentes épocas do ano (seca, enchente e cheia). Os 14 peixes estudados na época da seca apresentaram maior número de flagelados na circulação sanguínea (agosto a novembro de 2009).

Tabela 1. Grau de parasitismo por *Trypanosoma* sp. de acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*) de água doce.

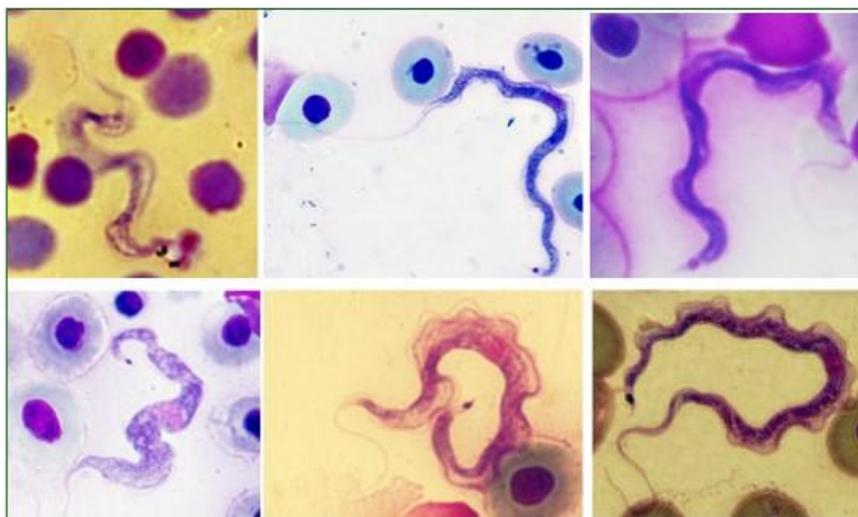
Nº de registro do peixe	Grau de parasitismo
25	++
26	-
28	++
29	-
30	-
31	+++
32	+++
34	-
35	++
38	-
39	-
40	-
41	-
42	+++
45	++
48	+
49	++
50	++
51	-
52	++

54	++
55	++
59	++
60	+
61	++

Legenda: +++: 10^4 parasitos/mL; ++: 10^3 parasitos/mL; +: 10^2 parasitos/mL; e -: $<10^2$ parasitos/mL.

Morfometria: com a observação dos esfregaços foi possível notar as diferentes disposições do parasito na lâmina (Figura 2), dificultando a visualização de algumas estruturas morfológicas, influenciando diretamente nas medições e no estabelecimento de parâmetros taxonômicos, que são indispensáveis para a classificação do parasito. Sendo assim, a partir da morfometria de 100 tripanosomas/33 lâminas examinadas (Tabela 2), foi possível determinar o subgênero do hemoflagelado encontrado no *Pterygoplichthys pardalis*.

Figura 2. Diferentes formas tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. em lâminas de esfregaços sanguíneos corados pelo método panótico (1000X) do peixe de água doce acarí-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*).



Nas observações microscópicas do parasito, verificou-se a presença de cinetoplasto próximo a região posterior do corpo do flagelado, núcleo central, membrana ondulante com o flagelo livre, granulações no citoplasma, que são características visualizadas para a forma evolutiva denominada como tripomastigota, pertencente ao gênero *Trypanosoma*. Também foram observadas variadas formas (finas e/ou largas) de tripomastigotas no sangue de um mesmo animal.

O resultado das mensurações (média em μm) indica que este parasito pertence ao subgênero *Megatrypanum*, apresentando uma média de comprimento total do corpo (T) de $71,44 \mu\text{m}$, encaixando-se nos parâmetros estabelecidos por estudos de Shaw *et al.* (1986) para este subgênero, que possui uma amplitude de comprimento total do corpo variando de $35 - 110 \mu\text{m}$. As formas tripomastigotas apresentaram uma média de $58,73 \mu\text{m}$ para o corpo celular e uma razão do comprimento pela largura do corpo de $22,01 \mu\text{m}$. Verificou-se que o índice nuclear foi de $0,99 \mu\text{m}$ para os 100 flagelados mensurados.

Tabela 2. Média de mensuração de *Trypanosoma (Megatrypanum)* sp. n. do peixe de água doce acará-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*).

Nº parasitos	Média									
	µm								µm ²	
	T	C	F	PN	NA	L	C/L	IN	ANu	AKDNA
100	71,44	58,73	12,71	29,02	29,73	2,74	22,01	0,99	7,56	0,99

Legenda: T (comprimento total); C (corpo celular sem flagelo); F (comprimento da porção livre do flagelo); PN (distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo); NA (distância do meio do núcleo à extremidade anterior); L (largura do corpo na porção mais larga); C/L (razão comprimento/largura do corpo); e IN (índice nuclear: razão PN/NA); Anu (área do núcleo); e AkDNA (área do kDNA).

Estes parasitos apresentam o citoplasma com granulações leves e de cor púrpura. Com extremidades afiladas, na parte anterior localiza-se o cinetoplasto, de forma redonda, apresenta coloração rosa e com média de área de 0,99 µm²; sua distância até o meio do núcleo é de 29,02 µm. O núcleo é geralmente ovalado podendo ser levemente circular e na maior parte das vezes ocupa toda a largura do corpo, com média de área de 7,56 µm² e mesma coloração do cinetoplasto. A distância do meio do núcleo até a extremidade posterior é de 29,73 µm, enquanto a porção do flagelo livre é de 12,71 µm, e na maioria dos parasitos não possuem coloração que o destaca, dificultando sua mensuração.

A membrana ondulante é claramente observável, sendo que a maioria dos indivíduos apresentou uma membrana com apenas algumas ondulações. Quanto aos índices de prevalência de *Trypanosoma* spp. em cascudos no estado Mato Grosso do Sul por Pomini e seus colaboradores (2005), foi de 46,7, 66,7 e 68%, respectivamente, para *Pterygoplichthys anisitsi*, *Hypostomus cochliodon* e *Hypostomus cf. boulengeri*. Os hemoflagelados observados as amplitudes de comprimento (35,07 a 104,51 mm) e largura (1,05 a 6,72 mm), a posição do núcleo constante. Espécies de *Trypanosoma* descritas morfológicamente por Pomini *et al.* (2005) se assemelham com seis espécies já conhecidas por parasitar peixes da família Loricariidae: *Trypanosoma guaibensis* e *Trypanosoma commersoni* (*Hypostomus commersoni*), *Trypanosoma venustissimum* (*Hypostomus plecostomus*) e *Trypanosoma immanis*, *Trypanosoma guaibensis* e *Trypanosoma anusi* (*Loricariichthys anus*).

Machado e Horta (1911) realizaram uma descrição detalhada do *Trypanosoma chagasi* encontrado no cascudo *Plecostomus punctatus*. Eles investigaram a morfologia, ciclo de vida e diferentes formas do hemoflagelado, utilizando esfregaços corados. Além disso, os autores observaram que a quantidade de *T. chagasi* na circulação periférica aumentava durante os meses frios do inverno, enquanto havia uma notável diminuição durante o verão. No mesmo estudo, tentou-se isolar o parasito por meio de punção cardíaca, utilizando uma pipeta Pasteur de ponta fina, e semeá-lo em meio NNN (Novy, MacNeal e Nicolle, 1904). No entanto, as tentativas de isolamento mostraram-se infrutíferas, conforme relatado pelos autores.”

4. CONCLUSÃO

A descrição desta espécie de flagelado é viabilizada pela combinação das características biológicas com outros dados. Este estudo abordou informações importantes sobre a nova espécie de hemoflagelado, denominada *Trypanosoma* n. sp., que infecta o peixe *Pterygoplichthys pardalis*.

REFERÊNCIAS

- [1] Brito, A.L. 1981. Aspectos anatômicos e considerações sobre os hábitos de *Pterygoplichthys multiradiatus* Hancock, 1828, do bolsão do januacá: Amazonas, Brasil (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIDAE). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 102pp.
- [2] Castro, F.C.P.1999. Produção e estabilidade durante a estocagem de concentrado protéico de Peixe (Piracuí) de Acari-Bodó, *Pterygoplichthys multiradiatus* (Hancock, 1928) e Aruanã, *Osteoglossum bicirrhosum* (Vandelli, 1829). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 105pp.
- [3] Fróes, O.M.; Fortes, E; Lima, D.F.; Leite, V.R.V. 1979. *Trypanosoma* (Protozoa, Kinetoplastida) de peixes de água doce do Brasil. II: novos tripanosomas de cascudos (Pisces:Loricariidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 39:425-429.
- [4] Goulding, M.; Carvalho, M.L.; Ferreira, E.G. 1988. Rio Negro: Rich Life in Poor Water:The Hague: SBP Academic Publishing, Netherlands.
- [5] Horta, P.; Machado, A. 1911. Estudos citológicos sobre o *Trypanosoma chagasi* n. sp. encontrados em peixes do gênero *Plecostomus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3:336-344.
- [6] Novy, F.G, Macneal, W.J. 1904. On the cultivation o *Trypanosome brucei*. *Journal Infectologyc Dis.*, 1:1-3.
- [7] Pomini, E.; Soares, R.A., Paiva, F.; Froehlich, O. 2000. Ocorrência e prevalência de *Trypanosoma* spp. GRUBY (Protozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em cascudos (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) em duas regiões do Estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 102pp.
- [8] Yossa, M.I.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 1998. Detritivory in two Amazonian fish species. *Journal of Fish Biology*, 52: 1141-1153.

Estudo *in vivo* de formulações aplicadas ao tratamento tópico da Leishmaniose Tegumentar Americana

Bruno Bezerra Jensen, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, de transmissão vetorial e causada por protozoário do gênero *Leishmania*. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida. Essa doença constitui um problema de saúde pública em diferentes países e o registro anual é de 1 a 1,5 milhões de casos. Os medicamentos utilizados de forma terapêutica para o tratamento da leishmaniose tegumentar apresentam uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral. Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para com os pacientes, o estudo em pauta refere-se ao desenvolvimento e aplicação de formulações tópicas contendo *Libidibia ferrea*, que indiquem uma maior atividade antileishmania e formulações com óleos vegetais e contendo drogas padrões por ensaios *in vivo*, tendo como modelo animal experimental hamsters infectados com parasitos do gênero *Leishmania*. Assim, este estudo possibilitou acompanhar a evolução morfológica das lesões causada pelo parasito e a viabilidade dos parasitos durante e após tratamento tópico com novas formulações de uso tópico.

Palavras-chave: *L. amazonensis*, teste *in vivo*, Tratamentos alternativos.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, de transmissão vetorial e causada por protozoário do gênero *Leishmania*. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.* 2003).

A Leishmaniose Tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (Brasil 2010). No Brasil, observa-se uma expansão geográfica dessa enfermidade. No período de 1980 a 2004, a LTA apresentou coeficientes de detecção com tendência ao crescimento, que oscilaram entre 3,8 e 22,9 por 100.000 habitantes (Nasser *et al.* 2009). Os fármacos utilizados como terapêutica para o tratamento da leishmaniose tegumentar apresentam uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral (Silva-López 2010).

Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para com os pacientes, o presente possui a finalidade de desenvolver e aplicar formulações tópicas contendo *Libidibia ferrea*, que indiquem uma maior atividade Leishmanicida e formulações com óleos vegetais e contendo drogas padrões por ensaios *in vivo*, tendo como modelo animal experimental hamsters infectados com parasitos do gênero *Leishmania*. Assim, este estudo possibilitou acompanhar a evolução morfológica das lesões causada pelo parasito e a viabilidade dos parasitos durante e após tratamento tópico com novas formulações de uso tópico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DE LEISHMANIA

Foram utilizadas formas Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e a 24°C.

2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O modelo biológico experimental para o estudo foram 24 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (acima de 90 dias), fêmeas e machos e pesando equivalente a 200g. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e o procedimento para o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do Biotério do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS – INPA. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições adequadas a sua manutenção, com dieta e água *ad libitum*. O projeto foi submetido à comissão de ética dos animais, possuindo o número de protocolo 011/2012.

2.3. PROCEDIMENTOS PARA O TRATAMENTO TÓPICO

Foram inoculados 10⁶ mL do parasito na forma promastigota de *L. amazonensis* recém-isoladas em cultivo de amastigotas provenientes de lesões de hamsters, aplicados na pata direita traseira para a primeira experimentação e no focinho para a segunda

experimentação. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas.

O delineamento para a avaliação biológica foi determinado em experimentação I e II, os quais continham dois grupos recebendo tratamento e um grupo controle negativo para cada experimentação, levando em consideração que em cada grupo havia quatro animais.

As formulações utilizadas continham extratos de *L. ferrea* (Gel 02), óleos vegetais (ACU02) ou Antimônio sb (creme 01 e 03) em fórmulas anídras.

As formulações foram aplicadas uma vez ao dia, 50 mg por aplicação, por animal, na área e proximidades da lesão. A área total das lesões foi aferida diariamente com um paquímetro e registradas. O aspecto morfológico das lesões foi analisado e acompanhada a sua evolução diária, sendo registrado em foto documento.

Os animais foram eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico - Difenhidantoina sódica), de acordo como indicado pela comissão de ética animal do INPA.

Foram recolhidos segmentos da área da lesão para fixação e armazenamento para microscopia eletrônica e criopreservação em nitrogênio líquido. Outros segmentos foram utilizados para impressão por aposição em lâmina e semeados em meio RPMI completo para determinação da viabilidade parasitária.

As lâminas foram fixadas com metanol e em seguida, coradas pelo método de Giemsa para quantificação parasitária em três campos para cada lâmina através do uso do Microscópio óptico.

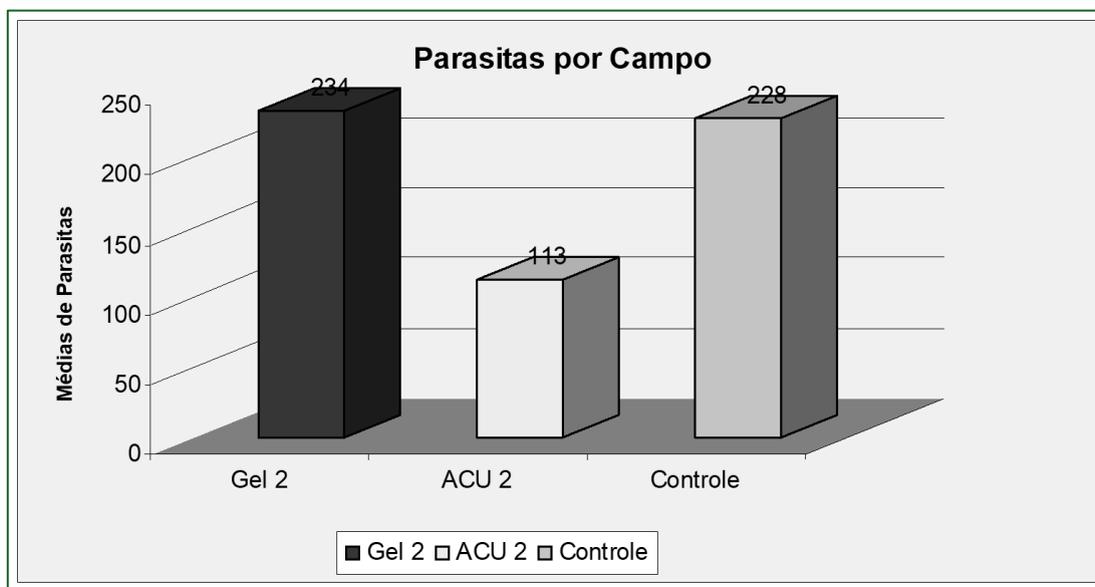
Após os tratamentos, os dados registrados foram digitados em um banco de dados previamente elaborado no programa Minitab versão 15 e em seguida, analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA), utilizando limite de 95% de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os grupos das experimentações que tiveram recolhimento de segmentos das lesões e semeados em meio RPMI apresentaram viabilidade parasitária para infecção de Leishmaniose.

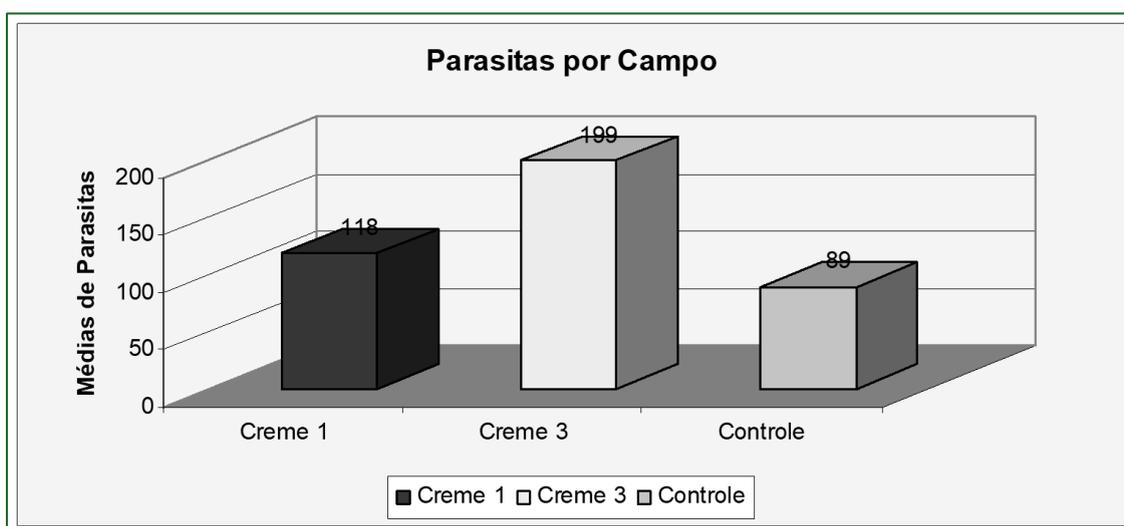
As médias de parasitos por campo no experimento foram calculadas através do teste ANOVA e obteve uma significância estatística ($p < 0,05$) com o valor de p igual 0,014. Na figura 01 foi possível observar que o ACU 2 obteve melhor resultado ao ser comparado com as médias de parasito/campo do grupo controle. Não foi observado resultado satisfatório com as médias do grupo Gel 2, devido ser superior ao do grupo controle.

Figura 01. Médias de parasitos por campo das lâminas do experimento I.



O estudo ANOVA realizado para calcular as médias de parasitos por campo no experimento II, demonstrou significância estatística ($p < 0,05$) em que o p foi equivalente a 0,035. Na figura 02 observou-se que as médias de parasitos por campo do grupo que recebeu tratamento com creme 1 obteve menor número do que a do creme 3, encontrando um número de parasitos em maior concentração ao comparar-se com o grupo controle, verificando que mesmo com ausência de tratamento demonstrou a menor média de parasitos.

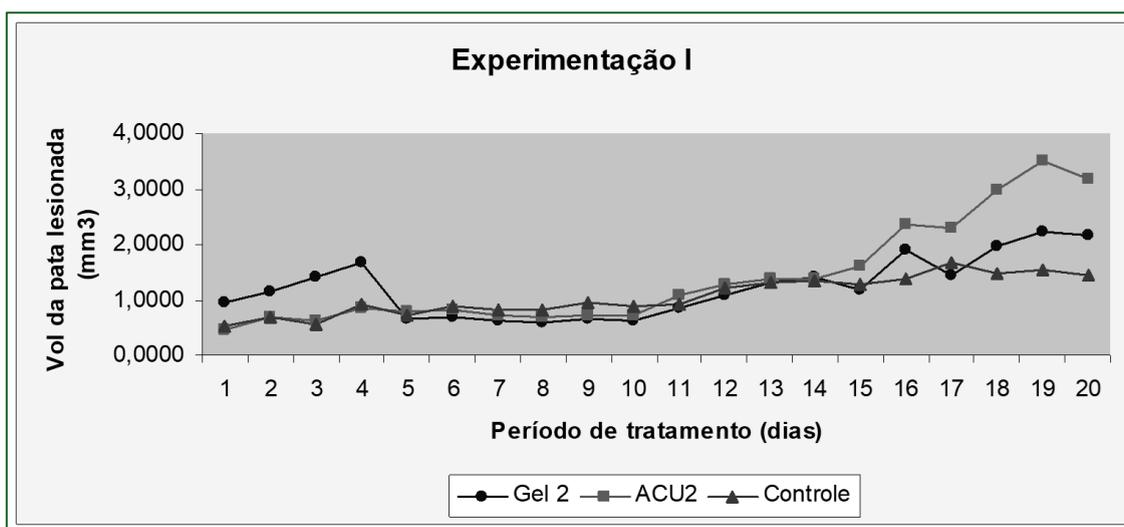
Figura 02. Médias de parasitos por campo das lâminas do experimento II.



De acordo com o teste ANOVA foi possível calcular as médias e observar que houve significância estatística ($p < 0,05$), em que no primeiro experimento p foi equivalente a 0,030. Analisando a figura 03 verificou-se que o primeiro grupo (Gel 02) que recebeu

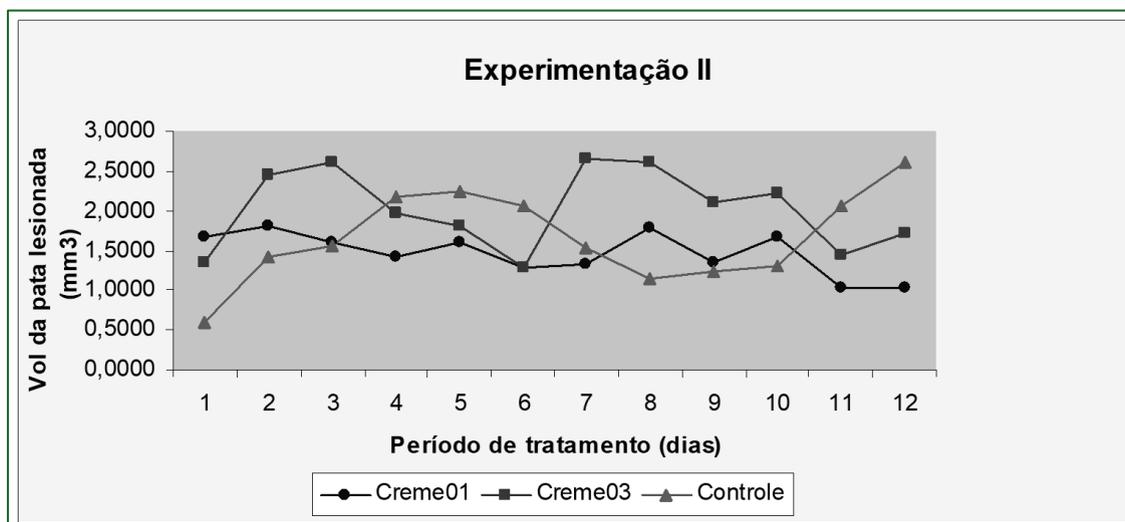
tratamento com formulação I, até o quarto dia as lesões mantiveram-se em crescimento, mas do quinto dia ao décimo houve um controle do crescimento das lesões, porém nos dias consecutivos as lesões obtiveram um crescimento gradativo, havendo certa dissonância ao compará-lo com o grupo controle que demonstrou um crescimento constante até o vigésimo segundo dia de tratamento, porém os dias seguintes houve uma oscilação. O último grupo (ACU 02) que recebeu tratamento com a formulação II obteve um resultado mais significativo, durante os primeiros dez dias, as lesões não cresceram consideravelmente, mas os seguintes dias houve um crescimento constante e exacerbação das lesões.

Figura 03. Variação das médias do volume das lesões em grupo durante o tratamento I.



O experimento II também apresentou significância estatística ($p < 0,05$) o qual o p foi respectivamente a 0,005. Analisando a figura 04 observou-se que o grupo que recebeu tratamento com a formulação - Creme 1 obteve um resultado significativo, em que até o sétimo dia de tratamento as lesões não apresentaram oscilações relevantes, somente no décimo ao último dia de tratamento, pois houve uma redução no tamanho das lesões. Foi possível comparar com o grupo controle, o qual as lesões cresceram gradativamente até o quinto dia, a partir do décimo dia houve um crescimento nas lesões consideravelmente. O último grupo que recebeu tratamento com a formulação - creme 3, obteve um resultado discrepante aos outros grupos, pois até o terceiro dia as lesões tiveram um crescimento contínuo, posteriormente apresentaram uma redução no tamanho das lesões até o sexto dia, em seguida as lesões desenvolveram-se com um tamanho relevante e oscilando durante o resto do tratamento.

Figura 04. Variação das médias do volume das lesões em grupo durante o tratamento II.



Levando em consideração que o Gel 02 contendo extrato do epicarpo de *L. ferrea* no qual possui estudos que demonstram efeito significativo na cicatrização das lesões, como já referenciado em estudos com caprinos (Oliveira *et al.* 2010), o Gel ACU 02 e o creme 1 aplicado na segunda experimentação apresentaram melhor resultado com o menor número de médias de parasitos por campo, sugerimos que estas formulações necessitam ser reformuladas com o intuito de obter uma concentração mais efetiva assim como uma maior eficácia quanto a sua melhor absorção e efetiva morte parasitária.

4. CONCLUSÃO

Apesar dos resultados relevantes, ainda surge à necessidade do aperfeiçoamento de uma formulação contendo uma ou mais substâncias bioativas que venham contribuir para um tratamento mais eficaz e com menores efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- [1] Brasil. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde. 180pp.
- [2] Gontijo, B. & Carvalho, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(1): 71-80.
- [3] Nasser, J.T.; Donalizio, M.R.; Vasconcelos, C.H. 2009. Distribuição espacial de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas, Estado de São Paulo, no período de 1992 a 2003. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(3): 309-314.
- [4] Oliveira, A.F.; Batista, J.S.; Paiva, E.S.; Silva, A.E.; Farias, Y.J.M.D.; Damasceno, C.A.R.; Brito, P.D.; Queiroz, S.A.C.; Rodrigues, C.M.F.; Freitas, C.I.A. 2010. Avaliação da atividade cicatrizante do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. var. *férrea*) em lesões cutâneas de caprinos. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 12(3): 302-310.
- [5] Silva-López, R. E. 2010. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Química Nova, 33: 1541-1543.

CAPÍTULO 14 Formulações tópicas contendo princípios ativos de *Libidibia ferrea* para o tratamento de lesões relacionadas à Leishmaniose tegumentar experimental

Bruno Bezerra Jensen, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antônia Maria Ramos Franco

Resumo: A Leishmaniose Tegumentar é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, de transmissão vetorial e causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esta doença é endêmica nas Américas. Os fármacos de primeira escolha utilizados na terapia da doença são injeções diárias de antimoniais pentavalentes, porém apresentam reações adversas, tais como resistência do parasito e abandono do tratamento por serem medicamentos de administração invasiva. Os produtos naturais obtidos de vegetais apresentam-se como uma alternativa para o tratamento de inúmeras enfermidades. Devido a necessidade da busca de uma terapia mais eficaz, com baixo custo e com menos efeitos colaterais aos pacientes, o presente trabalho objetiva estudar a aplicação de formulações de uso tópico contendo extratos de *Libidibia ferrea* através de ensaios *in vivo*. Foram inoculados no focinho de 30 hamsters (*Mesocricetus auratus*) formas promastigotas infectadas de *L. amazonensis* em fase estacionária. O delineamento experimental consistiu na divisão de quatro grupos que receberam algum tipo de tratamento, como a formulação tópica contendo extrato metanólico de *Libidibia ferrea* (EMX1 e EMX3), com formulação sem ativo (placebo – EMX2) e/ou com aplicações intramuscular de Glucantime® (CONT+). Além de um único grupo com animais que não receberam tratamento (controle negativo – CONT-). As formulações foram aplicadas uma vez ao dia na área da lesão. O volume total das lesões foi aferido e registrado diariamente com paquímetro e a evolução do aspecto clínico foram foto documentadas. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos das lesões foram obtidos para impressão em lâmina, quantificação parasitária por diluição e viabilidade parasitária em meio NNN. Os resultados foram registrados em um banco de dados no programa GraphPad Prism versão 6 e em seguida, analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança. Em todos os grupos de experimentação, ainda foram detectados parasitos viáveis após 25 dias de tratamento, e as lesões mostraram similaridade no grau de parasitas por grama. A continuidade dos estudos com formulações para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea contendo uma ou mais substâncias bioativas podem contribuir como tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; produtos naturais; *Leishmania amazonensis*; Experimentação animal.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, sua transmissão ocorre de forma vetorial por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Dostálova e Volf 2012; Brasil 2017). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.* 2003; Silveira *et al.* 2004; Mota e Miranda 2011).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 90 países, distribuídos nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (Alvar 2012; Brasil 2017). Os fármacos utilizados como terapêutica para o tratamento da LT apresentam uma série de problemas, incluindo resistência do parasito, indução de efeitos colaterais e abandono dos pacientes por serem medicamentos de administração parenteral (Silva-López 2010).

A necessidade de tratamentos com maior eficácia e segurança vem estimulando pesquisas com produtos naturais de plantas com atividade antileishmania, uma vez que os vegetais possuem uma diversidade química de metabólitos secundários estruturalmente únicos. No Brasil, estudos com produtos naturais têm mostrado também o potencial de substâncias e óleos obtidos de espécies encontradas no país. Um dos exemplos de metabólitos secundários com atividade antileishmania foi por meio das benzofenonas preniladas que foram isoladas de *Garcinia brasiliensis* (Pereira *et al.* 2010).

Além disso, trabalhos anteriores do Grupo de pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mostrou inibição do crescimento *in vitro* de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* por meio do teste de uma planta nativa no Brasil, a *Libidibia ferrea* (Cortez 2004; Falcão 2010; Comandolli-Wyrepkowski *et al.* 2017). Diante desses resultados preliminares, sugere-se a continuidade da pesquisa com a realização de outras etapas dos ensaios pré-clínicos.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar em modelo *in vivo*, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*), a atividade de formulações tópicas contendo o extrato metanólico de *Libidibia ferrea* no tratamento da forma cutânea da Leishmaniose. Já que estes achados podem agregar para o aprimoramento do protocolo terapêutico de pacientes diagnosticados com Leishmaniose tegumentar.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. CULTIVO DE LEISHMANIA

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e a 24°C.

2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O modelo biológico experimental para o estudo foram 30 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos (acima de 90 dias), machos e pesando equivalente a 200g. Os animais foram provenientes do Biotério do INPA, e o procedimento para o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do próprio Biotério. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições adequadas a sua manutenção, com dieta e água *ad*

libitum. O projeto foi submetido à comissão de ética dos animais, com o número de protocolo 009/2012.

2.3. PROCEDIMENTOS PARA O TRATAMENTO TÓPICO

Foram inoculados 10^6 mL do parasito na forma promastigota de *L. amazonensis* recém-isoladas em cultivo de amastigotas provenientes de lesões de hamsters, aplicados no focinho para a experimentação. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas.

O delineamento experimental foi por meio da separação de cinco grupos experimentais (recebendo algum tipo de tratamento ou não) com seis animais por grupo, conforme:

- EMX1: tratados com formulação tópica contendo extrato de *Libidibia ferrea*, via tópica;
- EMX2: tratados com formulação tópica sem substância ativa (placebo);
- EMX3: tratados com formulação tópica contendo extrato de *Libidibia ferrea*, via tópica e associação com o Glucantime®, via intramuscular;
- CONT+: tratados com Glucantime® pela via intramuscular (IM);
- CONT-: ausentes de tratamento durante a experimentação.

As formulações foram aplicadas uma vez ao dia, 50 mg/aplicação/ animal, na área e proximidades da lesão. A área total das lesões foi aferida diariamente com um paquímetro e registradas. O aspecto morfológico das lesões foi analisado e acompanhada a sua evolução diária, sendo registrado em foto documento.

Os animais foram eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoina sódica), de acordo como indicado pela comissão de ética animal do INPA.

Após a eutanásia dos animais, as lesões foram tricotomizadas e os segmentos da lesão no eixo longitudinal foram seccionados com bisturi. Os segmentos de tecido foram transferidos para solução salina + Gentamicina® e criopreservação; solução de glutaraldeído 3,0% em tampão fosfato (para análise em Microscopia eletrônica de transmissão/MET); solução salina estéril e posterior inoculação em tubos com meio de cultura NNN (Novy & McNeal 1904; Nicolle 1908) e segmento para impressão em lâmina.

Os tubos de cultura com meio NNN foram incubados em estufa a 25 °C durante 7 dias, e após esse período foi investigada a presença de promastigotas viáveis nos meios, utilizando microscópio óptico.

As lâminas contendo impressão das lesões foram fixadas com metanol (PA) durante um minuto e em seguida, coradas durante duas horas utilizando o corante Giemsa. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente e então secas a temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica para verificar a presença de amastigotas em macrófagos e retirou-se uma média dessa relação entre número de parasitos no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) pelo seu número encontrado nos vinte e cinco campos analisados, para a realização da avaliação de carga parasitária dos grupos dessa experimentação através do uso do Microscópio óptico numa resolução 1000x.

Para a quantificação parasitária em meio fase líquido de crescimento, foi utilizado o método de Buffet *et al.* (1995) modificado, no qual os segmentos da lesão, após a remoção, pesagem e homogeneização em meio Schneider suplementado com 20% SFBi, foi diluído serialmente em condições estéreis, em triplicata, em placas de 96 poços contendo 225 μ L de meio de cultura. Após um período de sete dias de incubação a 25 °C, as placas foram examinadas em microscópio invertido e realizada a titulação final correspondente à última diluição no poço que apresentasse ao menos uma forma parasitária. O número de parasitos por grama foi calculado do seguinte modo: Número de parasitos/g = média da titulação positiva recíproca de cada triplicata/ peso da lesão.

Os dados registrados (tamanho da lesão por animal/dia e a quantidade de amastigotas contados por campo nas lâminas coradas com Giemsa) provenientes dos resultados das aferições das lesões foram inseridos em um banco de dados previamente elaborado no programa *GraphPadPrism* versão 6 e em seguida, analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança para verificar a diferença entre os grupos de tratamento para estes dois parâmetros analisados.

As formulações foram preparadas segundo metodologia confidencial, vinculadas ao projeto parceria e acordo Internacional entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e a Universidade de Helsinki, pelo programa VAIKUTUS – FP7 – PEOPLE – IRSES – 295262.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 30 dias da inoculação de promastigotas de *L. amazonensis*, os hamster apresentaram lesão característica de leishmaniose na forma cutânea na região do focinho, mostrando um aumento no volume da região.

Habitualmente são utilizados camundongos ou hamsters jovens e pré-púberes em ensaios biológicos *in vivo* para a Leishmaniose, pois estes são mais suscetíveis a infecção (Lima 2008). Quanto a inoculação esta pode ser realizada em diferentes partes do corpo como, na base da cauda por via intradérmica (Rodrigues 2012), no coxim plantar (Eissa *et al.* 2011) ou até mesmo no focinho, local definido para os experimentos do presente projeto.

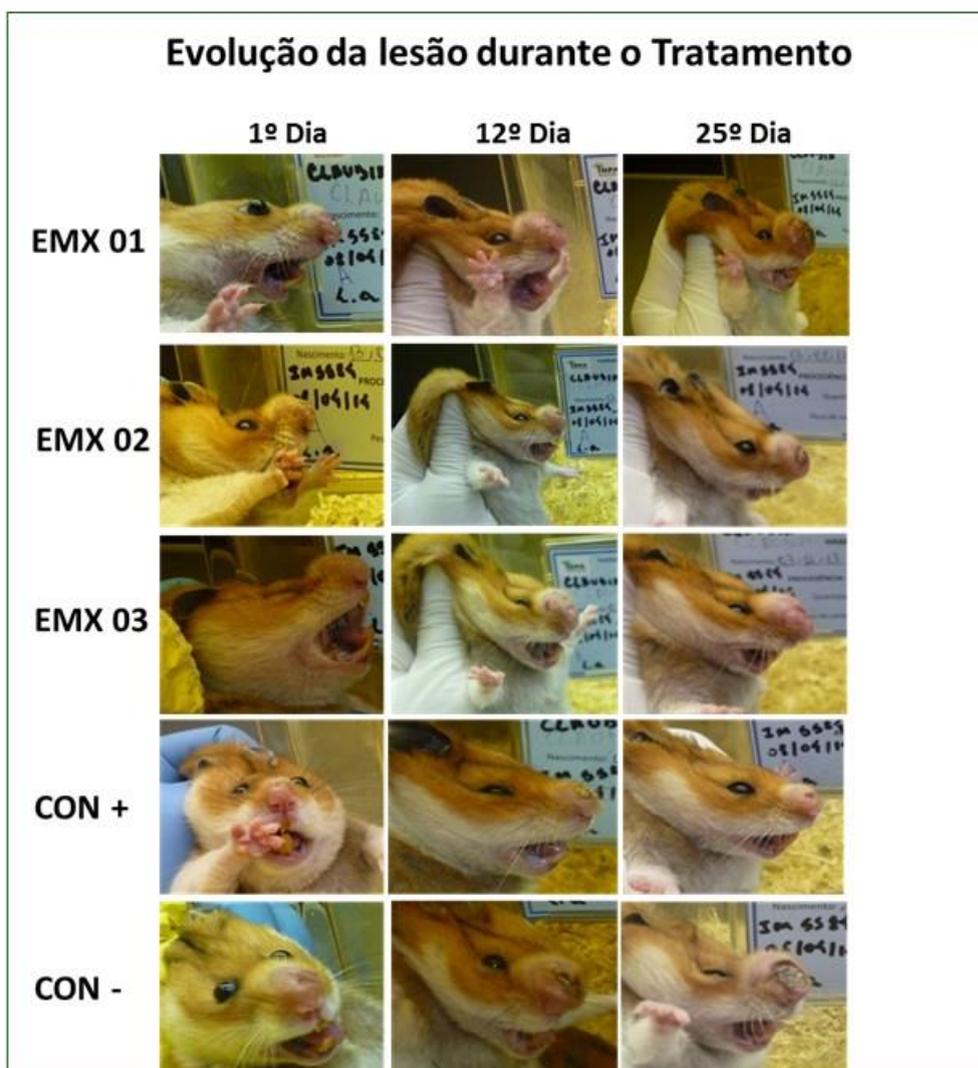
Segundo Suman e Nichi (2011), através dos modelos animais é possível verificar a atividade de drogas em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção e para dar uma indicação inicial da toxicidade, embora nenhum reproduza com precisão o que acontece nos humanos.

Após os vinte e cinco dias de tratamento pode-se avaliar o aspecto (macroscópico) clínico das lesões dos hamsters de todos os grupos, e determinar uma comparação entre eles. Os animais do grupo EMX1 apresentaram uma lesão de forma nodular no início (Figura 1). Durante e após o tratamento e apresentou uma crosta na área da lesão e não foi observada uma redução da lesão, somente controle na evolução clínica. Os animais do grupo EMX2 também apresentaram lesões nodulares no início do tratamento. Durante e após o tratamento apresentaram na lesão uma úlcera associada com infecção secundária.

Os animais do grupo EMX3 apresentaram lesões nodulares no início, durante e após o tratamento, mas não houve uma redução no tamanho das lesões, somente controle dos tamanhos delas assim como nos animais dos grupos EMX1 e CONT+. Os animais do grupo controle positivo (CONT+) apresentaram lesões nodulares no início, durante e após

o tratamento, mas não obtiveram redução no tamanho das lesões assim como os outros grupos supracitados.

Figura 1. Evolução clínica macroscópica das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em diferentes dias do estudo do tratamento tópico. EMX1, EMX2 e EMX3 formulações utilizadas em sigilo científico; CON+ = tratamento com Glucantime®; CON- = grupo com ausência de tratamento.



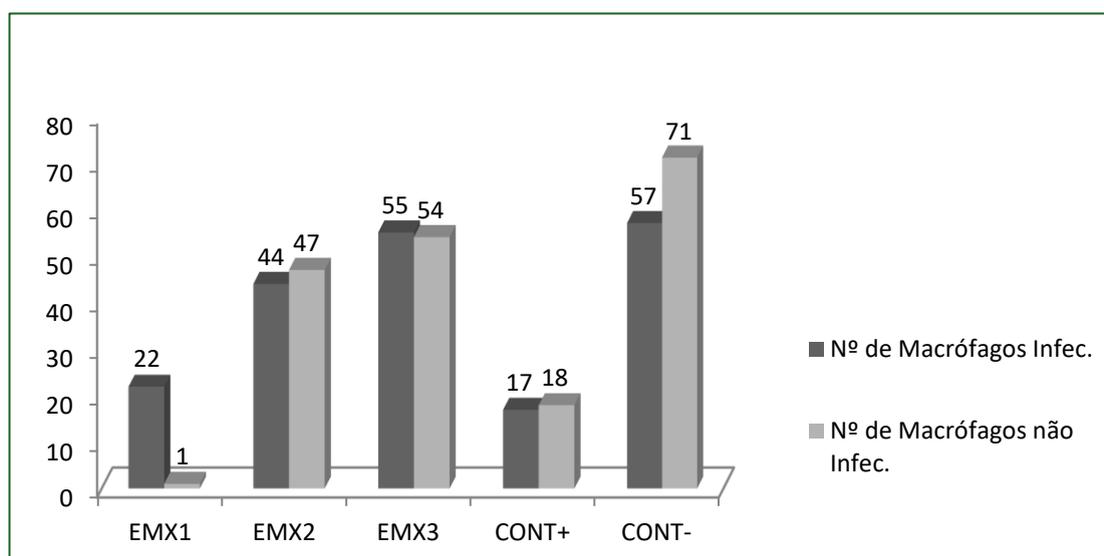
O resultado apresentado por este último grupo foi bastante interessante, pois esperava-se que por ser um dos tratamentos preconizados pelo Ministério da Saúde para pacientes com Leishmaniose tegumentar, mostra-se um resultado mais eficaz (Brasil 2017). Os resultados observados podem ser explicados devido à escolha do modelo experimental, pois sabe-se que os *Mesocricetus auratus* são altamente suscetíveis à proliferação parasitária e inclusive são utilizados como meio de cultivo vivos (Reithinger *et al.* 2007).

E por fim, os animais do grupo controle negativo (CONT-) apresentaram lesões nodulares no início do tratamento. Durante e após o tratamento as lesões se agravaram e apresentaram características ulcerosas e com infecções secundárias, caracterizando-se clinicamente como o grupo de lesões mais graves.

Os fragmentos das lesões provenientes dos animais de todos os grupos que foram semeados em meio NNN para verificação de parasitas viáveis com grau de infectividade. Todos os grupos apresentaram parasitas de morfologia fusiformes, parasitas viáveis em abundância, no entanto somente nos grupos EMX2, CON+ e CON- apresentaram rosetas (aglomeração de parasitas em formação de círculo).

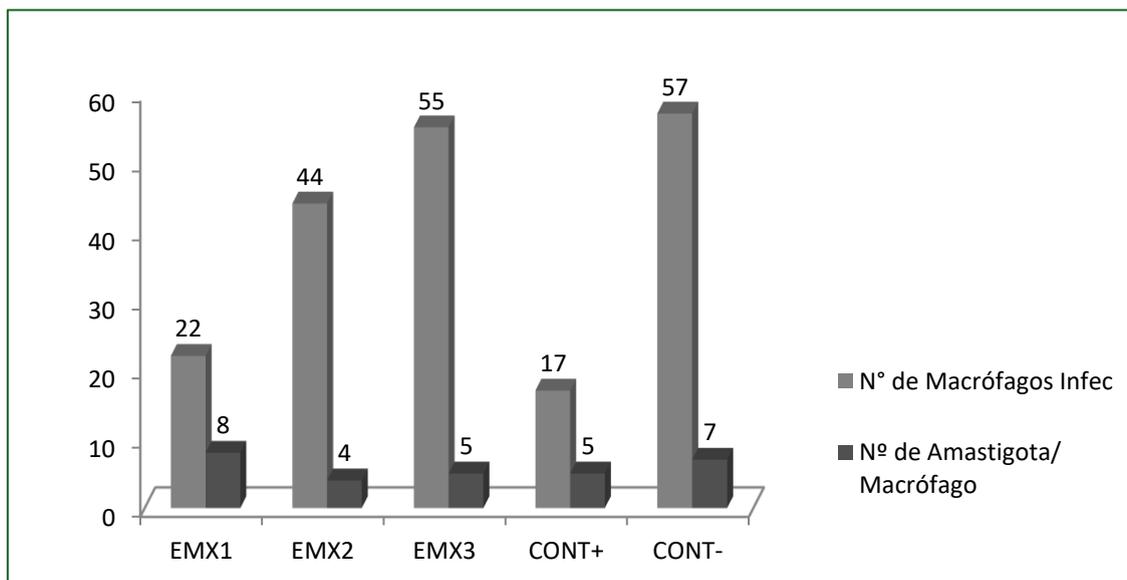
Os resultados das impressões em lâminas foram utilizados para comparar o número de macrófagos infectados com o número de macrófagos não infectados dos vinte e cinco campos lidos através de Microscopia óptica. Pode-se observar que o grupo EMX1 obteve-se um bom resultado comparando aos demais grupos, no entanto, o grupo CON+ demonstrou melhor resultado como esperado, mesmo com sua eficácia moderada (Figura 2).

Figura 2. Relação de Macrófagos Infectados com os não infectados presentes nas lesões, analisadas pelo método de impressão em lâminas e coradas com Giemsa.



Após a análise de macrófagos infectados e não infectados, foi possível calcular a média de amastigotas totais interiorizados em macrófagos pelo próprio número dessas células encontradas nos campos observados nas lâminas. Com o gráfico elaborado através desses valores, pode-se observar que a menor carga parasitária é do grupo CON+ e em seguida o grupo EMX1 ao comparar com o grupo CON-, mesmo não alcançando uma eficácia terapêutica esperada (Figura 3).

Figura 3. Relação da média de parasitas no interior dos macrófagos pelo número de macrófagos presentes nos campos analisadas pelo método de impressão em lâminas e coradas com Giemsa.

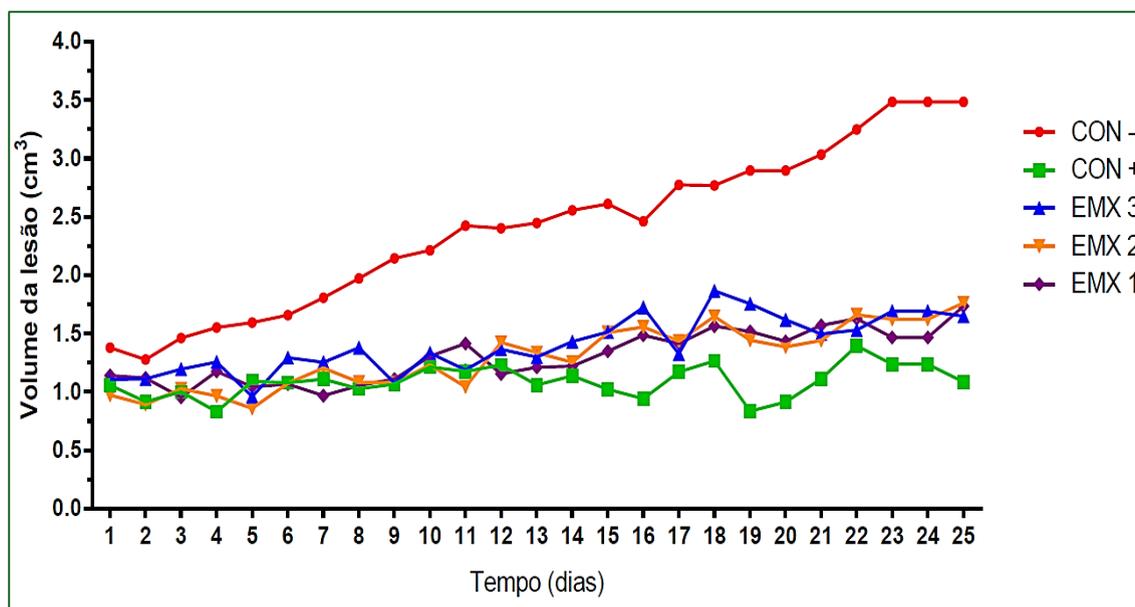


Os dados da quantificação parasitária em meio líquido por diluição seriada demonstraram um crescimento de amastigotas viáveis até a última diluição, o que resultou em um grau de infecção maior $1,0 \times 10^5$ para todos os tecidos. Modificações metodológicas de Buffet *et al.* (1995) indicam a possibilidade da análise da determinação de crescimento após três dias de incubação, no entanto o período de incubação utilizado para este experimento foi de sete dias, demonstrando insuficiente para um resultado mais fidedigno para os resultados do presente projeto. Segundo Campos (2008), o período de incubação foi de exatamente três dias (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação da carga parasitária dos tecidos com lesão (focinho) pelo método de diluição seriada em placas de 96 poços.

Grupo	média de parasitas/grama em cultura	grau de infecção - parasitas x diluição/grama de tecido de lesão
EMX1	$1,46 \times 10^5$	$> 1,0 \times 10^5$
EMX2	$1,06 \times 10^5$	$> 1,0 \times 10^5$
EMX3	$1,08 \times 10^5$	$> 1,0 \times 10^5$
CONT (+)	$1,05 \times 10^5$	$> 1,0 \times 10^5$
CONT (-)	$1,05 \times 10^5$	$> 1,0 \times 10^5$

Figura 4. Evolução clínica do volume da lesão em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* durante o tratamento com as formulações tópicas e Glucantime®.



A aferição diária dos volumes dos focinhos, registradas no decorrer do tratamento dos animais permitiu calcular as médias dos volumes das lesões e consequente avaliação da significância estatística. Pode-se observar que a partir do 13º dia o grupo CON+ demonstrou significância estatística. O grupo EMX3 apresentou significância estatística a partir do 17º dia. O grupo EMX2 apresentou significância estatística a partir do 19º dia. O grupo EMX1 apresentou significância estatística a partir do 20º dia, segundo o teste Anova e Tukey com parâmetro de $p < 0,05$ referente ao grupo CON- (ou seja, o grupo de animais sem tratamento) (Figura 4).

4. CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados obtidos da avaliação dos tratamentos com a formulação contendo extrato de *Libidibia ferrea* (via tópica) e com o uso do Glucantime® (via IM), foram encontradas diferenças no aspecto clínico entre os grupos tratados em relação ao grupo controle, contudo, a análise parasitológica mostrou a presença de uma grande quantidade de parasitas viáveis. Estes fatos pontuam a necessidade da continuidade dos estudos com as formulações tópicas contendo princípios ativos, com maior tempo de experimentação e frações mais purificadas do extrato de *L. ferrea*, já que não houve diferença estatística entre os grupos que receberam o tratamento tópico em comparação com os que receberam tratamento parenteral. Além da inclusão de outros parâmetros farmacológicos a serem estudados. Diante disso é de extrema necessidade o aperfeiçoamento de uma formulação contendo uma ou mais substâncias bioativas que venham contribuir para um tratamento mais eficaz e com redução dos efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- [1] Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; DenBoer, M. 2012. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7: 35671.
- [2] Brasil. 2017. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 191pp.
- [3] Buffet, P.A.; Sulahian, A.; Garin, Y.J.F.; Nassar, N.; Derouin, F. 1995. Culture Microtitration: a sensitive method for quantifying Leishmania infantum in tissues of infected mice. *Journal American Society for Microbiology*, 39: 2167-2168.
- [4] Comandoli-Wyrepkowski, C.D.; Jensen, B.B.; Grafova, I.; Santos, P.A.D.; Barros, M.C.; Soares, F.V.; Barcellos, J.F.M.; Silva, A.F.; Grafov, A.; Franco, A.M.R. 2017. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. *Acta Amazônica*. 47 (4): 331-340.
- [5] Cortez, A. C. 2004. Avaliação da atividade in vitro dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Libidibiaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 86 pp.
- [6] Dostálova, A.; Volf, P. 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasite Vector*. 5 (1): 276.
- [7] Eissa, M.M.; AMER, E.I.; EL SAWY, S.M.F. 2011. Leishmania major: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 128: 382-390.
- [8] Falcão, N. M. S. 2010. Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Libidibia ferrea* Martius (Fabales: Libidibiaceae). Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 83pp.
- [9] Gontijo, B. & CARVALHO, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.
- [10] Lima, L.F.A. 2008. A Influência do Gênero e da Infecção materna na resposta à *Leishmania braziliensis* em filhotes de hamster. Dissertação de Mestrado em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 52 pp.
- [11] Mota, L.A.A.; Miranda, R.R. 2011. Dermatologic and otorhinolaryngologic manifestations in Leishmaniasis. *International archives of Otorhinolaryngology*. 5(3): 376-381.
- [12] Neves, D.; Melo, A.; Linardi, P.; Victor, R. 2005. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo. Atheneu, 2005. 47 pp.
- [13] Nicolle, G.L. 1908. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Acad. Sci.*, 146: 842-843.
- [14] Novy, F.G.; MacNeal, W.J. 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Infect. Dis.* 1: 1-30.
- [15] Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7(1): 581-596.
- [16] Rodrigues, L.F. 2012. Avaliação da atividade in vivo do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, 91p.
- [17] Silva-López, R.E. 2010. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, 33: 1541-1543.
- [18] SILVERA, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99(3): 239-251.
- [19] Suman, G. & Nishi. 2011. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug Discovery. *Indian J Med. Res.*, 133: 27-39.

CAPÍTULO 15 Estudo *in vivo* de novas formulações contendo drogas padrão contra infecção causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Camila Silva Santos, Fabiane Veloso Soares, Bruno Bezerra Jensen, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: A LTA é considerada uma doença negligenciada, pois acomete populações com baixo nível socioeconômico, com pouca força política e ainda, é considerada uma doença pouco atraente para a indústria farmacêutica. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade biológica *in vivo* de formulações contendo drogas padrão para o tratamento das leishmanioses, através de duas vias de administração, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal, verificando a evolução morfológica das lesões causadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, bem como a viabilidade dos parasitas após tratamento. Diante dos resultados observados, pode-se constatar de forma geral que não houve total eficácia nas formulações testadas com o protocolo utilizado no tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*. Quanto à viabilidade parasitária, foi encontrado parasitismo. As terapêuticas disponíveis para o tratamento da leishmaniose humana são ainda substancialmente limitadas. São necessárias novas pesquisas experimentais visando verificar a ação em outras espécies de *Leishmania*. Diante dos resultados observados, sugerimos tempo de tratamento mais prolongado e contínuo com o intuito de obter uma maior eficácia e efetiva morte parasitária após tratamento.

Palavras-chave: Doença negligenciada, tratamento experimental, novas terapias.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas zoonóticas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por dípteros da família Phlebotomidae, constituindo um grande problema de saúde pública mundial, de tal maneira que estão incluídas entre as doenças do *Program of Tropical Diseases Research* e classificadas como uma das seis doenças endêmicas mais importantes do mundo (Hotez *et al.* 2007), estando presente em 98 países e em cinco continentes (Alvar 2012).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta manifestação polimórfica de pele e mucosas, causada por diversas espécies de *Leishmania*, sendo as mais frequentes no Brasil *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Murback *et al.* 2011).

No estado do Amazonas predomina a forma cutânea, principalmente na região metropolitana de Manaus, onde 481 novos casos da doença foram notificados no ano de 2013 e a transmissão ocorreu principalmente nos municípios de Rio Preto da Eva (136 casos), Presidente Figueiredo (107 casos), Itacoatiara (52 casos) e Manacapuru (25 casos) [SINAN/SVS/MS, 2014]. No município de Manaus, uma das espécies predominante é a *L. (V.) guyanensis* (Naiff *et al.* 1999; Chrusciak 2009).

A LTA é considerada uma doença negligenciada com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento e controle, e por acometer populações com baixo nível socioeconômico, força política e ainda por ser uma doença pouco atraente para a indústria farmacêutica (Alvar *et al.* 2006; Penna *et al.* 2011).

Os antimoniais pentavalentes permanecem como base terapêutica para o tratamento das leishmanioses há mais de 50 anos (Lima *et al.* 2007). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como tratamento de primeira escolha 10 a 20 mg/kg/dia de antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) intravenoso ou intramuscular, por um período de 20 dias, no tratamento das formas cutâneas localizadas e disseminadas. Se não houver cicatrização completa três meses após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido por um período de 30 dias. Persistindo o insucesso terapêutico, deve ser utilizada uma das drogas de segunda escolha, como a Pentamidina e Anfotericina B (Brasil 2010).

Apesar da sua eficácia os medicamentos existentes na atualidade para o tratamento dessa endemia causam com frequência efeitos adversos (Penna *et al.* 2011), além disso o uso parenteral (intramuscular ou endovenoso), o tempo de cura prolongado e o custo elevado do tratamento, são fatores limitantes para o terapêutica adequada dos casos de LTA. É importante destacar que a maioria dos casos ocorre em áreas de difícil acesso, nas zonas rurais, o que dificulta a aplicação parenteral da droga e o monitoramento de seus efeitos colaterais, exigindo vigilância rigorosa em alguns casos (Basano e Camargo 2004).

Vale ressaltar que o tratamento da LTA com as drogas disponíveis atualmente representa um obstáculo à condução clínica adequada dos casos da doença, levando à redução, interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes do seu término (Demicheli *et al.* 2005). Consequentemente, a quimioterapia da LTA apresenta várias limitações, tornando urgente a necessidade de pesquisar drogas alternativas, esquemas mais curtos e baratos que facilitem o tratamento da doença (De Paula *et al.* 2003).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial terapêutico *in vivo* de formulações contendo drogas padrão já utilizadas para o tratamento da leishmaniose,

administrado por via tópica e intramuscular em hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal, verificando a evolução morfológica das lesões causadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

O modelo biológico experimental para o estudo foram 24 hamsters (*M. auratus*) adultos (acima de 90 dias), machos e pesando equivalente a 200g. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do próprio Biotério/INPA. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições adequadas a sua manutenção, com dieta e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais – CEUA/ INPA, possuindo o número de protocolo 009/2012.

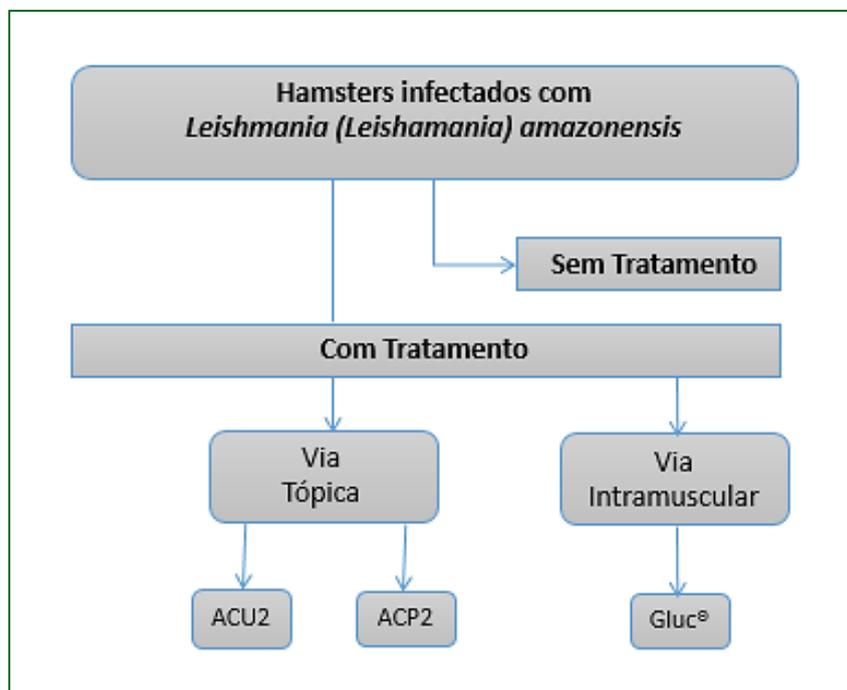
2.2. INOCULAÇÃO

Foram inoculados 0,1 mL de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) recém-isoladas em cultivo de amastigotas provenientes de lesões de hamsters, aplicados no focinho para experimentação. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas.

2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento para a avaliação biológica foi determinado em experimentação, o qual conteve 3 grupos com 4 animais cada, recebendo tratamento e um grupo controle negativo com os 4 animais (Figura 1).

Figura 1. Delineamento Experimental com substâncias utilizadas ACP2 e ACU2 (em sigilo científico) e Gluc = Glucantime®.



2.4. FORMULAÇÕES

Foram utilizadas duas formulações (ACP2, ACU2) em sigilo por estarem em processo de patente (*Brazilian Patent BR 10 2013 029618 0*). Também foi utilizado o antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), onde cada ampola de 5mL contém 405 mg de antimônio pentavalente, correspondendo a 81mg/mL/Sb⁵.

2.5. TRATAMENTO E AFERIÇÃO DO ASPECTO MORFOLÓGICO DAS LESÕES

As formulações foram aplicadas na lesão uma vez ao dia/animal durante 11 dias consecutivos e os após esse período os animais apenas foram observados por mais 19 dias. Abaixo quadro do protocolo de tratamento utilizado.

Formulação	Volume	Via de administração
ACU 2	50mg	Tópica
ACP 2	50mg	Tópica
Glucantime®	20mg/kg/dia (0,15mL)	Intramuscular (IM)

A área total das lesões (volume, altura e comprimento) foi aferida e registrada diariamente com auxílio de paquímetro. O aspecto morfológico das lesões foi analisado e acompanhado diariamente, sendo fotodocumentado. Estes animais foram organizados conforme as recomendações do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

2.6. EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoina sódica), de acordo como indicado pelo Comitê de Ética de Pesquisas com Uso de Animal do INPA.

2.7. VIABILIDADE PARASITÁRIA

Após tratamento, foi realizada a eutanásia (de acordo com as normas de uso animal) de cada um dos animais e fragmentos das lesões e outros órgãos (fígado, baço e rim) semeados em meio de cultura NNN, bem como preparação de impressão em lâminas coradas com Panótico (Panótico Rápido Laborclin®).

Os tubos de cultura com meio NNN foram incubados em estufa a 25 °C durante 7 dias, e após esse período foi investigada a presença de promastigotas viáveis nos meios, utilizando microscópio óptico. As lâminas coradas foram analisadas em microscopia óptica para verificar a presença de amastigotas em macrófagos.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

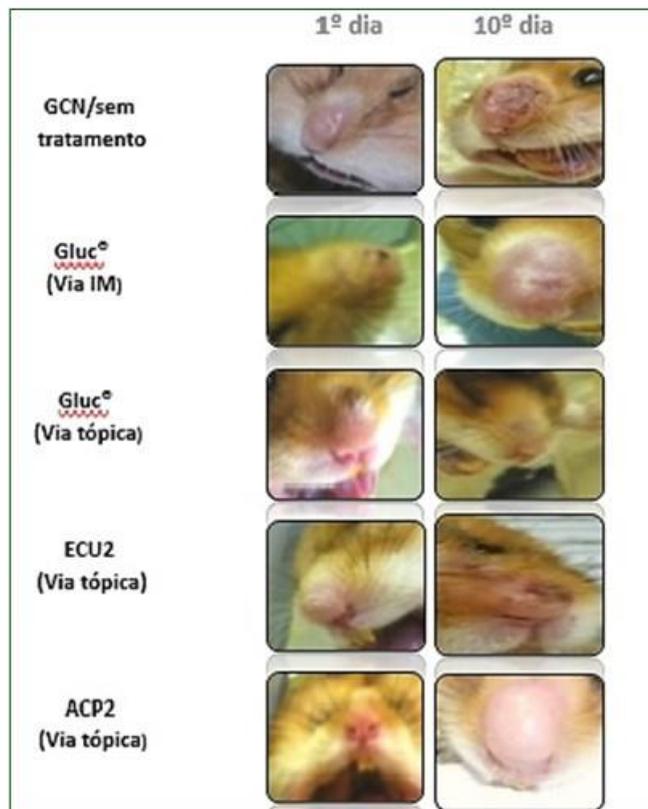
Os dados foram analisados estatisticamente através de teste Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, utilizando limite de 95% de confiança para verificar a diferença entre os grupos de tratamento. Os gráficos foram plotados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ASPECTOS CLÍNICOS DA LESÃO

Após 30 dias da inoculação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os hamsters apresentaram lesão característica de leishmaniose cutânea (nódulo dérmico) na região do focinho. Na Figura 2 observamos a evolução das lesões durante o tratamento.

Figura 2. Aspectos clínicos da lesão. Substâncias utilizadas em sigilo científico (ECU2, ACP2,) e Gluc = Glucantime®. Vias de administração: vias tópica e intramuscular.



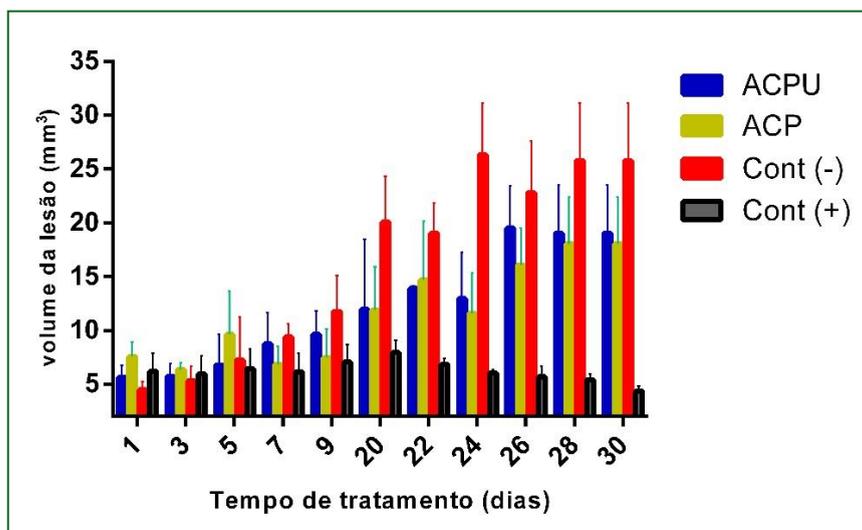
3.2. EFICÁCIA DO TRATAMENTO

Ao analisar a figura 3, observamos que não houve redução significativa no tamanho das lesões cutâneas com as formulações ACP2 e ACU2 em comparação aos grupos controles ($p > 0,05$).

Estudos relatam que a via de administração do medicamento e o prolongamento da terapêutica, podem apresentar melhora da eficácia do tratamento. Uma nova abordagem terapêutica com o uso do dispositivo de tatuagem para melhor direcionar a entrega da droga, tem sido utilizada no tratamento experimental da doença, demonstrando eficácia *in vivo* em 10 dias de tratamento, com regressão completa das lesões cutâneas por volta do 28º dia (Shio *et al.* 2014).

Como dito e já citado em outros estudos, algumas drogas administradas de forma tópica ou por via oral tem apresentado resultados favoráveis, embora sejam necessários estudos clínicos adicionais com novos protocolos de tratamento que favoreçam conhecimento real da eficácia. Como a Miltefosine, utilizado por via oral em doses de 133 a 150 mg ao dia por 4 semanas, que obteve índices de cura de 10 e 89%, respectivamente (Jho *et al.* 1999).

Figura 3. Evolução do tamanho das lesões cutâneas de hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratados durante 11 dias por vias intramuscular (Cont +) e tópica (ACPU e ACP), e grupo sem tratamento (Cont -), e acompanhados por 19 dias após o tratamento.



A considerável oscilação observada no tamanho das lesões leva-nos a crer que o protocolo utilizado como período de tratamento (apenas 11 dias de tratamento) pode ter influenciado no crescimento ou redução das lesões cutâneas de todos os grupos tratados. Experimentos realizados em animais, pelas mais diversas vias de administração e com período de tratamento contínuo e prolongados relatam resultados estatisticamente significantes (Galvão *et al.* 2000; Santos *et al.* 2011; Shio *et al.* 2014).

3.3. VIABILIDADE PARASITÁRIA

Os resultados de culturas e impressão em lâminas de todos os grupos das experimentações quando comparados entre si demonstram o mesmo padrão de resposta. Por exemplo, o fragmento de pele (lesão) apresentou parasitismo persistente em cultura, sendo confirmado com a presença de amastigotas em lâmina corada, ou seja, em termos de resultados positivos e negativos observou-se que o diagnóstico através das impressões em lâmina foi tão sensível quanto à cultura.

4. CONCLUSÃO

As terapêuticas disponíveis para o tratamento da leishmaniose humana são ainda substancialmente limitadas. Diante dos resultados observados, pode-se constatar de forma geral que não houve total eficácia nas formulações testadas com o protocolo utilizado no tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*. Brevemente será realizada análise histológica e microscopia eletrônica de transmissão dos fragmentos de tecidos já reservados. São necessárias novas pesquisas experimentais visando verificar a ação em outras espécies de *Leishmania* spp. e tempo mais prolongado de tratamento.

REFERÊNCIAS

- [1] Alexander, J. 1988. Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. *Parasitology*, 96: 297–302.
- [2] Almeida, M.C, Cuba-Cuba, C.A., Moraes, M.A., Miles, M.A. 1996. Dissemination of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *J Comp Pathol*, 115: 311-316.
- [3] Alvar, J.; Velez, I.D; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7: 35671.
- [4] Basano, S.A; Camargo, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 7: 328.
- [5] Buffet, P.A; Sulahian, A; Garin, Y.J; Nassar, N; Perouin, F, 1995. Culture Microtitration: A sensitive method for quantifying *Leishmania infatum* in tissues of infected mice. *Antimicrobial Agents Chemother*, 39: 2167-2168.
- [6] Brasil. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- [7] Chrusciak, T. A. 2009. Pesquisa clínica para avaliar a eficácia e segurança da miltefosina oral em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania guyanensis*, comparada ao tratamento com antimonial pentavalente. Tese Universidade do Estado do Amazonas/Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. 132p.
- [8] De Paula C.D.R.; Sampaio J.H.D.; Cardoso, D.R.; Sampaio R.N.R. 2003. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamida administrada em três doses durante uma semana e de N-metilglucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Uberaba, São Paulo, 3: 36.
- [9] Filho, A.V.C et. al. 2008. Estudo comparativo entre Mitelfosine oral e antimonial de N-metilglucamina parenteral no tratamento de leishmaniose experimental causada por *L. amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(4): 424-27.
- [10] Hotez, P.J; Molyneux, D.H; Fenwick, A.; Kumaresan, J. Control of neglected tropical diseases. *N England J Med*. 6;357(10): 1018-27.
- [11] Murbach, N.D.N., et al. 2011. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 86 (1): 55-63.
- [12] Naiff M.F, Cupolillo E., Naiff R.D, Momen H, Barret T.V, Grimaldi Jr. G. 1999. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32: 243.
- [13] Penna, G.O.; et al. 2011. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 86: 5: 865-877.
- [14] Rey J.A; Travi B.L; Valencia A.Z. Saravia N.G. 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg*. 43:623-631.
- [15] SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2014.saude.gov.br/sinanweb>. Acesso em 30/09/2022.
- [16] Shio, M. et al. 2013. A Drug Delivery by Tattooing to Treat Cutaneous Leishmaniasis. *Nature*, 4: 4156.
- [17] Yépez, J. et al. 1999. Effect of intralesional treatment with Lidocaine and Glucantime in hamsters infected with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Bol. Dir. Malariol. Saneam. Ambient.*, 39(1): 10-20.

Fracionamento e Purificação dos metabólitos secundários do extrato de *Libidibia ferrea* e atividade antileishmania

Caio Coutinho de Souza, Bruno Bezerra Jensen, Maria da Paz Lima, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, Richaelly Pinheiro dos Santos, Francimeire Gomes Pinheiro, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Erika Oliveira da Silva, Antonia Maria Ramos Franco

Resumo: As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas com uma ampla distribuição mundial. Tal enfermidade é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença negligenciada e questão de saúde pública. A farmacoterapia preconizada para o seu tratamento apresenta problemas graves relacionados ao seu efeito tóxico. Em virtude disso, é necessária a busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, uma espécie vegetal que apresenta uma gama de atividades farmacológicas é a *Libidibia ferrea*. Já são conhecidas inúmeras propriedades terapêuticas e atividade antileishmania através de testes *in vitro* e *in vivo* com a Fração Diclorometano. O objetivo deste estudo foi realizar o fracionamento e purificação da fase mais ativa do extrato MeOH de *Libidibia ferrea*, analisar seu perfil químico e avaliar a atividade antileishmania. Para tanto, preparou-se extratos MeOH do epicarpo, foi feita partição líquido-líquido com diferentes sistemas, DCM 1, DCM 2 e AcOEt. Houve análises de espectro de ¹H, ensaio biológico *in vitro* contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e fracionamento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Os resultados denotaram que o sistema DCM 1 apresentou um maior rendimento, com 0,58%. Os espectros de ¹H indicaram que o sistema DCM 1 teve uma maior intensidades de sinais que sugerem possível presença de compostos glicosilados. Foram obtidas 18 frações através do fracionamento cromatográfico por CCD. Tanto DCM 1 e DCM 2 apresentaram atividade antileishmania após 48 horas de incubação. No entanto, DCM 1 devido as análises espectrométricas foi o sistema mais promissor e ainda se encontra sobre processo de purificação.

Palavras-chave: Produtos naturais, ensaio *in vitro*, Doença tropical negligenciada, tratamento alternativo.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas que apresentam diferentes manifestações clínico-epidemiológicas e ampla distribuição mundial (Rodrigues 2012). É uma doença causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* sp, transmitida aos humanos através da picada da fêmea do flebotomíneo, também conhecido como mosquito palha (Camargos 2013). Tal enfermidade é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença negligenciada e questão de saúde pública (Rocha 2012).

Com relação à farmacoterapia preconizada pelo Ministério da Saúde para essa enfermidade, problemas graves relacionados ao efeito tóxico do tratamento convencional podem comprometer seriamente órgãos vitais. Portadores de cardiopatias são contraindicados a fazer o uso do antimonial pentavalente (Glucantime®), pacientes com insuficiência renal correm risco ao se tratar com anfotericina B, e ainda a pentamidina (Pentacarinat®) é contraindicada no caso de gestação e insuficiência hepática (Brasil 2017).

Além desse esquema de tratamento por definição de ordem de terapia, existe também a relação por espécies de *Leishmania* circulantes. Em casos de pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*, recomenda-se o Glucantime® como terapia de primeira escolha, já aqueles pacientes oriundos de áreas onde há predomínio de *Leishmania guyanensis*, a pentamidina é indicada como primeira escolha, enquanto que a anfotericina B torna-se segunda escolha no tratamento (Brasil 2017).

Em virtude das mais variadas reações adversas e devido ao longo tempo de tratamento, surge à necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas mais baratas e que propiciem um melhor cenário da situação clínica e epidemiológica. Uma dessas alternativas é o uso de plantas medicinais que apresentam propriedades terapêuticas e que são utilizadas pelo homem desde os primórdios da humanidade para os mais diversos fins alimentícios e medicinais (Hard *et al.* 2012).

Uma espécie vegetal que apresenta uma gama de atividades farmacológicas é a *Libidibia ferrea*, popularmente conhecida como “Jucá” ou “pau-ferro”, em estudos anteriores demonstram um grande interesse terapêutico pelo fato desta espécie apresentar considerável potencial biológico (Ferreira e Soares 2015). Já são conhecidas as atividades antioxidante e gastroprotetora (Rocha *et al.* 2016), potencial neuroprotetor (Cirineu *et al.* 2017), uso no tratamento de feridas, contusões, anti-diarréicos, anticatarrais e agente cicatrizante (Costa *et al.* 2016), agente hipoglicemiante (Vasconcelos *et al.* 2011) e anti-inflamatório (Carvalho *et al.* 1996).

Os trabalhos de Cortez (2004) e Falcão (2010) foram pioneiros na avaliação da inibição do crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* frente aos extratos obtidos de *Libidibia ferrea*. Assim como, o trabalho de Comandolli-Wyrepkowski (2015), que realizou testes biológicos *in vitro* com as frações Hexânica, Diclorometânica (DCM), Acetato de etila e n-butanólica, onde a fração DCM apresentou um melhor resultado antileishmania contra as formas das espécies supracitadas de *Leishmania* e em seguida o desenvolvimento de uma formulação para a aplicação em animais de experimentação.

O estudo recente de Jensen (2017), corroborou com esses resultados da ação contra o parasita da espécie *L. amazonensis* a partir da avaliação da atividade da fração

diclorometano de *Libidibia ferrea* através de ensaio biológico *in vivo*. Foi possível observar que os animais tratados com a formulação tópica com essa fração, mostrou um controle na lesão e redução da carga parasitária, inclusive sem diferença estatística ao comparar com os animais tratados com o medicamento padrão.

Sendo assim, faz-se necessário a continuidade dessa pesquisa com o fracionamento e purificação da fase mais ativa do extrato metanólico de *Libidibia ferrea* após a análise química e atividade antileishmania, para indicar a possibilidade de um possível candidato terapêutico alternativo para a leishmaniose tegumentar, menos agressivo, com maior acessibilidade para todos os níveis socioeconômicos e otimizando a adesão do tratamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Foram realizadas coletas para a obtenção do material vegetal (epicarpo) de *L. ferrea* (Martius ex Tul.) LP Queiroz (Fabales: Fabaceae-“Caesalpinoideae”) de uma propriedade particular no bairro Parque Dez de Novembro, Manaus - AM. Coordenadas: 3°4'34”S 60°0'11”W.

2.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO MEOH DE *L. FERREA*

Todo o material vegetal coletado, separado, foi seco em estufa de circulação forçada, com temperatura inferior à 45°C. Após a secagem, as partes foram moídas e pulverizadas em moinho de facas. Após a pulverização, ocorreram sucessivas extrações com os solventes de interesse, Hexano (VETEC) durante 7 dias, e metanol (VETEC), também por 7 dias.

2.2.1. PARTIÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi fracionado por partição líquido-líquido, foram utilizados dois diferentes sistemas, onde, 20 g do extrato metanólico foi solubilizado em 200 mL de H₂O:MeOH (9:1) e 200 mL de MeOH:H₂O (7:3). Este procedimento permitiu a separação e obtenção da Fração DCM1 (9:1) e da Fração DCM2 (7:3). Posteriormente, as frações foram concentrados por meio do rotaevaporador (YAMATO), de acordo com Wyrepkowski (2015).

2.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para análise em CCD, foram preparadas alíquotas das amostras, diluindo-as em solventes orgânicos, aplicando-as em seguida com o auxílio de tubo capilar de vidro a 0,5 cm da base da cromatoplaça de alumínio com sílica gel 60 (MERCK), com a distância de 1 cm entre um *spot* e outro. Os reveladores empregados foram radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e vanilina sulfúrica e vapor de Iodo.

2.4. CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC):

O fracionamento das frações de *L. ferrea* foi realizada em coluna de vidro com dimensões $\varnothing = 2,5$ cm e alt = 47 cm, utilizando o suporte cromatográfico Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) por mecanismo de exclusão.

2.5, ATIVIDADES *IN VITRO* COM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

2.5.1. MANUTENÇÃO DOS PARASITAS E PREPARO DE MASSA PARASITÁRIA

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) criopreservadas no criobanco do Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/COSAS/INPA. Para o cultivo foram utilizados RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, USA), suplementado com soro fetal bovino inativado (SFBi), incubados a 25 °C de acordo com Jaffe *et al.* (1984).

2.5.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (IC50) DAS FRAÇÕES DE *LIBIDIDA FERREA*

A atividade antileishmania das frações foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade de *L. amazonensis*. As frações foram filtradas e diluídas em meio de cultura, foram usadas as concentrações de 125 a 7,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O controle negativo foi o DMSO 1% (Dimetilsulfóxido/Merck) e controle positivo foi a Pentacarinat® (Isetionato de pentamidina) nas concentrações de 6 a 0,375 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PROCESSO EXTRATIVO E ANÁLISE QUÍMICA

Após o processo extrativo, foi possível obter um rendimento de 20 % (950g) do extrato metanólico do epicarpo de *Libidibia ferrea*. Em seguida, foi realizada uma partição líquido-líquido, onde apresentou um rendimento de 0,58% (116mg) da fração DCM1, 0,56% (113 mg) da fração DCM2 e 50% (1.000 mg) da AcOEt, a partir de 20 g do extrato MeOH do epicarpo de *L. ferrea*.

3.2. ANÁLISE DAS CROMATOPLACAS DAS FASES DCM 1, DCM 2 E ACOET

A análise prévia de diferentes sistemas de partição líquido-líquido, mostrou que os sistemas DCM 1 e DCM 2 apresentaram um perfil químico similar, onde foi possível verificar a eluição dos mesmo. No entanto quando revelado em vapor de iodo o sistema DCM 1, possuía manchas amareladas mais marcantes. Sabe-se que o iodo complexa-se com os compostos insaturados [dupla ligação] (Collins *et al.* 1990). Sugerindo a presença de tais compostos. (Figura 1).

As amostras FDCM1 e FDCM2 apresentaram rendimento e sinais no espectro de RMN similares, no entanto, a FDCM1 apresentou mais intensidade nos sinais, sugerindo assim, o prosseguimento quanto a sua determinação química. Para melhores análises de purificação a mesma foi submetida a um fracionamento em Coluna Sephadex LH-20 com MeOH:Acetona (1:1), resultando na obtenção de 18 frações. Após o fracionamento foi possível observar que as frações que apresentaram um maior rendimento foram as frações 6 (81.8 mg/14,1 %) e a fração 8 (90.3 mg/15,66 %).

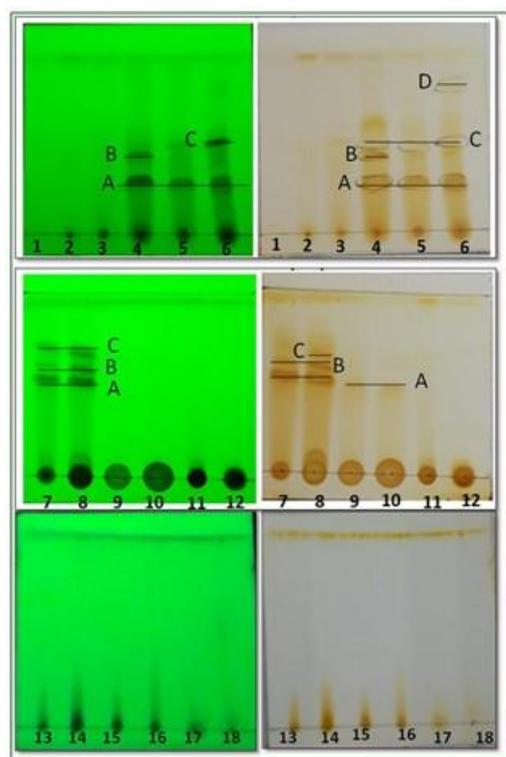
3.4. ANÁLISE DAS CROMATOPLACAS DAS FRAÇÕES 1-18

Foram analisadas previamente as frações Fr1 a Fr6. As cromatoplas reveladas em vapor de Iodo mostraram que as amostras apresentaram substâncias com polaridades distintas. Isto pode ser percebido uma vez que as Fr 1, 2, 3 ficaram retidas na base, demonstrando que possuem uma maior polaridade quando comparadas as outras. Onde mostram a presença de manchas com R_f próximos a 0,3 nas Fr4A, Fr5A e Fr6A (Figura 3).

Quando revelada em vapor de Iodo a Fr4B mostrou um R_f de 0,4. Dentre as amostras analisadas a Fr6 apresentou um R_f de 0,5. É importante frisar que as Fr 4, 5 e 6 eluíram significativamente melhor, mostrando afinidade com o sistema DCM:MEOH (95:5), como pode ser notado quando revelado em luz UV 254nm. Já a eluição das amostras de Fr7 a Fr12 revelaram que este sistema utilizado apresentava maior afinidade com as Fr 7 e 8. Embora as frações 9, 10, 11 e 12 demonstraram uma maior polaridade, os valores de R_f foram maiores nas Fr 7 e 8, com 0,6 em ambas.

As análises das Fr 13 a 18 revelaram que tais amostras possuem mais afinidade pela fase estacionária e eram de caráter mais polar, com algumas diferenças nas eluições de uma fração para a outra. E não foi possível calcular o R_f de nenhuma amostra (Figura 3), o que sugere uma possível mudança no sistema de eluição. A Fr8 não revelou em vapor de Iodo, podendo indicar que na amostra não há presença de nenhuma substância.

Figura 3. Cromatografia de Camada Delgada das Amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6. Sistema de eluição DCM:MEOH (95:5); frações 7-12 obtidas da coluna cromatográfica da partição DMC 1. Eluição com DCM:MEOH (9:1); frações 13-18 obtidas da coluna cromatográfica da partição DMC 1. Eluição com DCM:MEOH (8:2). Reveladas em vapor de Iodo.



3.5. ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO*

Quanto a atividade antileishmaniana foram selecionadas as amostras FDCM 1, FDCM 2 e FAcEOT obtidas da partição líquido-líquido. Não houve diferença significativa entre os resultados das amostras FDCM 1 e FDCM 2 durante o período observado (Figura 4). Já a amostra FAcEOT não apresentou atividade *in vitro* contra o parasita *Leishmania amazonensis* (Figura 5).

Figura 4. Atividade antileishmaniana das frações de *Libidibia ferrea* frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) A-FDCM. B- FDCM 2. Avaliados em 24 e 48 horas.S

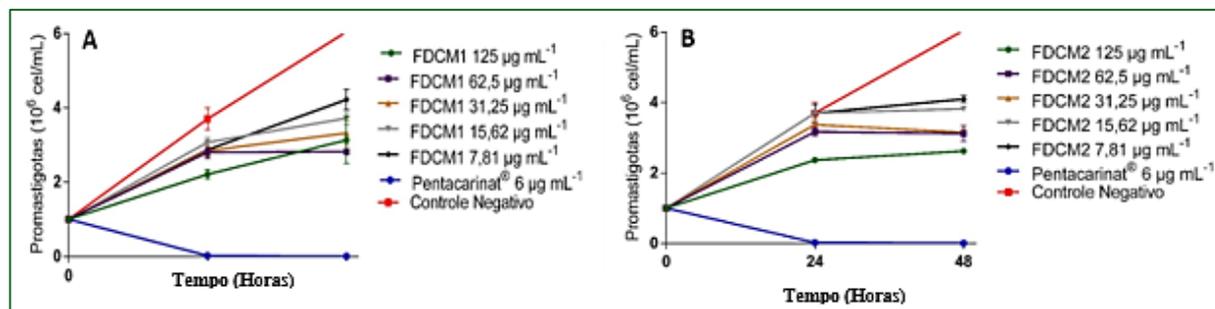
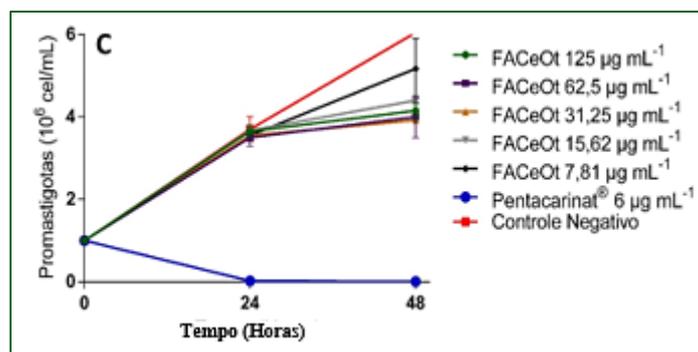


Figura 5. Atividade antileishmania das frações de *Libidibia ferrea* frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) C – FACeOt. Avaliado em 24 e 48 horas.



Através da análise da IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%), durante o período de 24 horas não houve atividade antileishmania por nenhuma amostra avaliada. Somente no período de 48 horas, as amostras FDCM1 e FDCM2 apresentaram atividade biológica com IC₅₀ respectivo de 90 e 78,5 µg.mL⁻¹. De acordo com Osorio *et al.* (2007), as concentrações ativas em ensaios biológicos *in vitro* podem ser classificadas como: concentrações altamente ativas (IC₅₀ < 10 µg.mL⁻¹), ativas (IC₅₀ entre 10 - 50 µg.mL⁻¹), moderadamente ativas (IC₅₀ entre 50 - 100 µg.mL⁻¹) e não ativas (IC₅₀ > 100 µg.mL⁻¹). Desta forma, os resultados do ensaio biológico *in vitro* demonstram que as frações desempenharam uma atividade moderadamente ativa.

4. CONCLUSÃO

Foi possível avaliar parcialmente o perfil de dois sistemas de partição líquida. A amostra DCM 1 teve uma maior intensidade de sinais que sugerem possível presença de compostos glicosilados. Ambas amostras, DCM 1 e DCM 2 apresentaram atividade antileishmania após as 48 horas de incubação. A DCM 1 devido as análises espectrométricas foi o sistema mais promissor e ainda se encontra sobre processo de purificação, sugerindo a busca de uma substância candidata para uma terapia alternativa para a Leishmaniose Tegumentar.

REFERÊNCIAS

- [1] Collins, C.H.;Braga, G.L.;Bonato. 1990. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, 4 a .ed.,Editora da Unicamp, 279pp.
- [2] Comandolli-Wyrepkowski, C.D. 2015. Atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* de *Libidibia ferrea* e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 199pp.
- [3] Jaffe, C.L.; Grimaldi, J.G.; McMahon-pratt, D. 1984.The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: morel, C.M- (ed), Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual. 2ed. Fundação Oswaldo Cruz, 47-91.
- [4] Osorio, E.; Arango, G.J.; Jiménez, N.; Alzate, F.; Ruiz, G.; Gutiérrez, D.; Paco, M.A.; Giménez, A.; Robledo, S. 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of colombian Annonaceae. Journal Ethnopharmacology, 3: 360-365.
- [5] Rocha, A. J. 2012. O impacto social das doenças negligenciadas no Brasil e no mundo. Monografia

(Graduação em Medicina) Universidade Federal da Bahia, Bahia, 5pp.

[6] Rodrigues, L. F.; 2012. Avaliação da atividade in vivo do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Centro de Pesquisas René Rachou, Minas Gerais, 19pp.

[7] Sá, L. A. 2017. Determinação do papel estrutural que proteínas auxiliares exercem para a ativação das glicosiltransferases na biossíntese de antibióticos macrolídeos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 35pp.

www.poisson.com.br
contato@poisson.com.br

@editorapoisson



<https://www.facebook.com/editorapoisson>

