



A UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO ENTENDIMENTO DA ECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS

Dr Adalberto Alves Pereira Filho

O estudo do conteúdo intestinal de insetos hematófagos vetores de patógenos é de grande importância ecológica e epidemiológica, pois permite verificar o grau de relação do vetor para com o hospedeiro reservatório infectado, levando a compreensão dos vários componentes do ciclo de transmissão. Algumas espécies de flebotomíneos, por exemplo, se alimentam exclusivamente em um vertebrado específico, enquanto outros são oportunistas e se alimentam de vários hospedeiros, incluindo espécies que servem como reservatórios de *Leishmania* (Oshaghi *et al.* 2006).

Os estudos das fontes sanguíneas de alimentação de flebotomíneos aliados à pesquisa da infecção natural por *Leishmania* spp., têm sido muito úteis para melhor conhecer a epidemiologia das leishmanioses, aumentando o entendimento sobre os hospedeiros preferenciais na natureza. A identificação da fonte alimentar sanguínea pode indicar os reservatórios potenciais de *Leishmania* spp. (Haouas *et al.* 2007), ou até mesmo o papel protetor ou atrativo que certos animais poderiam desempenhar, em relação ao homem, em área de transmissão destes parasitos (Oliveira-Pereira *et al.* 2008). Tais estudos vêm auxiliar nas atividades de controle e vigilância dessa doença (Dias *et al.* 2003, Garlapati *et al.* 2012; Quaresma *et al.* 2012).

As técnicas de identificação de repasto sanguíneo foram inicialmente baseadas em análises imunológicas. Algumas dessas técnicas são até hoje utilizadas, determinando as fontes alimentares sanguíneas de flebotomíneos empregando testes de precipitina como nos trabalhos de Barata *et al.* (2005) no Estado de Minas Gerais e de Dias *et al.* (2003); Oliveira-Pereira *et al.* (2008); Fonteles (2009) no Estado do Maranhão.

Entretanto, estes testes consomem tempo e apresentam baixa sensibilidade (Sant'Anna *et al.* 2008; Ravasan *et al.* 2009), além de apresentarem reatividade cruzada entre as espécies, requerem a produção de anticorpos específicos para uma ampla gama de hospedeiros potenciais, e são incapazes de apontar reservatórios imprevisíveis (Haouas *et al.* 2007).

Recentemente abordagens moleculares, mais sensíveis e precisas, baseadas em técnicas moleculares como a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizadas na identificação da fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos, como o gene prepronociceptin (Haous *et al.* 2007; Jaouadi *et al.* 2013) e regiões do citocromo b (Steuber *et al.* 2005; Sant'anna *et al.* 2008). A identificação de um conjunto de iniciadores universais dirigidos para as regiões conservadas do gene mitocondrial do citocromo b (*cyt b*) de vertebrados por Kocher *et al.* (1989), e alguns protocolos desenvolvidos no trabalho anterior de Irwin *et al.* (1991) descrevem iniciadores capazes de amplificar o gene do citocromo b de vários mamíferos, permitindo a amplificação de sequências nucleotídicas relevantes para amostras de DNA mitocondrial encontradas no repasto sanguíneo em artrópodes hematófagos (Kent & Noris 2005; Molaei *et al.* 2008; Steuber *et al.* 2005).

A PCR seguida pela digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) tem mostrado ser uma análise fácil, confiável e rápida para a identificação do DNA. A PCR-RFLP se mostra exequível quando comparada com outros métodos de biologia molecular tais como T-RFLP e RFLP-hibridização cujos custos são mais onerosos, e menos usados em países em desenvolvimento (Oshaghi *et al.* 2006).

A análise de PCR-RFLP do citocromo b foi usada em trabalhos anteriores na identificação da origem de fontes alimentares sanguíneas em carrapatos *Ixodes ricinus* (Kirstein & Gray 1996), na mosca tsé-tsé (Steuber *et al.* 2005) em mosquitos do gênero *Anopheles* (Oshaghi *et al.* 2006a) e flebotomíneos (Quaresma *et al.* 2012; Ravasan *et al.* 2009) e vem sendo cada vez mais utilizada na pesquisa da origem da fonte alimentar sanguínea de insetos

hematófagos. Em flebotomíneos Ravasan *et al.* (2009) mostraram que esta técnica apresentou ótimos resultados na identificação da alimentação sanguínea desses insetos capturados no campo, sendo capaz de identificar fontes alimentares mistas de alimentação.

Anteriormente, a investigação da infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp. era realizada através da dissecação do inseto e observação direta do parasita por microscopia óptica, ou pelo isolamento usando técnicas apropriadas de cultura do parasito ou inoculação do material obtido em animais de laboratório. Entretanto, tais procedimentos consumiam tempo, e requeriam grande habilidade técnica, principalmente devido ao tamanho reduzido dos insetos (Oliveira-Pereira *et al.* 2006; Carvalho *et al.* 2008).

Diversos autores têm utilizado técnicas de Biologia Molecular em estudos sobre as leishmanioses, sobretudo em trabalhos que visam detectar, identificar e caracterizar estes parasitos em infecções humanas, caninas e em reservatórios Cortes *et al.* 2004; Gontijo 2000; Volpini *et al.* 2004). Em flebotomíneos, as principais vantagens do uso de tais técnicas no estudo da infecção natural, são a sensibilidade e especificidade, independente do número, estágio, e localização dos parasitos no tubo digestório dos flebotomíneos (Perez *et al.* 1994).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucléicos, e veio substituir as técnicas de dissecação do inseto e observação direta do parasito, sendo empregada com sucesso na determinação da infecção natural de flebotomíneos com boa especificidade e sensibilidade (Soares *et al.* 2010).

A pesquisa por PCR de *Leishmania* spp. em flebotomíneos, seguida pela técnica de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) têm-se mostrado de fácil realização, confiável, e rápida na identificação do DNA do parasito no inseto vetor, sendo utilizada em diversos trabalhos (Margonari *et al.* 2010; El-Beshbishy *et al.* 2013).

Objetivos Específicos:

- Entender as Bases da Biologia Molecular;
- Ilustrar o papel que a Biologia Molecular pode proporcionar no estudo da ecologia de vetores;
- Explanar como o entendimento da ecologia de vetores por meio da Biologia Molecular pode ser útil.

Referências Bibliográficas:

Barata RA, Franca-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Fiuza J, Lorosa ES, Macedo CG, Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 421-425.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF 2008. Naturally Infected Lutzomyia Sand flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8 (3): 413-414.

Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* .1.-specific kineplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 12-17.

Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM 2003. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad de Saúde Pública* 19: 1373-1380.

El-Beshbishy HA, Al-Ali KH, El-Badry AA 2013. Molecular characterization of *Leishmania* infection in sand flies from Al-madinah Al-munawarah province, western Saudi Arabia. *Exp Parasitol* 134(2): 211-215.

- Fonteles RS, Vasconcelos GC, [Azevedo PCB](#), [Moraes JLP](#), Lorosa ES, [Kuppinger O](#), [Rebêlo JMM](#) 2009. Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 647-650.
- Garlapati RB, Abbasi I, Warburg I, Warburg A, Poché D, Poché R 2012. Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *Journal of Medical Entomology* 107: 515-521.
- Gontijo CMF 2000. Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: Estudos Moleculares de amostras de Leishmania isoladas de casos humano. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 158 pp.
- Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C 2007. Development of a molecular tool for the identification of Leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6): 1054-1059.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol* 32: 128-144
- Jaouadi K, Haouas N, Chacara D, Boudabous R, Gorcii M, Kidar A, Depaquit J, Pratlong F, Dedet JP, Babba H 2013. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) blood meal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci: could *Sergentomyia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens? *Ann Entomol Soc Am* 106: 79-85.
- Kent RJ, Norris DE 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *American Journal of Medical Hygiene* 73(2): 336-342.
- Kirstein F, Gray JS 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of *Lyme borreliosis* by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 4060-4065.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci* 86:6196-6200
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN 2010. Phlebotominae Sand Flies (Diptera:Psychodidae) and Leishmania Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol* 47(6):1212-1219.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Diuk-Wasser M 2008. Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, U.S.A.: Molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. *J Med Entomol* 45: 1143-1151.
- Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa ES, Rebêlo JMM 2008. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 24(9):2183-2186.
- Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N 2006b. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Exp Parasitol* 112: 232-236.
- Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 161-164.

Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCN, Andrade Filho JD 2012. Natural Leishmania sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4): 480-485.

Ravasan NM, Oshaghi MA, Javadian E, Rassi Y, Sadraei J, Mohtarami F 2009. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *J Arthropod Borne Dis* 3(1): 8-18.

Sant'Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Calvacante RR, Alexander B, Bates PA 2008. Blood meal identification and parasite infection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop* 107: 230-237.

Soares MRA, Carvalho CC, Silva LA, Lima MSC, Barral AMP, Rebêlo JMM, Pereira SRF 2010. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 26 (12): 2409-2413.

Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol Res* 97: 247-54.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31-37.