



BEATRIZ MENDONÇA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE *PRIMERS* SUBGÊNEROS ESPECÍFICOS
PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania* EM
FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NO MUNICÍPIO DE
RIBEIRÃO VERMELHO, MG**

**LAVRAS-MG
2019**

BEATRIZ MENDONÇA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE *PRIMERS* SUBGÊNEROS ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO
DE DNA DE *Leishmania* EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NO MUNICÍPIO DE
RIBEIRÃO VERMELHO, MG**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Licenciada.

Prof. Dr. Sidney Almeida Ferreira
Orientador

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante
Co-orientadora

M.a Ingrid Marciano Alvarenga
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

À Deus, por mais uma abençoada existência, sendo
minha força e meu porto seguro.

À minha amada e batalhadora mãe, Naliane, que sempre me incentivou, me amou
incondicionalmente e sempre foi meu suporte.

Às minhas irmãs Lays, Isabela, Isadora e Bárbara, que sempre foram minha fortaleza, meu
amparo e minhas melhores amigas.

Ao meu amor e melhor amigo Victor, que sempre acreditou mais em mim do que eu mesma, que
me incentivou e me ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus padrinhos Viviane e Dinho, por sempre terem me ajudado em todas as etapas da minha
vida, principalmente na faculdade.

Aos meus avós Iolanda e Manoel, por serem meus exemplos e me apoiarem.

Aos demais amigos que a vida me trouxe, me proporcionando momentos memoráveis.

Aos professores que mais me ajudaram nesta caminhada, sendo exemplos de esforço,
profissionalismo e dedicação.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tantas oportunidades concedidas, por toda proteção e amparo, por caminhar ao meu lado e me fortalecer todos os dias da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente aos Departamentos de Biologia, Ciências da Saúde e Medicina Veterinária pela oportunidade e aperfeiçoamento profissional.

À Universidade Federal de Minas Gerais por me ajudarem a complementar este trabalho.

Ao Programa de Bolsa Institucional de Pesquisa – PIBIC/UFLA, pela concessão da bolsa de iniciação científica durante a graduação.

À CAPES e ao CNPq por financiarem este trabalho.

Ao professor Marconi pela oportunidade do primeiro estágio e por toda paciência, quando eu ainda era caloura.

Aos professores Joziana e Thales, por terem me acolhido e me permitido fazer parte da família BIOPAR e NEP. Por terem me estendido a mão e terem me apoiado desde o início desta trajetória. Ao Thales por ter sido meu orientador e ter me ajudado. À Jozi por ser este exemplo de pessoa, de profissional e por ter me auxiliado tanto como co-orientadora.

Ao professor Sidney, que não apenas me orientou durante o desenvolvimento deste trabalho, mas teve a paciência de me ensinar, me ouvir e me ajudar com enorme dedicação todas as vezes que eu precisei.

À família NEP e BIOPAR por terem acrescentado de maneira grandiosa à minha caminhada profissional, através de experiências, fonte conhecimento e amizade.

Aos amigos que conquistei ao longo destes quatro anos fazendo parte do NEP/BIOPAR, em especial Marina, Carol, Thiago, Mariana, Alexandra e Daniel pela oportunidade de aprender com vocês e por toda ajuda. Um especial agradecimento à Ingrid, que foi essencial para a realização deste trabalho.

À Jose, que me ajudou quando eu iniciei no NEP e continuou me auxiliando com a realização dos experimentos deste trabalho, com tanta paciência e tantos ensinamentos.

Ao professor Ricardo Fujiwara, que foi extremamente solícito e abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar minhas identificações moleculares.

Aos meus atenciosos tios Vânia e Divino, que me hospedaram em sua casa todas as vezes que eu precisei ir a Belo Horizonte realizar meus experimentos.

Ao meu casal favorito Beatriz e Samuel, por me proporcionarem tantas risadas, bons momentos, viagens e por compartilharem tantos conselhos quando eu precisei.

À Maísa, que tem sido uma grande amiga, conselheira e companheira de meditações.

Aos amigos do grupo “Colônia Esperança”, que proporcionaram inúmeros bons momentos, deliciosas risadas e muito carinho. Obrigada por fazerem parte da minha jornada!

Aos amigos do grupo “Rolezinho de sábado” agradeço os bons momentos, risadas e desabafos que me proporcionaram, você são demais!

Às minhas amigas Nina, Gabrielly e Isabela por todo incentivo, ajuda, conselhos e bons momentos compartilhados.

À minha grande amiga Andrea por ter me ajudado quando eu mais precisei. Pelos inúmeros bons conselhos e avisos, pelas meditações e por me ajudar a evoluir como pessoa e como ser espiritual, me fortalecendo cada dia mais.

Aos meus avós Manoel e Iolanda, por serem meus exemplos de persistência, amor, fé e sempre estarem ao meu lado.

Aos meus padrinhos Viviane e Dinho, por terem feito tanto por mim e pelos meus estudos, sem vocês eu não teria realizado este sonho.

Às minhas irmãs Lays, Isabela, Isadora e Bárbara, pelo carinho, união e por sempre estarem ao meu lado acreditando no meu potencial.

À minha mãe, por sempre ter me incentivado meus estudos, por ter me apoiado em todas as minhas escolhas, por ter acreditado em mim desde o início. Você é uma das responsáveis por esta realização.

À Kira e a Melissa, por todo companheirismo, amor puro e incondicional.

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro Victor, por todo o amor, paciência, cumplicidade e companheirismo. Por ter sido a minha fortaleza durante todo esse tempo, por ser o maior incentivador e apoiador deste sonho. Sem você eu não teria conseguido!

Aos demais amigos, colegas e professores, que fizeram parte desta caminhada e contribuíram diretamente ou indiretamente de alguma forma para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.” Chico Xaxier

RESUMO

As leishmanioses correspondem um complexo de doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que possuem as fêmeas dos flebotomíneos como vetores dos parasitos entre hospedeiros mamíferos. A doença pode se manifestar em duas principais formas clínicas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LV pode acometer humanos e cães, sendo estes últimos considerados reservatórios do parasito no meio urbano. A LV apresenta um elevado impacto na saúde pública devido sua elevada letalidade. O reconhecimento da ocorrência de espécies de *Leishmania* em uma determinada região, bem como a relação destas com o vetor e com os hospedeiros vertebrados, são essenciais para um melhor entendimento sobre o ciclo de transmissão e as formas de controle das leishmanioses. Sendo assim, uma investigação rigorosa da presença dos parasitos e vetores é importante para uma descrição epidemiológica clara das leishmanioses. Investigações epidemiológicas em municípios da região sul de Minas Gerais foram iniciadas recentemente para se obter mais informações sobre o agravo. Um destes municípios foi Ribeirão Vermelho, onde ocorrem pesquisas preliminares desde 2017 as quais já demonstraram a presença de cães soropositivos e do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Porém, ainda há poucas informações sobre as leishmanioses no local, apontando a necessidade de mais estudos epidemiológicos para esclarecer a distribuição e identificação de vetores e de espécies de *Leishmania* que possam estar presentes. Sendo assim, objetivo foi avaliar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos capturados no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais e avaliar *primers* para os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* específicos. Para isto, foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores específicos para os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* endereçados para sequências de DNA de cinetoplasto (kDNA). Uma amostra constituída de 19 flebotomíneos fêmeas foi analisada e estes insetos pertenciam as seguintes espécies e gênero: *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Expapillata firmatoi*, *Evandromyia cortelezii*, *Pintomyia fischeri* e *Brumptomyia* spp. Através da análise molecular, foi detectada uma positividade de 100% das amostras para o subgênero *Leishmania*. Devido a alta prevalência das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* na região, isso indica a possibilidade dessas espécies estarem presentes nos flebotomíneos analisados deste estudo. Além disso, a presença do DNA do subgênero *Leishmania* em flebotomíneos de Ribeirão Vermelho sugere uma capacidade vetorial dos parasitos, o que necessita, porém de mais estudos para confirmação. Outro resultado analisado foi a contaminação das reações com *primer* do subgênero *Viannia*, o que inviabilizou a análise dessas amostras. De acordo com as informações obtidas neste trabalho, é necessário a identificação das espécies de *Leishmania* circulantes e a continuação da investigação epidemiológica sobre as leishmanioses na região de estudo.

Palavras chave: detecção da infecção, epidemiologia, leishmanioses, PCR, Ribeirão Vermelho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Classificação dos subgêneros de <i>Leishmania</i> relacionados a sua localização de ocorrência.....	5
Figura 2 - Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar no mundo.....	9
Figura 3 - Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral no mundo.....	11
Figura 4 - Mapa do município de Ribeirão Vermelho.Fonte: Google Earth (2019).....	17
Figura 5 - Gel de agarose representando os produtos da PCR utilizando iniciadores para os subgêneros <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i>	22
Figura 6 - Gel de agarose representando os produtos da PCR utilizando iniciadores para os subgêneros <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i>	23
Figura 7 - Gel de agarose representando os produtos da PCR utilizando iniciadores para os subgêneros <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de DNA das amostras.	21
Tabela 2 - Amostras dos flebotomíneos com sua respectiva espécie ou gênero identificados.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Agente etiológico	3
2.2 Histórico da Leishmaniose Tegumentar	6
2.3 Histórico da Leishmaniose Visceral.....	6
2.4 Aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar	7
2.5 Aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral	8
2.6 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar	9
2.7 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral	11
2.8 Diagnóstico da infecção por <i>Leishmania</i>	13
3 OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivo Específico	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Área de Estudo	17
4.2 Extração de DNA	18
4.3 PCR subgênero específico	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
PERSPECTIVAS	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses se constituem em um complexo de doenças infectoparasitárias causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) que possuem como insetos vetores os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). A doença acomete os seres humanos, mamíferos domésticos e silvestres, sendo considerada, portanto uma zoonose. As leishmanioses são responsáveis por um elevado impacto na saúde pública e podem se manifestar em diferentes formas clínicas, sendo as principais a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT).

As leishmanioses estão presentes em quase todos os continentes e o número de casos do agravo está em crescente expansão geográfica. No Brasil, as leishmanioses também estão amplamente distribuídas por todo território nacional, por isso as medidas de controle devem ser reforçadas e aperfeiçoadas, o que exige mais estudos sobre a doença.

Após a demonstração de transmissão ativa das leishmanioses no município de Lavras, no Sul de Minas Gerais, Prefeitura de municípios vizinhos começaram a demonstrar maior preocupação e necessidade em expandir as ações de educação em saúde, além de realizar estudos epidemiológicos sobre as leishmanioses. Um desses municípios foi Ribeirão Vermelho que até o ano de 2017, não contava com nenhum estudo sobre leishmanioses. A partir de um inquérito sorológico realizado em 2017, confirmaram-se os primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral canina (LVC), além disso flebotomíneos também foram coletados no local.

A compreensão sobre as espécies de *Leishmania* presentes em uma determinada região, bem como a relação destes com o vetor e com os hospedeiros vertebrados, é essencial para elucidar o ciclo de transmissão. A correta identificação das espécies de parasito presentes nos insetos é um fator importante para a determinação de vetores de *Leishmania*. Ademais, é importante se conhecer as espécies de parasitos, pois estas estão relacionadas com as formas clínicas manifestadas pelas leishmanioses. Conhecer os dados epidemiológicos do município são essenciais para auxiliar a implementação de ações de controle e prevenção da doença

Devido aos poucos dados sobre as leishmanioses em Ribeirão Vermelho, há necessidade de mais estudos que descrevam a distribuição e identificação das espécies vetoras e principalmente a identificação das espécies de *Leishmania* que estão presentes. Desta forma, o

objetivo deste estudo foi a investigação da presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos coletados no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agente etiológico

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida) (FIGURA 1), transmitidos por insetos vetores e que possuem as fêmeas de flebotomíneos como transmissoras entre hospedeiros mamíferos (ROGERS, 2012).

Para a manutenção do ciclo de vida de *Leishmania* sp. é essencial a presença de flebotomíneos, insetos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae.

As fêmeas de flebotomíneos se infectam durante o repasto sanguíneo. Neste caso, elas ingerem macrófagos de hospedeiros reservatórios infectados pelas formas amastigotas que se transformam em promastigotas no intestino do vetor. Posteriormente, os parasitos multiplicam-se e se tornam infectantes de 8 a 20 dias após a hematofagia (DESJEUX, 2004). Apenas as formas promastigotas metacíclicas do parasito são capazes de desenvolver a infecção nos hospedeiros mamíferos (LAINSON; SHAW, 1987).

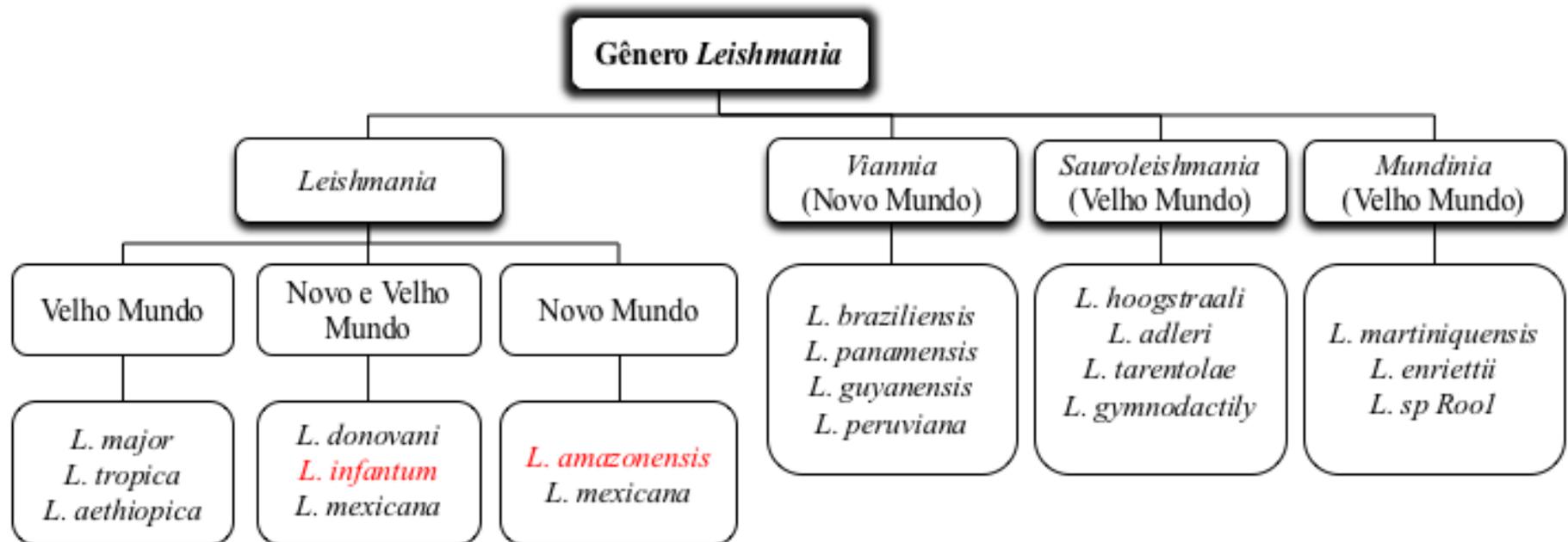
A leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) são classificadas como doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e representam umas das principais doenças transmitidas por vetores nas Américas (WHO, 2019).

O gênero *Leishmania* forma um grupo monofilético com quatro subgêneros, *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)*, *L. (Sauroleishmania)* e *L. (Mundinia)*. As espécies de *Leishmania* que acometem os mamíferos estão divididas entre os subgêneros *Mundinia*, *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Sauroleishmania* agrupa as espécies de *Leishmania* que acometem répteis e estão presentes principalmente no Velho Mundo (DOMINGUÉZ 2015). E o novo subgênero *Mundinia* agrupa espécies de parasitos que acometem seres humanos e cangurus (ESPINOSA et al, 2016; DESBOIS et al, 2014).

As espécies do subgênero *Leishmania* possuem o ciclo de vida no inseto hospedeiro limitado aos intestinos médio e anterior (LAINSON 2010). Elas são responsáveis em sua maioria pelo desenvolvimento de lesões cutâneas e eventualmente lesões cutâneo-difusas (MARZOCHI, SCHUBACH; MARZOCHI 1999).

As espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, durante o ciclo de vida no inseto vetor, passam uma fase de desenvolvimento que apresenta formas paramastigotas arredondadas e ovaladas bem como algumas formas promastigotas aderidas à parede do intestino posterior (LAINSON: SHAW, 1987; LAISON 2010). A maioria destas espécies causam lesões cutâneas e mucosas, e algumas raramente acometem o homem (MARZOCHI, SCHUBACH; MARZOCHI 1999).

Figura 1- Classificação dos subgêneros de *Leishmania* relacionados a sua localização de ocorrência.



Fonte: Adaptado de Bates, 2007; Espinosa e colaboradores, 2016.

2.2 Histórico da Leishmaniose Tegumentar

O primeiro relato de LT no Brasil ocorreu em 1827 e foi registrado no documento da Pastoral Religiosa Político- Geográfica, que está no livro intitulado “Antiguidad de la syphilis em el Perú” (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

Em 1895, Juliano Moreira relatou a primeira observação clínica da LT no país, denominando a lesão como “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. Em 1909, Lindenberg encontrou o parasito em amostras de lesões cutâneas e nasobucofaríngeas de indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias em São Paulo, confirmando as formas amastigotas de *Leishmania* e nomeando as lesões de “Úlcera de Bauru”. Gaspar Vianna, em 1911, ao descrever um caso de leishmaniose cutânea disseminada de um paciente de Paraíba do Sul, identificou o parasito como *Leishmania brasilienses*, nome posteriormente corrigido por Alfredo da Mata para *L. braziliensis* (VIANNA, 1911) em 1916 (FURUSAWA; BORGES, 2014). Apenas em 1922 Aragão comprovou a importância do flebotomíneo como vetor do parasito (BRASIL, 2010).

No ano 1950 a LT já estava distribuída por todo o território nacional, com novos casos coincidindo com regiões em que o desmatamento era causado para construção de estradas e apresentando maior número de casos em São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco. Em 1960, esse quadro era predominante entre populações rurais dos estados mais populosos da década (VALE; FURTADO, 2005).

2.3 Histórico da Leishmaniose Visceral

O primeiro relato registrado de LV no Brasil aconteceu em 1934, quando Henrique de Azevedo Penna encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em lâminas de cortes histológicos de fígado de pacientes que foram a óbito com suspeita de febre amarela (PENNA, 1934). Após 20 anos deste registro, ocorreu o primeiro surto da doença no município de Sobral no Ceará (DEANE, 1956).

Entre os anos de 1908 a 1986, foi registrada uma epidemia de LV no estado do Piauí, com uma alta prevalência entre crianças menores de cinco anos e menor prevalência entre adultos acima de 40 anos, com um total de 1509 indivíduos acometidos (COSTA; PEREIRA;

ARAÚJO, 1990). Na década 80, constatou-se uma mudança na distribuição geográfica da LV no país. A doença que antes era restrita a ambientes rurais e silvestres, principalmente do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões alcançando inclusive a periferia de grandes cidades (GONTIJO; MELO, 2004).

No Brasil, entre os anos de 1990 a 2018 um total de 91.085 casos de leishmaniose visceral humana (LVH) foram reportados, além de 4.476 óbitos no período de 2000 a 2018. O aumento do número de casos de LVH nos últimos anos em todo o mundo se deve a vários fatores principalmente relacionados a globalização, as mudanças climáticas, ao aumento de viajantes internacionais, além do aumento de infecções por *Leishmania* através de transfusão sanguínea em países estrangeiros (SHAW, 2007; MANSUETO et al, 2014; STEVERDING, 2017).

A participação dos canídeos na epidemiologia da LV foi mencionada pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Comte que observaram o parasito na pele de cães infectados (ALVES, 2006). Em 1914, Laveran e Franchini realizaram a infecção experimental em 25 cães com *Leishmania infantum* (NICOLLE, 1908) e encontraram parasitos na pele e em outros órgãos destes animais.

Devido ao crescimento da área de abrangência deste agravo e ao aumento no número de casos, a LV é atualmente considerada pela Organização Mundial da Saúde (2019), uma das prioridades dentre as doenças tropicais.

2.4 Aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar

Nas Américas já foram descritas cerca de 12 espécies de *Leishmania* causadoras da forma tegumentar em humanos, e oito espécies causadoras da doença em outros animais (BRASIL, 2017). No Brasil, atualmente já foram identificadas sete espécies (BRASIL, 2017), sendo as mais prevalentes *L. braziliensis*, *Leishmania amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1972) e *Leishmania guyanensis* (FLOCH, 1954).

A LT se subdivide em cutânea localizada, disseminada, mucocutânea e difusa. Na forma cutânea localizada, a manifestação mais frequente é o desenvolvimento de uma única lesão no local da picada do flebotomíneo. Também pode se apresentar na forma disseminada com múltiplas lesões ulceradas distribuídas pelo corpo. No caso da forma mucocutânea, surgem lesões destrutivas na mucosa nasal, faríngea e laríngea o que pode levar a extensa destruição tecidual com ocorrência de infecções secundárias (AHLUWALIA, et al 2010; PALUMBO,

2010). A forma difusa caracteriza-se pelo surgimento de múltiplos nódulos não ulcerados espalhados pela pele (ANVERSA et al, 2018).

2.5 Aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral também conhecida como Calazar, é uma doença sistêmica, causada pelo parasito *Leishmania donovani* (LAVERAN; MESNIL, 1903) que prevalece na África Oriental, Índia e em partes do Oriente Médio, e pela espécie *L. infantum* presente na Europa, Norte da África e América Latina (LUKES, 2007).

A espécie *L. infantum* também é responsável pela forma visceral da doença em cães (BRASIL, 2014). Os cães desempenham um papel importante na epidemiologia da LV, sendo considerados o principal reservatório urbano do parasito em localidades como Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, China, América Central e do Sul (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

No Brasil a *L. infantum* possui como principais vetores o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1913) e *Lutzomyia cruzi* (MANGABEIRA, 1938; BRASIL, 2014). Outras espécies envolvidas na transmissão de *L. infantum* no Brasil são *Pintomyia fischeri* (PINTO, 1926) e *Migonemyia migonei* (FRANÇA, 1920) (GALVIS-OVALLOS et al., 2017; MOYA et al., 2015; GUIMARÃES, 2016).

O período médio de incubação do agravo em cães é de 3 a 7 meses (BRASIL, 2017). As principais manifestações clínicas encontradas nos exames físicos dos cães com leishmaniose visceral canina (LVC) são: linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, ulcerações cutâneas, perda de peso, perda de apetite, onicogribose, epistaxe, febre, lesões oculares, diarreia e vômito (CIARAMELLA, et al 1997). Porém, grande parte dos cães infectados exibem a forma assintomática da leishmaniose e ainda atuam como reservatórios (DANTAS-TORRES et al., 2006).

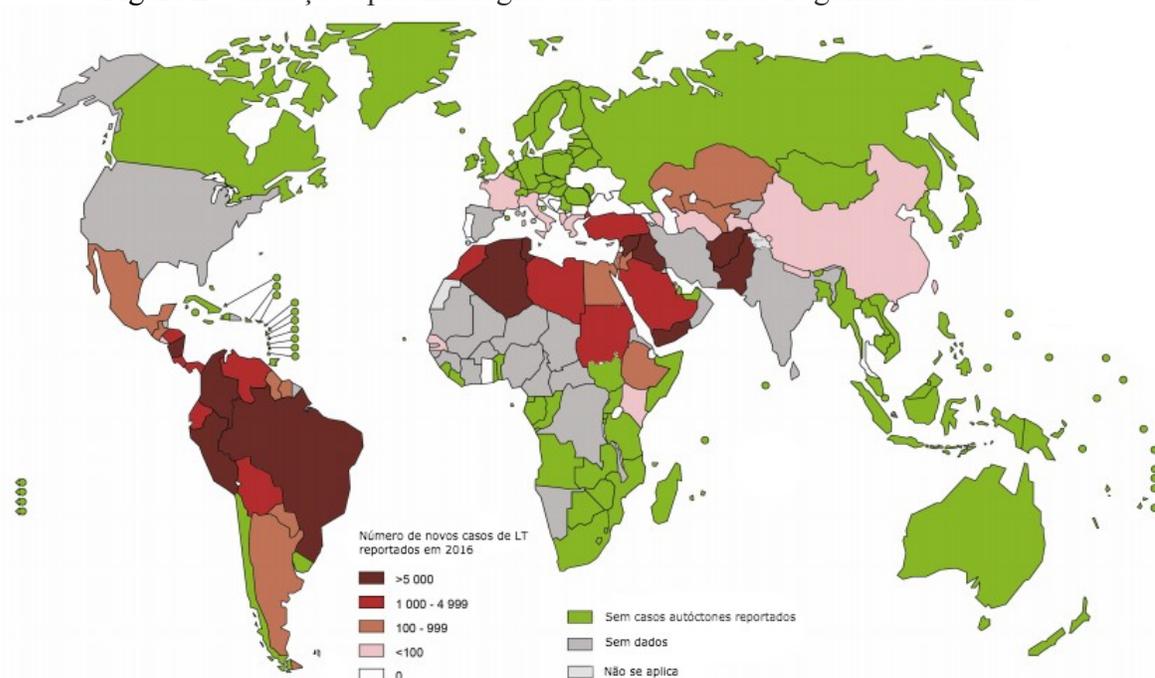
A LV é uma doença zoonótica e com alta letalidade, pois, quando não tratada, pode levar o paciente a óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2017). O período médio de incubação nos humanos dura em média de 2 a 6 meses e no cão de 3 a 7 meses (BRASIL, 2017). Em relação aos sinais clínicos mais frequentemente observados em humanos infectados destacam-se: febre alta, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, tosse, diarreia e astenia (BADARO et al 1986; DAHER, et al 2008).

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem de diferentes fatores, tais como as espécies de *Leishmania* infectantes, a interação parasito-hospedeiro, o estado imunológico do hospedeiro, a genética do hospedeiro, a idade e condição nutricional (BADARÓ et al, 1986; BOGDAN, 2012; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

2.6 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar

A LT é uma doença que está amplamente distribuída pelo globo e a maioria dos casos relatados desta doença, ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria (WHO, 2019) (FIGURA 3). A Organização Mundial de Saúde (2019) estima que 1 milhão de novos casos foram diagnosticados nos últimos cinco anos.

Figura 2 - Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar no mundo.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2016).

Em 2017, dos 200 países que reportaram casos de leishmanioses para a OMS, 65 destes eram endêmicos para LV e LT, sendo o Brasil um dos países incluído nesta lista (WHO, 2019). Segundo a OMS (2019), o Brasil se destaca entre os países que mais reportam casos de LT.

A leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LM) são endêmicas em 18 países das Américas. No período de 2001-2017 foram registrados 940.396 casos novos de LC, distribuídos em 17 países endêmicos, com uma média anual de 55.317 casos (PAHO, 2019).

Em 2017, 72,6% do total de casos foram reportados pelo Brasil (17.526), seguido pela Colômbia (7.764), Peru (6.631) e Nicarágua (4.343) (PAHO, 2019). Dos casos registrados nesse ano, 3,78% (1.882) foram casos da forma LM, considerada a mais grave dentre as formas da LT, por causar complicações clínicas como deficiências e mutilações. Além disso, cerca de 94% dos casos relatados de LT na América Latina, então concentrados no Brasil (PAHO, 2019).

No Brasil, a LT é uma doença que possui diferentes agentes etiológicos, reservatórios e vetores. Apresenta diferentes padrões de transmissão e a epidemiologia da doença é complexa, o que aponta para a necessidade de mais estudos para melhor esclarecê-la (BRASIL, 2017).

Até o ano de 2017, todos os estados brasileiros já haviam registrado casos autóctones de LT, com uma grande concentração de casos na região Norte (44,7%). Em 2018, foram reportados 16.432 casos de LT no país, sendo a região Sudeste responsável pelo quarto maior número de casos registrados (1.646). Em Minas Gerais no ano de 2018, o número de pessoas acometidas pela LT foi 1.434, sendo o estado com maior concentração de registros de casos da doença na região (BRASIL, 2018).

No município de Lavras, localizado na região Sul de Minas Gerais, cinco casos de LT foram registrados no período de 2004 a 2013, sendo dois de área rural e três de área urbana (BARÇANTE, et al 2018). Atualmente, há onze casos registrados da doença no município (SINAN, 2019). Deste registro, destacam-se positivamente os dois últimos casos que evoluíram para cura clínica e negativamente um caso que foi a óbito um mês após o início do tratamento (SINAN, 2019). Em Lavras, estudos preliminares já identificaram vetores ou possíveis vetores de espécies de *Leishmania* que causam a forma tegumentar da doença como: *Nyssomyia whitmani* (ANTUNES; COUTINHO, 1939), *Migonemyia migonei* e *Pintomyia fischeri* (BARÇANTE, et al 2018; CASTRO, 2017; BARCELOS et al, 2015).

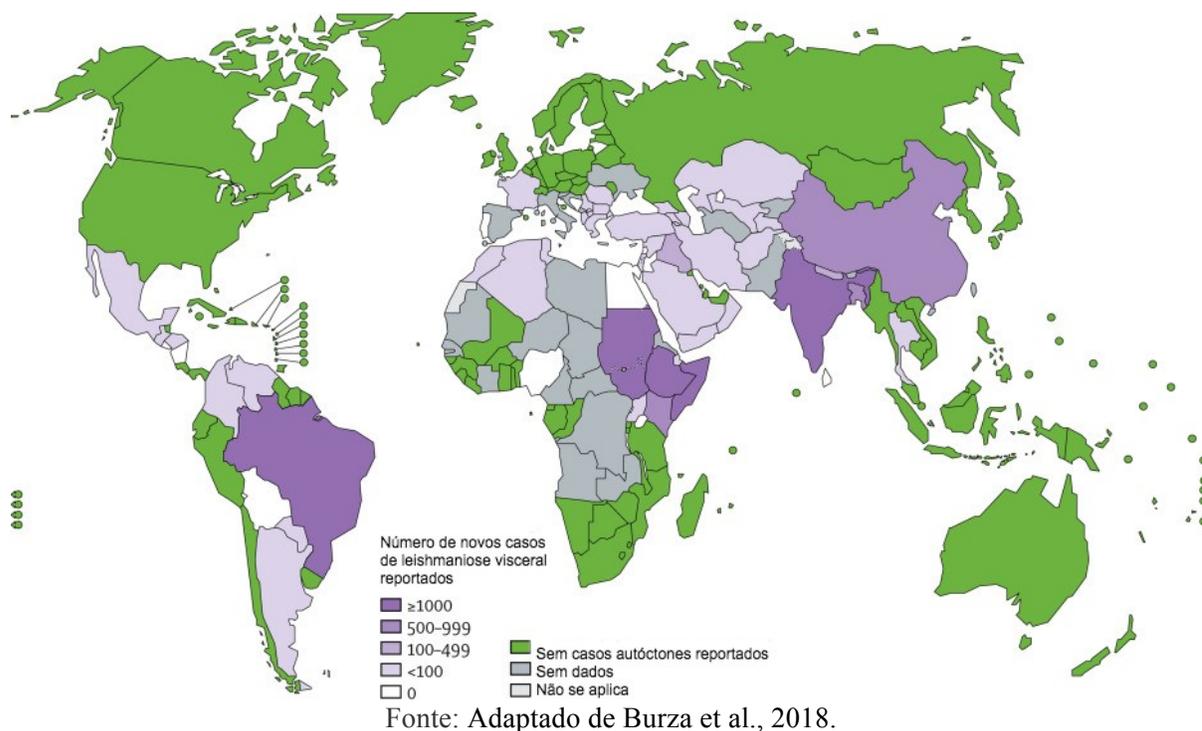
Ribeirão Vermelho, município vizinho de Lavras não possui até o momento, casos humanos registrados de LT. Em 2017 iniciaram-se estudos nesta região onde foram encontrados e coletados flebotomíneos. Posteriormente, foi detectado a presença de DNA do gênero *Leishmania* nestes insetos (ALVARENGA, 2019).

2.7 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são doenças negligenciadas que prevalecem principalmente em regiões de clima tropical e subtropical e afetam mais de um bilhão de pessoas, principalmente na faixa tropical do globo onde se concentram as populações mais vulneráveis dos países em desenvolvimento (WHO, 2019). As populações que vivem em condições financeiras menos favoráveis, sem saneamento básico adequado, em contato com vetores, com animais domésticos e outros animais como gado e galinhas são as mais afetadas (BORGES, et al 2009; WHO, 2019). A LV é considerada a segunda doença parasitária causada por protozoário que mais mata no mundo, depois da malária (JHA, et al 2012).

A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença amplamente distribuída em todo o mundo exceto na Antártida e Oceania (WHO, 2016) (FIGURA 2). No ano de 2017, 94% dos novos casos relatados à Organização Mundial de Saúde (WHO) ocorreram em sete países, sendo eles o Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Estima-se que 300.000 novos casos são diagnosticados por ano, além de mais de 200.000 mortes anuais (WHO, 2019).

Figura 3 - Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral no mundo.



Nas Américas, a LVH é endêmica em 12 países e no período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos, resultando em uma média de mais de 3.000 casos novos por ano. Em 2017, o Brasil foi o país que mais reportou casos de LV, com um percentual de 72,6%. Além disso, cerca de 96% dos casos relatados na América Latina, estão concentrados no Brasil (PAHO, 2019).

No Brasil, a LVH é considerada um grande problema de saúde pública devido à elevada letalidade dos casos não tratados ou diagnosticados tardiamente (BRASIL, 2014). No ano de 2017, 23 estados brasileiros apresentavam casos de LV, distribuídos nas 5 regiões brasileiras e com uma letalidade de 8,8% (BRASIL, 2017). Em 2018, foram reportados 3.466 casos de LVH no país e 289 óbitos, sendo a região Sudeste responsável pelo terceiro maior número de casos registrados. Em Minas Gerais o número de casos confirmados foi de 324 com letalidade de 10,1% e 34 óbitos no mesmo ano (BRASIL, 2018).

Atualmente vários municípios de Minas Gerais são considerados endêmicos para LV e têm sido alvos de estudo. Alguns destes são: Montes Claros (MONTEIRO et al., 2005) e Porteirinha (BARATA et al., 2004) no Norte de Minas, Paracatu (DIAS et al., 2011) na mesorregião Noroeste de Minas e Belo Horizonte (LOPES et al., 2010; ARAÚJO et al., 2013). Porém, relatos de novos casos têm sido reportados em outras localidades do estado como a região Sul que já é considerada uma área de transmissão recente de LV. A expansão da LV pode estar associada a diversos fatores tais como: mudanças ambientais e climáticas, descontinuidade ou ausência das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados por ações antrópicas, dificuldades de controle da doença em grandes centros urbanos onde problemas de desnutrição, moradia e saneamento básico são frequentes (GONTIJO; MELO, 2004).

Dentre os municípios da região Sul de Minas Gerais, Lavras se destaca por ser identificado como área de transmissão recente de LVH. Um estudo preliminar demonstrou a ocorrência de cães positivos para infecção por *L. infantum* em vários bairros do município, porém nenhum caso ainda havia sido notificado até 2013 (NARCISO, 2016). A partir da triagem de cães em um abrigo de Lavras, detectou-se uma taxa de positividade de 20% dos 32 cães avaliados (SANTOS et al., 2014). Também foram encontrados flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* em diferentes bairros e no campus da Universidade Federal de Lavras (UFPA) (BARCELOS et al., 2015). Esses achados levaram à realização de inquéritos sorológicos no município. No período de junho de 2013 a junho de 2018, foram realizados 6.782 testes DPP®

(teste imunocromatográfico - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) e destes, 443 foram positivos confirmados pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (BLANCO, 2019).

A presença de *L. longipalpis* foi registrada a primeira vez em 2015 em Lavras (BARCELOS et al., 2015) e em 2016 foi detectada sua infecção natural por *Leishmania* spp. (CASTRO et al, 2019). Em janeiro de 2017, foi notificado o primeiro caso humano do município (NARCISO, et al 2018), totalizando, até o presente momento, oito casos notificados com dois óbitos por LVH (SINAN, 2019).

O município de Ribeirão Vermelho até o ano de 2017 não contava com nenhum estudo sobre leishmanioses. A partir de um inquérito sorológico canino realizado em 2017, confirmaram-se os 14 primeiros casos autóctones de LVC. A partir destes resultados, iniciaram-se, estudos no município no mesmo ano, onde foram encontrados e coletados flebotomos. Em 2019 foi detectado a presença de DNA do gênero *Leishmania* em flebotomíneos da região (ALVARENGA, 2019).

2.8 Diagnóstico da infecção por *Leishmania*

O diagnóstico precoce de uma doença parasitária é de fundamental importância para se tomar decisões adequadas, que permitirão um tratamento correto e rápido do paciente infectado. Métodos de diagnóstico mais rápidos e precisos auxiliam a vigilância epidemiológica, pois doenças infecciosas que apresentam relevante impacto para a saúde pública poderão ser identificadas precocemente e controladas de forma mais eficaz (CAVALCANTI; LORENA; GOMES, 2008).

Atualmente, há três principais formas de se realizar o diagnóstico da infecção por *Leishmania* em cães e humanos através dos métodos: parasitológico, sorológico e molecular. O diagnóstico parasitológico pode ser realizado de forma indireta que inclui o xenodiagnóstico e a observação de parasitos em cultura. Há a forma direta que leva em conta a observação de amastigotas em lâminas coradas de amostras clínicas como: medula óssea, linfonodo, baço, fígado, pele e sangue (LAURENTI, 2009).

O método sorológico visa a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de hospedeiros infectados. No Brasil, o Ministério da Saúde (2014) preconiza a realização do teste rápido imunocromatográfico de plataforma de via dupla (*Dual path plataform* - DPP® - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) como teste de triagem e o ensaio de imunoadsorção enzimática ELISA

(EIE-LVC®) como teste confirmatório para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina LVC (BRASIL, 2016).

Os métodos moleculares visam a a detecção e amplificação de sequências de DNA do parasito. A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) se destaca por ser a técnica mais utilizada para diagnóstico molecular (DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018). Esta é uma metodologia que consiste em realizar ciclos repetidos de desnaturação, anelamento com iniciadores específicos e extensão enzimática de uma sequência alvo do genoma. Esta técnica visa a síntese *in vitro* de milhares de cópias de um determinado segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase (SAIKI et al., 1985).

A PCR como técnica de detecção do parasito apresenta várias vantagens como a elevada sensibilidade e especificidade quando comparada a métodos parasitológicos e sorológicos convencionais (ROSSI et al., 2008). A PCR possibilita a identificação de sequências genéticas específicas de *Leishmania* mesmo a partir de quantidades mínimas como 50fg de DNA do parasito (FU; PERONA-WRIGHT; BARKER, 1998). Esta técnica também conta com a necessidade de infraestrutura laboratorial adequada e pessoas com experiência para minimizar os riscos relacionados à contaminação ou inibição da reação (CAÑADAS, et al. 2006).

Outra vantagem da PCR é sua versatilidade, pois permite detectar o parasito em vários hospedeiros como cães (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990), humanos (COSTA, 2014) e animais silvestres utilizando-se um mesmo protocolo (RICHINI-PEREIRA, et al 2014). Também é uma técnica robusta para fazer detecção de DNA de parasitos em vetores (SILVA, 2016; RÊGO et al 2015; BRUIJN; BARKER 1992).

A metodologia mais tradicional utilizada para a identificação do parasito no intestino de flebotomíneos tem sido a dissecação do aparelho digestivo seguido da montagem em lâmina com o material amostrado e posterior visualização direta de promastigotas. O diagnóstico também é concluído quando os parasitos amostrados crescem em meios de cultura ou quando realiza-se sua inoculação em animais de laboratório dos quais os parasitos são posteriormente isolados (COSTA, 2016). Porém, as desvantagens deste processo são: a suscetibilidade à contaminação, baixa sensibilidade, dificuldade de processamento de um grande número de amostras, necessidade de habilidade técnica para o manuseio, além de ser um procedimento de lenta realização (PEREIRA, 2010; OLIVEIRA-PEREIRA, et al 2006).

O uso da biologia molecular se destaca por auxiliar nas investigações epidemiológicas, no controle e tratamento de doenças parasitárias (CAVALCANTI; LORENA; GOMES, 2008). Os primeiros trabalhos de PCR na fauna flebotomínica foram descritos nas Américas (BRUIJN; BARKER, 1992). Segundo Perez e colaboradores (1994), a técnica de PCR permite detectar DNA de protozoários em flebotomíneos independentemente do número de parasitos, do estágio de desenvolvimento ou da localização dos mesmos dentro do vetor.

Vários pesquisadores têm se dedicado a estudar e a compreender melhor a infecção de flebotomíneos por *Leishmania*. A classificação das espécies como vetoras seguem os critérios sugeridos por Killick-Kendrick (1990). Alguns destes critérios são: ser uma espécie antropofílica; se alimentar de alguma espécie vertebrada que possua o papel de reservatório; sua dispersão deve coincidir com a distribuição da doença nos humanos; as espécies de *Leishmania* isoladas dos flebótomos devem ser as mesmas isoladas dos hospedeiros vertebrados; os insetos devem ser permissivos à infecção por *Leishmania* spp. e também serem capazes de transmitir o parasito entre mamíferos através do repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 1990, WHO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos capturados no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Objetivo Específico

Testar iniciadores para os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* específicos a partir dos flebotomíneos coletados na área de estudo.

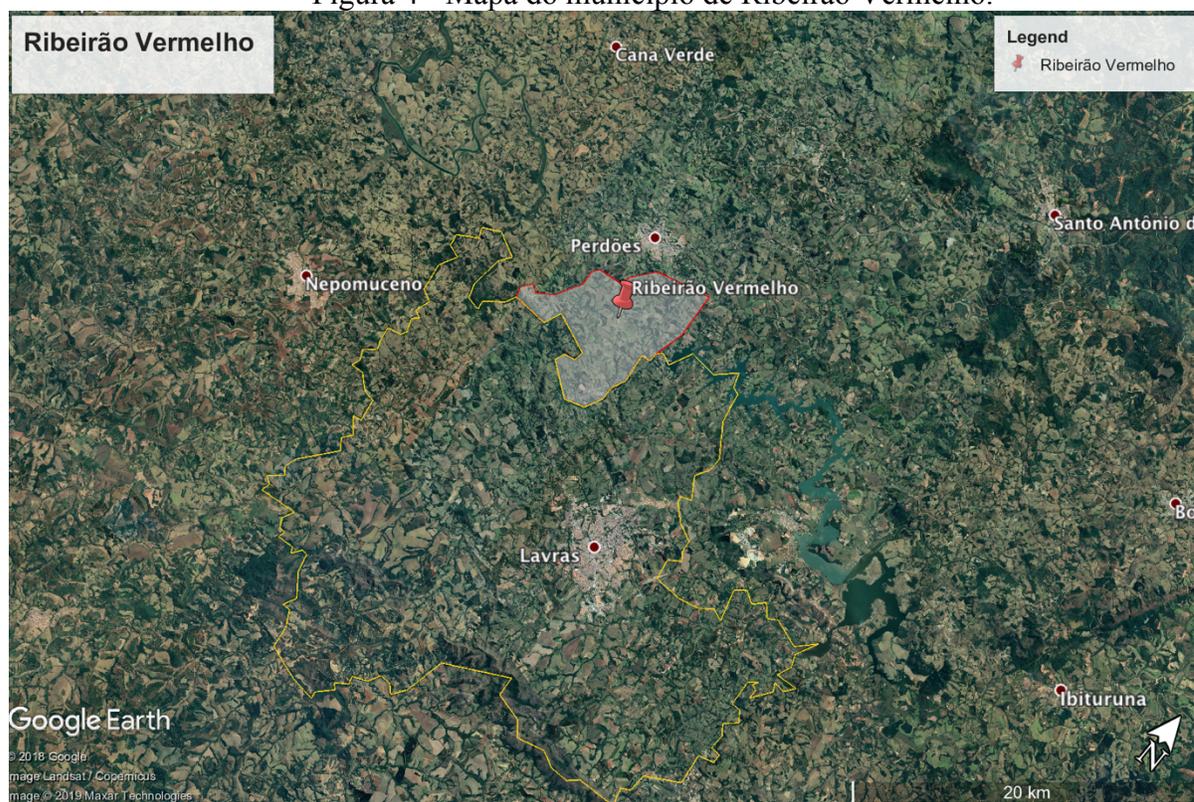
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

Ribeirão Vermelho é um município vizinho de Lavras e localizado ao Sul do estado de Minas Gerais (FIGURA 4). Possui uma população estimada de 4.033 habitantes (IBGE, 2019) e, de acordo com dados da Vigilância em Saúde de Ribeirão Vermelho a partir das últimas campanhas de vacinação antirrábica, a população de cães é de aproximadamente 1200 animais (RIBEIRÃO VERMELHO, 2017).

Está localizado há cerca de 12 km de Lavras e 270 km de Belo Horizonte. É um dos menores municípios do Estado, com apenas 49.251 km² de área total. O município está localizado na Mesorregião do Campo das Vertentes e na Microrregião de Lavras. O bioma predominante é a Mata Atlântica e o Rio Grande compõe sua principal bacia hidrográfica. O crescimento, tanto populacional quanto econômico, está ligado à implantação da ferrovia na região (IBGE, 2019; RIBEIRÃO VERMELHO, 2019).

Figura 4 - Mapa do município de Ribeirão Vermelho.



Fonte: Google Earth (2019).

4.2 Extração de DNA

As extrações foram realizadas a partir de flebotomíneos coletados por Alvarenga (2019). As coletas foram realizadas em Ribeirão Vermelho utilizando armadilhas luminosas tipo HP, uma tecnologia adaptada da armadilha CDC (*Centers for Disease Control – EUA – CDC*, 2008). As coletas foram mensalmente realizadas, no período entre fevereiro de 2018 a maio de 2019, onde armadilhas eram instaladas e permaneciam ligadas nos locais de coleta por três dias consecutivos, das 18h às 6h do terceiro dia (ALVARENGA, 2019).

O flebotomíneos também foram identificados por Alvarenga (2019), no qual os espécimes eram pertencentes à cinco espécies e um gênero: *Lutzomyia longipalpis*, (FRANÇA; PARROT, 1921), *Migonemyia migonei*, *Expapillata firmatoi* (BARRETO, MARTINS; PELLEGRINO, 1956), *Evandromyia cortelezzii* (BRÈTHES, 1923), *Pintomyia fischeri* e *Brumptomyia spp.* (ALVARENGA, 2019).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Um inseto por vez foi macerado em microtubos autoclavados de 1,5mL. Depois acrescentou-se 50µL de tampão de lise contendo NaCl (0,08 M), sacarose (0,18 M), EDTA (0,06), SDS a 0,5%, Tris-CL (0,1), pH 8,6. As amostras foram colocadas em banho maria a 65°C durante 30 minutos e depois foram adicionados 7,1µL de acetato de potássio (8 M). As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 30 minutos em geladeira a 4°C. As mesmas foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000g e o sobrenadante foi transferido para novos tubos que receberam 100µL de etanol a 95%.

Em seguida, foi realizada outra centrifugação por 10 minutos a 13.000g. Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado invertido contra um papel absorvente para secar. Em seguida, adicionaram-se 100µL de etanol 70% ao tubo já seco, passando pela centrífuga a 13.000g por 10 minutos. Por fim, foi descartado o sobrenadante e o tubo foi colocado novamente invertido em um papel absorvente para secar. Ao final, adicionaram-se 30µL de água ultrapura estéril para a hidratação do DNA de cada amostra.

Após a extração, todas as amostras foram submetidas à espectrofotometria ($A_{260/280}$) no aparelho NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, a fim de se verificar a concentração e qualidade do DNA das amostras.

4.3 PCR subgênero específico

A presença de DNA de *Leishmania* foi detectada por PCR usando iniciadores subgênero específicos desenhados por Cardoso e colaboradores (2019), cujo alvo foi uma sequência de 135 pares de bases (pb) do DNA de cinetoplasto (kDNA) do subgênero *Leishmania* e 70 pb do DNA de cinetoplasto do subgênero *Viannia*. O delineamento da PCR também foi definido de acordo com o protocolo utilizado no trabalho de Cardoso e colaboradores (2019).

A reação utilizando iniciadores para o subgênero *Leishmania* foi preparada para um volume final de 20 μ L contendo de 20ng DNA das amostras testadas, além de 4 μ L da solução tampão GoTaq Green 5x, 2,0 μ L de dNTP a 2,0 mM, 1 μ L dos iniciadores kDNA Leish F/R (5' CGTGGGGGAGGGGCGTTCT 3') e (5' CCGAAGCAGCCGCCCTATT 3') a 10 μ M, 0,25 μ L de Taq DNA Polimerase a 5U/ μ L e volume complementar de água ultrapura.

A reação utilizando os iniciadores subgênero *Viannia* específicos seguiu os mesmos procedimentos. Porém, os iniciadores usados foram MP1L (5' TACTCCCCGACATGCCTCTG 3') e MP3H (5' GAACGGGGTTTCTGTATGC 3') a 10 μ M.

A amplificação foi processada no aparelho termociclador Applied Biosystems™ da seguinte forma: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C para as amostras com iniciadores subgênero *Leishmania* específicos e a 60°C para iniciadores subgênero *Viannia* específicos por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por 7 minutos.

Foi empregado como controle negativo a extração de DNA de flebotomíneos machos e criados em laboratório. Além desse controle negativo com flebotomíneos, foram utilizados controles negativos sem DNA, apenas com os reagentes da PCR. E como controles positivos foram empregadas duas cepas de laboratório com *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).

Ao final, as amostras foram submetidas à eletroforese em um gel de agarose a 3,0% que foi preparado utilizando 160 mL de tampão TAE 1X, 4,8g de agarose e 7,5 μ L de brometo de etídio. Um padrão de peso molecular Kasvi de 100 pb foi utilizado. Após a solidificação da solução, esta foi colocada em uma cuba com TAE, submetidas a 140V por cerca de 40 minutos. Posteriormente, o resultado foi revelado no foto documentador Gel Doc™ EZ Imager.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fêmeas dos flebotomíneos coletadas por Alvarenga (2019), foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction - PCR) dirigida ao ITS 1 (EL TAI et al., 2000) utilizando-se iniciadores gênero específicos, na qual 21 amostras foram positivas. Posteriormente as mesmas amostras foram submetidas à técnica do polimorfismo de comprimento de fragmento (RFLP) (CASTRO, 2017), obtendo-se resultados negativos para esta técnica. Devido a este fato, foi realizado no presente trabalho a PCR utilizando iniciadores para subgêneros específicos.

Com fins didáticos, foi adotado o termo infecção como sendo a presença de DNA de *Leishmania* no flebotomíneo, ou seja, uma evidência da presença do parasito no vetor.

Em duas das 21 amostras não foi possível realizar a PCR devido a concentração extremamente baixa de DNA (TABELA 1).

Tabela 1 - Concentração de DNA das amostras.

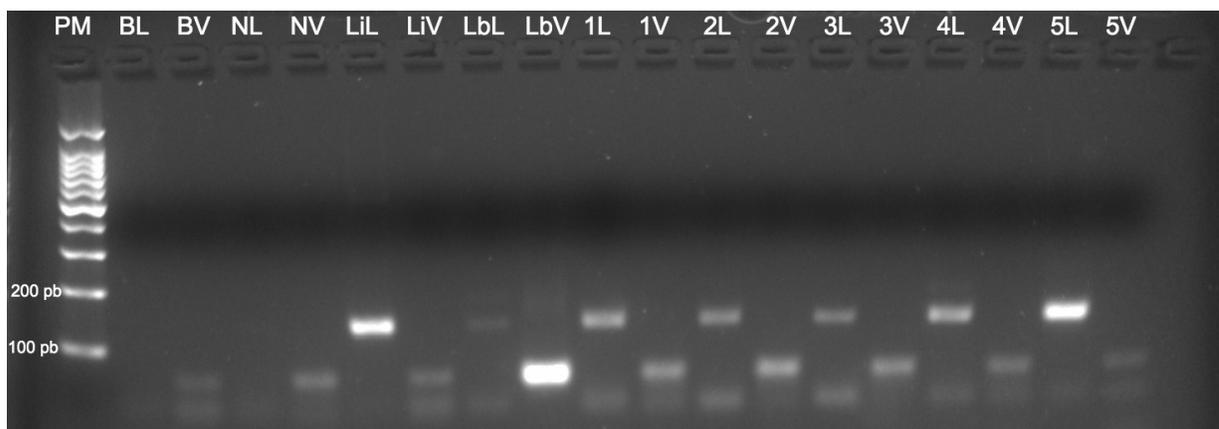
Código da amostra	Concentração de DNA (ng/μL)
1	23,5
2	8,6
3	8,7
4	14,9
5	7,0
6	17,4
7	6,9
8	5,6
9	6,9
10	9,7
11	8,3
12	6,0
13	5,6
14	6,1
15	5,3
16	8,5
17	8,6
18	9,0
19	6,7
20	1,9
21	2,1

Fonte: Do autor (2019).

Através da análise molecular, foi detectada uma positividade de 100% (19/19) das amostras referentes ao subgênero *Leishmania* conforme demonstrado nas Figuras 5, 6 e 7. Esses resultados confirmam a positividade das amostras pela técnica de PCR com ITS1 para o gênero *Leishmania*. Porém, também foi identificada uma contaminação nas amostras com *primers* para o subgênero *Viannia*, invalidando os resultados neste caso (FIGURAS 5, 6 e 7). A contaminação pode ser observada conforme a aparição de bandas espúrias evidenciadas nos controles negativos da Figura 1, nas canaletas BV e NL. Além disso, as últimas bandas ressaltadas na região inferior do gel, cerca de 50 pb, são dímeros de primer.

Os espécimes foram codificados de 1 a 19 antes da realização da PCR para a facilitar a compreensão durante a realização dos procedimentos.

Figura 5 - Gel de agarose representando os produtos da PCR utilizando iniciadores para os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.



Legenda: **PM**: marcador de peso molecular (100pb);

BL e BV: Controles negativos sem DNA (*primers* subgêneros *Leishmania* e *Viannia* específicos respectivamente);

NL e NV: Controles negativos com flebotômios machos (*primers* subgêneros *Leishmania* e *Viannia* específicos respectivamente);

LiL: Controle positivo com *L. (L). infantum** (*primers* subgênero *Leishmania* específicos);

LIV: Controle negativo com DNA de *L. (L). infantum* (*primers* subgênero *Viannia* específicos);

LbL: Controle negativo com DNA de *L. (V). braziliensis** (*primers* subgênero *Leishmania* específicos);

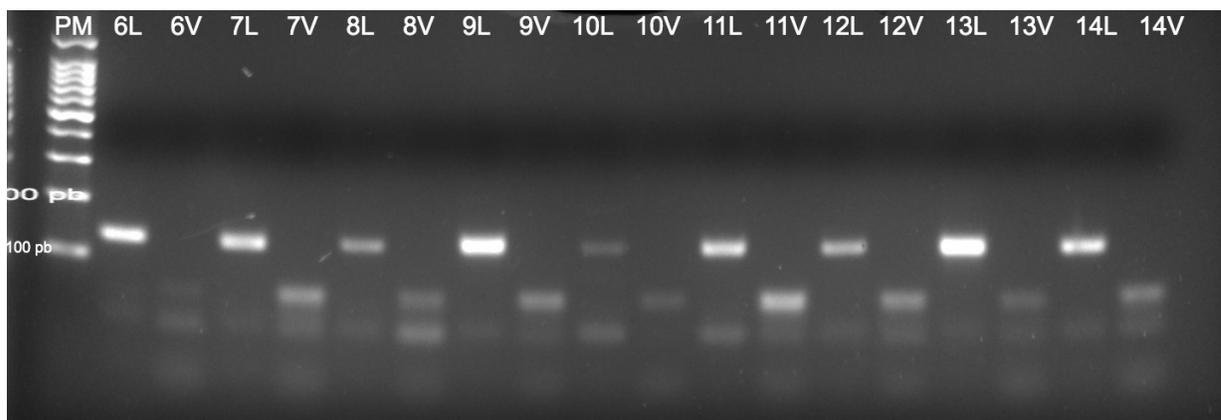
LbV: Controle positivo com DNA de *L. (V). braziliensis* (*primers* subgênero *Viannia* específicos).

1L a 5V: amostras de flebotômios alternadas com *primers* para os subgêneros *Leishmania* (**L**) e *Viannia* (**V**).

*Cepas utilizadas para controles positivos: *L. (L). infantum* (MHOM/BR/1974/PP75); *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).

Fonte: Do autor (2019).

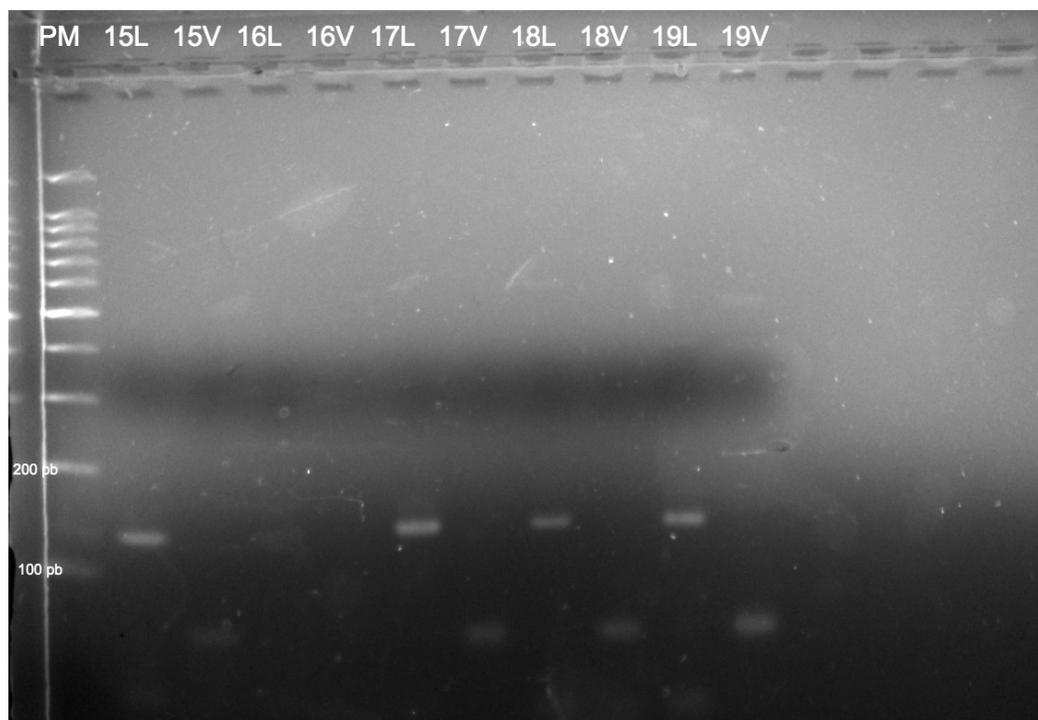
Figura 6 - Gel de agarose representando os produtos da PCR utilizando iniciadores para os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.



Legenda: **PM**: marcador de peso molecular (100 pb);
6L - 14V amostras de flebotomíneos alternadas com *primers* para os subgêneros *Leishmania* (**L**) e *Viannia* (**V**).

Fonte: Do autor (2019).

Figura 7 - Gel de agarose representando os produtos da PCR utilizando iniciadores para os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*



Legenda: **PM**: marcador de peso molecular (100 pb);
15L - 19V amostras de flebotomíneos alternadas com *primers* para os subgêneros *Leishmania* (**L**) e *Viannia* (**V**).

Fonte: Do autor (2019).

A relação dos códigos das amostras com o gênero ou as espécies identificadas das amostras analisadas estão representadas conforme na Tabela 2.

Tabela 2 - Amostras dos flebotomíneos com sua respectiva espécie ou gênero identificados.

Código da amostra	Gênero/Espécie
1	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
2	<i>Brumptomyia sp.</i>
3	<i>Brumptomyia spp.</i>
4	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
5	<i>Migonemyia migonei</i>
6	Sem identificação*
7	<i>Expapillata firmatoi</i>
8	<i>Evandromyia cortelezzi</i>
9	Sem identificação*
10	Sem identificação*
11	<i>Brumptomyia spp.</i>
12	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
13	<i>Expapillata firmatoi</i>
14	Sem identificação*
15	<i>Pintomyia fischeri</i>
16	<i>Migonemyia migonei</i>
17	<i>Expapillata firmatoi</i>
18	<i>Migonemyia migonei</i>
19	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
20	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
21	<i>Migonemyia migonei</i>

Legenda: *não foi possível realizar a identificação da espécie/gênero.

Fonte: Do autor (2019).

Atualmente, cerca de 53 espécies de *Leishmania* já foram descritas. Destas, 31 espécies são conhecidas por parasitarem mamíferos e 20 são de importância médica (AKHOUNDI, 2016). Essas espécies estão divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, classificados de acordo com o desenvolvimento do parasito no intestino do flebotomíneo (LAINSON; SHAW, 1987).

Há duas espécies do gênero *Leishmania* que se destacam por serem as mais prevalentes na região: *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* (BRASIL, 2017; LUKES, 2007). Os resultados válidos da PCR indicam que o DNA do subgênero *Leishmania* detectado nos

flebótomos analisados, com base no conhecimento epidemiológico e taxonômico, possivelmente pertencem a *L. infantum* ou *L. amazonensis*.

Leishmania amazonensis é uma importante espécie do subgênero *Leishmania* que causa as quatro formas clínicas da leishmaniose tegumentar (LT): a leishmaniose cutânea localizada, a disseminada, a mucocutânea e a difusa (ANVERSA et al, 2018). Está distribuída no Brasil, principalmente em áreas florestais da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão) e também em outros estados como Bahia, Minas Gerais e Goiás e Paraná (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL 2017). A espécie de flebotomíneo apontada como vetor de *L. amazonensis* é *Bichromomyia flaviscutellata* (MANGABEIRA, 1942) (SILVEIRA, et al 1991).

Embora não tenha sido encontrada esta espécie de vetor na área de estudo, espécies como *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* já foram encontradas infectadas por *L. amazonensis* nos estados do Ceará e Bahia (NOGUEIRA, et al 2017). Cardoso e colaboradores (2019) também encontraram o mesmo parasito nos flebotomíneos *L. longipalpis* em Minas Gerais. Um estudo realizado por Silva (2019) detectou 48 flebotomíneos positivos para o gênero *Leishmania*, nas espécies *L. longipalpis*, dois de *Lutzomyia renei*, um de *Evandromyia cortelezzii* e de *Expapillata firmatoi*, sendo a taxa de infecção de 0,37% para o gênero. A detecção positiva para o subgênero *Leishmania* em flebotomíneos *M. migonei* e *L. longipalpis* achada neste estudo pode sugerir uma possível infecção por *L. amazonensis*, o que pode estar corroborando com os trabalhos descritos. Não há relatos na literatura de infecção por *L. amazonensis* em *E. cortelezzii*, *E. firmatoi* e *P. fischeri*, podendo ser este o primeiro relato da infecção destas espécies por *L. (Leishmania)*.

Apesar deste ser um parasito que acomete os seres humanos, estudos têm detectado a presença de *L. amazonensis* em cães com sintomatologia clínica de leishmaniose visceral canina (LVC) em diversos lugares, como exemplo duas cidades de Minas Gerais, Paracatu e Governador Valadares (SILVA, 2009; VALDIVIA, et al 2017; CARDOSO, et al 2019).

Um outro estudo realizado por Paz e colaboradores (2018) também demonstrou que pode ocorrer a reatividade cruzada da infecção por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em cães sem manifestações clínicas de LVC que foram positivos no teste imunocromatográfico (DPP-Bio-Manguinhos). Esses resultados demonstram uma das dificuldades em aplicar ações de controle para a leishmaniose visceral (LV). A identificação das espécies de *Leishmania* é importante para

evitar a eutanásia desnecessária de cães. Portanto, os programas de controle das leishmanioses não devem se basear apenas em testes sorológicos, pois eles não permitem a identificação das espécies (SANCHES et al, 2016).

O cão possui grande importância na epidemiologia da LV por ser a principal fonte de infecção de vetores em áreas urbanas e periurbanas, mantendo o ciclo de vida dos parasitos (BANETH et al, 2008). Há estudos investigando a importância do cão na epidemiologia das espécies dermatrópicas de *Leishmania*, porém, nada foi comprovado (DANTAS-TORRES, 2007).

A outra espécie possível para o subgênero *Leishmania* no contexto deste trabalho é *L. infantum* que é responsável pela LVC e pela leishmaniose visceral humana (LVH) (LUZ, et al 2019). Este parasito possui como vetor o flebotomíneo *L. Longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005) e na sua ausência, o *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al, 1998).

Um estudo avaliou pela primeira vez a susceptibilidade de *M. migonei* a duas cepas de *L. infantum* e comparou o desenvolvimento dos parasitos nesta espécie com *L. longipalpis*. Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao desenvolvimento em ambas as espécies de flebotomíneos. Como conclusão, foi analisado que a antropofilia da espécie, somado à abundância em focos de LV e à infecção natural por *L. infantum*, compõe uma evidência importante de que *M. migonei* pode ser outro vetor do parasito no Brasil (GUIMARÃES, 2016).

Rêgo (2013) averiguou a presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos coletados em Porto Alegre. Foram analisadas 113 amostras de flebotomíneos, sendo que cinco delas eram *P. fischeri* e foram positivas na PCR para *L. infantum*. Este estudo registrou a primeira detecção molecular de *L. infantum* em *P. fischeri* e levantou a possibilidade de que esta espécie possa estar envolvida no ciclo de transmissão do parasito na área estudada (RÊGO, 2013). Outro trabalho também demonstrou a presença de *L. infantum* em flebotomíneos coletados identificados e submetidos à PCR no município de Pains localizado no estado de Minas Gerais. Das 20 espécies de insetos identificados, duas eram *E. cortelezzi* e *E. firmatoi* que estavam infectadas com o parasito (SILVA, 2019).

De acordo com o presente estudo, as espécies *M. migonei*, *E. cortelezzi*, *E. firmatoi* e *P. fischeri* foram positivas para o subgênero *Leishmania*, havendo possibilidade das mesmas

estarem infectadas por *L. infantum*. Os flebotomíneos do gênero *Brumptomyia* sp. indentificados entre as amostras neste trabalho foram positivas na PCR para o subgênero *Leishmania*. Porém, na literatura não há relatos da infecção por *Leishmania* neste inseto no Brasil, sendo este o primeiro relato da presença de DNA do subgênero *Leishmania* em *Brumptomyia* sp. Isto reforça a necessidade de mais estudos sobre o perfil epidemiológico da infecção por *Leishmania* em flebotomíneos. Nas Américas já foi confirmada a presença de *Leishmania* sp. em flebotomíneos *Brumptomyia leopoldoi* em um estudo no Equador (QUIROGA, et al 2017).

Visto que o subgênero *Leishmania* abrange as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* de importância médica no país, estes resultados são importantes, pois podem auxiliar a elucidar os possíveis ciclos de transmissão na área de estudo, como ocorreu em Lavras. Através de estudos anteriores foi registrado sorologia positiva de cães para LVC (BLANCO, 2019), a presença de *L. longipalpis* (BARCELOS et al, 2015), a infecção natural de *L. longipalpis* por *Leishmania* spp. (CASTRO et al, 2019) e registrado casos de LVH (NARCISO, et al 2018; SINAN, 2019).

Alvarenga (2019) desenvolveu um estudo em Ribeirão Vermelho em que foram realizados testes DPP® em 348 animais, e destes 14 foram positivos também para o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Dois destes cães positivos foram eutanasiados e posteriormente a infecção foi confirmada pelos métodos parasitológico e molecular. Alvarenga (2019) também identificou a presença de *L. longipalpis* no município. Desta forma, há a possibilidade de ocorrência de um ciclo de transmissão de LV neste município. Vale ressaltar que a distribuição das espécies de *Leishmania* está entre vários fatores relacionados à presença dos seus vetores e de seus hospedeiros.

Para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneos, os métodos moleculares têm sido muito utilizados. A PCR é uma ferramenta eficiente em estudos epidemiológicos na detecção de DNA do parasito em diversos hospedeiros como o homem, animais silvestres e domésticos, e flebotomíneos. Porém, esta técnica não detecta necessariamente a infecção ativa pelo protozoário, mas é mais utilizada como evidência da presença do parasito nos seus hospedeiros.

Outro resultado analisado neste estudo foi a contaminação dos controles negativos referentes ao subgênero *Viannia*. Consequentemente, todas as outras amostras apresentaram a banda alvo (70 pb), exceto na amostra 101V. Provavelmente, o que aconteceu neste caso foi

uma inibição de reação, visto que devido a contaminação esperava-se que aparecesse uma banda em todas as amostras e neste caso não apareceu nenhuma.

A contaminação cruzada entre ácidos nucleicos exógenos presentes no ambiente de trabalho é uma das principais razões de invalidação da PCR. Por ser esta técnica muito sensível, a PCR é vulnerável à contaminação. As fontes deste problema podem ser os reagentes, instrumentos descartáveis, transferência de amostras, procedimentos de manuseio inadequado entre outros (ASLANZADEH, 2004).

A inibição da PCR pode ser resultado de uma manipulação inadequada das amostras ou da presença de inibidores nos reagentes, nos tubos e nos jalecos. Outro motivo para a inibição pode ser a extração de DNA baseada na utilização de fenol que, apesar de fornecer alto rendimento, comumente resulta em amostras com graus variáveis de pureza. Isto pode comprometer a qualidade do DNA caso resíduos de fenol permaneçam na amostra. O fenol pode inibir a ação da enzima Taq DNA polimerase impedindo o processo de amplificação do DNA (MCCORD; PIONZIO; THOMPSON 2014).

Outra importante origem de contaminação é a não eliminação de *amplicons* que se acumulam no ambiente de trabalho. Quantidades mínimas de contaminantes podem levar a resultados falso-positivos e os produtos de amplificação podem contaminar reagentes de laboratório, equipamentos e até sistemas de ventilação. Esta é considerada a principal fonte de contaminação (ASLANZADEH, 2004).

Outros fatores que prejudicam os resultados de PCR são: as condições inadequadas de armazenamento do DNA (STEPHEN, et al 2009), a realização de todas as etapas da reação no mesmo ambiente e várias pessoas manuseando as mesmas amostras. Geralmente, a fase de detecção dos produtos da amplificação é mais susceptível a contaminações. No entanto, é possível evitar essas fontes de contaminantes através da separação de ambientes, métodos químicos, físicos, entre outros (ASLANZADEH, 2004).

Quanto a separação de ambientes, recomenda-se que a estrutura do laboratório deva ser dividida em áreas diferentes para a extração de DNA, preparação de *master mix* e amplificação/revelação. Recomenda-se também que todas estas etapas sejam executadas em um fluxo unidirecional. Os métodos químicos envolvem as práticas gerais de limpeza, em que todas as superfícies devem ser rotineiramente descontaminadas para evitar contaminação cruzada.

Também é necessário que os instrumentos utilizados estejam limpos. O método de irradiação UV é um método físico fácil e prático que auxilia na eliminação de produtos de amplificação envolvidos na contaminação (ASLANZADEH, 2004).

Outro problema potencial para a PCR é a inibição da reação. Para se certificar de que a inibição não aconteceu por perda do material genético, deve-se utilizar controles endógenos para a amplificação de genes constitutivos específicos, neste caso, de flebotomíneos. Isto permite a certificação adequada da extração de DNA e a identificação correta de resultados falsos-negativo (LINS et al, 2002).

As bandas observadas ao final dos géis, são dímeros de *primers*. Eles geralmente possuem cerca de 30 a 50 pb e os *primers* utilizados no trabalho amplificam fragmentos de 70 ou 135 pb, por isso, são facilmente distinguidos das bandas de interesse. Isso é comum de acontecer quando os *primers* estão em concentrações elevadas (RYCHLIK, 1995). Por tanto, para se evitar este acontecimento, é necessário analisar se as concentrações dos *primers* estão adequadas ou se deve realizar diluições.

Conclusão, parasitos do subgênero *Leishmania* ocorrem em flebotomíneos de Ribeirão Vermelho. Os resultados deste trabalho demonstram a importância e a necessidade da investigação das espécies de *Leishmania* presentes na área de estudo, para se ter uma visão mais ampla sobre a situação epidemiológica da região. Apesar da presença do DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos não ser suficiente para garantir a competência vetorial das espécies analisadas, esta é uma condição que deve ser considerada e avaliada principalmente se os flebotomíneos forem antropofílicos.

A correta identificação das espécies de flebotomíneos presentes em uma área, bem como as espécies de *Leishmania* que os infectam auxilia na compreensão da epidemiologia das leishmanioses e também no planejamento e adoção de medidas de prevenção e controle apropriadas do agravo.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho aponta para a necessidade de mais conhecimentos sobre os flebotomíneos e parasitos do gênero *Leishmania* presentes no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais. Estudos em maior escala sobre as leishmanioses na área de estudo devem ser realizados para se obter mais dados epidemiológicos sobre o agravo. Isto inclui mais inquéritos diagnósticos, coletas de flebotomíneos, identificação das espécies destes insetos e dos parasitos presentes. Além disso, as reações de PCR para o subgênero *Viannia* das amostras deste trabalho devem ser repetidas com maior rigor técnico, visando-se evitar contaminação das mesmas como aconteceu neste estudo. Assim, o resultado da infecção nos flebotomíneos por parasitos do gênero *Viannia* poderão ser analisados e complementarão os resultados encontrados.

De maneira geral, este conjunto de estudos visa subsidiar as medidas de controle das leishmanioses em Ribeirão Vermelho. Visto que o conhecimento sobre o perfil epidemiológico de infecção de *Leishmania* em flebotomíneos pode auxiliar na implementação de ações de combate mais efetivas e direcionadas contra as leishmanioses que estão ocorrendo na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, S. et al. Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. **The British Medical Journal**, v. 329, p. 842-844.
- AKHOUNDI, M., et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349.
- ALVARENGA, I. M. **Leishmaniose visceral**: caracterização de uma nova área de transmissão, de um antigo problema de saúde pública. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. **Organización Panamericana de salud**, Rio de Janeiro, p. 94-98, 2006.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, mar. 2018.
- ARAÚJO, V. E. M. et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2540, 2013.
- ASLANZADEH, J. Brief Review: Preventing PCR Amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 34, n. 4, p. 389-396, 2004.
- BADARÓ, R. et al. A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, out. 1986.
- BADARO, R. et al. New Perspectives on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003-1011, 1986.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-230, 2008.
- BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.
- BARÇANTE, T. A et al. First report of *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) and *Pintomyia fisheri* (Pinto, 1926) in a transmission area of American cutaneous Leishmaniasis, in south of Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Dairy. Veterinary & Animal Research**, v. 7, n.3, p.99-101, 2018.

BARCELOS, A. L. et al. Fauna flebotômica do município de Lavras, MG: dados preliminares. In: **XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UFLA**, Lavras, 2015.

BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**. v. 99, p. 125-146, 1989.

BASANO, S. A. CAMARGO, M. L. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3. P. 328-337.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097- 1106, 2007.

BLANCO, Y. A. C. **Identification and observational epidemiological study of flebotomine fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the transmission area of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Lavras-MG, Brazil**. 2019. 49p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal de Lavras, 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. **Sinan/SVS/MS**. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. **Sinan/SVS/MS**. 2018. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1 ed. Brasília/DF, 25 p. 2016.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 ed. Brasília/DF, 706 p. 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose tegumentar 2017**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2017. 19 p. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/Leish-2017-novo-layout.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose visceral 2017**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2017. 25 p. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília/DF, 120 p., 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília/DF, 191 p. 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília/DF, 180 p., 2010.

BRUIJN, M. H., BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropical**, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

BOGDAN, C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, p. 60-66, abr. 2012.

BORGES, B. K. A.; et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BURZA, S., CROFT, S. L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, p. 951-970 2019.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e Kalazar. **Ciência e cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, jan./mar, 2003.

CAÑADAS, M. P., et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH em los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. **Salud pública de México**, v .48, n. 5, set/out 2006.

CASTRO, J.C. **Investigação da fauna flebotomínica e sua infecção por *Leishmania spp.*, no município de Lavras, MG, Brasil**. 58 p. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

CASTRO, J. C. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Lavras, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 52, n.9, ago. 2019.

CARDOSO, M. S. et al. Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0211831, 2019.

CAVALCANTI, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Parasitologia tropical**, v. 37, n. 1, p. 1-14, jan-abr 2008.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n.21, p. 539–543, nov. 1997.

COSTA, L. E. S. **Diversidade de Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e detecção molecular de parasitas do gênero *Leishmania* no município de Bom Jesus dos Perdões, estado de São Paulo.** 60 p. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia De Leishmaniose Visceral No Estado Do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, p. 361-72, 1990.

COSTA, L. N. G. **Aplicação da técnica de PCR para o diagnóstico e monitoramento da leishmaniose tegumentar e visceral na região de Campinas-SP e de Teresina-PI.** 2014. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil:** estudos sobre reservatórios e transmissores realizados do Estado do Ceará. 162 p. 1956. Tese, Serviço Nacional de educação sanitária, 1956.

DESBOIS, N. et al. *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). **Parasite**, v. 21, p. 12, 2014.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n.5, p. 305-318, set. 2004.

DAHER, E. F. Clinical Presentation and Renal Evaluation of Human Visceral Leishmaniasis (Kala-azar): A Retrospective Study of 57 Patients in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 329-332, 2008.

DIAS, E. S. et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 176, n. 2, p. 101-111, 2011.

DOMINGUÉZ, O. A. E. **Diversidade, taxonomia e filogenia de tripanossomatídeos da subfamília Leishmaninae.** 2015. 47 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DUTHIE, M. S.; LISON, A.; O. COURTENAY. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 881-890, 2018.

EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2016.

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

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 1, p. 7-25, 2014.

GALVIS-OVALLOS, F. et al, Canine visceral Leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, n. 2, p. 10, 2017.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOOGLE. Google Earth Pro. Version 7.3 2019. Ribeirão Vermelho. Disponível em: <<https://www.google.com.br/earth/versions/>>. Acesso em: 3 nov. 2019.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

GUIMARÃES, V. C. F. V. **Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* (Diptera:Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum***. 2016. 84 p. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2016.

GUIMARÃES, V. C. F. V. *Leishmania amazonensis* DNA in wild females of *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 159, 2016.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **População estimada**, Ribeirão Vermelho, 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/ribeirao-vermelho/panorama>>. Acesso em: 18 out. 2019.

JHA, P. K. et al. Postrenal transplant laryngeal and visceral leishmaniasis - A case report and review of the literature. **Indian Journal of Nephrology**, v. 22, n. 4, p. 301-3, jul. 2012.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, jul. 2015.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1-24, 1990.

LAINSON, R. 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.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v. 1, 120 p., 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LINDEMBERG, A. A úlcera de Bauru e seu o micróbio. Comunicação preventiva. **Revista médica de São Paulo**, v. 12, p. 116-120, 1909.

LINS, R. M. M. A, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Molecular Biology**, v. 11, p. 117-122, 2002.

LOPES, E. G. P et al. Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1062-1071, 2010.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, mai. 2007.

LUZ, J. G. G. Where, when, and how the diagnosis of human visceral leishmaniasis is defined: answers from the Brazilian control program. **Memorial Institutot Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, p. e190253, 2019.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travellers: a literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, p. 563–581, 2014.

MCCORD, B.; PIONZIO, A.; THOMPSON, P. Analysis of the Effect of a Variety of PCR Inhibitors on the Amplification of DNA using Real Time PCR, Melt Curves and STR Analysis. **National Criminal Justice Reference Service**. 167 p. 2015. Disponível em: <<https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/249148.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MOYA, S.L. et al. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Tropica**, v. 152, p. 181–184, 2015.

MICHALSKY, E. M, et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, p. 255–259, 2002.

MITCHELL, C. et al. Cross-contamination during processing of dried blood spots used for rapid diagnosis of HIV-1 infection of infants is rare and avoidable. **Journal of Virological Methods**, v. 163, n. 2, p. 489-491, 2010.

MOREIRA, J. Existe na Bahia o botão de Biskra: estudo clínico. **Gazeta Médica da Bahia, Salvador**, v. 26, p. 254-258. 1895.

NARCISO, T. P. et al. First report of an autochthonous human visceral leishmaniasis in a child from the South of Minas Gerais State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 61, 2019.

NARCISO, T. P. **Investigação do estado da leishmaniose visceral canina no município de Lavras-MG**. 2016. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

NOGUEIRA, M. N. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in the permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 608, 2017.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. et al. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 540-543, nov-dez 2006.

PAHO/WHO. Pan American Health Organization: Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. **Leishmaniasis Report**, Washington, n. 7, mar. 2019.

PALUMBO, E. Treatment Strategies for Mucocutaneous Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 147-150, 2010.

PAZ, G. F., et al. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Tropica**, v. 182, p. 198-201, 2018.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. In: GONTIJO; MELO, 2004. **Brasil Médico**, v. 48, p. 949-50, 1934.

PEREIRA, D. de P. **Avaliação de infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), por *Leishmania* spp. empregando ensaios de PCR multiplex e PCR em tempo real.** 2010. 176 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária)- Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

PEREZ, J.E et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88n. 2, p. 161-164, 1994.

PIRAJÁ, G. V.; LUCHEIS, S. B. a vigilância epidemiológica de flebotomíneos no planejamento de ações de controle nas leishmanioses. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 4, p. 503-515, 2014.

QUIROGA, C. Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 6, p. 1704–1711, 2017.

RÊGO, F. D. **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil.** 151 p. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2013.

RÊGO, F. D. et al. Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122038, 2015.

RIBEIRÃO VERMELHO, Prefeitura Municipal. História de Ribeirão Vermelho. Ribeirão Vermelho, 2019. Disponível em: <http://ribeiraovermelho.mg.gov.br/cont_pag1.asp?pag=41>. Acesso em: 21 out. 2019.

RIBEIRÃO VERMELHO. Prefeitura Municipal. **Vigilância Ambiental e Epidemiológica.** Dados das campanhas de vacinação antirrábica do município, 2017.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, p. 20-27, 2014.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–275, 1990.

ROGERS, M. E. The Role of *Leishmania* Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 223, 2012.

- ROSSI, E. et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Tropical**, v.105, n.2, p.158-165, 2008.
- RYCHLIK, W. Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. **Molecular Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 129-34.
- SANCHES, L. C, et al. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 465-469, 2016.
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SANTOS, M. J. B. M et al. Inquérito sorológico para leishmaniose visceral canina no município de Lavras-MG: dados preliminares. In: **Anais do VXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**, Gramado, 2014.
- SHAW, J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 541-547, 2007.
- SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos de Leishmaniose Tegumentar SRS de Varginha.
- SILVA, D. F. **Aspectos epidemiológicos das leishmanioses no município de Pains, centro oeste mineiro**. 89 p. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2019.
- SILVA, S. R. **Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina**. 110 P. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2009.
- SILVA, V. G. **Aspectos entomológicos e infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em municípios do estado de São Paulo com autoctonia de transmissão de leishmaniose visceral humana e/ou canina**. 2016. 135 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Coordenadoria de Controle e Doenças)- Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2016.
- SILVEIRA, S.T, et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 85, p. 735-738, 1991.
- SANTOS, S. O, et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998.

STEPHEN, A.B. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 82, 2017.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. **Anais Brasileiros em Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canineisolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40804, 2017.

WHO, World Health Organization. 2019. Disponível em:
<https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 17 out. 2019.

_____. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2016. Disponível em:
<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_wit_h_imported_cases.pdf?ua=1>. Acesso em 29 nov. 2019.

_____. **Control of the leishmaniases:** report of a meeting of the World Health Organization Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 22–26 March 2010. Disponível em:
< <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>>. Acesso em: 26 nov. 2019.