



35^o
Bonito - MS

ANAIS do 35^o Congresso Brasileiro de Espeleologia
19 - 22 de julho de 2019 - ISSN 2178-2113 (online)



O artigo a seguir é parte integrando dos Anais do 35^o Congresso Brasileiro de Espeleologia disponível gratuitamente em www.cavernas.org.br.

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

COSTA, F.L.B.; ALVES, V.S. A biologia molecular como ferramenta de trabalho, a identificação de phlebotominae na Gruta do Ballet. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 35, 2019. Bonito. *Anais...* Campinas: SBE, 2019. p.700-704. Disponível em: http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe_700-704.pdf. Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia.
Consulte outras obras disponíveis em www.cavernas.org.br

A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE TRABALHO, A IDENTIFICAÇÃO DE PHLEBOTOMINAE NA GRUTA DO BALLET MATOZINHOS – MINAS GERAIS

MOLECULAR BIOLOGY AS A WORKING TOOL, THE IDENTIFICATION OF PHLEBOTOMINAE IN BALLET CAVE

Fábio Luis Bondezan da COSTA (1,2); Viviane de Souza ALVES (2)

- (1) Subterrânea Pesquisas Ambientais.
- (2) Universidade Federal de Minas Gerais.

Contatos: subterraneasl@gmail.com; gouveiava@ufmg.br.

Resumo

A Gruta do Ballet, localizada na cidade de Matozinhos-MG, se destaca por sua relevância do ponto de vista arqueológico, sendo, portanto, um importante atrativo turístico da região. Em campanha de valoração foram coletados exemplares de Flebotomíneos que podem ser transmissores do parasito causador da leishmaniose. Os exemplares coletados foram identificados por microscopia ótica com o uso de chaves, como sendo da espécie *Lutzomyia renei*. As amostras de DNA extraídas das fêmeas de flebotomíneos foram utilizadas para determinar a presença de DNA de *Leishmania*. Para isto, foi realizada a técnica PCR dirigida ao ITS1 do rDNA de *Leishmania*. Todas as amostras deram negativo para a presença do parasita, mas o monitoramento da cavidade é de fundamental importância pois estudos já relataram a presença de DNA de *Leishmania (Viannia) guyanensis* em exemplares provenientes de área endêmica para leishmaniose tegumentar.

Palavras-Chave: cavernas; Gruta do Ballet; Phlebotominae; leishmaniose tegumentar.

Abstract

The Ballet Cave, located in the city of Matozinhos-MG, stands out for your relevant archaeological point of view, be therefore an important tourist attraction of the region. In valuation campaign were collected copies of Sandfly that can be transmitters of the parasite that causes leishmaniasis. The specimens collected were identified by optical microscopy using keys, as being of the species Lutzomyia renei. The DNA samples extracted from the female sandfly were used to determine the presence of Leishmania DNA. For this, were used the PCR technique addressed to ITS1 of the rDNA of Leishmania. All samples were negative for the presence of the parasite, but the monitoring of the cavity is of fundamental importance since studies have reported the presence of Leishmania (Viannia) guyanensis DNA in specimens from endemic area for leishmaniasis integumentary.

Keywords: caves; Ballet cave; Phlebotominae; integumentary leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

A Gruta do Ballet (UTM 7840270 599030) está localizada a cerca de 40 km ao norte de Belo Horizonte, na cidade de Matozinhos, Minas Gerais, na Área de Proteção Ambiental "Carste de Lagoa Santa", importante área arqueológica, espeleológica e paleontológica no Brasil, abrigando um grande número de sítios onde foram estudados os vestígios do homem de "Lagoa Santa". A cavidade está inserida em um conjunto Cárstico de beleza cênica além de ser de grande importância arqueológica. Localiza-se a 1 km aproximadamente do Abrigo de Poções, 500 metros à direita de Chapéu, e a 4,5 km a nordeste de Matozinhos, em um rochedo calcário onde domina do alto, um riacho e uma depressão também de formação calcária.

A caverna, em calcário, possui aproximadamente 150 metros de desenvolvimento e painéis de arte rupestre pré-histórica localizados na entrada. As pinturas são muito peculiares, formando um grupo especial com características estilísticas próprias, representando antropomorfos femininos e masculinos com todos os indivíduos olhando para fora da cavidade.

A caverna está dentro da propriedade da mineradora CRH (Antiga Lafarge) que por exigência dos órgãos ambientais, investiu na criação, em sua propriedade, de uma RPPN Reserva Particular do Patrimônio Natural, e em projetos ambientais, entre eles a conservação e adequação da Gruta do Ballet à visitação (DAVID, 2003). Atualmente a área se encontra protegida e são

realizadas visitas guiadas por funcionários habilitados à cavidade.



Figura 1: Região de entrada da Gruta do Ballet.



Figura 2: Bloco rochoso com o desenho de um único antropomorfo evidenciando uma possível cena de parto.

Durante a realização de trabalho de licenciamento ambiental onde foi realizada a valoração da cavidade foram coletados exemplares de flebotomíneos que são conhecidos como possíveis transmissores de Leishmaniose visceral. Portanto a identificação de possíveis vetores da Leishmaniose e a presença ou não do parasito torna-se fundamental para a manutenção da visitação à cavidade.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve o objetivo de identificar os exemplares de flebotomíneos coletados no trabalho de valoração da Gruta do Ballet, assim como verificar por meio de identificação molecular a possível presença do parasito causador da leishmaniose visceral nos exemplares avaliados.

3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença crônica grave, causada por espécies de *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*. No Brasil, o agente etiológico *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), é transmitido ao homem através da picada de fêmeas da espécie *L. (L.) longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912). (MICHALSKY *et al*, 2011)

A leishmaniose visceral encontra-se atualmente entre as sete endemias consideradas prioritárias no Mundo. Nos últimos anos, a doença vem se tornando um importante problema de saúde pública, estando amplamente distribuída nos quatro continentes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Oriente Médio, sul da Europa, norte da África, América do Sul e Central. Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que cerca de 97% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil (MICHALSKY *et al*, 2011).

Dessa forma, em função da identificação de possíveis vetores da doença e da importância da Gruta do Ballet como local de visitação turística fez-se necessário a realização do presente estudo.

4. METODOLOGIA

Coletas dos exemplares de flebotomíneos foram realizadas com a autorização do Instituto Estadual de Florestas do Estado de Minas Gerais, através das autorizações para captura/coleta/transporte de animais silvestres números 013/2014/GPFAF/MG de 24 de abril de 2014; 007/2014/MG de 28 de julho de 2015 e 007/2014/MG de 23 de outubro de 2015. Os organismos coletados foram enviados ao Grupo de Estudos em Leishmanioses do Centro Pesquisas René Rachou para identificação e verificação da possível presença do parasito.

4.1 Montagem e Identificação dos flebotomíneos

A montagem das fêmeas de flebotomíneos foi realizada utilizando-se líquido de Berlese (LANGERON, 1949, modificado), que possibilita o exame das estruturas internas com maior nitidez, devido a sua menor refringência. Foi utilizada como caráter taxonômico na identificação específica das fêmeas, a visualização da espermateca e do cibário, mantendo no momento da dissecação, a parte ventral da cabeça voltada para cima. O restante do corpo, contendo o tórax e o restante do abdômen foi

aconditionado em tubo eppendorf 1,5 mL a seco, mantido a -20°C até a realização da extração de DNA.

A identificação específica dos flebotomíneos realizada com a observação por microscopia ótica de caracteres morfológicos internos e externos, seguindo as chaves e a classificação proposta por Galati (2003). A abreviação do nome das espécies neste estudo segue a proposta de Marcondes (2007).

4.2 Extração de DNA das fêmeas capturadas

A extração foi realizada utilizando Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN seguindo o seguinte protocolo modificado por Quaresma *et al.*, (2011): as fêmeas de flebotomíneos foram maceradas em 100 μL de solução de lise celular e à mistura foi adicionado 1 μL de proteinase K. A solução foi homogeneizada por inversão do tubo e incubada a 55°C *overnight*. Após o período de incubação, foi adicionado 1 μL de RNase à solução, que foi homogeneizada por inversão e incubada a 37°C por trinta minutos. Posteriormente as amostras foram incubadas por três minutos no gelo e adicionados 100 μL de solução de precipitação de proteínas. Os tubos foram vortexados por 20 segundos a alta velocidade seguido de centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm), e a fase aquosa transferida para um tubo novo. Adicionou-se 300 μL de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente, seguida de outra centrifugação por cinco minutos a 12000 x g (14000 rpm).

Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido contra um papel absorvente. Adiciona-se etanol 70% ao tubo já seco e invertê-lo várias vezes seguido de outra centrifugação a 12000 x g (14000 rpm) por cinco minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo deve permanecer invertido contra um papel absorvente para secar até não sobrar nenhum resquício de álcool. Ao final, adicionou-se 25 μL de solução de hidratação de DNA. As amostras foram incubadas a 65° por uma hora e posteriormente deixadas a temperatura ambiente *overnight*, sendo estocadas ao final à temperatura de -20°C .

Após a extração foi realizada a dosagem de moléculas de DNA em amostras sorteadas aleatoriamente, verificando a presença, concentração e qualidade do material extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000. Conforme recomendações do fabricante o espectro de luz é

ajustado para 260 e 280 nanômetros, faixa em que os ácidos nucleicos são detectados. A razão da absorbância de 260nm/280nm é utilizada para avaliar a pureza do material extraído, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,4 de 1,8. Valores menores que a margem pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes provenientes do processo de extração.

4.3 PCR dirigida ao *Internal Transcribed Spacer I (ITS I)* do rDNA

As amostras de DNA extraídas das fêmeas de flebotomíneos foram utilizadas para determinar a presença de DNA de *Leishmania*. Para isto, foi realizada a técnica PCR dirigida ao ITS1 do rDNA de *Leishmania* (EL TAI *et al.*, 2000), que amplifica um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pares de bases (SCHONIAN *et al.*, 2003). Para a amplificação das amostras foi utilizado o par de iniciadores LITSR: 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S: 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'.

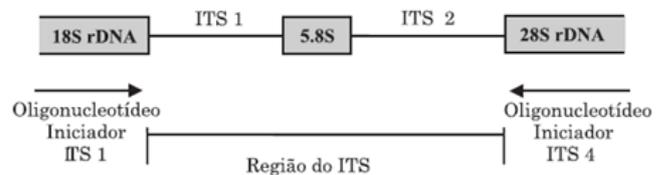


Figura 3: Região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2.

A reação foi preparada para um volume final de 25 μL contendo 5 μL de DNA da amostra a ser testada, 2,5 μL da solução tampão 10x, 0,75 μL de MgCl_2 (50mM), 0,5 μL de dNTP mix a 10mM, 1,25 μL de cada um dos iniciadores (LITSR e L5.8R) a 10 μM , 0,25 μL de Taq DNA polimerase a 10U/ μL , 1,25 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 12,25 μL de H_2O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 72°C por dez minutos. Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 5 nanogramas de DNA extraído de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum*

(MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), e como controle negativo foi utilizado água destilada estéril como “template”.

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV), sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram banda de peso molecular correspondente ao esperado, 300-350pb, utilizando o peso molecular (PM) de 100pb.

3. RESULTADOS

Um total de vinte e uma fêmeas de flebotomíneos pertencentes à espécie *Lutzomyia renei* foram identificadas seguindo a metodologia descrita anteriormente. Nenhuma amostra submetida à análise molecular através da PCR dirigida ao ITS1 apresentou resultado positivo (Figura 1), podendo concluir que estes insetos não apresentavam infecção com parasitos do gênero *Leishmania*.

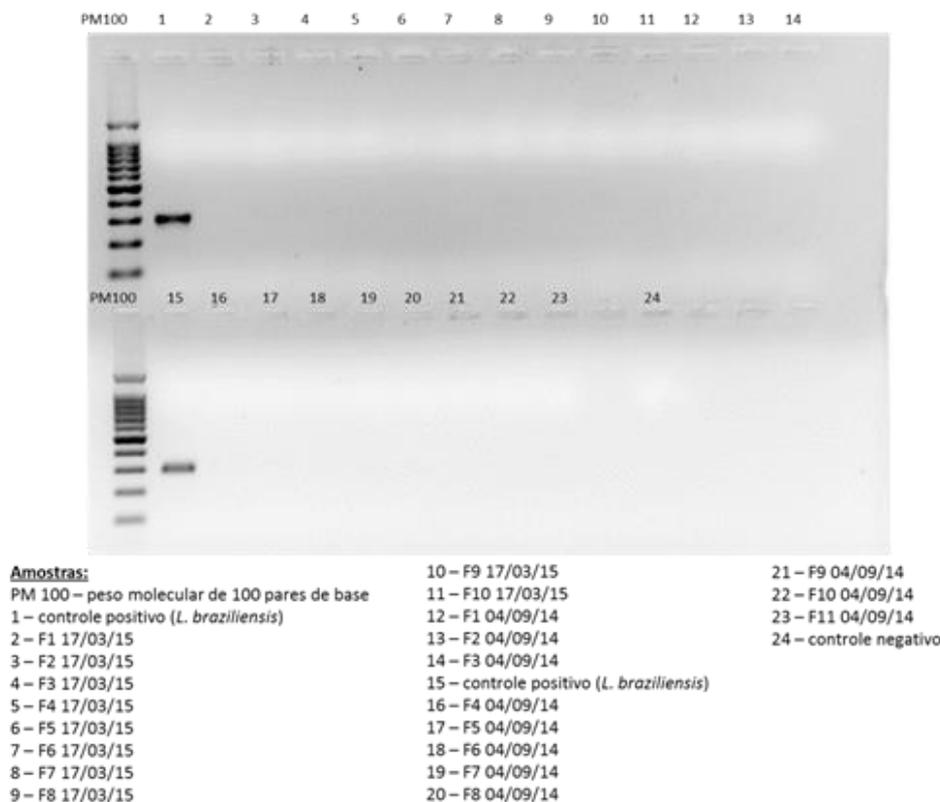


Figura 3: Resultados visualizados em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV).

Apesar de *L. renei* não apresentar importância vetorial comprovada na transmissão de *Leishmania*, Rego et al., (2015) em estudo conduzido na região norte do estado de Minas Gerais, relatou a presença de DNA de *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* em exemplares provenientes de área endêmica para leishmaniose tegumentar.

4. CONCLUSÕES

Os estudos realizados não identificaram a presença do parasito da leishmaniose nos exemplares coletados, sendo que a espécie de

flebotomíneo identificada não possui importância vetorial comprovada na transmissão do parasito. Apesar do resultado obtido sugere-se que sejam realizadas periodicamente a coleta e identificação de exemplares do mosquito para que seja mantida a segurança dos que visitam a Gruta do Ballet.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Grupo de Estudos em Leishmanioses do Centro Pesquisas René Rachou pelo apoio ao projeto.

REFERÊNCIAS

- DAVID, H. **Conservação da Gruta do Ballet, Minas Gerais, Brasil**. XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia. Januária MG, 04-14 de julho de 2003. Disponível em: <<http://www.sbe.com.br/anais27cbe/J1-12.pdf>>.
- EL TAI NO, O. O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. 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. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**; 94, 1–5. 2000.
- GALATI, E. A. B. **Classificação de Phlebotominae**. In EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz; 23-51. 2003.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Vol.7, N.3, 2004.
- LANGERON, M. **Précis de microscopie**. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine Saint-Germain, Paris, 1949.
- MARCONDES, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. **Entomological News**; 118: 351–356, 2007.
- MICHALSKY, E. M. Et al. Natural infection with *Leishmania infantum* chagasi in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44(1):58-62, jan-fev, 2011.
- QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; 105: 579-585, 2011.
- RÊGO, F. D.; RUGANI, J. M. N.; SHIMABUKURO, P. H. F.; TONELLI, G. B.; QUARESMA, P. F.; GONTIJO, C. M. F. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve Brazil. **PLoS ONE**. 10:e0122038. 2015.
- SÁBIO, P. B.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Redescription of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *renei* Martins, Falcão & Silva, 1957 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Zootaxa** 3999 (4): 589–599. 2015.
- SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. *PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**; 47: 349-358, 2003.