

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Ciências Médicas**

Identificação de Reservatórios de Zoonoses em Insetos Vetores por Espectrometria de Massa.

Vladimir Costa Silva

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda N. R. Sampaio.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.

Brasília, 2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela em Teresina-PI, Laboratório de Sanidade Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí em Teresina-PI e Laboratório de Espectrometria de Massa do Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) da Embrapa em Brasília-DF, com o apoio financeiro da CAPES na forma de bolsa de estudos.

Dedico este trabalho a meus pais, Francisco Marques da Silva e Francisca Costa Silva, pelo amor, compreensão e apoio sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e professor, Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa, por apostar na capacidade do seu aluno instruindo-o no caminho da ciência e dando fundamental apoio para execução deste trabalho.

Ao amigo e professor, Dr. Carlos Bloch Jr., por todo o prazer e empenho em ensinar. Pela acolhida em seu laboratório e pela confiança e liberdade concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Isabel K. de Miranda Santos, uma das idealizadoras deste trabalho e grande colaboradora.

À amiga Telma Lúcia S. Teixeira, pela paciência e cuidado com a colônia de insetos e pelo grande apoio na execução de experimentos cruciais neste trabalho.

Ao amigo Jadson Antunes, pelo apoio e grande amizade.

À Professora Ivete Lopes Mendonça, pelo apoio na execução dos trabalhos de campo e uso de seu laboratório.

À Professora Yolanda Galindo, pelo grande auxílio em minha inserção neste programa de pós-graduação e por me apresentar a minha orientadora.

À Professora Dra. Raimunda Nonata R. Sampaio, por me receber como aluno, pela confiança dispensada e grande apoio.

À Dra. Maura V. Prates, pelo apoio no seqüenciamento de hemoglobinas de *C.thous*.

Ao amigo Jorge Alex Taquita de Melo, pela grande amizade, pela prestimosa ajuda e colaboração na execução deste trabalho.

Aos grandes amigos, José Roberto, Leonardo Calderon e Guilherme Brand, por toda ajuda dispensada nos momentos alegres e difíceis.

Ao Dr. Orin Courtenay, pelo suporte financeiro dado a execução deste trabalho.

Aos amigos Lindomar Rosendo e Alan Carvalho, pela confiança, amizade e grande auxílio.

Ao amigo Luciano Paulino, pelo prestimoso auxílio nas análises estatísticas deste trabalho e seu grande prazer em ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado.

Aos amigos e amigas: Saulo, Felipe, Fred, Eder, Karla, Mariana, Marta, Flavio, Natacha, Nathalia, Dani, Daniel, Fernandinha, Clarissa, e Nélio pelo companheirismo que fizeram do local de trabalho um lugar agradável e alegre.

Sumário

Abreviaturas e siglas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. A leishmaniose visceral no Brasil e no Mundo	1
1.2. Agente etiológico e vetor do calazar	1
1.3. Agente etiológico e vetor	3
1.4. Interação do vetor com <i>Leishmania sp</i> e eventos digestivos	5
1.5. Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral	6
1.6. Estratégia de controle e identificação de reservatórios	7
2. Objetivos	12
3. Material e Método	13
3.1. Colônia de flebótomos	13
3.2. Preparação de insetos	13
3.3. Dissecção.....	13
3.4. Extração e purificação de hemoglobinas de <i>Cerdocyon thous</i>	14
3.5. Digestão tríplica	14
3.6. Fragmentação e seqüenciamento por CapLC/MS/MS	15
3.7. MALDI LIFT-TOF/TOF	16
3.8 Interpretação de espectros de massa MS/MS	16
3.9. Alinhamento e análise em bancos de dados	18
3.10. Perfis de digestão de hemoglobina por flebótomos	18
3.11. Análise estatística	18
4. Resultados	19
4.1. MALDI-TOF/TOF	19
4.1.2. Identificação de repastos múltiplos	19

4.1.3. Amostras de campo	19
4.2. Purificação e seqüenciamento de hemoglobina de <i>C. thous</i>	27
4.3. Alinhamento de cadeias de hemoglobina	27
4.4. LC ESI-Q-TOF MS/MS	27
4.5. Seqüenciamento de hemoglobina de <i>C.thous</i> (Seqüência <i>de Novo</i>)	29
4.6. Perfis de digestão de hemoglobinas no trato digestivo de flebótomos	39
4.7. Análise discriminante	42
5. Discussão	44
6. Conclusões	49
7. Referências Bibliográficas	50

Abreviaturas e Siglas

(NH ₄)HCO ₃	Carbonato de amônio
CapLC	Cromatografia líquida capilar
CDC	Armadilha de luz para insetos
CID	Dissociação induzida por colisão
DA	Análise discriminante
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	1,4-Dithiothreitol
ESI	Ionização eletrospray
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
LC	Cromatografia líquida
LVA	Leishmaniose visceral americana
MALDI	Ionização/ Dessorção em matriz assistida a laser
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
MP	Matriz peritrópica
PMF	Impressão digital de peptídeo
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoride
Q-TOF	Quadrupolo – tempo de voo
RP	Fase reversa
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	Tempo de voo
PCR	Reação em cadeia de polimerase

Lista de Figuras

1. Ciclo eco-epidemiológico da LVA	7
2. Esquema de fragmentação de peptídeo e nomenclatura.....	15
3. Exemplo de seqüenciamento de peptídeo por MS/MS	17
4. Espectros de MS de hemoglobina humana em digestão	20
5. Espectros de repasto com 48 horas de digestão	21
6. Espectros de repasto com 96 horas de digestão.....	22
7. Espectros de peptídeos de múltiplo repasto em extrato bruto e purificado.....	23
8. Espectros de MS/MS de peptídeos identificados em múltiplo repasto.....	24
9. Espectros de MS de hemoglobina de amostra de campo.....	25
10. Espectros de MS/MS para diferenciação de espécies em amostras de campo.....	26
12. Cromatogramas de hemoglobina purificada e digerida de <i>C.thous</i>	28
13. Alinhamento de seqüência de cadeia alfa e beta de <i>C.thous</i>	29
14. Fragmento de cadeia beta (31-40) de hemoglobina de <i>C.thous</i>	29
15. Fragmento de hemoglobina de <i>C.thous</i> cadeia alfa (62-90), (41-56) e (17-31).....	30
16. Hemoglobina de <i>C.thous</i> cadeia alfa (100-127), beta (18-30) e alfa (93-99).....	31
17. Hemoglobina cadeia alfa (1-7), beta (1-8) e beta (41-59) de <i>C.thous</i>	32
18. Hemoglobina cadeia beta (77-82), alfa (128-139) e beta (105-120) de <i>C.thous</i>	33
19. Hemoglobina cadeia beta (88-95), beta (121-132) e alfa (17-40) de <i>C.thous</i>	34
20. Alinhamento de hemoglobina com semelhanças e diferenças entre as espécies.....	35
21. Cromatograma de massa de hemoglobina de <i>C.thous</i>	36
22. MS e MS/MS em tempos de retenção diferentes no cromatograma de massa.....	37
23. Seqüências de hemoglobina geradas a partir do cromatograma de massa.....	38
24. Perfis de diferenças na digestão de hemoglobina humana e de cão em 24/48 horas.....	40
25. Perfis de diferenças na digestão de hemoglobina humana e de cão em 72/96 horas	41
26. Gráfico de DA de sangue humano, de cão e raposa com 96 horas de digestão	42
27. Espectro de seqüências de hemoglobina e albumina de hamster	43

Lista de Tabelas

1. Peptídeos de repasto múltiplo com diferenças entre hemoglobinas	24
2. Peptídeos encontrados em amostras de campo	25
3. Íons de amostra de sangue humano e de cão para comparação de perfis de digestão.....	39

RESUMO

Introdução: O estudo do conteúdo alimentar de vetores hematófagos é de reconhecida importância ecológica e epidemiológica. As metodologias atualmente empregadas nesse estudo não possibilitam a identificação de múltiplas fontes de sangue, caracterização de espécies filogeneticamente relacionadas bem como repastos tardios acima de 72 horas, no trato digestivo de insetos vetores. **Objetivo:** O presente trabalho tem por objetivo utilizar a espectrometria de massa para identificação de fontes de sangue em vetores de zoonoses tendo como modelo o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (Díptera – Psychodidae). Para identificação e diferenciação de espécies de animais vertebrados foi usada a hemoglobina que é a molécula mais abundante no trato digestivo dos insetos após alimentação. **Material e Métodos:** As amostras retiradas do trato digestivo de 250 insetos foram separadas por cromatografia líquida de alto desempenho e submetidas à identificação em espectrômetros de massa MALDI TOF/TOF e LC ESI-Q-TOF em escala de nanofluxo. **Resultados:** Dos cinco mil espectros gerados foram identificadas todas as espécies de animais vertebrados (homem, cão, galinha, porco, raposa e hamster) usados nos experimentos em laboratório incluindo múltiplos repastos. Foi possível também a identificação de espécies após 96 horas da primeira alimentação e o acompanhamento da digestão das hemoglobinas que revelaram diferentes perfis de clivagem para cada animal usado como fonte de sangue. As hemoglobinas identificadas em insetos capturados no campo foram as de cão doméstico, porco e galinha que correspondem a espécies presentes na residência onde foram feitas as coletas. **Discussão:** As técnicas mencionadas neste trabalho foram desenvolvidas para aplicação de forma inédita na identificação de reservatórios de zoonoses e demonstraram considerável sensibilidade e acurácia, podendo ser usadas para estudos de comportamento e preferências alimentares de vetores em áreas endêmicas e de risco, contribuindo assim para elaboração de medidas de controle mais eficazes no combate a doenças transmitidas por insetos hematófagos.

ABSTRACT

Introduction: The study of the blood meal of hematophagus vectors is of great ecological and epidemiological impact. The techniques now made possible in that study don't make possible the identification of multiple sources of blood, characterization of species phylogenically related as well as late meals above 72 hours, in the digestive treatment of vectorial insects. **Objective:** The present work had for objective to use the mass spectrometry for identification of blood sources in zoonoses vectors tends as model the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Díptera - Psychodidae). For identification and differentiation of species of vertebrate animals was used the hemoglobin that is the most abundant molecule in the digestive treatment of the insects after feeding. **Material and Methods:** The samples of the digestive treatment of 250 insects were separate for high performance liquid chromatography and submitted to the identification in mass spectrometers MALDI TOF/TOF and LC ESI-Q-TOF in nanoflow scale. **Results:** Of the more than 5 thousand generated spectra was identified all of the species of vertebrate animals used in the experiments in laboratory including multiple meals. It was possible also the identification of species after 96 hours of the first feeding and the attendance of the digestion of the hemoglobins that revealed different cleavage profiles for each animal used as source of blood. The identified hemoglobins in insects captured in the field the one of domestic dog, pig and chicken that corresponds to present species in the place were. **Discussion:** The techniques mentioned in this work were developed for application in an unpublished way in the identification of zoonoses reservoirs and they demonstrated considerable sensibility and accuracy, could be used for studies of behavior and alimentary preferences of vectors in endemic areas and of risk, contributing like this to elaboration of more effective control measures in the combat to diseases transmitted by hematophagus insects.

KEY WORDS: Blood Sources, Mass Spectrometry, *Lutzomyia longipalpis*, Peptide Mass Fingerprinting.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A leishmaniose visceral (LV) no Brasil e no Mundo:

A partir das primeiras observações em 1885 na Índia os estudos sobre a leishmaniose visceral ou Kala-azar (doença negra ou mortífera em hindu) avançaram significativamente até a descoberta simultânea do agente etiológico por William Leishman e Charles Donovan em 1903, posteriormente batizado em 1904 por Ronald Ross com o nome de *Leishmania donovani*. Em 1908, Nicolle & Comte demonstraram pela primeira vez o parasita em cães, sugerindo seu possível papel como reservatório da doença. Permaneceu desconhecido, entretanto, o mecanismo de infecção, até que Sinton mostrou a convincente coincidência entre a distribuição da leishmaniose visceral e *Phlebotomus argentipes* (Diptera-Psychodidae). Finalmente, em 1931, a transmissão foi conseguida pela picada de flebotomíneos em hamsters e esses insetos puderam ser formalmente incriminados como vetores (Gibson, 1983; Neves, 1998).

Hoje a LV está presente em cinco continentes e é endêmica em regiões tropicas e subtropicais de 88 países: 16 desenvolvidos, 72 em desenvolvimento e 13 deles subdesenvolvidos sendo que a prevalência mundial é de 12 milhões de casos no mundo e a incidência anual é de LV de 500.000 casos (WHO/LEISH/2000.42) .

No Brasil, Henrique Penna em 1934, após analisar 47.000 lâminas de corte histológico de fígado de pacientes mortos encontrou leishmânia em 41. De 1936 a 1939 Evandro Chagas demonstrou em seus estudos a infecção por leishmânia em cães e humanos e incriminou o vetor como sendo um flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* identificado anteriormente por Lutz e Neiva em 1907. Em 1937 o parasita causador da leishmaniose visceral (LV) ou calazar como ficou conhecida no Brasil, foi classificada como *Leishmania chagasi* (Cunha e Chagas, 1937).

Os trabalhos clássicos de Deane e Alencar (1956) no Ceará traçaram o perfil epidemiológico do calazar naquela época contribuindo de modo direto para o estudo da distribuição da doença em diferentes ecossistemas demonstrando seu ecletismo biogeográfico.

Os trabalhos de Deane (1956) revelaram também a existência de um possível ciclo silvestre da doença ao encontrar raposas da espécie *Pseudalopex vetulus* infectadas com leishmânia.

O caráter rural da infecção na década de 70 tomou outras proporções nas décadas de 80 e 90 quando foram notificados 600 casos nos anos de 83 e 84 (Costa *et al*, 1990) e 1000 casos no período de 93 a 95 em Teresina – PI (FNS, normas técnicas 1996). O processo de epidemias urbanas verificou-se também em vários estados do nordeste como Natal – RN, São Luiz – MA, Jequié – BA e em cidades do sudeste como Belo Horizonte - MG e Montes Claros - MG.

Atualmente a LV só não está presente na região sul e em parte da região norte do Brasil, contudo apresenta várias áreas endêmicas em todas as outras regiões com crescente expansão (MS - Vigilância em saúde, 2003).

As medidas de controle adotadas pela fundação nacional de saúde ainda baseia-se no diagnóstico e extermínio de cães doentes e na borrifação para controle de vetores. Entretanto, a doença vem se mantendo nas áreas endêmicas e se alastra por regiões como o entorno de Brasília - DF onde antes não eram notificados casos de LV humana ou canina.

As ocupações humanas de áreas outrora consideradas silvestres, o desequilíbrio ecológico causado pelo impacto ambiental entre outros fatores, contribuiu diretamente para o alastramento desta doença.

Estudos para incriminação de novas espécies de reservatórios vertebrados nas cidades têm mostrado a importância de técnicas de identificação de conteúdo alimentar em vetores hematófagos o que tem contribuído para elucidar questões que envolvem o comportamento e preferências alimentares desses insetos, fator crucial no desenvolvimento de novas estratégias de controle como a borrifação de casas e a remoção de animais infectados .

1.2 Agente Etiológico e Vetor do Calazar:

Os parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral são protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) que agrupa espécies unicelulares, digenéticas (heteroxenos), pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*, encontrados nas formas flageladas promastigotas e paramastigotas, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e amastigota, sem flagelo livre, parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (humanos, canídeos, pequenos roedores, etc.).

Os hospedeiros invertebrados de LV estão limitados a insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Díptera – *Psychodidae*), e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva 1912) é a espécie de maior distribuição. Descrita por Penna (1934) tem vasta distribuição na América

Latina e são encontrados do México a Argentina onde há ligação direta com os casos de LV principalmente no Brasil, que contribui com 90% dos casos (Young e Duncan, 1994).

Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos. Embora as infecções sejam mais comuns nos roedores e canídeos, são conhecidas também entre edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e, entre eles, o homem e a transmissão ocorre através da picada do inseto infectado.

A infecção em aves e anfíbios até então não foi descrita, e os organismos encontrados parasitando os répteis, até bom tempo considerado do gênero *Leishmania*, são aceitos como pertencentes ao gênero *Sauroleishmania* por Lainson e Shaw (1987).

1.3 Biologia de *Lutzomyia longipalpis*:

Os flebótomos são insetos holometabolos possuindo quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adultos (Ward 1990; Killick-Kendrick 1999). No ambiente natural, no estágio de larvas, alimentam-se de material orgânico do solo (Ferro *et al*, 1997), enquanto os adultos de ambos os sexos podem alimentar-se de açúcar de planta (Chaniotis, 1974). Só fêmeas adultas precisam de sangue antes da oviposição, embora algumas espécies como *L. lichyi* podem pôr o primeiro grupo de ovos na ausência de uma refeição de sangue (Montoya-Lerma 1992). Devido a sua importância como vetor da leishmaniose, muitas tentativas para estabelecer colônias de *L. longipalpis* e outras espécies de flebotomíneos em laboratório, foram reportadas, contribuindo para criação de colônias em regiões endêmicas, incluindo a usada neste estudo (Mangabeira 1969; Deane e Deane 1955; Sherlock e Sherlock 1959; Killick-Kendrick *et al*, 1973/ 1977).

Rangel *et al*, (1986) estudando o ciclo biológico da colônia de *L. intermedia* de Lapinha – MG sob diferentes condições mostrou que a conclusão de ciclo biológico de ovo para adulto de *L. longipalpis* variava de 28 a 36 dias, dependendo da fonte de sangue. A produtividade de flebótomos melhorou quando fêmeas se alimentaram de sangue de hamster e galinha, comparado com sangue de cães e humanos.

A oviposição normalmente começa no quinto dia depois da refeição de sangue e varia de 24 a 52 ovos por fêmea. Semelhantemente, Ready (1978, 1979) também observou diferenças no comportamento alimentar de *L. longipalpis* e uma superioridade nutricional do sangue de hamster comparado a sangue humano enquanto estudava produção de ovos de *L. longipalpis* em duas colônias brasileiras.

De acordo com Rangel *et al.*, (1986), a eclosão do ovo normalmente ocorre após 6-9 dias com o desenvolvimento do estágio de larvas e pulpas aproximadamente após 14-19 e 8-9 dias, respectivamente. O período de desenvolvimento total e aparecimento de adultos usando sangue de hamster foram de 35 dias (25-42). Adultos, machos e fêmeas, alimentam-se de açúcar, sendo que, aproximadamente 70% das fêmeas de *L. longipalpis* sobrevivem até sete dias sem uma refeição de sangue. Para as fases larvais, os autores testaram muitos tipos de comida (legumes e misturas) e observaram a preferência por ração para peixe que também previne o desenvolvimento de fungos.

1.4 Interação do vetor com *Leishmania sp* e eventos digestivos:

Em geral, depois do repasto sangüíneo, formas amastigotas dentro dos macrófagos diferenciam-se em promastigotas procíclicas que se dividem e se prendem a microvilosidades intestinais e assim evitam sua eliminação com a digestão do sangue. Durante a digestão, o sangue é rodeado por uma matriz peritrópica (MP) que é composta de quitina, um polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que também está presente no exoesqueleto dos insetos. A MP compartimenta os eventos digestivos, permitindo a formação de um gradiente de tripsina do epitélio à parte interna do material a ser digerido que contém células de sangue e parasitas.

Sob essas condições, os parasitas são protegidos da destruição pelas enzimas digestivas, e têm tempo para se diferenciar em promastigotas procíclicas. Subseqüentemente, os parasitas produzem uma quitinase que digere a MP, expondo o epitélio onde podem aderir e então permanecer lá, até a diferenciação (Pimenta *et al.*, 1997).

Uma suposta quitinase *L. longipalpis* – derivada foi caracterizada recentemente por Ramalho-Ortigão e Traub-Cseko (2003) e também foi mostrado seu envolvimento na digestão da MP. Esta quitinase é produzida depois do repasto, alcançando produção máxima em 72 horas. A formação e destruição da PM parecem ser eventos concomitantes, e bem-sincronizados de deposição e degradação de quitina Pascoa *et al.*, (2002) propôs que a MP também pudesse ser um substrato que se liga ao grupo heme, um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina no mosquito *Aedes aegypti*.

Em seu ciclo de vida, as leishmânias sofrem muitas modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dentro do intestino dos flebótomos. O polimorfismo na forma procíclica de *L. chagasi* dentro de *L. longipalpis* é muito evidente e foi descrito em detalhes por Walters *et al.*, (1989) onde rapidamente, a diferenciação do parasita progride de promastigota (duas formas seqüentes I e II) para nectomonas que aderem ao intestino médio

seguido por separação e diferenciação para haptomonas em forma de pêra e que migram para a parte anterior do intestino médio. A haptomona parece ser o precursor dos paramastigotas em forma de coração que também se prendem ao esôfago e faringe. São observadas formas natatórias livres e muito ativas na fase tardia, e é considerado que são promastigotas metacíclicas as formas infecciosas que são injetadas no hospedeiro vertebrado pelo flebótomo durante uma refeição de sangue. Embora múltiplos repastos de sangue de *L. longipalpis* entre cada ciclo gonotrófico tenham sido observados (Elnaiem *et al.*, 1992c), isto não parece interferir com a dinâmica de metaciclogênese, sendo os parasitas capazes de normalmente se desenvolverem com a entrada de sangue extra (Elnaiem *et al.*, 1994). Durante a interação de *L. mexicana* com *L. longipalpis*, Stierhof *et al.*, (1999) descreveu a formação de uma estrutura tipo gel, composta de proteofosfoglicanos secretados. Esta estrutura obstrui o trato digestivo do flebótomo, interrompendo o mecanismo de alimentação durante a próxima refeição, favorecendo assim a regurgitação em lugar de entrada de sangue. De acordo com Rogers *et al.*, (2002), a formação de tampão tem 75% de parasitas metacíclicos; isto aumenta a probabilidade de transmissão de leishmânia na próxima refeição de sangue.

1.5. Eco-epidemiologia da LVA:

Apesar de persistirem dúvidas sobre a origem da *L. chagasi* como agente infeccioso da LVA no Brasil devido a hipóteses de sua semelhança genômica com a espécie *L. infantum* do Velho Mundo (Mauricio *et al.*, 1999) e a importação do parasita por colonizadores e seus animais domésticos, os estudos clássicos realizados por Deane *et al.*, 1956, no Estado do Ceará, encontrando raposas da espécie *Lycalopex vetulus* naturalmente infectadas com leishmânia e com capacidade de infectar *L. longipalpis*, sugerindo que a *L. vetulus* é espécie nativa das Américas.

Os trabalhos de Lainson *et al.*, 1969, 1987 mostrando raposas da espécie *Cerdocyon thous* no Estado do Pará infectadas, e um sucesso (42,3%) no isolamento do parasita em triturados de fígado e baço de hamsters infectados. Os trabalhos de Sherlock *et al.*, 1984, 1988 que isolou leishmânia de gambás da espécie *Didelphis albiventris*, Corredor *et al.*, 1989a,b; Travi *et al.*, 1994 que isolaram leishmânia de *Didelphis marsupialis* e Travi *et al.*, 2002; Lainson *et al.*, 1987 que isolaram leishmânia de roedores das espécies *Proechimys canicollis* e *Proechimys semispinosus*, entre outros, reforçam a hipótese de que a *L. chagasi* é uma espécie nativa e que há um ciclo silvestre da doença com hospedeiros vertebrados com papéis

definidos como reservatórios naturais (raposas) e os reservatórios potenciais (marsupiais e roedores).

Constitui-se reservatório-hospedeiro efetivo de qualquer parasita aquele que pode participar na sua manutenção e disseminação na natureza. Quando parasitas são dependentes de vetores hematófagos para a transmissão, é claramente necessário que se mostre que estes podem ser infectados quando se alimentam no reservatório em questão e, até que isto se concretize, o animal infectado é conhecido como reservatório potencial.

O isolamento de *L. chagasi* de numerosos espécimes da raposa *C. thous* e gambás *D. marsupialis*, e a infecção experimental de *Lu. longipalpis* se alimentando nestes animais os coloca firmemente na categoria de reservatórios naturais de *L. chagasi* (Lainson *et al.* 1990; Travi *et al.*, 1998a). Por outro lado, embora resultados positivos de testes de PCR em tecidos de alguns roedores selvagens indiquem que estes também podem representar reservatórios, o isolamento do parasita, e a infecção experimental de *Lu. longipalpis* não são precisos nesses animais infectados, o que requer confirmação por novos experimentos.

A figura 1 retrata o ciclo eco-epidemiológico da LVA no nordeste do Brasil onde possivelmente animais silvestres mantêm um ciclo silvestre enzootico de contato com *Lutzomyia longipalpis* (1).

A invasão de ambientes silvestres próximos a áreas florestais por homens com seus animais domésticos (2,3) permite o estabelecimento de colônias de vetores tornando o cão, o principal reservatório do parasita. Linhas contínuas indicam rotas definidas de transmissão e linhas tracejadas representam possível transmissão envolvendo outros animais silvestres e a possível capacidade do homem como fonte de infecção para *L. longipalpis*. A interrogação aponta para outros reservatórios que podem estar direta ou indiretamente relacionados à manutenção do parasita nos ambientes peridomiciliar e silvestre.

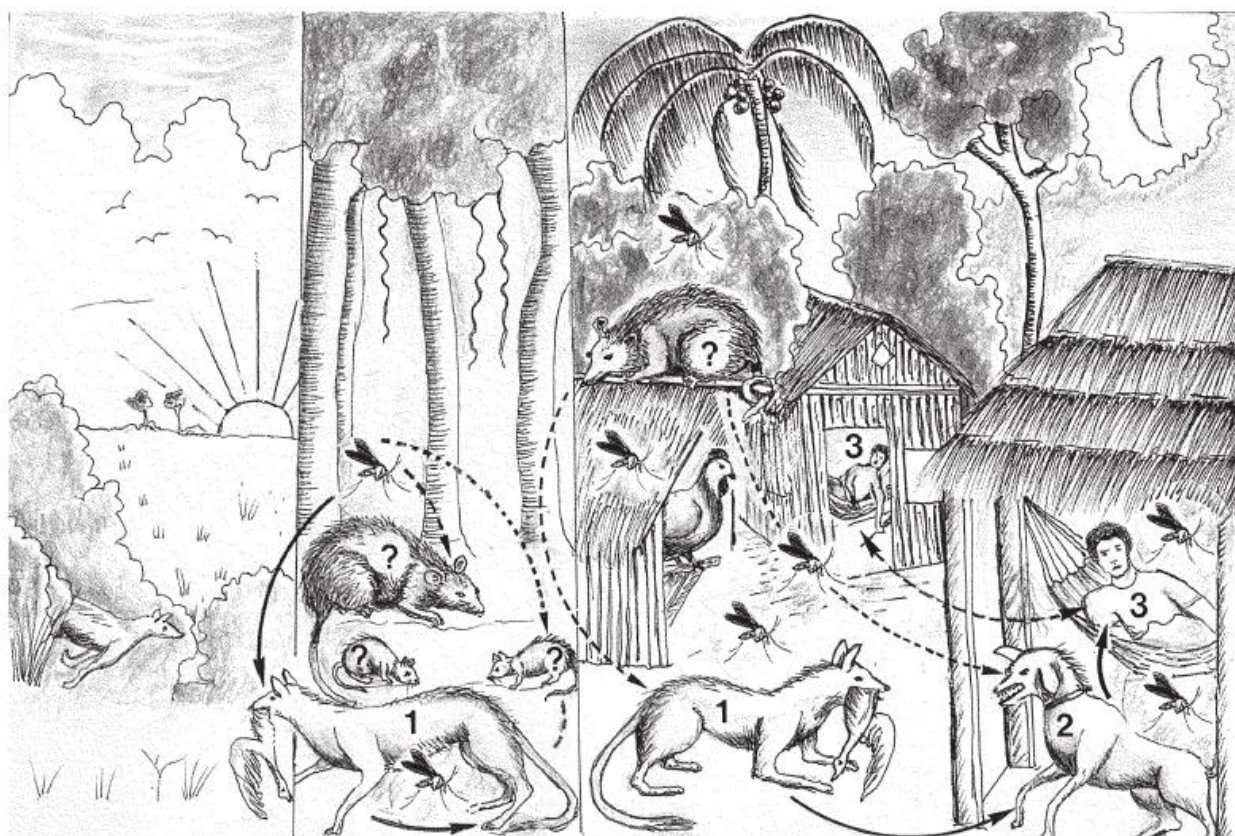


Figura. 1. Sugestão do ciclo eco-epidemiológico de *L.chagasi* retratado o contato entre reservatórios silvestres e domésticos e a circulação da população de *L.longipalpis*. (Lainson *et al*, 1989).

1.6. Estratégia de controle e identificação de reservatórios:

Uma estratégia para o controle de zoonoses é a triagem de animais ou de rebanhos infectados. Contudo, esta abordagem pode não ser a mais eficiente quando múltiplos reservatórios animais podem desempenhar diferentes papéis na transmissão para seres humanos. A identificação correta da espécie animal relevante tem implicações econômicas e de saúde pública. Muitas doenças transmitidas por vetores têm mais de um vetor e mais de um hospedeiro, que podem ser animais domésticos ou selvagens. O cenário da transmissão de algumas destas doenças é bastante complexo e a cadeia de transmissão normalmente não é compreendida claramente.

A incriminação de reservatórios de doenças transmitidas por vetores usualmente começa pela identificação dos vertebrados infectados e pela verificação da prevalência de infecção e pela abundância desta espécie de animal. Além disto, um reservatório tem também

que ser competente para transmitir o agente infeccioso para os vetores invertebrados (competência reservativa) para poder manter a sobrevivência do parasita.

Além de estar infectado, de ser competente e abundante, um candidato a hospedeiro tem que ser freqüentemente picado pelo vetor (taxa de picadas elevada) para que se possa atribuir a ele o papel de reservatório de certo patógeno. Tomados todos juntos, a abundância do hospedeiro, a competência reservativa e a taxa de picadas fornecem a taxa de inoculação, que é a medida da capacidade e o melhor índice para incriminar um hospedeiro como reservatório (Mather *et al*, 1989). Um dos problemas desta forma de avaliar a capacidade reservativa é a fidedignidade das estimativas da taxa de picada, pois são muito variáveis, e dependem desde a localização do hospedeiro até as circunstâncias do momento, tais como o vento, a temperatura, a luminosidade e outros fatores (Gibson *et al*, 1999).

Contudo, a maior falha deste índice é que, enquanto fornece informação sobre as escolhas por determinados reservatórios vertebrados feitas pelo vetor hematófago, não fornece nenhuma informação sobre o roteiro alimentar dos mesmos, que é definido pelo trânsito entre os hospedeiros vertebrados. Esta é a etapa crucial para a transmissão de um parasita, pois é através dela que o vetor, ao adquirir um parasita se alimentando em um reservatório vertebrado infectado, realiza a transmissão do patógeno ao mudar de hospedeiro e se alimentar em um outro hospedeiro, suscetível ao agente infeccioso.

A fragilidade destes índices é parcialmente contornada pela análise do conteúdo alimentar para a identificação do hospedeiro em que o vetor se alimentou. Esta abordagem também permite a aquisição de informação sobre a origem do vetor, por exemplo, se urbano ou silvestre. Testes de precipitina e ensaios imunoenzimáticos são feitos usualmente e a proporção de sangue é então relacionada à abundância do hospedeiro para dar uma idéia da preferência por um hospedeiro (proporção de forragem). Contudo, a abordagem imunológica tem duas falhas: primeiro, ela não detecta repastos sangüíneos mais antigos que 24 horas (Tesh *et al*, 1971) e, segundo, não distingue espécies próximas filogeneticamente (Silva *et al*, 2001). Insetos que voam, normalmente repousam nos primeiros dias após terem se alimentado com sucesso (Killick-Kendrick *et al*, 1984).

Assim, um método de detecção restrito a apenas um dia, ou um pouco mais, não avalia apropriadamente o roteiro hematofágico do vetor. Até este primeiro dia, provavelmente o vetor ainda não iniciou o movimento em direção a um novo hospedeiro. Conseqüentemente, o método é incapaz de detectar mudanças de hospedeiro ou de dispersão espacial do vetor. A dificuldade do método em distinguir espécies de vertebrados filogeneticamente próximas que sejam candidatas a algum papel como reservatório pode ser muito importante para certas

doenças, para as quais espécies relacionadas disputam a importância eventual como reservatórios. Exemplos são raposas e cães, hospedeiros de leishmaniose visceral, e homens e macacos na transmissão do vírus da febre amarela. A incriminação de um ou de outro tem diferentes implicações e significativas consequências para as medidas de controle.

Avanços em tecnologias para a identificação precisa de hospedeiros por análise do repasto sanguíneo e para a discriminação de repastos sanguíneos mais antigos podem indicar de onde vem o vetor e, então, podem definir a direção do movimento de repasto infectante, da origem dos locais onde se encontram os hospedeiros infectantes para o lugar onde se encontra outro hospedeiro, junto ao qual o vetor tenha sido capturado. Isto terá uma tremenda força para descrever o roteiro alimentar de um vetor e, por conseguinte, o roteiro de transmissão de um parasita.

Para aplicação em modelagem matemática da ecologia de patógenos transmitidos por vetores, esta tecnologia, associada às mensurações estáveis da taxa de picadas, pode fornecer uma pista para estimativas não enviesadas do número de reprodução básico, em situações em que mais de um hospedeiro está presente. Isto pode ser feito, ponderando a taxa de picadas infectantes potenciais efetuadas, em cada hospedeiro ou espécie, pela proporção de repastos sanguíneos efetuados em cada hospedeiro.

A base para a fragilidade dos métodos imunológicos em distinguir proteínas filogeneticamente relacionadas é molecular. A interação antígeno – anticorpo depende mais das características conformacionais das moléculas envolvidas que das suas estruturas primárias (Abbas *et al*, 1998). A incapacidade de distinguir entre antígenos relacionados, pelos anticorpos, pode ser explicada pelo fato das mudanças interespecíficas de aminoácidos, que não afetam a estrutura terciária do determinante antigênico, poderem não alterar a especificidade da reação antígeno – anticorpo (Lodish *et al*, 2000). Por outro lado, a perda precoce da reatividade de métodos imunológicos pode ser devida a uma digestão precoce com rompimento das ligações peptídicas entre aminoácidos que montam a estrutura tridimensional dos determinantes antigênicos.

Os métodos para a detecção de repastos sanguíneos baseados na estrutura primária das moléculas do hospedeiro, isto é, na sua seqüência em vez da estrutura espacial, podem ganhar em especificidade ao identificar alterações moleculares mínimas de aminoácidos ou de nucleotídeos. Desde que uma única digestão pode destruir a estrutura terciária de proteínas, os métodos baseados na determinação da estrutura primária de moléculas através da amplificação e do seqüenciamento de ácidos nucleicos ou pela mensuração da massa

molecular e seqüenciamento de peptídeos, pode tornar mais amena a identificação de repastos sangüíneos.

Duas estratégias podem preencher estes requerimentos. Uma são os marcadores genéticos moleculares, entre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mukabana *et al*, 2002). Mínimas quantidades de DNA do hospedeiro podem ser amplificadas e então identificadas por análise de impressão digital de DNA ou por seqüenciamento direto. A análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos ou a determinação alélica foram tentadas tanto em *A. aegypti* como em *Anopheles gambiae* (Chow-Shaffer *et al*, 2000; Ansell *et al*, 2000; Mukabana *et al*, 2002). Os métodos mostraram elevada especificidade, mas com 24 horas, a maior parte do DNA das amostras não mais podia ser identificada. Contudo, um novo método, mais promissor, é a hibridização do heteroduplex dos produtos de PCR, que alcançou até 72 horas após o repasto em *Simulium danosum* (Boakye *et al*, 1999).

O outro método é a espectrometria de massa para identificar a hemoglobina de diferentes espécies (McComb *et al*, 1998; Espinosa *et al*, 1999). O método permite a rápida detecção da massa molecular da hemoglobina e de seus fragmentos digeridos depois de ser purificada por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC). A vantagem do método é que, desde que havendo hemoglobina em abundância, a etapa de amplificação se torna desnecessária. Se a hemoglobina intacta purificada e seus peptídeos digeridos presentes no intestino do inseto forem seqüenciados, pode então ser feita uma análise da dinâmica digestiva para as espécies estudadas.

Podem ser demonstradas, hipoteticamente, não apenas um tipo de impressão digital de cada espécie, definida pela peculiar massa molecular das cadeias de hemoglobina da espécie, mas também uma peculiar cinética de digestão, dependente do tempo. Se assim for, não somente as espécies na qual o inseto se alimentou podem ser identificadas, mas também quando o repasto ocorreu. Estes dois tipos de informações podem esclarecer bastante a dinâmica de vetores alados de doenças e os roteiros de transmissão de doenças por vetores alados. Esta abordagem pode ser a melhor para iluminar a incriminação de reservatórios e poderia, então, indicar melhores estratégias a serem destinadas para um reservatório suspeito de determinadas zoonoses.

Espinosa *et al*, 1999, utilizando um espectrômetro limitado em termos de resolução, sensibilidade e acurácia conseguiu diferenciar espécies animais usando a massa molecular das cadeias alfa e beta de hemoglobinas obtendo alto grau de precisão (espectros de MS). Os espectrômetros atuais possuem grande capacidade de análise pela junção de tipos diferentes de analisadores de massa e fontes de íons numa técnica conhecida como espectrometria de

massa seqüencial de duplo estágio ou Tandem (Cornish e Cotter, 1993) onde um íon precursor tem sua massa selecionada e tipicamente fragmentada por dissociação induzida por colisão a gás – CID (Jonsson, 2001) seguido por análise dos produtos restantes que determinam a composição da molécula fragmentada.

Atualmente esta técnica vem sendo usada para diagnóstico de polimorfismos em cadeias de hemoglobinas que determinam patologias como talassemias e eritrocitoses (Wild *et al*, 2003, Raí *et al*, 2001). Em casos como a anemia falciforme, onde há substituição de ácido glutâmico por valina na posição seis da cadeia beta, essa diferença de apenas 30 Da, é identificada em espectrômetros de massa pelo seqüenciamento direto de aminoácidos (Papayannopoulos e Biemann, 1994) que determina a estrutura primaria desta proteína. Hoje, há em bancos de dados de proteínas vários depósitos de variações em cadeias de hemoglobina de humanos e outros animais identificados por espectrometria de massa.

Outra aplicação de espectrometria de massa na identificação de proteínas conhecidas em determinada amostra biológica é a chamada impressão digital de um peptídeo ou *peptide mass fingerprinting* como é naturalmente conhecida (Hayter *et al*, 2003) Esta técnica visa à identificação de peptídeos formados pela digestão triptica da proteína conhecida que será identificada na amostra pela massa dos produtos da digestão. Ao saber a seqüência de aminoácidos da proteína de interesse e os pontos de clivagem da tripsina (entre resíduos de lisina e arginina) em digestão *in silico* usando softwares pacotes de programas disponíveis via internet on-line como o Cutter entre outros disponíveis em bancos de dados de proteínas, estes peptídeos são separados por cromatografia líquida e, em seguida, seqüenciados por espectrometria de massa (Meiring *et al*, 2002). Esses métodos usados comumente em proteômica serão utilizados neste trabalho para identificação de fonte de sangue em flebotomíneos vetores das leishmanioses. (Subitem adaptado de revisões de Costa, C.H. N, 2002).

2. Objetivos

Objetivo Geral:

Utilizar técnicas de espectrometria de massa para identificação de fontes de sangue em vetores de zoonoses.

Objetivos específicos:

Aplicar a técnica de espectrometria de massa na identificação de hemoglobinas de reservatórios, no trato digestivo de flebótomos.

Identificar, por espectrometria de massa, múltiplos repastos em diferentes espécies de reservatórios vertebrados em que os insetos se alimentaram.

Avaliar até quando a técnica permite a identificação de espécies de reservatórios vertebrados.

Descrever os perfis de digestão da hemoglobina nos insetos vetores.

Comparar os resultados obtidos com os alcançados por outras técnicas de identificação de reservatórios vertebrados por meio de revisões de trabalhos em periódicos indexados.

Seqüenciar a hemoglobina da raposa *Cerdocyon thous*, reservatório silvestre de LVA.

3. Material e Método

3.1 Colônia de flebótomos.

Os insetos usados nos experimentos foram obtidos de duas fontes.

O primeiro grupo com 200 fêmeas foi obtido de colônia estabelecida no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí (LASAN-UFPI) desde 1995. Os insetos da citada colônia são mantidos há várias gerações de acordo com as condições descritas por Modi & Tesh (1983). O segundo grupo foi formado por insetos do campo coletados do peridomicílio de uma residência do bairro Bela Vista I, zona sul de Teresina-PI.

Os insetos do campo foram coletados com armadilhas de luz tipo CDC colocadas no fim de tarde (por volta das dezoito horas) e retiradas na manhã do dia seguinte. Esses insetos foram separados em 4 grupos de 20 fêmeas ingurgitadas que foram dissecadas para retirada do trato digestivo que foi armazenado para posterior análise. O total de insetos, incluindo os capturados em campo, somou 280 exemplares.

3.2 Preparação dos insetos.

Quatro grupos de 50 fêmeas alimentaram-se, pela primeira vez, diretamente na pele de hamsters (*Mesocricetus auratus*), de um cão doméstico (*Canis familiaris*) de uma galinha (*Gallus gallus*) de uma raposa (*Cerdocyon thous*) e de um voluntário.

Após alimentação os insetos foram mantidos em dieta de 50% de sacarose, *ad libitum* a 25° C e 95% de umidade em estufa tipo B.O. D até o momento da dissecação.

Múltiplos repastos foram feitos alternando reservatórios em pequenos intervalos de tempo e em diferentes tempos de digestão para simular condições de interrupção de alimentação e repastos tardios. Os insetos capturados no campo foram mantidos em 4 grupos de 20 para análise.

3.3 Dissecação.

O intestino dos insetos foi retirado por dissecação com pinças entomológicas em lâmina microscópica contendo água Milli-Q® estéril e posteriormente colocado em criotubos contendo 10µM de inibidor de protease PMSF (Sigma) sendo posteriormente armazenados em nitrogênio líquido. O material estocado foi submetido à liofilização em centrífuga a vácuo

(Speed Vac, Savant) e guardados em freezer a -80°C até o momento da análise por espectrometria de massa.

3.4 Extração e purificação de hemoglobinas de *C.thous*:

A hemoglobina usada para seqüenciamento foi retirada de espécies de *C.thous* por meio de punção endovenosa. Foram retirados 10 ml para tratamento e posterior purificação. As raposas usadas no experimento são cativas no Parque Zoobotânico de Teresina-PI que colaborou plenamente com este trabalho. O sangue extraído foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos para separação do plasma. Os eritrócitos separados foram lavados com solução fisiológica de NaCl a 0,9% em intervalos de 5 vezes por centrifugação a 4°C e 15000 rpm. Após lavagem, as hemácias foram lisadas com água destilada. Após sucessivas centrifugações, a hemoglobina em suspensão foi estocada a -80°C para etapa de purificação. Para purificação foram usadas colunas de fase reversa Vydac® C18 RP 218TP504 300 Å 10µm 0,45x250 mm semipreparativa para separação de cadeias em extrato bruto e Vydac® C18 RP 218TP104 300 Å 5µm 0,45x250 mm analítica para purificação final das cadeias (Separations Group, Hesperia, CA, EUA). Os solventes usados formam água Milli-Q com TFA 0,1% (**A**) e acetonitrila com TFA 0,1% (**B**). Foi usado gradiente linear de 0 a 100% de B. A coleta das frações foi feita de forma manual e concentrada posteriormente em centrífuga a vácuo (Speedvac Savant). As cadeias separadas e concentradas foram submetidas à digestão trípica e purificação analítica usando o mesmo gradiente e solventes. As frações protéicas coletadas foram fragmentadas por MS/MS e seqüenciadas.

3.5 Digestão trípica.

A digestão trípica das hemoglobinas se fez necessária em detrimento do tamanho das moléculas e suas constituições bioquímicas necessitando de redução e alquilação para romper pontes entre cisteínas e corte com serinoproteases para formação de peptídeos seqüenciáveis por espectrometria de massa.

Para reduzir pontes disulfeto 100 mM de DTT foi acrescentado a uma concentração final de 10 mM nas soluções de proteína que foram incubadas por 1 h a 70°C na escuridão. O grupo tiol livre ($_{\text{SH}}$) foi subseqüentemente alquilado com iodoacetamida (50 mM concentração final) durante 3 horas a 37°C . A proteína reduzida e alquilada foi digerida com tripsina (Promega, wt_wt 1:50) por 8 h a 37°C a 0,25 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, pH 8.0. Finalmente,

as misturas de peptídeos resultantes foram dialisados com ponteiras C18 RP ZipTip® (Millipore) e resuspensas em água Milli-Q com 0.1% de TFA para análise por espectrometria de massa.

3.6 Fragmentação e seqüenciamento por CapLC/MS/MS.

A fragmentação e o seqüenciamento dos peptídeos foram feitos com o espectrômetro de massa Q-TOF Ultima API (Waters, Manchester, UK) operando com fonte nanofluxo e modo de ionização *Electrospray* positivo. As frações da RP-HPLC foram dissolvidas em uma solução de água/metanol 1:1 com 0,1% de ácido acético. As condições experimentais foram: voltagem do capilar 2,80 kV, voltagem do cone 40V e o método de fragmentação *CID* (*Collision Induced Dissociation*) utilizando argônio como gás de colisão. As amostras foram infusas em um fluxo de 200nL/min com o espectrômetro de massa operando no modo W e aquisição direta de dados.

Os dados da cromatografia capilar (CapLC®) acoplada ao espectrômetro de massa Q-TOF (CapLC/MS/MS), foram obtidos utilizando o Sistema CapLC® (Waters, Manchester, UK), com coluna *narrow-bore* Symmetry® C18 5µm (0,32 x 150mm, Waters, Manchester, UK). As soluções utilizadas foram água/acetonitrila/ácido trifluoracético nas proporções 90:10:0,1 e 10:90:0,1 como soluções A e B, respectivamente. O fluxo foi de 100 nL/min, com um gradiente de 5 a 100% de B em 400 minutos. O espectrômetro de massa operou no modo de aquisição em varredura direta de dados. O seqüenciamento obedeceu à nomenclatura de Roepstorff e Fohlman 1984, modificada por Johnson *et al*, 1987 onde moléculas carregadas com H⁺ no N terminal pertencem à série a, b ou c e as carregadas no C terminal pertence à série x, y ou z (Figura 2).

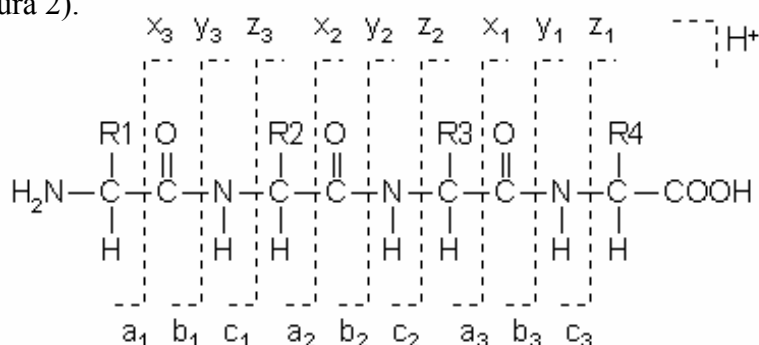


Figura 2. Fragmentação de peptídeo originando as séries de acordo com a nomenclatura.

A dupla clivagem da molécula dá origem a fragmentos internos formados pela combinação de produtos da série b e y. Cada fragmento interno é a assinatura de um aminoácido. Esses fragmentos com apenas uma carga lateral formada pela combinação da série y formam os íons chamados imônios. Cada aminoácido tem seu imônio característico o que permite sua identificação no espectro de MS/MS (Falick, 1993 e Papayannopoulos, 1995).

3.7 MALDI LIFT-TOF/TOF

Alíquotas de 50 pM em solução aquosa foram analisadas em espectrômetro UltraFlex II TOF/TOF (Bruker). As amostras foram misturadas a uma solução saturada de matriz Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) na proporção 3:1 e colocadas diretamente em uma placa AnchorChip. Os espectros de MS e MS/MS foram gerados em modo refletido, com calibração externa, usando kits de mistura de calibrantes padrão (Bruker). O seqüenciamento dos peptídeos foi feito pela fragmentação do íon precursor usando N_2 e dissociação induzida por colisão a gás (CID) e pressão de célula de colisão mantida a 2.8×10^{-6} torr.

3.8. Interpretação de espectros de massa MS/MS:

A interpretação de espectro de um peptídeo de massa 951.34 Da fragmentado por MS/MS é mostrado na figura 3 como exemplo. A protonação do peptídeo mostra o acréscimo de 1 Da referente ao íon H^+ adquirido no processo de ionização da amostra. A massa 952.34 Da corresponde ao íon precursor ou parental que, ao ser fragmentado por colisão a gás (CID), lança seus constituintes também protonados no analisador de massa gerando as séries b e y como descrito em nomenclatura citada acima. A subtração do valor total da massa do íon parental pelo íon posterior (no exemplo o íon 853,44) revela o início da série y (direção C terminal para N terminal) que é confirmada pela presença de íons de clivagem interna dos resíduos de AA classificados como x ou z caracterizados pela presença de -17 Da (perda de grupo NH^+) e +28 Da (manutenção do grupo COO^-). O contrário ocorre na série b quando a soma de cada resíduo até a massa do precursor (direção N terminal para C terminal) compõe o peptídeo. Essa série também é confirmada pelos íons de clivagem interna dos resíduos que formam a série a e c pela presença de +17 Da e -28 Da (manutenção do grupo NH^+ perda do grupo COO^-).

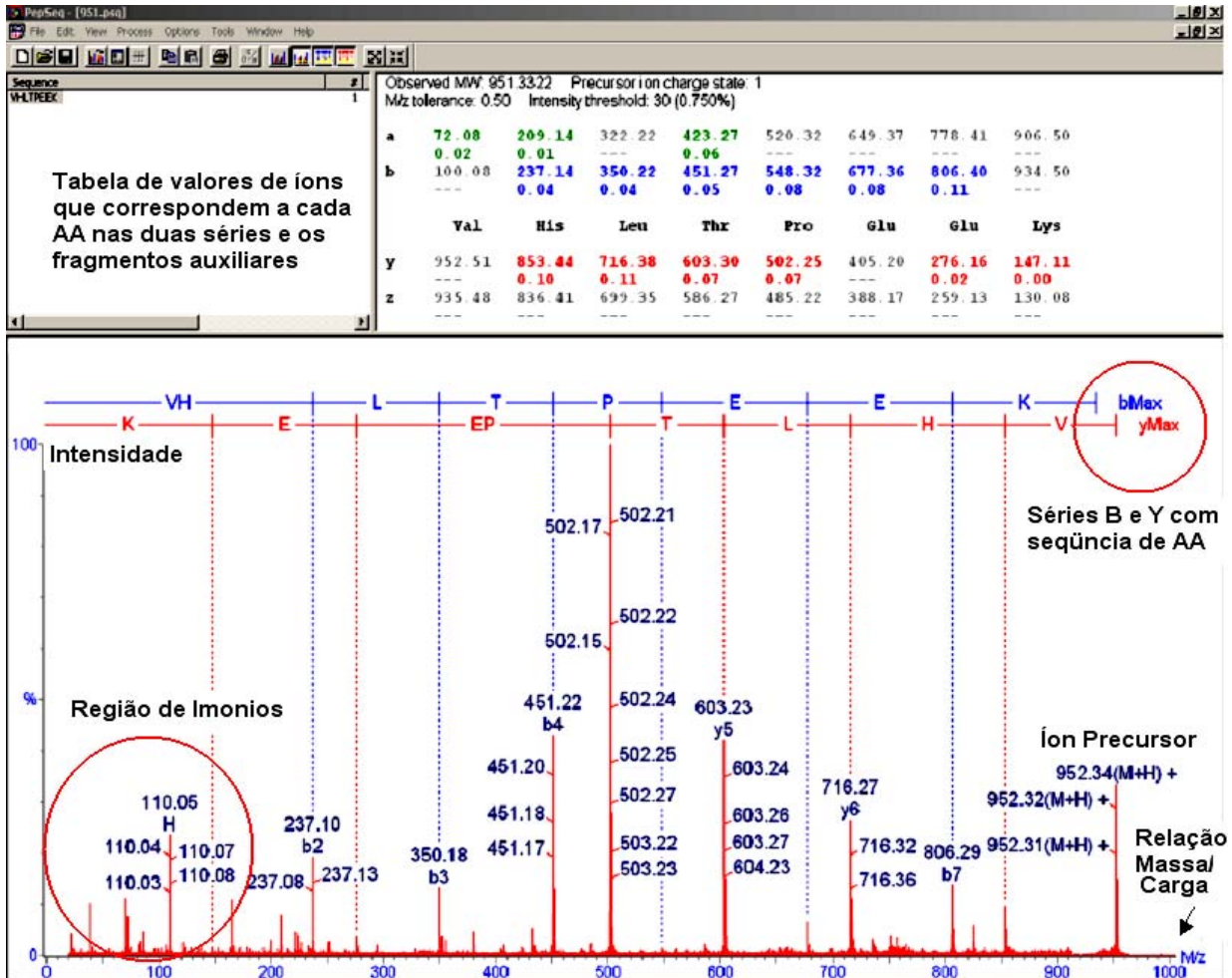


Figura 3. Espectro de MS/MS de seqüenciamento em software MassLynx v3.5 (Waters) que acompanha o espectrômetro de massa. Na janela acima a tabela com todos os íons encontrados que formam as séries b e y e as fragmentações internas de cada aminoácido. O espectro possui no eixo y a intensidade das massas e no eixo x a relação massa por carga dos íons. O círculo inferior revela a região dos imônios que correspondem a uma fragmentação interna ainda menor dos resíduos de aminoácidos mantendo apenas os radicais, H^+ e o grupo NH^+ . O círculo superior mostra as séries mais intensas (b e y) que determinam a seqüência dos aminoácidos que compõem o peptídeo.

3.9 Alinhamento e análise em bancos de dados:

Para o alinhamento de hemoglobinas foi usado o software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5. Copyright© 1997-2005 (Hall, 1999). As seqüências de cadeia alfa e beta das hemoglobinas foram retiradas dos bancos de dados Swiss-Prot e alinhadas para determinação consenso e a localização das regiões conservadas da molécula.

Programas “on-line” como Fasta3 e MPSearch foram usados para alinhar peptídeos seqüenciados e identificar similaridades, possibilidades de coincidências nas massas e seqüências de hemoglobinas de várias espécies registradas nos bancos. Outra forma de identificação usada foi a digestão teórica das hemoglobinas para determinar a massa e seqüência gerada com a clivagem da molécula pelas proteases dos insetos. O programa usado foi o Cutter, a enzima usada foi tripsina que cliva moléculas entre resíduos de lisina (K) e arginina (R). Fragmentos não específicos gerados pela degradação da molécula e por outras proteases também foram identificados pelo alinhamento e localizados na seqüência das cadeias.

3.10 Perfis de digestão de hemoglobina por flebótomos:

A média com desvio de oito dos íons mais intensos em 36 espectros gerados de 6 amostras diferentes de conteúdo alimentar dos flebótomos alimentados com sangue de cão e sangue humano em intervalos de 24 a 96 horas, foram separadas e comparadas em histogramas para demonstrar as diferenças na digestão e na formação de íons distintos para cada tipo de hemoglobina.

3.11 Análise estatística.

Para análise estatística foi usada a análise discriminante (DA) em software XLSTAT Versão 2006.2 da Addinsoft™. As massas geradas com a análise das moléculas de hemoglobina e seus fragmentos digeridos formaram as variáveis explanatórias quantitativas para identificar em um gráfico bidimensional se o grupo (espécie) a qual as variáveis pertencem são distintos. O software exclui a colinearidade permitindo a segregação das variáveis peculiares a cada grupo (Fisher, 1936; Huberty, 1994).

4. Resultados

4.1 MALDI-TOF/TOF

Por meio da técnica de MALDI foi possível a identificação de cadeias inteiras de hemoglobinas, identificadas pela precisa massa molecular mostrada em espectro da figura 4 obtido de amostra purificada de conteúdo alimentar de flebótomo 24 horas após repasto. A figura 6 mostra o conteúdo alimentar com 48 horas de digestão com a presença das cadeias alfa e beta de hemoglobina humana e os peptídeos gerados pelo processo digestivo. A figura 7 ilustra os peptídeos e cadeias alfa e beta de hemoglobina retiradas do trato digestivo após 96 horas de digestão. As setas indicam os vários peptídeos formados no avançado processo de digestão e o círculo mostra as cadeias alfa e beta em digestão.

4.1.2 Identificação de repastos múltiplos:

A figura 8 mostra a identificação de peptídeos de hemoglobinas de três espécies de animais diferentes que foram identificadas após aplicação da técnica de PMF. Em 8.1, vários peptídeos gerados no processo de digestão, em 8.2, peptídeos separados por cromatografia líquida para fragmentação e seqüenciamento. A tabela 1 mostra fragmentos de hemoglobina de sangue humano, de cão e de galinha obtidos da mesma região da cadeia alfa (fragmento 17-31) mostrando as diferenças entre as seqüências que são usadas como marcadores na diferenciação das espécies. A figura 8 mostra os espectros com seqüenciamento desses fragmentos.

4.1.3 Amostras de campo:

Foram encontradas hemoglobinas inteiras e fragmentos de diversas massas que foram tratadas com tripsina para localização por PMF e seqüenciamento (Fig. 9). Os peptídeos seqüenciados foram colocados na tabela 2 com a identificação da posição na cadeia de hemoglobina e a espécie à que pertencem.

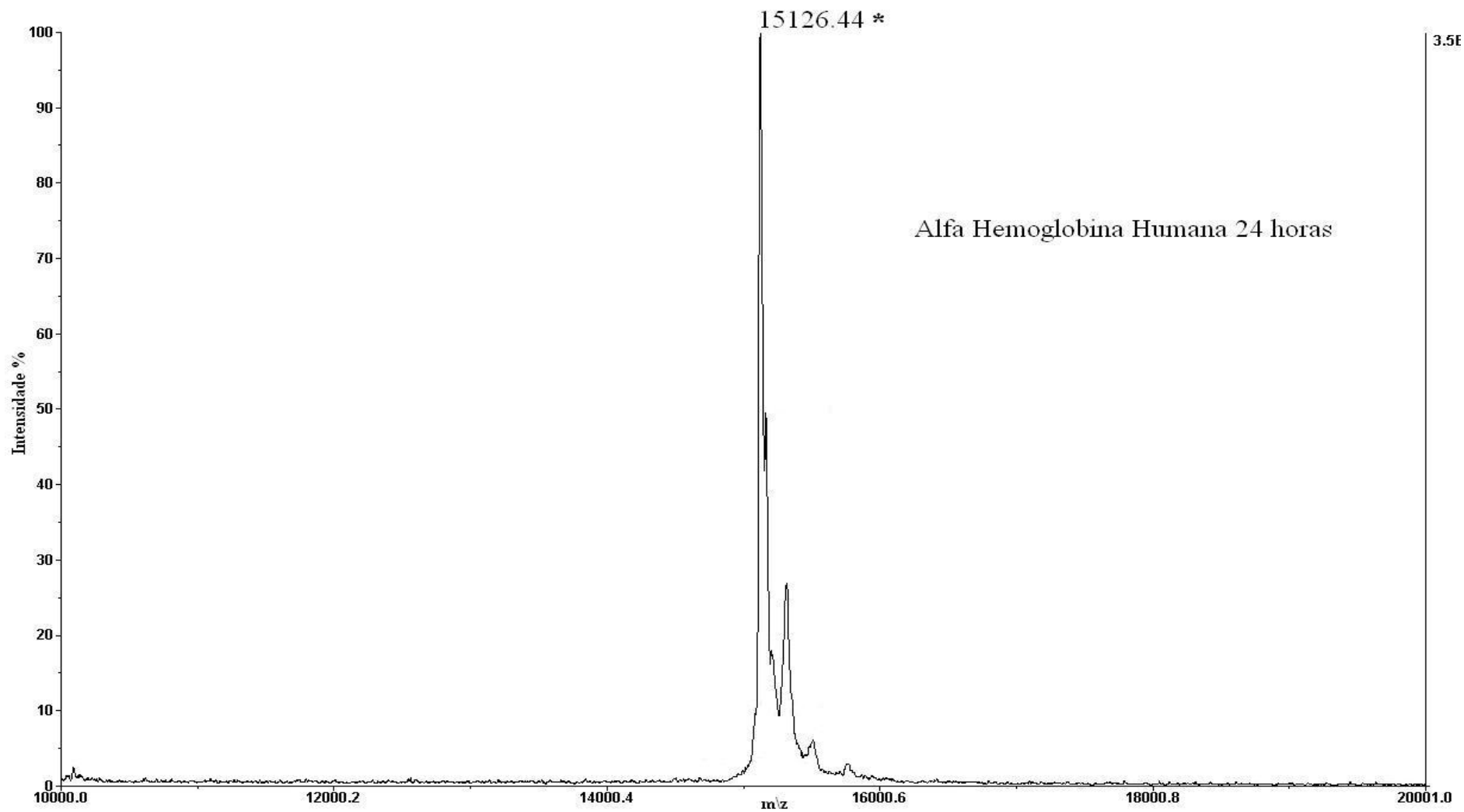


Figura 4. Espectro de massa de cadeia alfa de hemoglobina humana extraída e purificada do trato digestivo de flebótomo 24 horas após repasto. O valor 15126,44 Da (*) corresponde exatamente à massa da cadeia alfa que foi separada do conteúdo alimentar por RP-HPLC e identificada por MALDI-TOF/TOF MS.

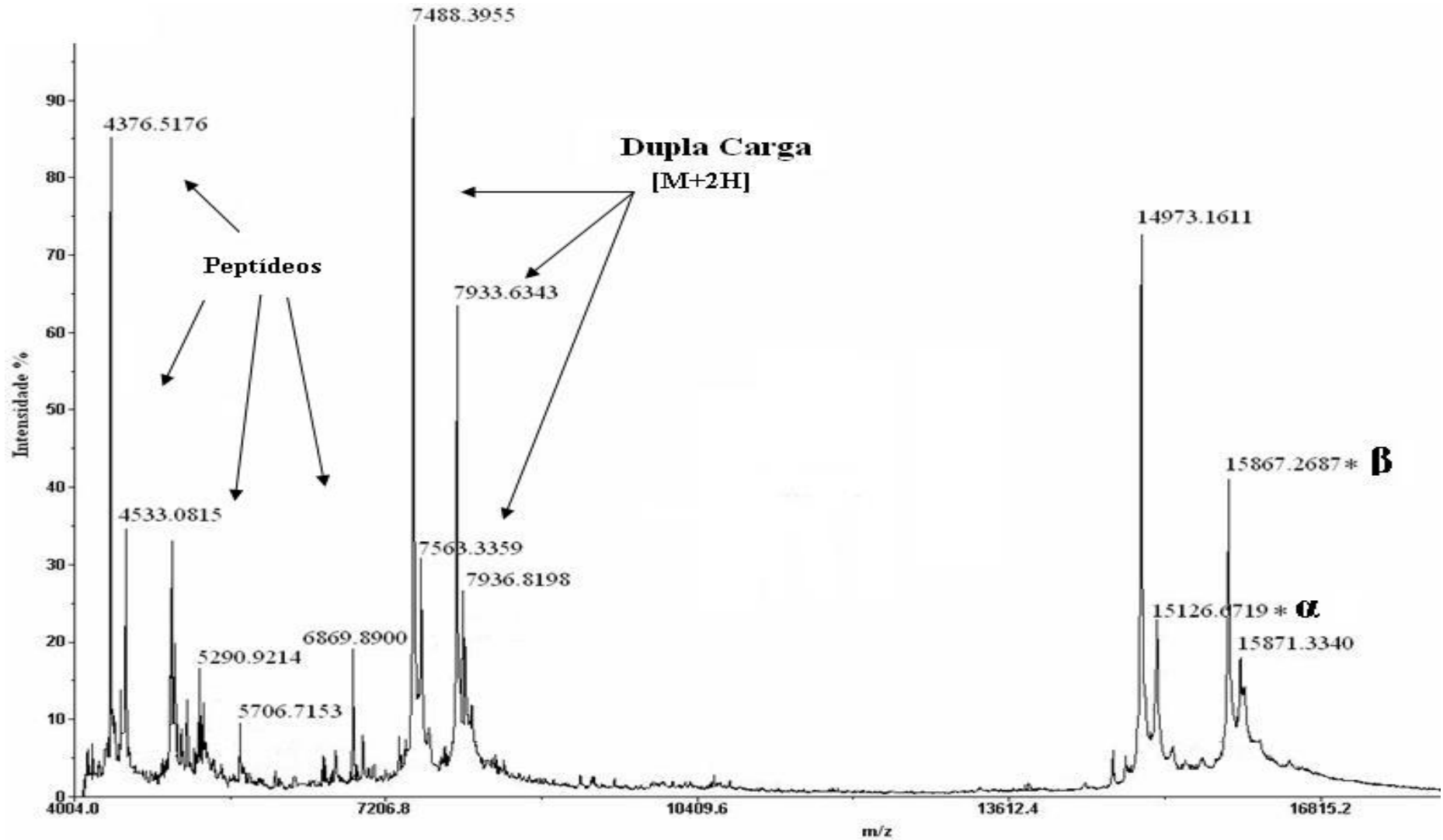


Figura 5. Espectro de massa mostrando a cadeia alfa e beta de hemoglobina humana extraída do trato digestivo de flebótomo 48 horas após primeira alimentação. As cadeias intactas (*) e os peptídeos frutos da digestão foram identificados por MALDI-TOF/TOF MS que mostrou acurácia de massa na identificação do repasto feito com sangue humano.

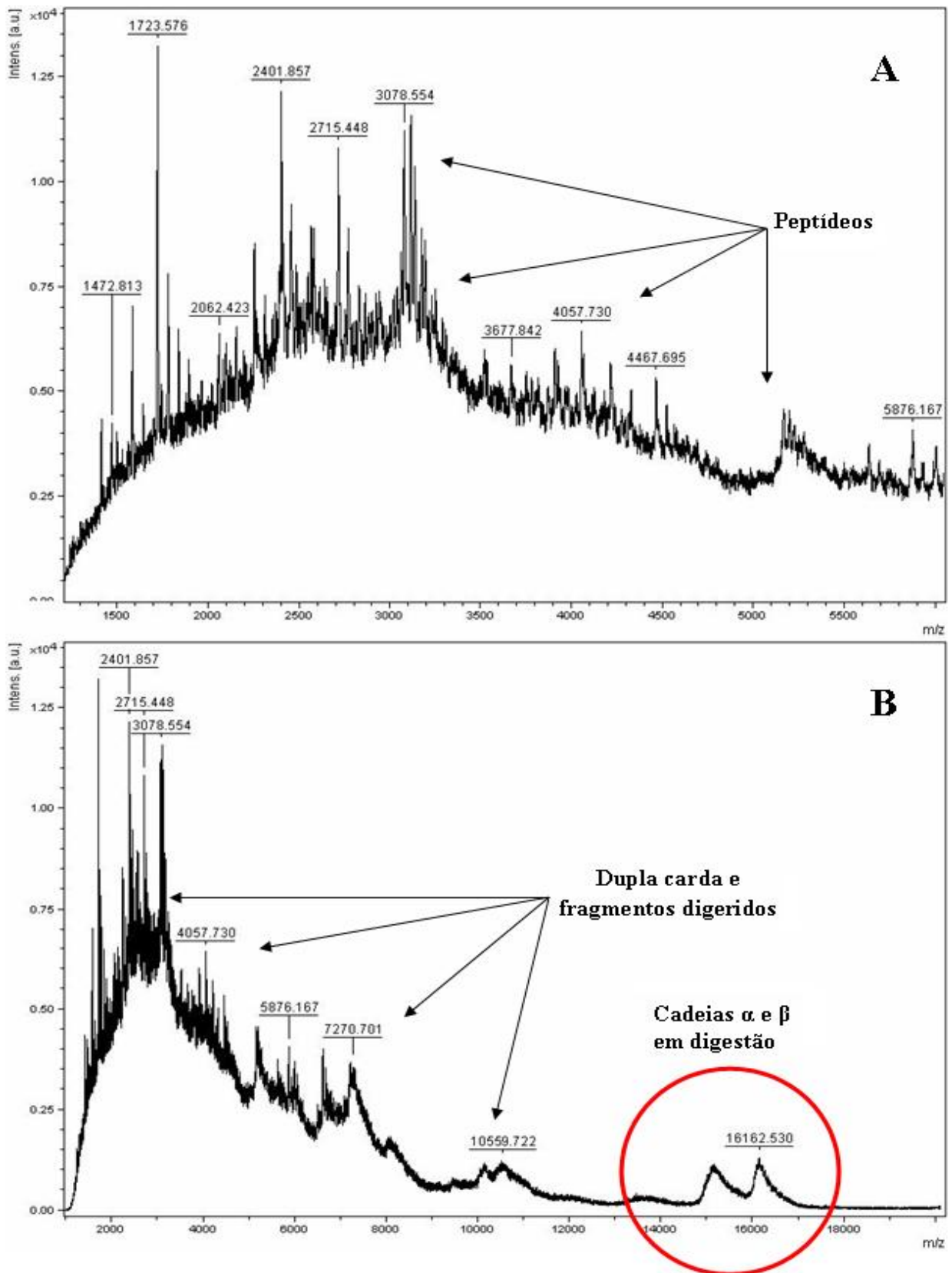


Figura 6. Espectros de massa de hemoglobina de cão e galinha em repasto misto. Repasto realizado inicialmente em cão e posteriormente em galinha após 96 horas da primeira alimentação. Em **A**, peptídeos formados da primeira alimentação na mistura formada com a digestão das cadeias alfa e beta mostradas em **B** juntamente com os fragmentos iniciais da hemoglobina do segundo repasto.

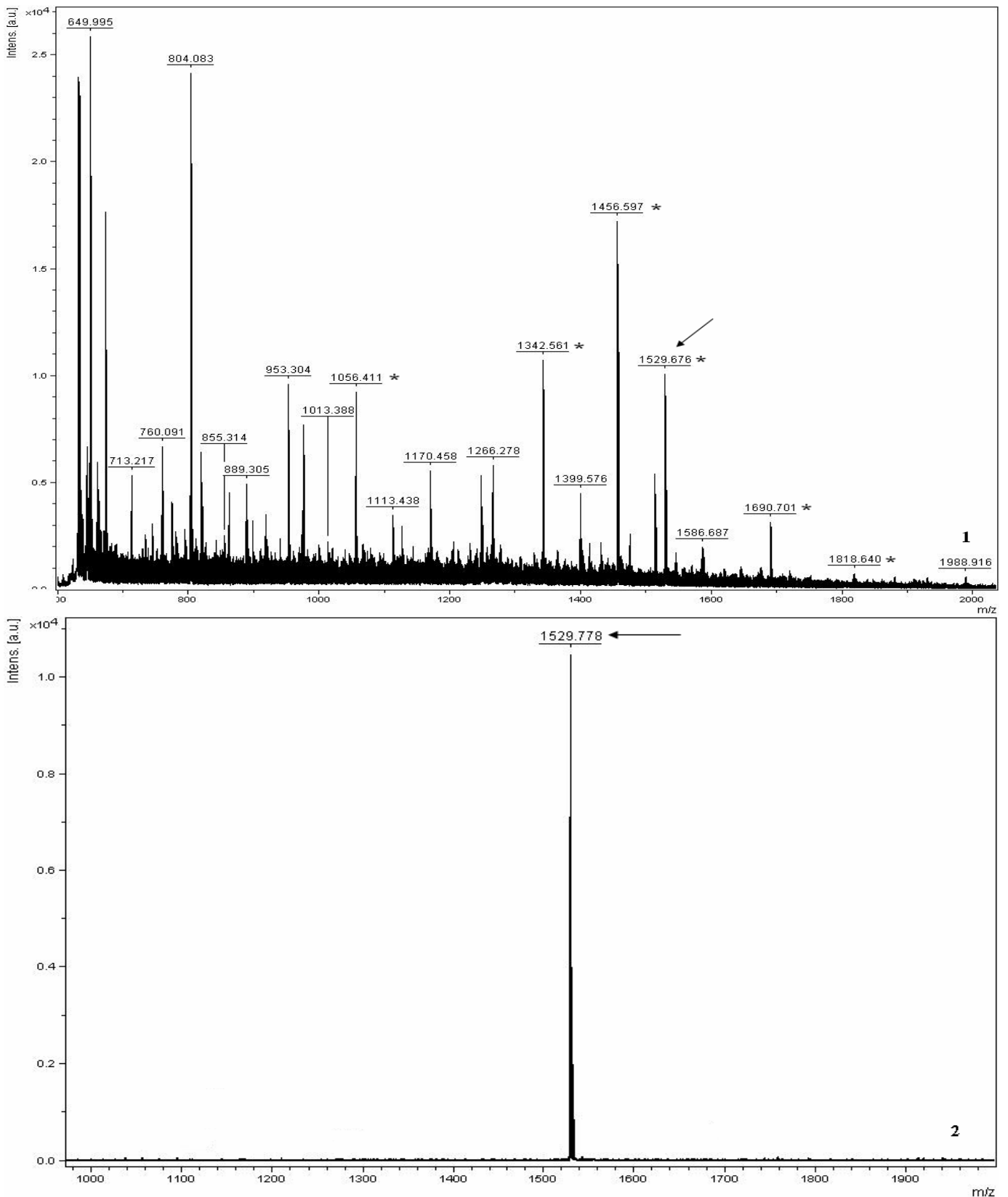


Figura 7. Espectros de MS mostrando peptídeos de múltiplas fontes de sangue (humano, galinha, cão) obtidos de conteúdo alimentar de flebótomo (1). Em asterisco os peptídeos que serviram para identificar as espécies. A seta indica um dos peptídeos submetidos a processo de purificação por HPLC com completa separação para posterior fragmentação por MS/MS.

Tabela 1. Peptídeos sequenciados de misturas de hemoglobina de três espécies extraídos de flebótomo. Peptídeo de cadeia alfa fragmento de 17-31.

Espécie	Número Fragmento	Número Resíduo	[M+H] ⁺ Massa	Sequência
Humano	04	17-31	1529.73	V GAH A GEYGA E AL R
Galinha	04	17-31	1645.78	I AGH A EEYGA E T L R
Cão	04	17-31	1487.69	I GGH A GDYGG E AL R

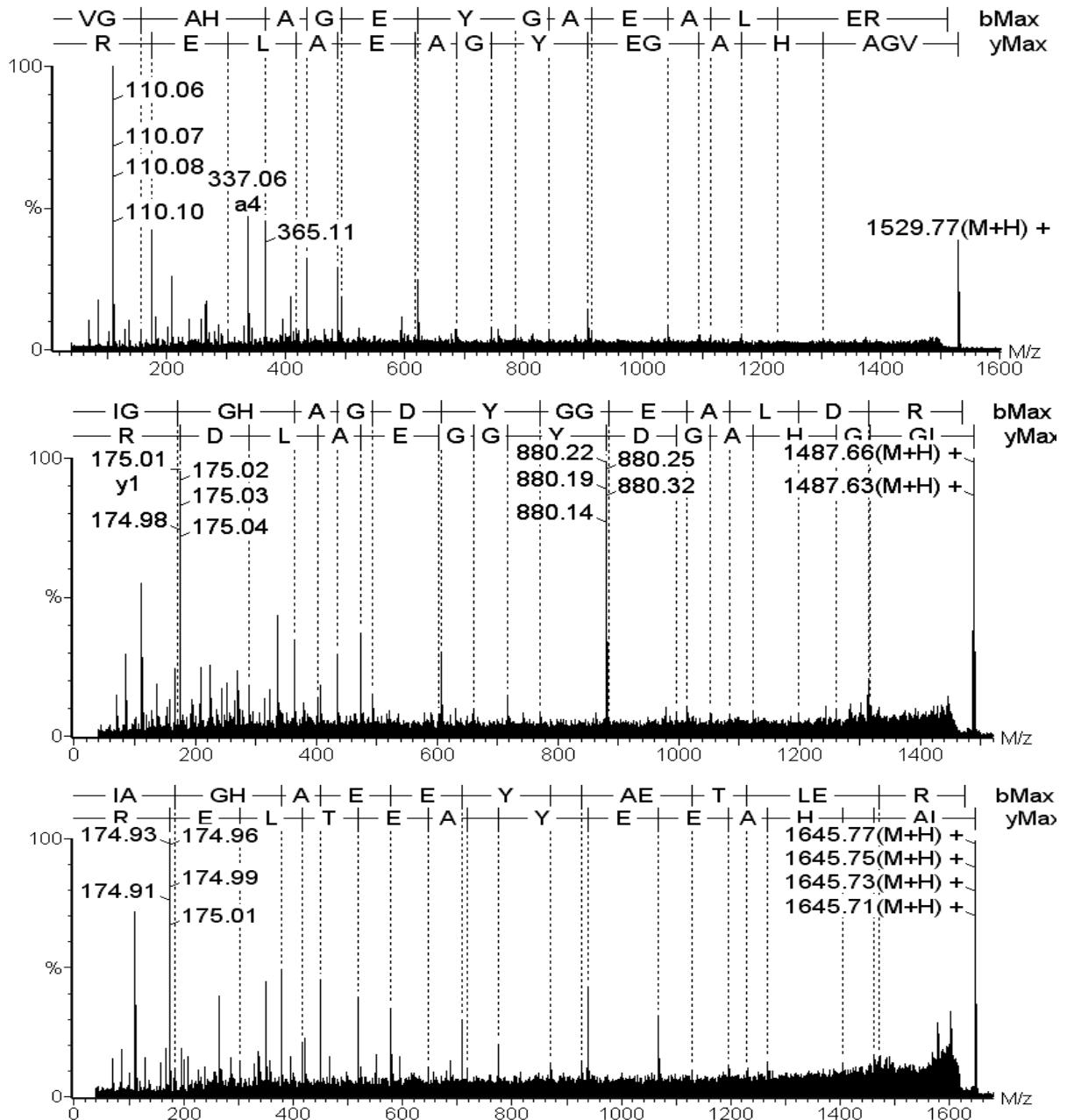


Figura 8. Peptídeos formados pela fragmentação de cadeia alfa de hemoglobina (resíduos de 17-31) em mistura, identificando as três espécies e a diferença entre sequências.

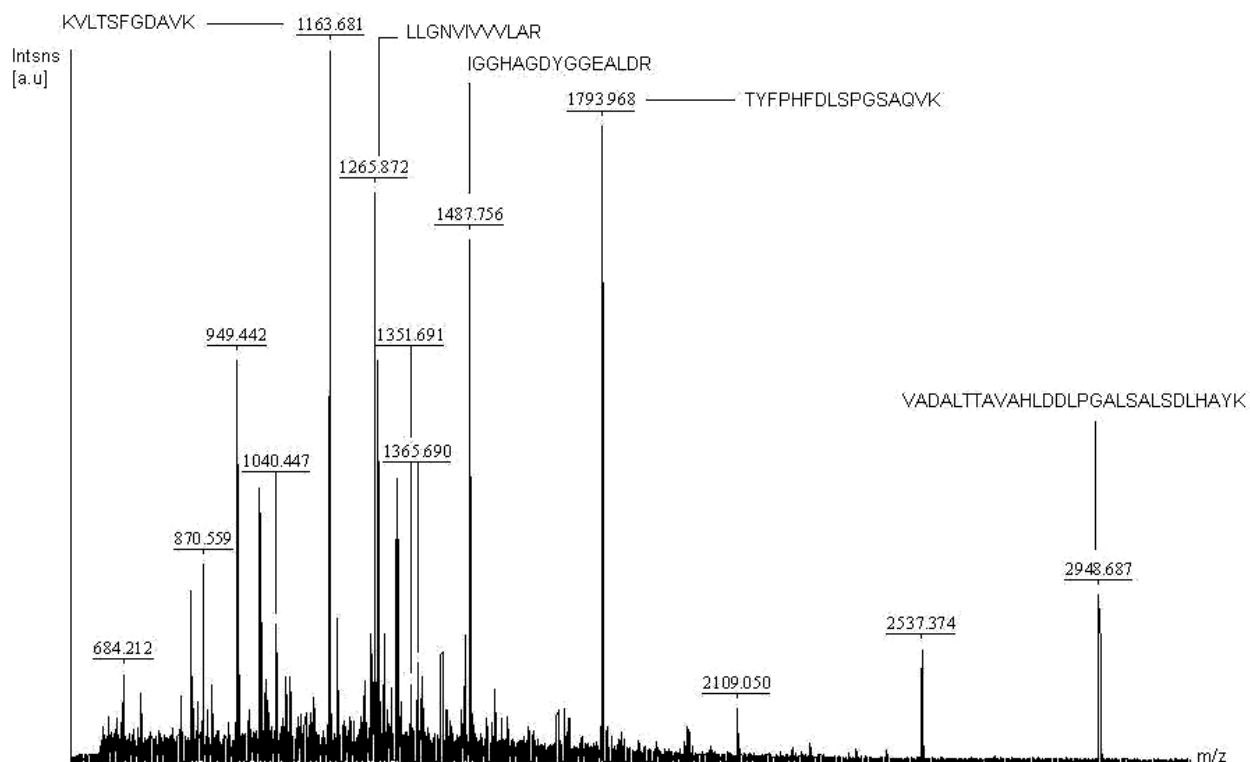


Figura 9. Espectro de MS mostrando peptídeos de espécies animais diferentes que foram identificados por seqüenciamento em conteúdo alimentar de flebótomo capturado no campo.

Tabela 2. Massa dos peptídeos seqüenciados na mistura e sua localização na hemoglobina de cada animal identificado.

Espécie	Fragmento	Resíduo	Massa	Seqüência
Galinha	Beta	66-76	1164.66	KVLTSFGDAVK
Porco	Beta	105-116	1265.83	LLGNVIVVVLAR
Cão	Alfa	41 -56	1793.89	TYFPHFDLSPGSAQVK
Cão	Alfa	62 -90	2948.54	VADALTTAVAHLDDLPGALSALSDLHAYK

Nas amostras de campo foram seqüenciados peptídeos de hemoglobina de galinha, de porco e cão, correspondendo às espécies animais encontradas no local. A figura 11 mostra os espectros de MS/MS com seqüência das hemoglobinas das três espécies.

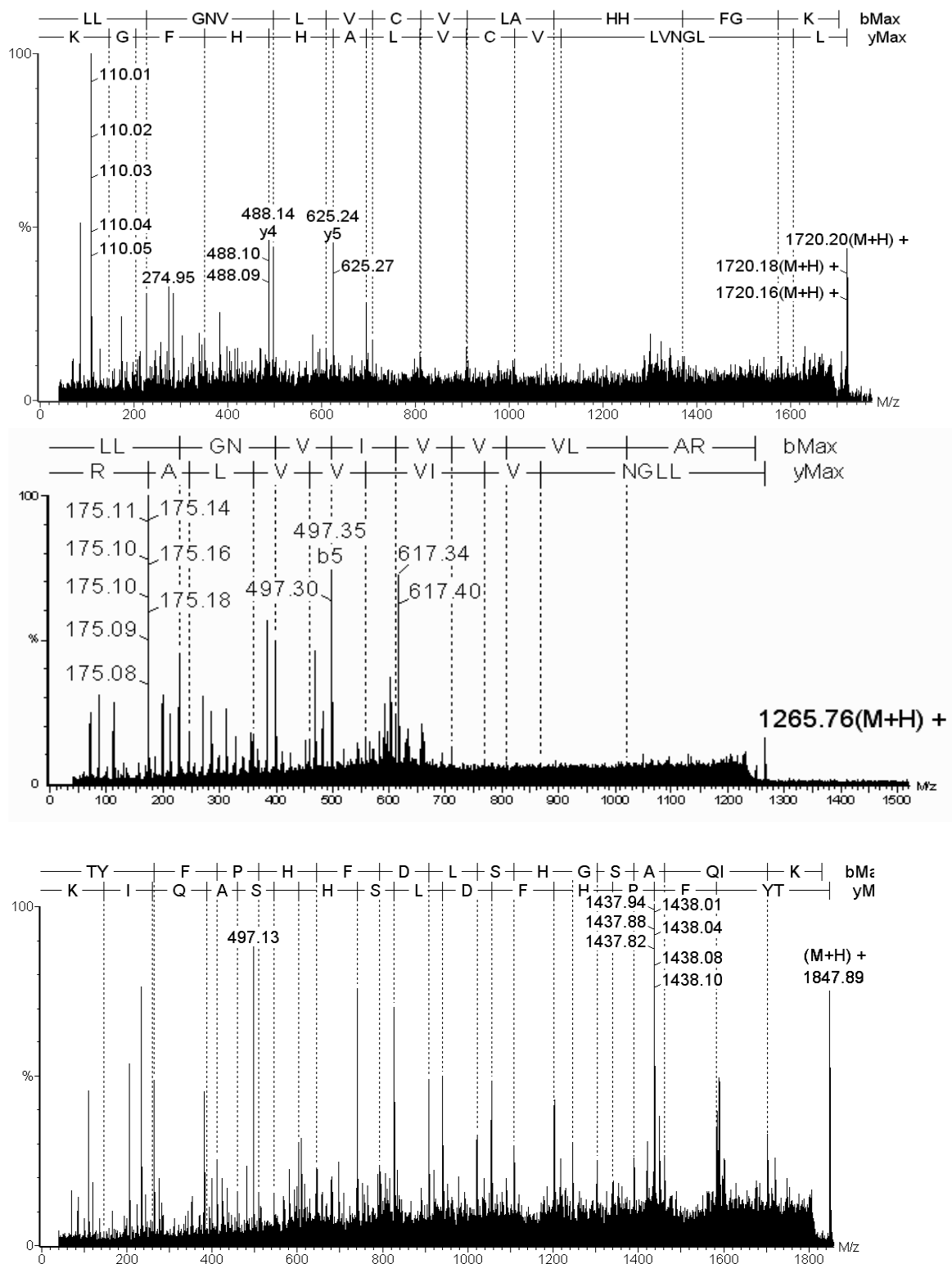


Figura 10. Espectros de MS/MS mostrando seqüências de hemoglobina de cão (α 105-120), de porco (α 105-116) e de galinha (α 41-56). Peptídeos extraídos de trato digestivo de flebótomo do campo.

4.2 Purificação e seqüenciamento de hemoglobina de *Cerdocyon thous*:

O cromatograma da figura 11A mostra a separação das cadeias alfa e beta em cromatografia semipreparativa. Em 11B a cromatografia analítica de cadeia para concentração digestão com tripsina para posterior separação (11C) de frações para fragmentação por MS/MS. As frações coletadas e submetidas a análise por espectrometria de massa mostraram peptídeos trípticos que foram fragmentados e seqüenciados diretamente.

A figura 12 mostra o alinhamento das cadeias alfa e beta de hemoglobina de *C.thous*, as figuras 13 a 18 mostram peptídeos de *C.thous* seqüenciados por MS/MS.

4.3 Alinhamento de cadeias de hemoglobina:

O alinhamento das seqüências de cadeia alfa e beta de hemoglobina mostram as diferenças entre espécies e indica as semelhanças (.) e as diferenças que foram usadas como marcadores na diferenciação das espécies (Fig. 19).

4.4 LC ESI-Q-TOF MS/MS

Por LC ESI-Q-TOF MS/MS em escala de nanofluxo foram identificadas massas moleculares diferentes de fragmentos de hemoglobina que geraram um cromatograma de massa (Fig.20-21) à medida que as amostras foram eluídas da coluna capilar e lançadas no espectrômetro de massa em tempos de retenção diferentes. Após a detecção nos canais do cromatograma de massa, cargas simples $[M+H]^+$ e duplas $[M+2H]^+$ foram selecionadas automaticamente para fragmentação gerando canais de MS/MS. Os canais da cromatografia de massa geraram espectros de MS e MS/MS para localização e seqüenciamento dos peptídeos (Fig. 22).

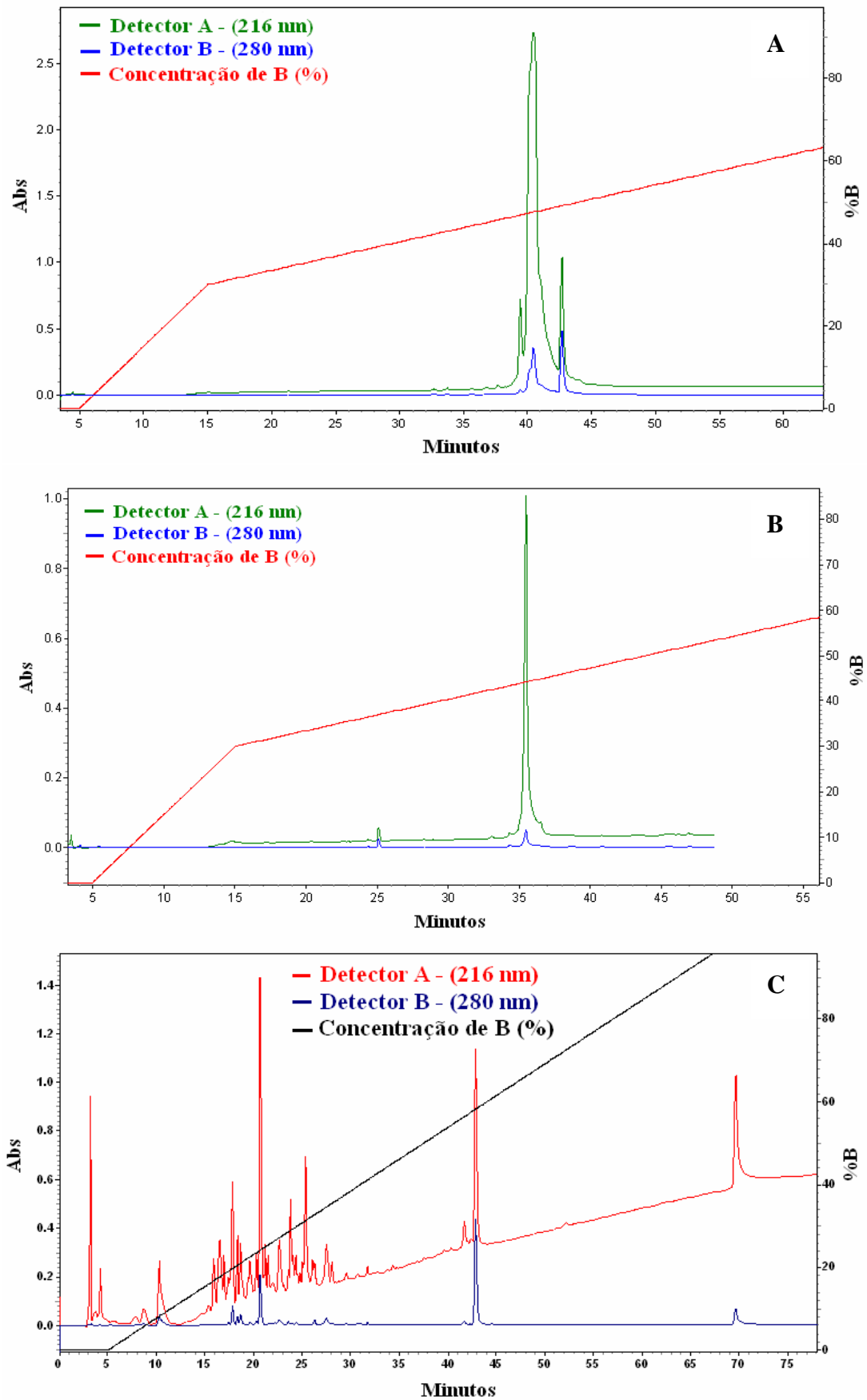


Figura 11. Cromatogramas de hemoglobina de *C. thous*. Em A, cromatografia de extrato bruto com separação de cadeias alfa e beta. Em B cadeia alfa purificada e em C digerido trípico de hemoglobina separado para análise por MS/MS.

4.5 Sequenciamento de hemoglobina de *C.thous* (Seqüência de Novo).

Seqüência cadeia alfa:

```

      10      20      30      40      50      60
VLSPADKTI1 KSTWDKIGCH2 ACDYGC3EALD4 RTFQSFPTTK5 TYFP6HFDLSP7 GSAQVKAHCK8

      70      80      90      100     110     120
KVADALTTAV9 AHLDDLPGAL10 SALS11DLHAYK12 LRVD13PVNFKL14 LSHCLLVTLA15 CHHPTEFTP16A

      130     140
VHASLDKFFI17 AVSTVLTSKY18 R
    
```

Seqüência cadeia Beta:

```

      10      20      30      40      50      60
VHLTAEKSL1 VSGLW2GKVN3V4 DEVG5GEALGR6 LLIVYPWTQR7 FDS8FGDLST9 PDAVMSNAK10V

      70      80      90      100     110     120
KAHGK11KVLNS12 FSD13GK14NLDN15 LKCTFAKLS16E LHCD17KLHVD18P ENFKLLGNV19L VCVLAH20HFGK21

      130     140
EFTPQVQAAY22 QKVVAGVAN23A LAHKYH24
    
```

Figura 12. Seqüências de cadeia alfa e beta e *C.thous*.

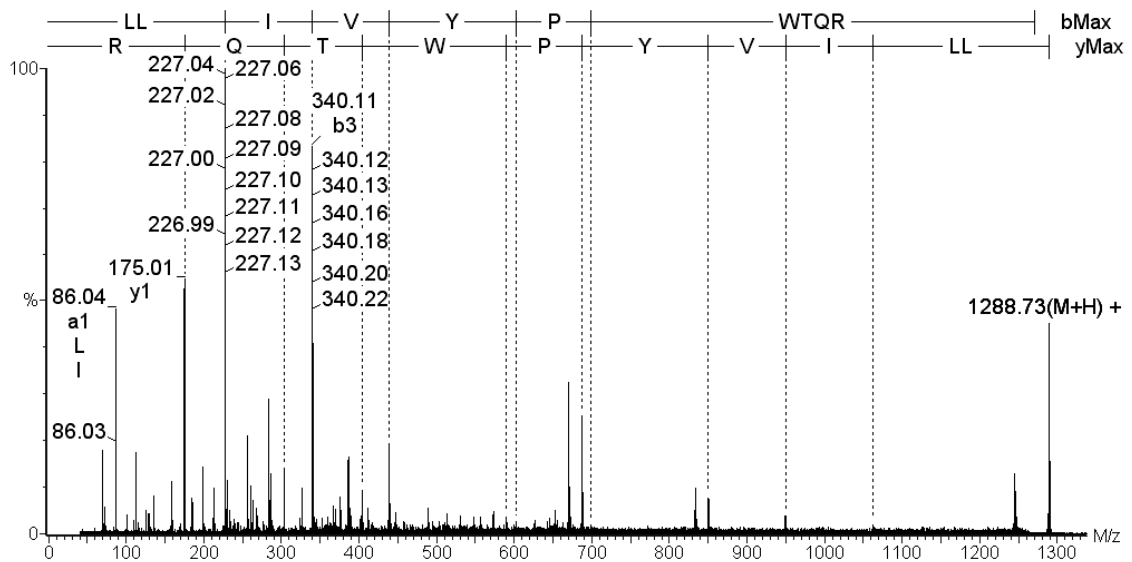


Figura 13. Espectro de MS/MS com seqüência de cadeia beta de hemoglobina de *C.thous* fragmento 31-40.

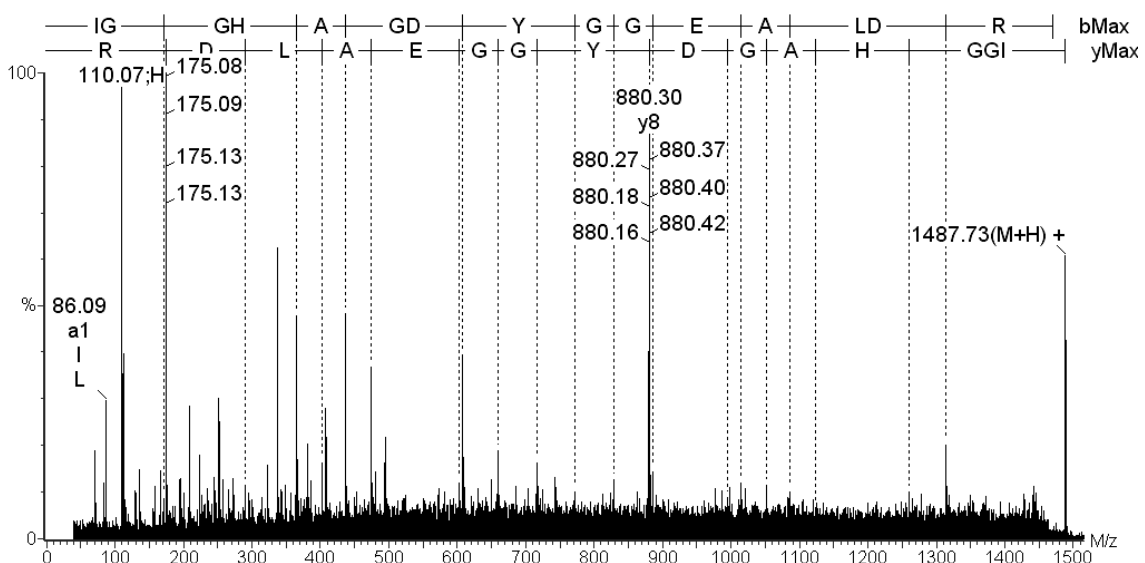
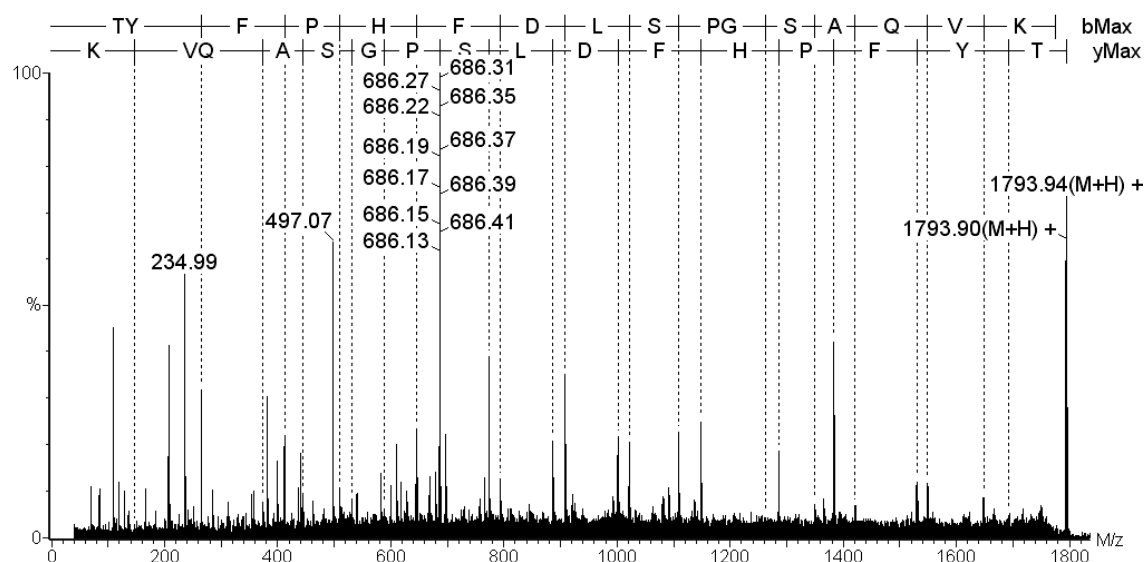
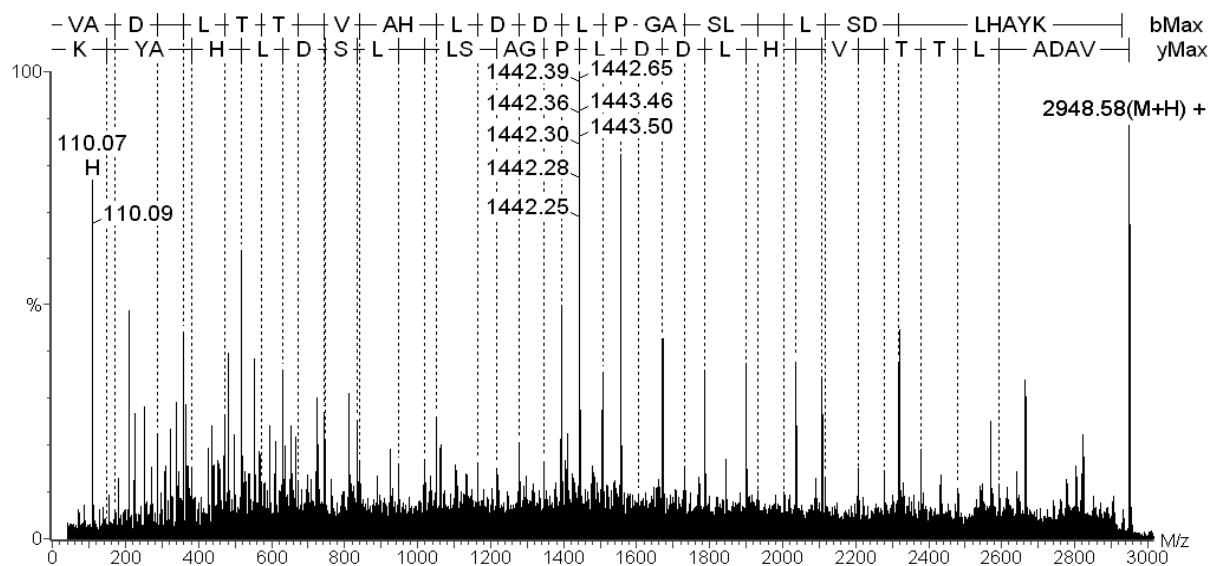


Figura 14. Espectro de MS/MS de hemoglobina de *C.thous* cadeia alfa (62-90), alfa (41-56) e alfa (17-31).

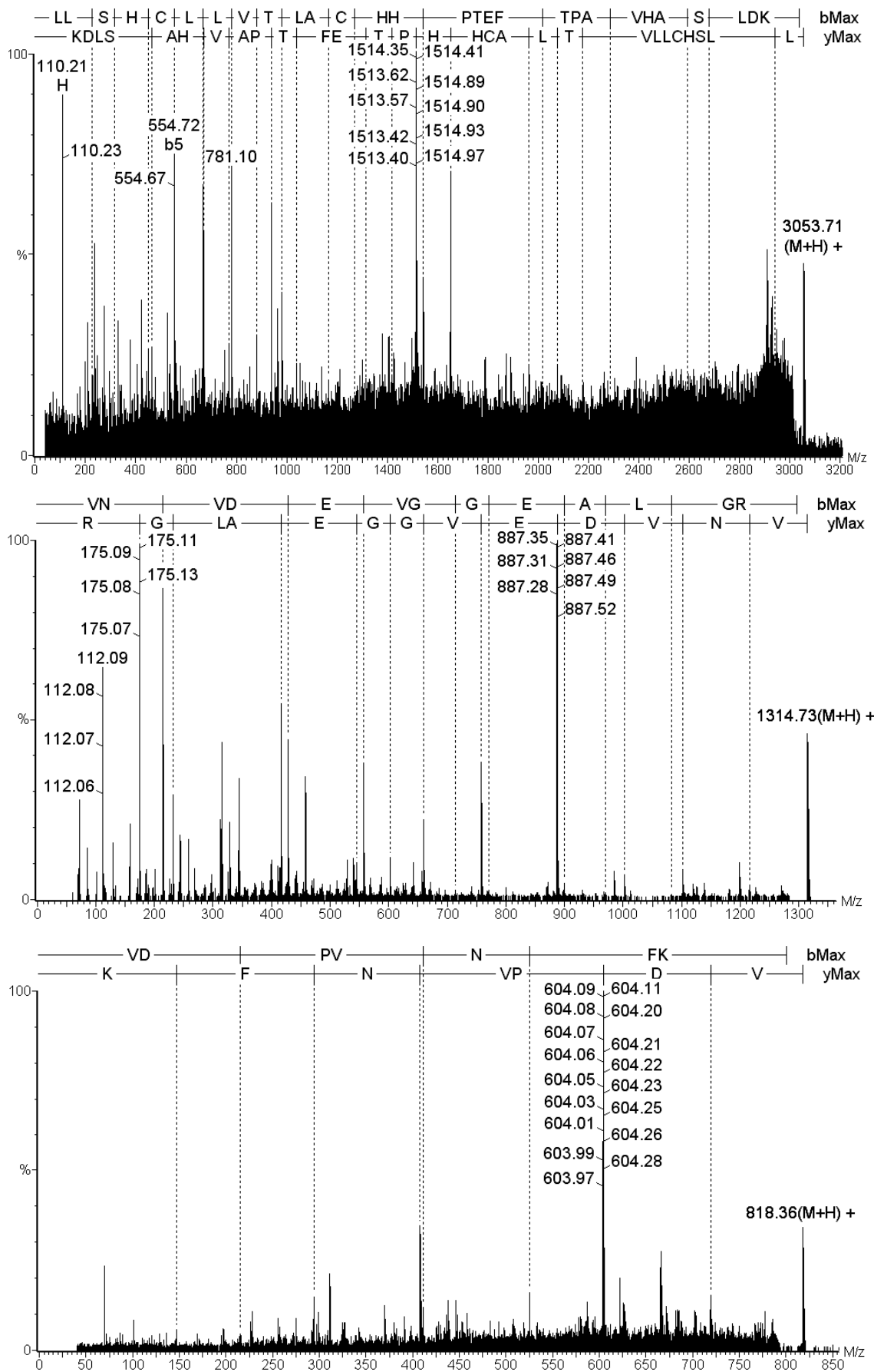


Figura 15. Sequenciamento de hemoglobina de *C.thous* cadeia alfa (100-127), beta (18-30) e alfa (93-99).

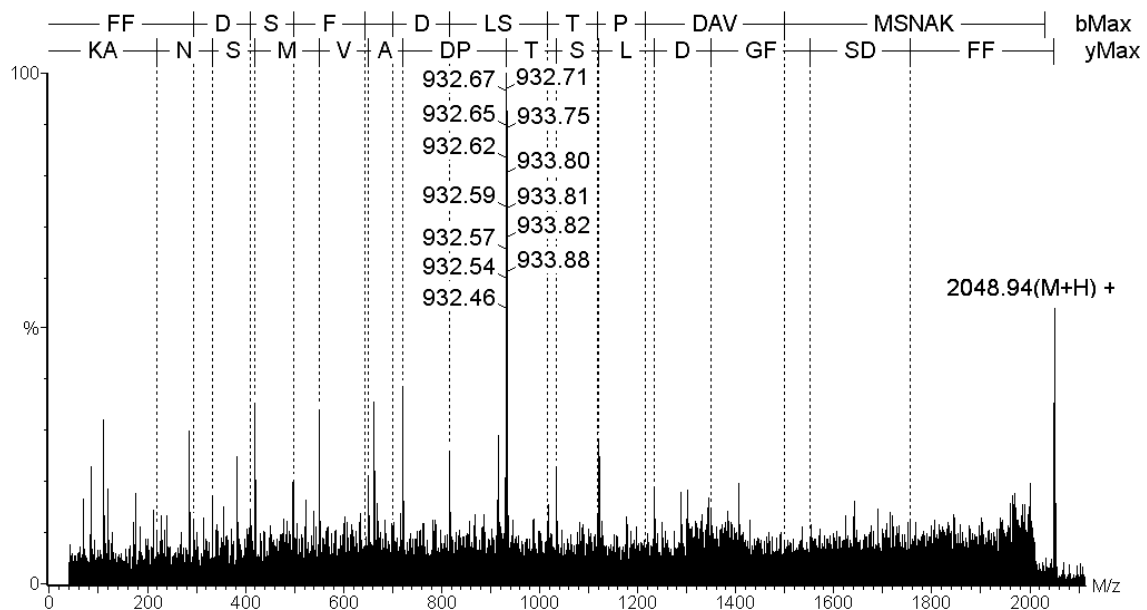
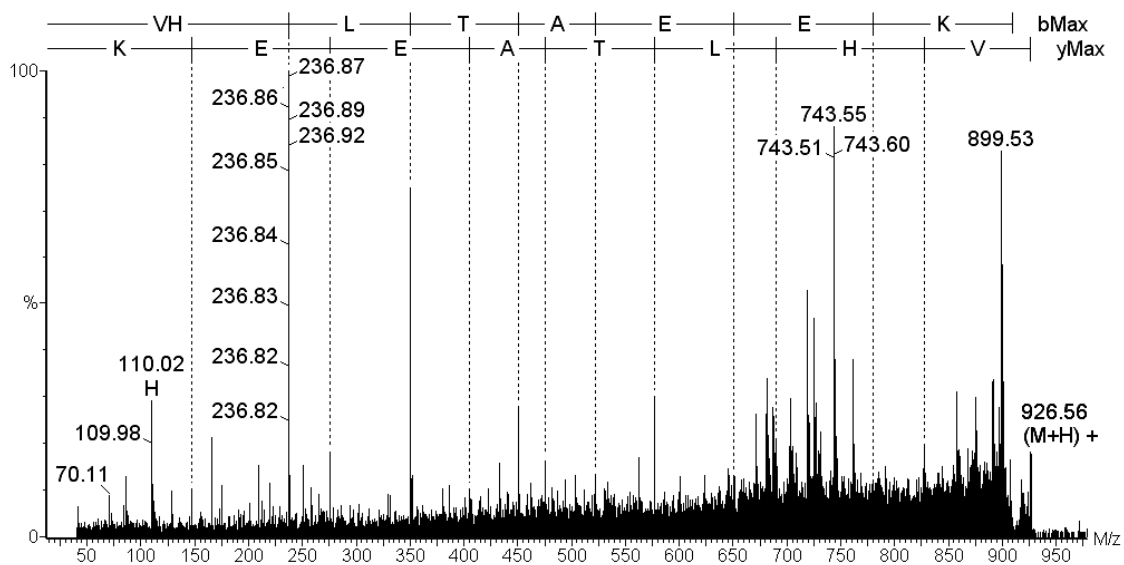
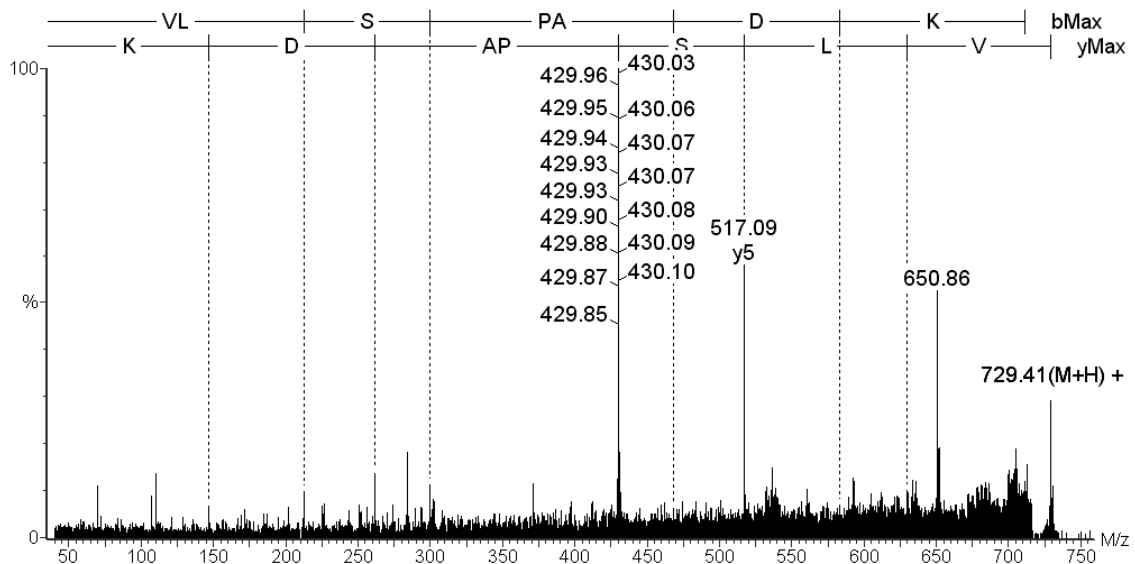


Figura 16. Espectros de MS/MS de hemoglobina cadeia alfa (1-7), beta (1-8) e beta (41-59) de *C.thous*.

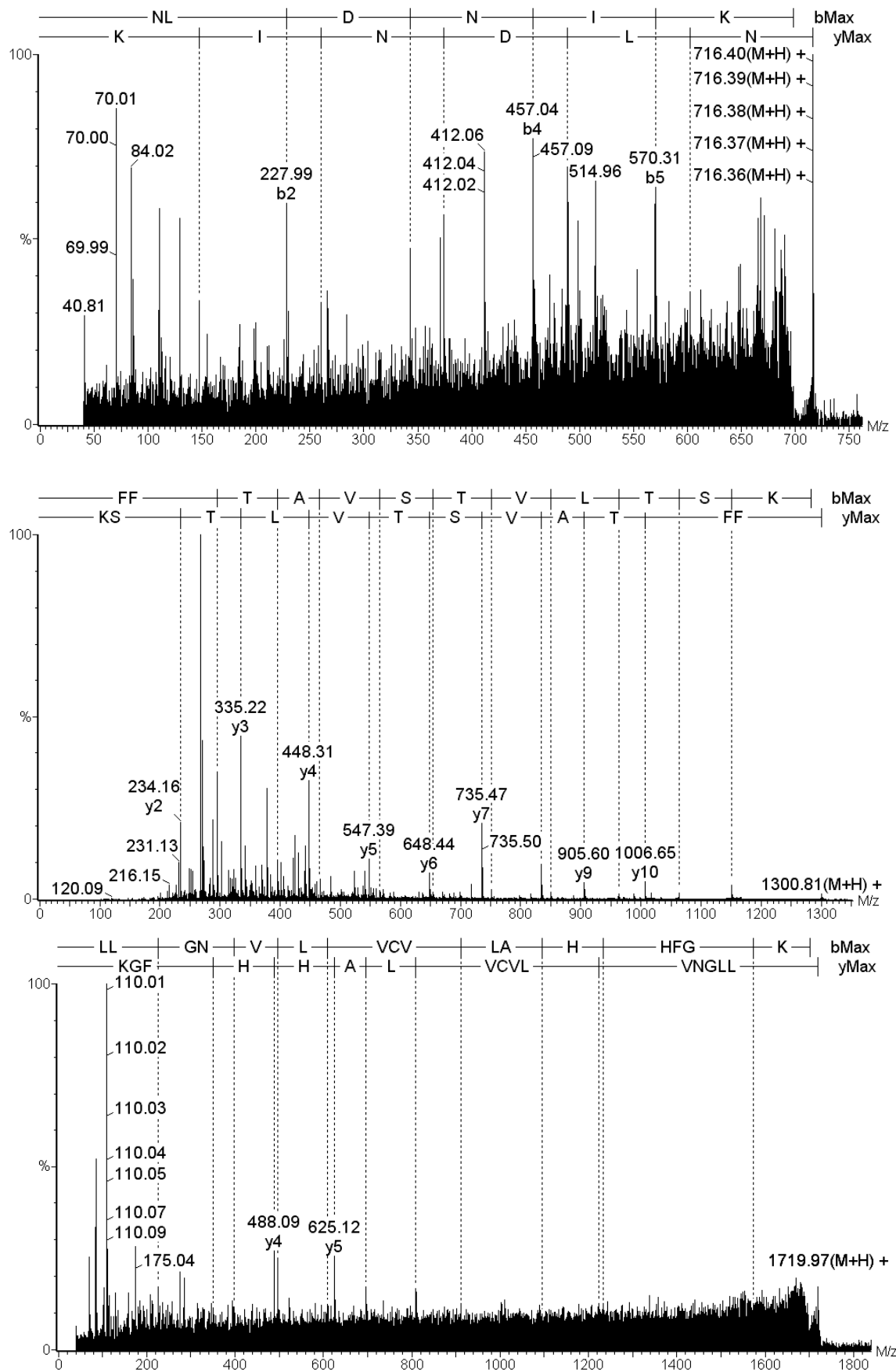


Figura 17. Espectros de MS/MS de hemoglobina cadeia beta (77-82), alfa (128-139) e beta (105-120) de *C.thous*.

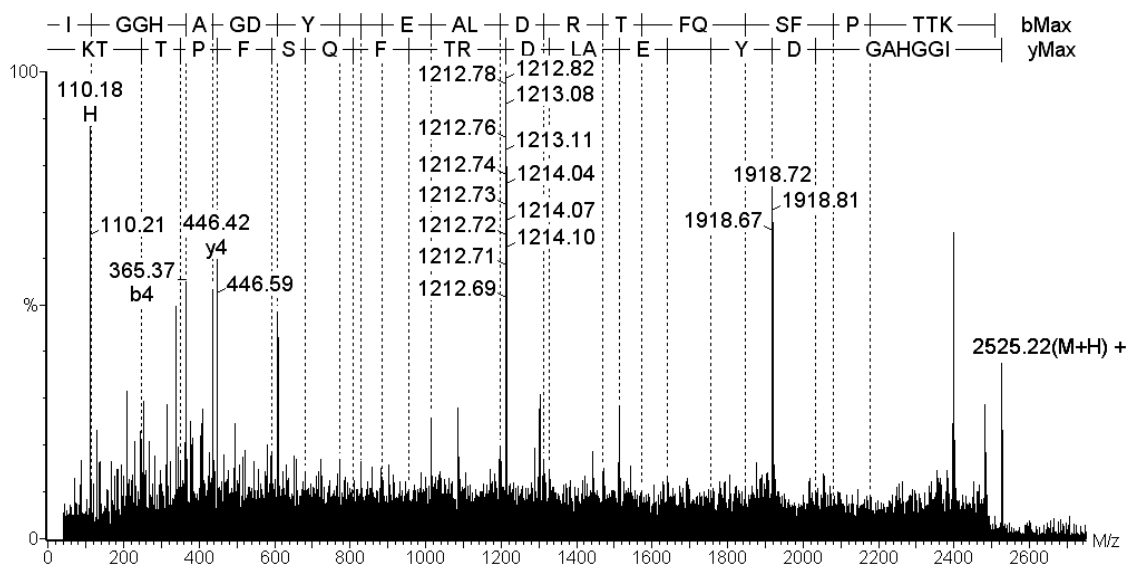
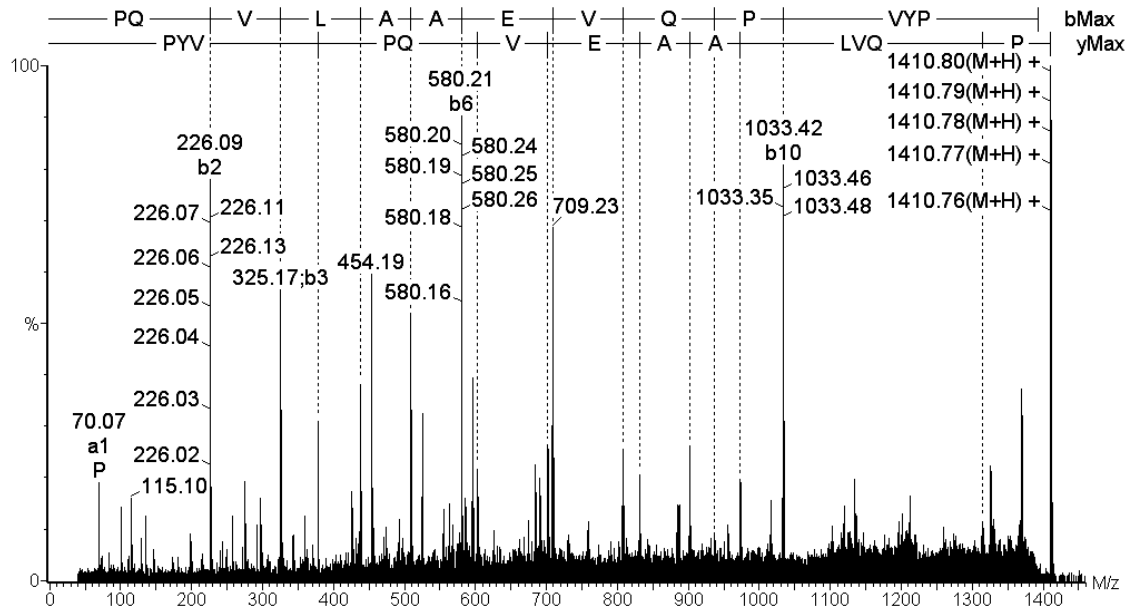
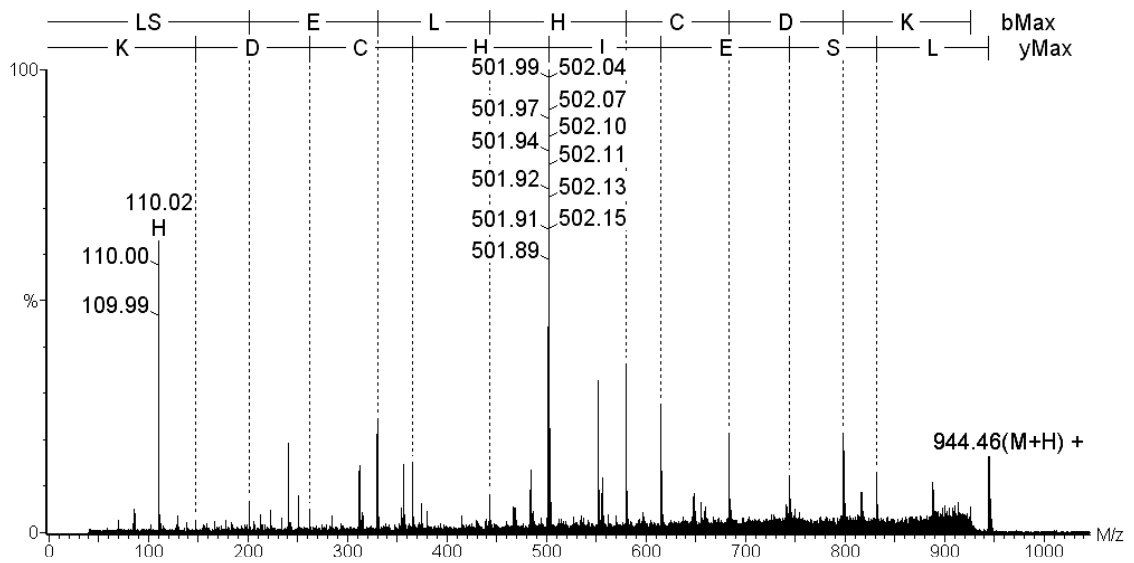


Figura 18. Espectros de MS/MS de hemoglobina cadeia beta (88-95), beta (121-132) e alfa (17-40) de *C.thous*.

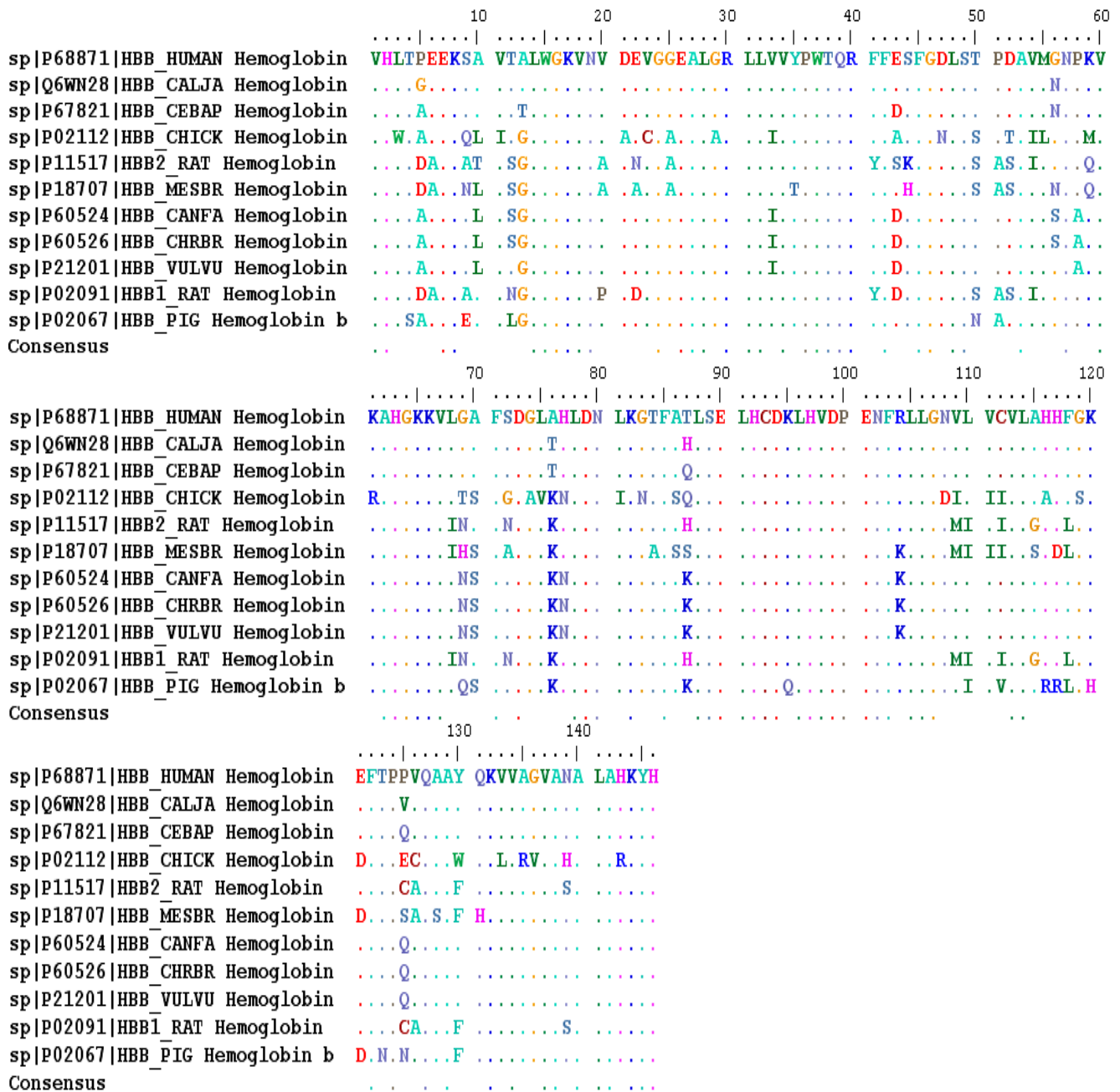


Figura 19. Alinhamento de cadeia beta de hemoglobinas de humano, sagüi, macaco prego, galinha, rato, hamster, gambá, cão, lobo guará, raposa, cavalo, boi, porco, bode e ovelha mostrando regiões homólogas (em asterisco) e diferenças que podem ser usadas como marcadores para diferenciação de cada espécie.

HemoCTtryp

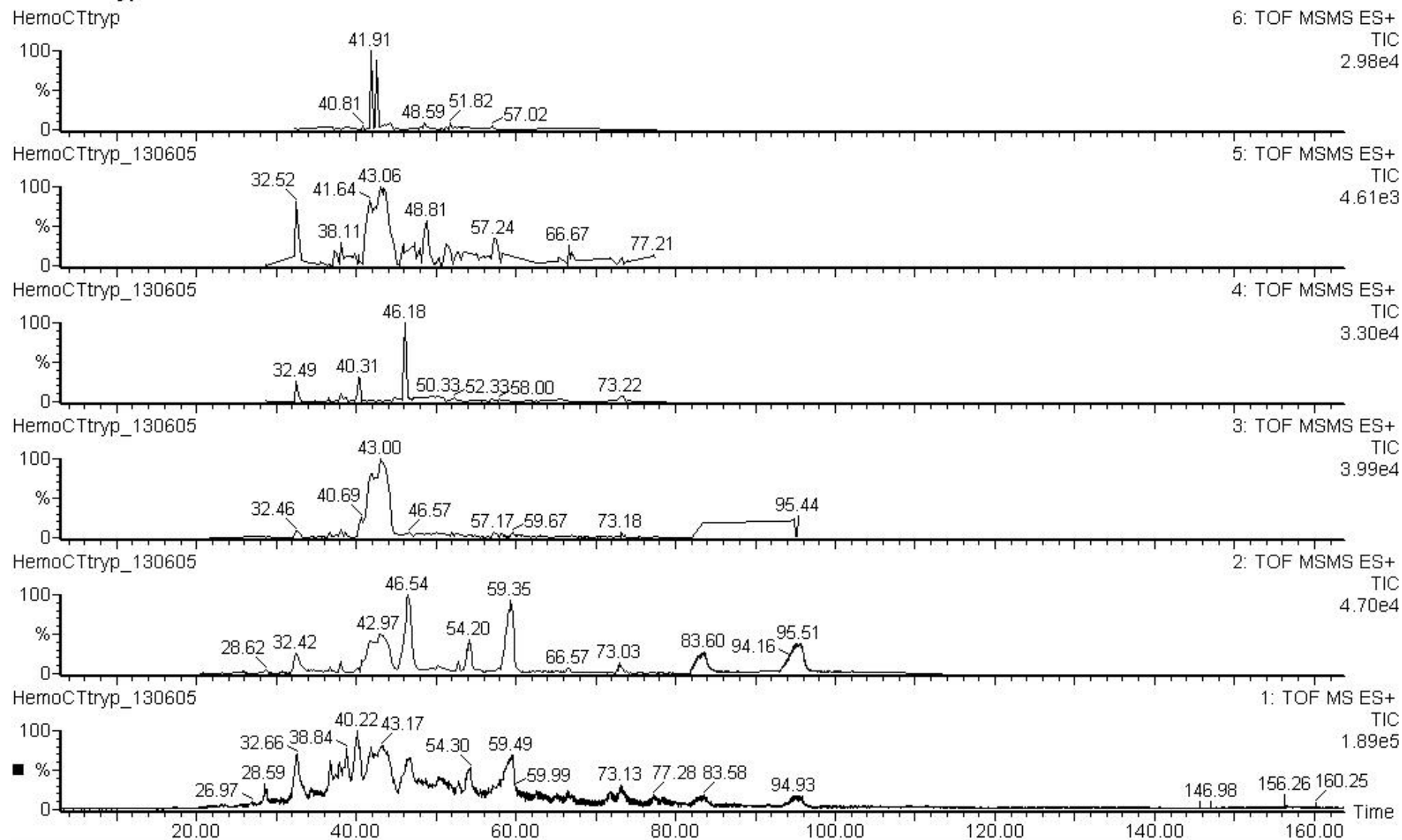


Figura 20. Canais de cromatografia de massa MS e MS/MS de material extraído do trato digestivo de flebótomos e digerido com tripsina para identificação por PMF.

HemoCTtryp

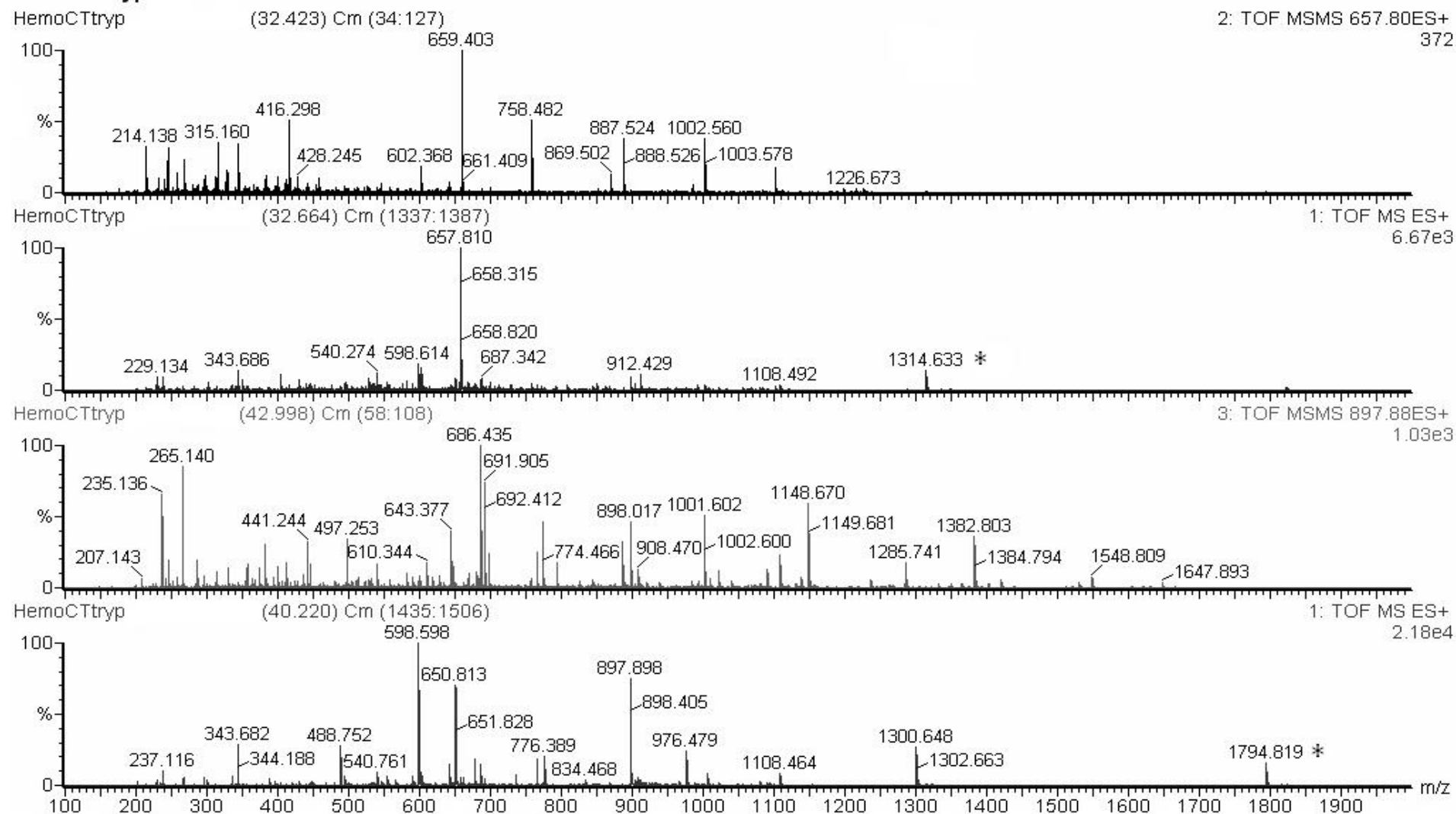


Figura 21. Espectro de MS mostrando massas distribuídas no cromatograma em diferentes tempos de retenção e MS/MS dos peptídeos de massa 1314 Da (*) e 1794 Da(*).

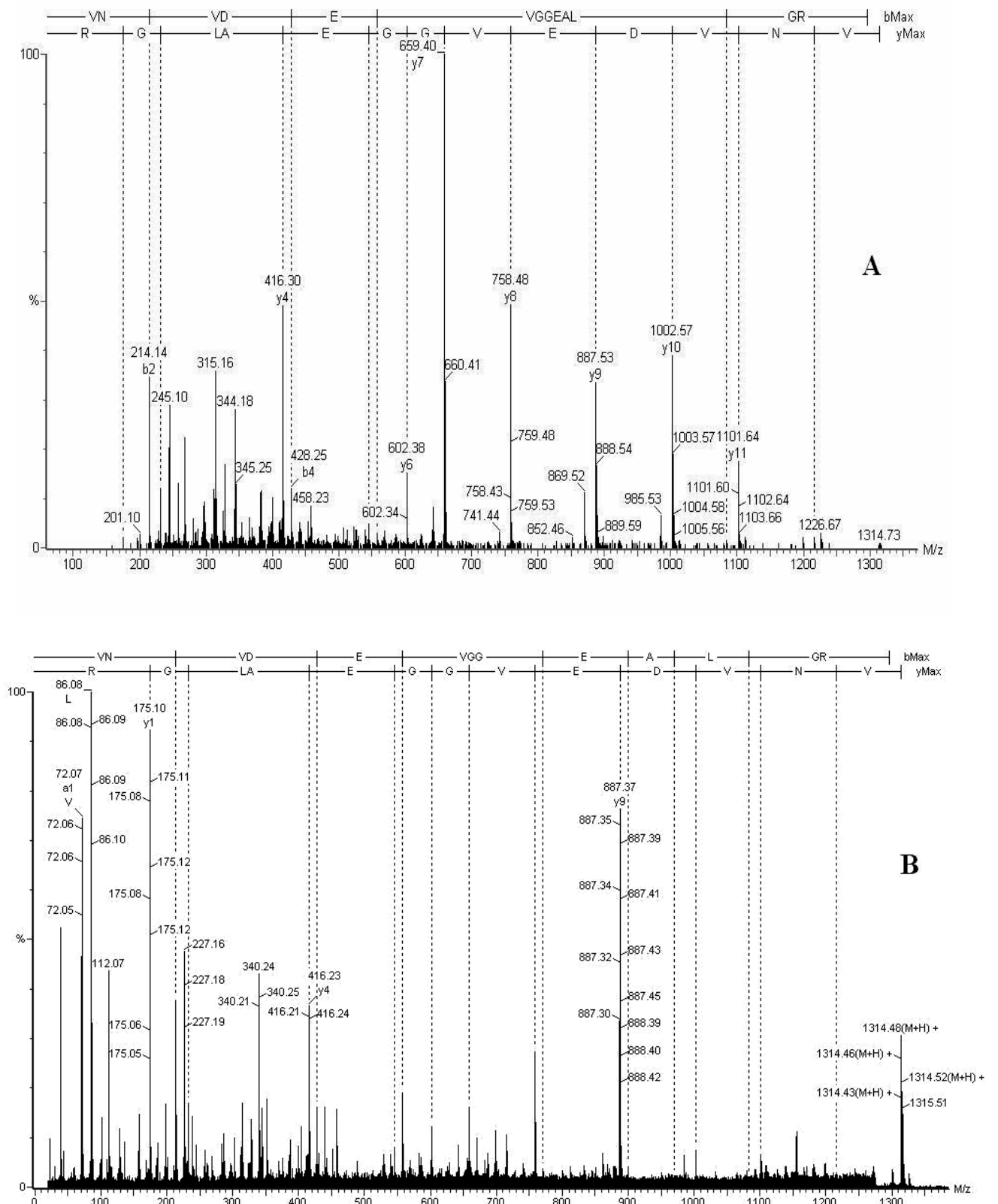


Figura 22. Espectros de MS/MS gerados por LC ESI-Q-TOF (**A**) e LIFT MALDI-TOF/FOF (**B**) de massa 1314, 67 Da de fragmento 18-30 de cadeia beta de hemoglobina de *C.thous* extraído de flebótomos e sequenciado diretamente.

4.6 Perfis de digestão de hemoglobinas no trato digestivo de flebótomos:

Os experimentos de TOF/MS nos diferentes tempos de digestão foram agrupados na tabela 3 que serviu como base para comparação entre a digestão da hemoglobina humana e de cão. Esta comparação foi feita por meio de histogramas (Fig. 23-24).

Tabela 3. Lista de íons de amostras de conteúdo alimentar analisadas por MS e selecionadas para comparação de perfis de digestão de hemoglobina de cão e humano. Com seleção dos 8 (oito) íons mais intensos em 6 (seis) repetições. O desvio (*s*) mostra a acurácia do método usado na comparação de perfis digestivos dos insetos.

Espécie	Massa [M+H] ⁺	<i>s</i>	Espécie	Massa [M+H] ⁺	<i>s</i>
Cão 24H	15893,70	±2.73	Hum 24H	15869,64	±1.22
Cão 24H	15301,75	±1.46	Hum 24H	15300,89	±5.57
Cão 24H	12353,19	±0.95	Hum 24H	14971,89	±1.05
Cão 24H	10591,98	±0.8	Hum 24H	7936,6	±0.50
Cão 24H	8293,51	±0.72	Hum 24H	7487,81	±0.42
Cão 24H	6175,08	±0.56	Hum 24H	6869,3	±0.37
Cão 24H	5582,42	±0.49	Hum 24H	5006,04	±0.31
Cão 24H	4195,24	±0.38	Hum 24H	4376,13	±0.32
Cão 48H	10151,86	±2.48	Hum 48H	15298,96	±5.57
Cão 48H	8617,36	±0.28	Hum 48H	13717,48	±2.10
Cão 48H	8801,03	±0.44	Hum 48H	11230,65	±2.33
Cão 48H	7893,78	±0.24	Hum 48H	8966,48	±0.88
Cão 48H	7780,00	±0.41	Hum 48H	8278,8	±0.72
Cão 48H	7578,16	±0.24	Hum 48H	7961,28	±0.80
Cão 48H	7464,06	±0.37	Hum 48H	5033,5	±0.36
Cão 48H	4195,24	±0.38	Hum 48H	4140,48	±0.86
Cão 72H	12277,73	±2.72	Hum 72H	15300,89	±6.45
Cão 72H	11427,1	±1.04	Hum 72H	11450,08	±1.00
Cão 72H	9989,88	±1.07	Hum 72H	8455,47	±0.54
Cão 72H	9751,83	±0.71	Hum 72H	8307,42	±0.29
Cão 72H	9259,39	±0.79	Hum 72H	8160,82	±0.35
Cão 72H	8986,47	±0.64	Hum 72H	8047,47	±0.31
Cão 72H	8757,61	±0.81	Hum 72H	5597,99	±0.28
Cão 72H	4366,94	±0.32	Hum 72H	4138,4	±0.28
Cão 96H	9126,79	±0.63	Hum 96H	15297,52	2,69
Cão 96H	8987,8	±0.33	Hum 96H	12358,65	5,62
Cão 96H	8758,48	±0.41	Hum 96H	11104,7	1,07
Cão 96H	5537,77	±0.33	Hum 96H	10886,9	2,26
Cão 96H	4626,53	±0.10	Hum 96H	9997,45	1,02
Cão 96H	4496,41	±0.26	Hum 96H	5954,72	0,84
Cão 96H	4381,13	±0.30	Hum 96H	4999,11	0,57
Cão 96H	4361,81	±0.50	Hum 96H	4364,75	0,97

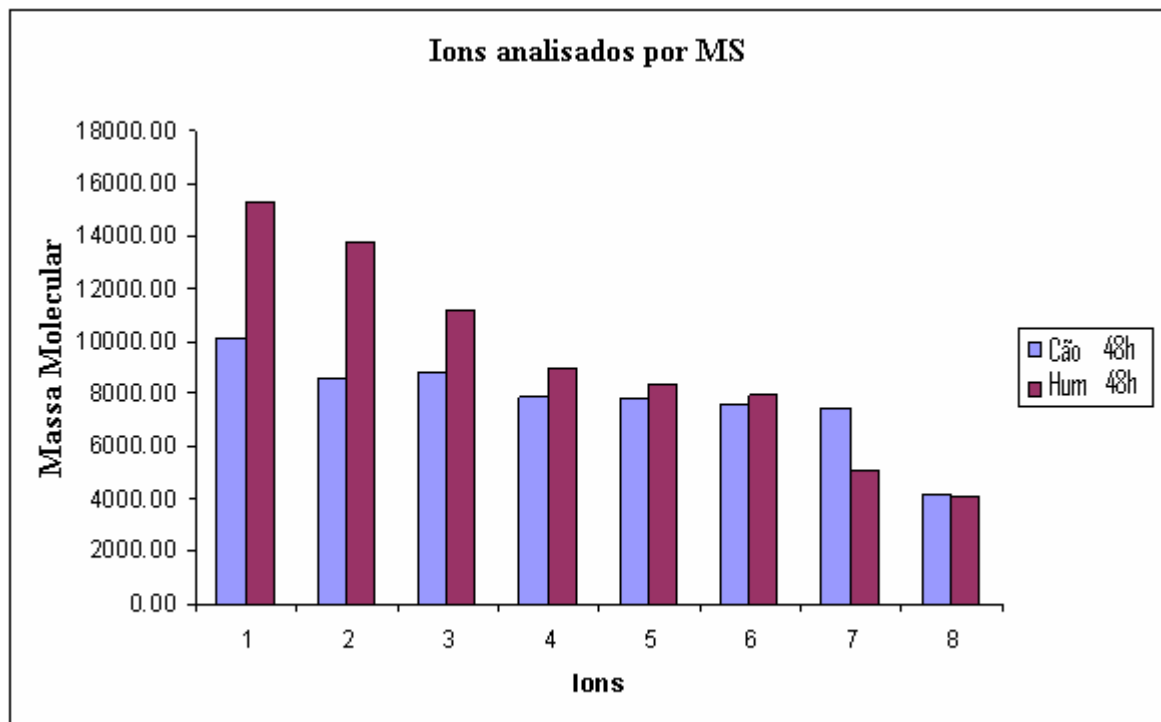
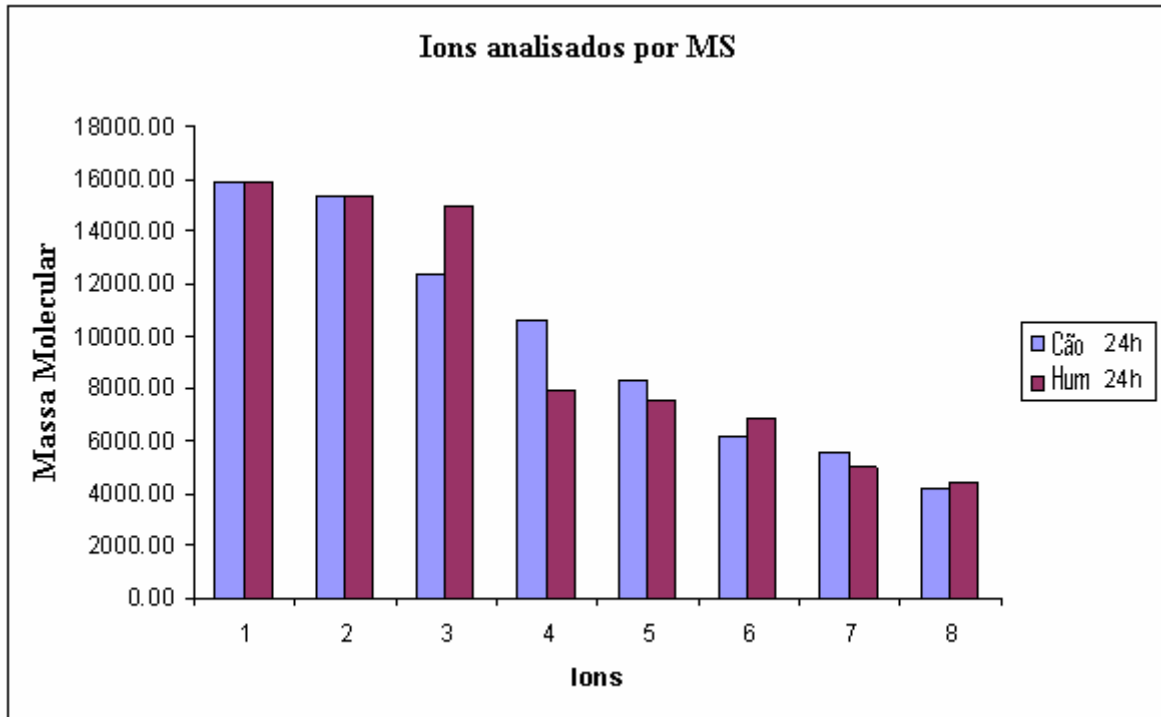


Figura 23. Lista das massas moleculares de oito dos mais significantes íons em seis experimentos de TOF/MS de sangue humano e de cão extraído de flebótomo 24 e 48 horas após repasto.

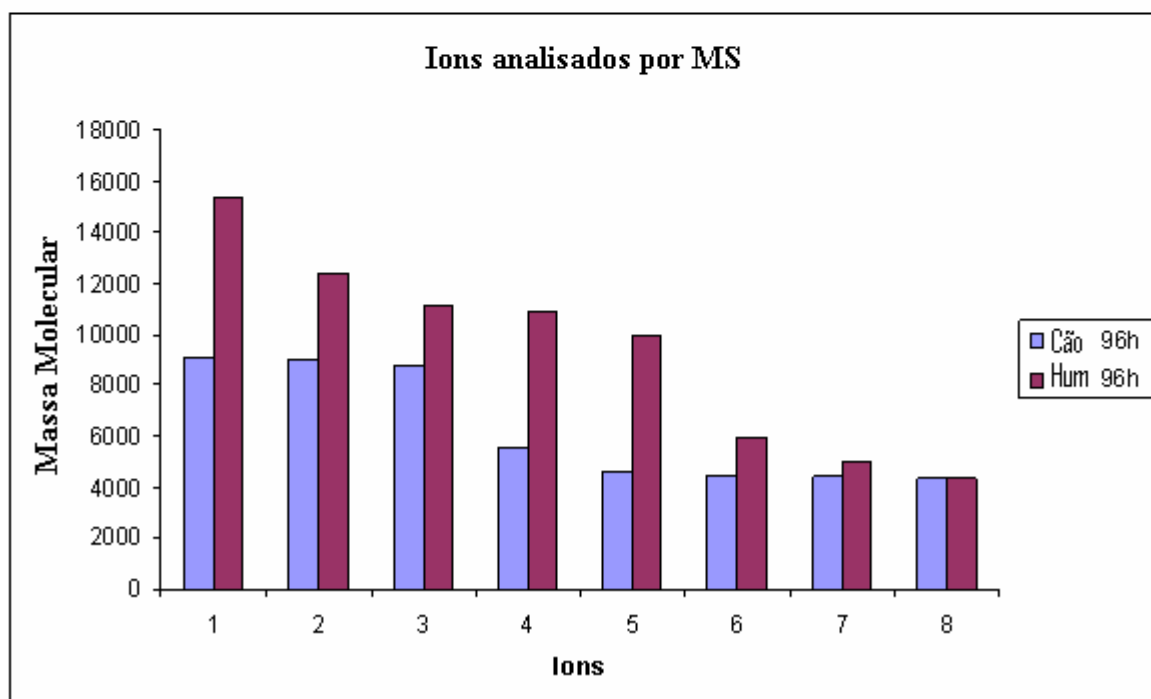
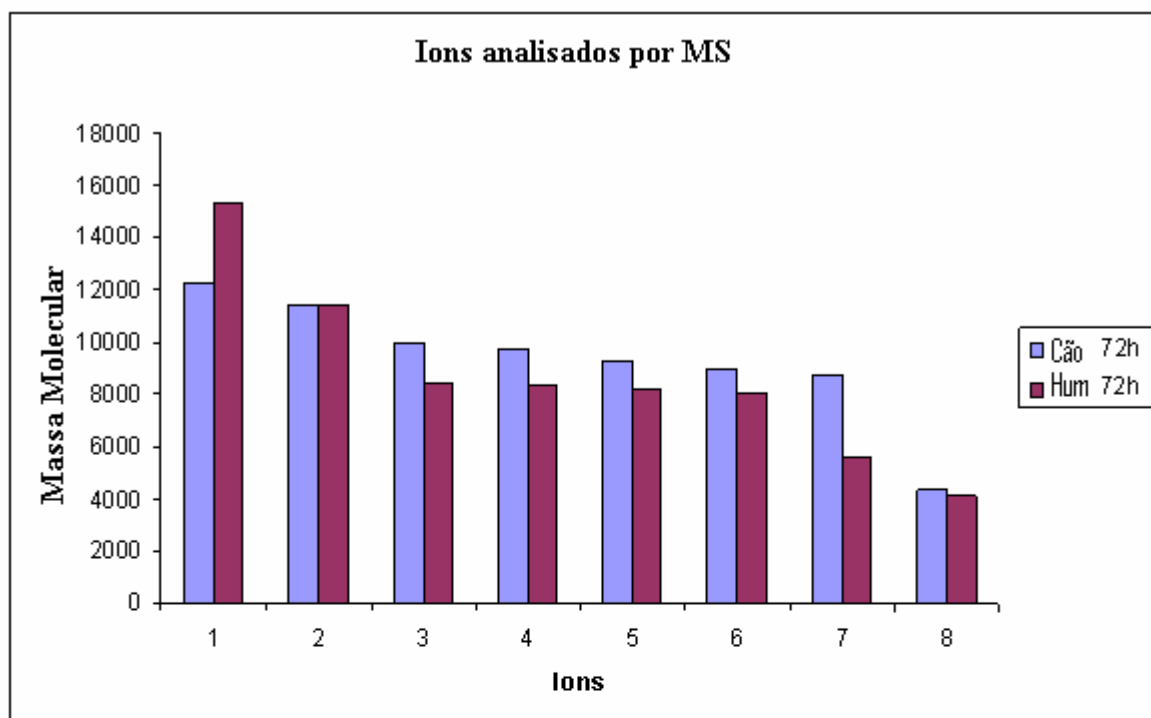


Figura 24. Lista das massas moleculares de oito dos mais significantes íons em seis experimentos de TOF/MS de sangue humano e de cão extraído de flebótomo 72 e 96 horas após repasto.

4.7 Análise Discriminante:

Separados por intensidade, um total de 6480 íons de 54 amostras foram utilizadas no experimento. A figura 25 mostra o gráfico bidimensional de análise discriminante onde são agrupados íons não colineares que determinam as diferenças entre sangue humano, de cão e raposa após 96 horas de digestão.

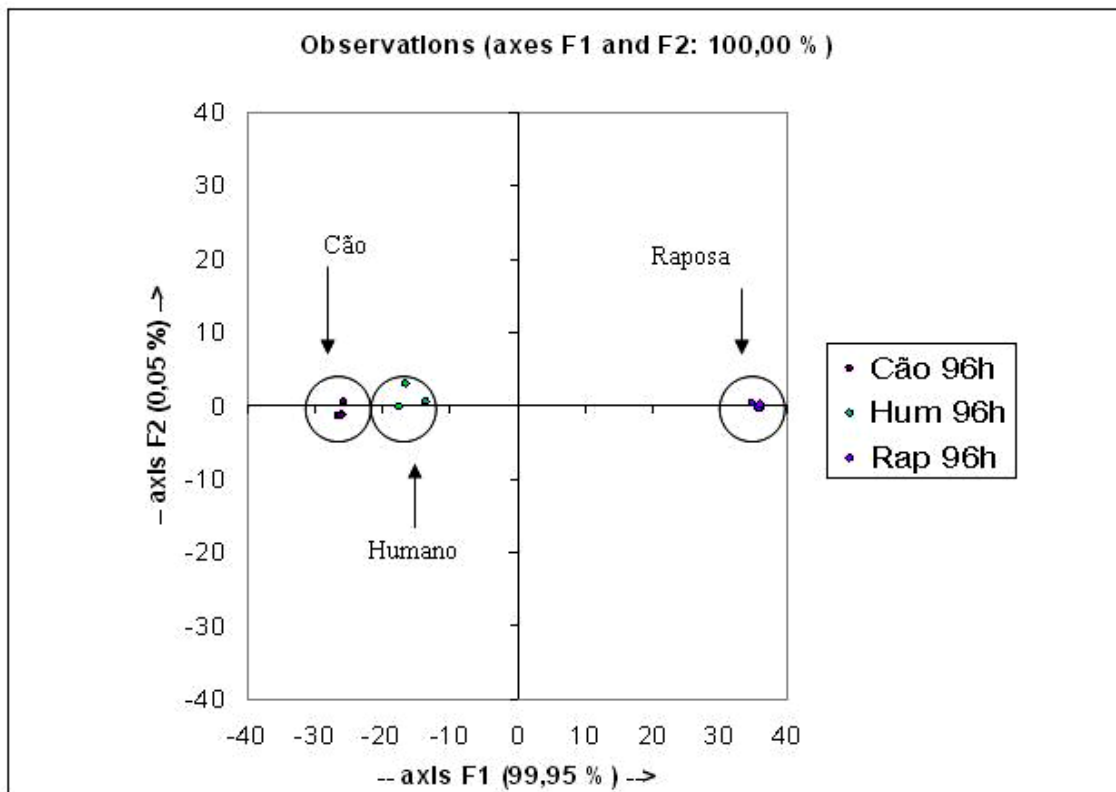


Figura 25. Gráfico bi-dimensional de análise discriminante de íons de amostras de sangue humano, de cão e de raposa da espécie *C.thous* retirados de trato digestivo de flebótomo após 96 horas de digestão.

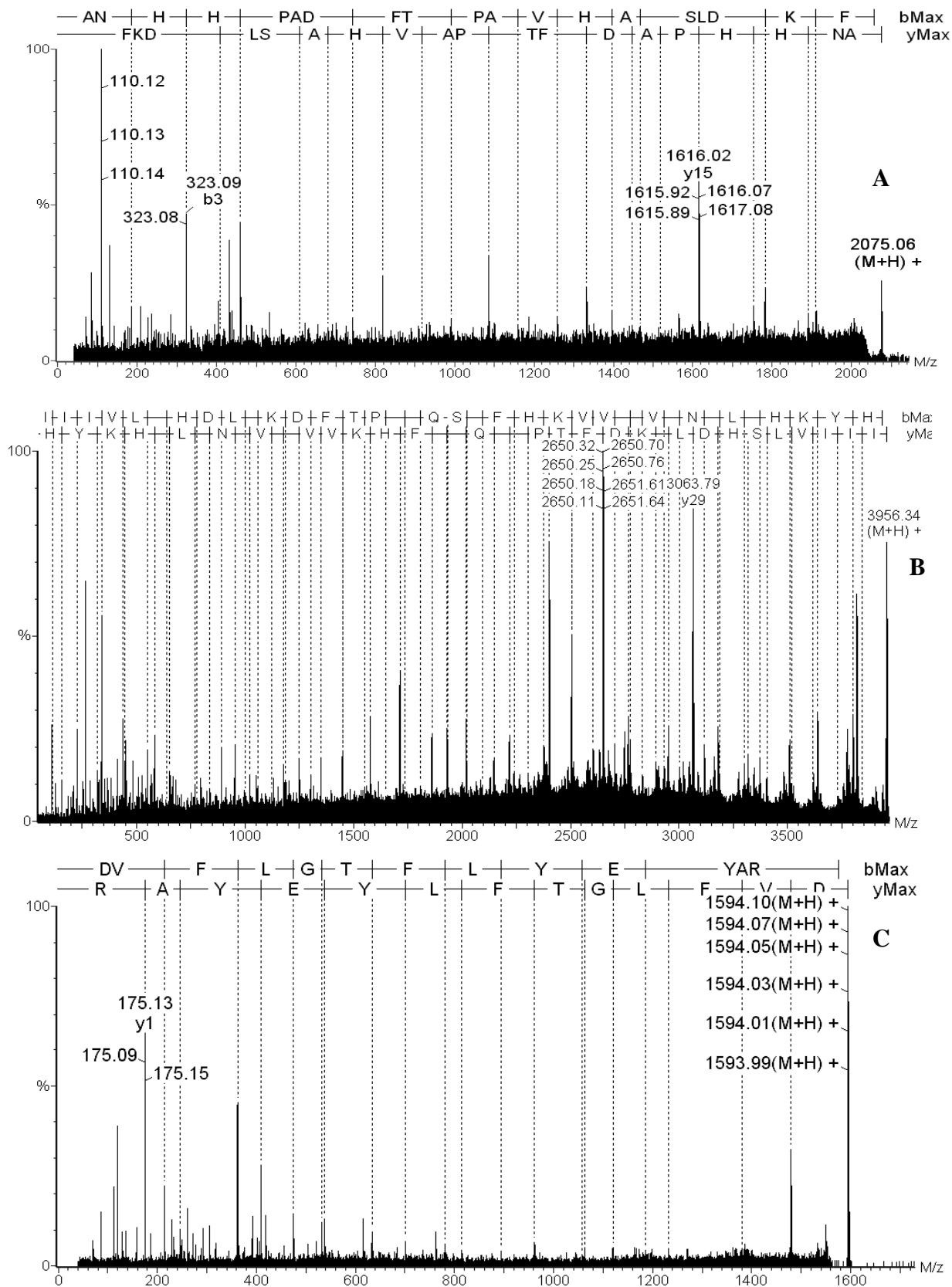


Figura 26. Espectros de MS/MS de fragmentos de hemoglobina e albumina de hamsters extraídos do trato digestivo de flebótomo. Em **A** peptídeo de 2075 Da fragmento de 111-128 de cadeia alfa. Em **B** peptídeo de 3956 Da fragmento de 110-146 de cadeia beta em **C** fragmento de albumina.

5. Discussão

Um dos parâmetros mais importantes na sustentação da transmissão de parasitas por vetores é sua preferência alimentar. A antropofilia de mosquitos direciona ao homem risco de doenças. Consequentemente o conhecimento da frequência de contato homem-mosquito é de suma importância para o entendimento do papel de vetores no ciclo de transmissão de doenças (Tempelis 1975, Scott *et al.* 1993).

A identificação de reservatórios em que vetores se alimentaram é importante para entender o papel de vetores e de animais vertebrados na transmissão e manutenção das zoonoses.

Com o intuito de identificar espécies animais em áreas endêmicas utilizando o material extraído do trato digestivo de mosquitos, foram desenvolvidas e aprimoradas várias técnicas para adquirir maior grau de sensibilidade e especificidade. Técnicas, como o teste de precipitina e enzima imunoenensaio (ELISA), vêm sendo usadas desde os anos 80 (Burkot *et al.* 1981) conseguindo grandes avanços e, atualmente, os exames envolvendo DNA mostraram grande sensibilidade na identificação de hospedeiros.

Entretanto, a carência de maior especificidade e sensibilidade para pequenas quantidades de material e a necessidade de se identificar repastos múltiplos e tardios (mais de 96 horas) tornam estas técnicas limitadas. Os repastos múltiplos e/ou tardios possibilitam a identificação do roteiro alimentar dos insetos e suas fontes de sangue.

A espectrometria de massa veio para proporcionar um alto grau de sensibilidade, resolução e acurácia, usando como matéria prima o que há de mais abundante em vetores hematófagos após repasto, a hemoglobina dos reservatórios vertebrados.

Atualmente espectrômetros modernos possuem considerável sensibilidade e acurácia podendo determinar precisamente a massa de compostos e a composição de misturas em diversos tipos de amostras biológicas. Esta ferramenta quando associada a outra técnica como a cromatografia líquida de alto desempenho garante maior precisão e especificidade.

A figura 4 mostra a cadeia alfa de hemoglobina humana de massa 15126 Da extraída do trato digestivo de flebótomos e purificada por RP-HPLC. As cadeias alfa e beta da hemoglobina são as fontes para identificação e diferenciação de espécies. A figura 5 mostra as cadeias de hemoglobina humana sendo digeridas (48 horas) e a formação de peptídeos à medida que o tempo avança. Embora condicionado a vários fatores, o repasto de vetores e a conseqüente dinâmica de digestão do sangue podem ser acompanhados. Esta dinâmica é

importante para descobrir, por exemplo, se o inseto possui sangue já em estado avançado de digestão e sangue novo, o que caracteriza um novo repasto e a possibilidade de efetivação da transmissão de parasitas.

As técnicas atuais não conseguem identificar espécies animais em repastos acima de 72 horas de digestão devido ao processo digestivo intenso e a quantidade de amostra, o que limita a possibilidade de identificar múltiplos repastos em vetores flebotomíneos que recorrem a uma segunda alimentação por volta do quarto dia após a primeira refeição. Este repasto é, provavelmente, o responsável pela contaminação de outros animais, uma vez que, no caso das leishmanioses, ao infectar os vetores, os parasitas necessitam desse prazo para se transformarem em formas infectantes (Vivenes *et al*, 2001). A identificação de sangue novo, sangue velho ou ambos no trato digestivo de flebotomos pode indicar um roteiro alimentar com incriminação de reservatórios como fonte de infecção.

A figura 6 mostra hemoglobina encontrada após 96 horas da alimentação inicial com conseqüente digestão, formação de peptídeos e fragmentos que podem ser identificados por seqüenciamento direto de sua estrutura primária, fato inédito mostrado neste trabalho.

O extrato bruto contendo hemoglobina de um ou mais reservatório pode ainda ser submetido à purificação por HPLC com separação de peptídeos para fragmentação direta. Esta etapa é importante na identificação de múltiplos repastos, pois permite a caracterização individual de cada fração de hemoglobina dos hospedeiros vertebrados na mistura como mostra a figura 7.

A diferenciação de espécies de hospedeiros vertebrados na mistura de hemoglobinas é feita pelo seqüenciamento de seus fragmentos digeridos que são identificados em bancos de dados de proteínas. Ao conhecer as proteases que agem no trato digestivo dos vetores e o ponto de clivagem destas enzimas, fica fácil prever a formação de peptídeos de massas conhecidas. Pode ser feita ainda a identificação de espécies de vertebrados em misturas usando peptídeos como marcadores da molécula digerida *in vitro* por uma enzima com ponto de clivagem conhecido que irá gerar peptídeos de massas também conhecidas e de fácil localização na mistura. A figura 8 mostra peptídeos de cadeia alfa de hemoglobina humana, de galinha e de cão, pertencentes à mesma região na molécula (fragmento 17-31) e com massa e composição diferentes. A figura 9 mostra o seqüenciamento desses peptídeos localizados na mistura devido a repastos múltiplos feito em laboratório de forma experimental e as diferenças entre cada espécie identificada. A aplicação destas técnicas para este fim é inédita até o presente momento.

Nas amostras de campo esta técnica mostrou igual capacidade na distinção de peptídeos de hemoglobinas de espécies diferentes. As amostras de campo foram colhidas em local onde há uma pocilga, um galinheiro e também criação de cães. Os insetos capturados por armadilhas CDC foram submetidos às mesmas técnicas de identificação usadas em amostras de laboratório com obtenção do mesmo resultado. A figura 10 mostra os espectros de MS/MS dos peptídeos de hemoglobinas seqüenciados e identificados em amostra de campo onde foram localizados fragmentos de cadeia alfa e beta de hemoglobinas das três espécies mencionadas.

A diferenciação de espécies filogeneticamente relacionadas como cão e raposa é também útil devido à necessidade de se investigar ciclos silvestres da doença e o deslocamento de parasitas e vetores em áreas urbanas e periurbanas, motivados por ações humanas que causam impacto ambiental e desequilíbrio ecológico.

Para diferenciar espécies reservatórios de leishmaniose como cão e raposa, foi feito o seqüenciamento da hemoglobina da raposa *C. thous*, reservatório silvestre da LVA. Para o seqüenciamento as cadeias alfa e beta foram purificadas e digeridas com tripsina para formar peptídeos que foram separados e identificados individualmente. A figura 11A mostra cromatograma de separação e cadeias em extrato de hemoglobina. Em 11B o cromatograma da cadeia separada e concentrada para digestão e separação de frações (11C) para posterior fragmentação e identificação em espectrômetro de massa. A figura 12 mostra alinhamento das seqüências da cadeia alfa e beta de *C.thous*, outro feito inédito deste trabalho.

O seqüenciamento (Fig. 13 a 18) revelou que *C.thous* possui cadeia alfa semelhante à de coiote (*Canis latrans*), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) diferenciando-se da cadeia de cão (*Canis familiaris*) apenas em um resíduo de aminoácido da posição 130 onde há treonina (T – 101,04) ao invés de alanina (A – 71,03). O espectro do peptídeo de massa 1300 Da (Fig. 17) fragmento 128-139 mostra a diferença na cadeia alfa de *C. thous*. A cadeia beta é semelhante a do cão, coiote e lobo guará, sendo diferente apenas da cadeia beta de raposa da espécie *Vulpes vulpes* (red fox). As diferenças entre canídeos podem se restringir a apenas um aminoácido em um conjunto de cadeias que podem chegar a 526. Entretanto essa diferença pode ser acentuada por outras características que são distintas de cada espécie como a distribuição geográfica, presença de vetores na região e capacidade do animal em abrigar o parasita e transmitir para os insetos.

A figura 19 mostra o alinhamento de cadeia beta de diferentes animais feito para demonstrar as semelhanças (ponto) e diferenças que podem ser usadas para localizar e distinguir espécies pela hemoglobina dos reservatórios. Os bancos de dados de proteínas

recebem depósito tanto de seqüências novas quanto de polimorfismos que possam ocorrer indicando a posição e a mudança ocorrida na molécula. Isto auxilia no processo de identificação das hemoglobinas de espécies diferentes que podem sofrer mudanças em sua estrutura.

A identificação de espécies pode ainda ser feita pela técnica de LC ESI-Q-TOF MS/MS ou LC MALDI-TOF/TOF MS/MS, ambas em escala de nanofluxo o que corresponde à cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa em modo de ionização eletrospray ou por MALDI. Na análise por LC ESI-Q-TOF MS/MS em escala de nanofluxo, à medida que a mistura é eluída de colunas capilares, suas frações são lançadas diretamente no espectrômetro que faz a identificação das moléculas em um cromatograma de massas (Fig. 20) mostrando canais de MS onde estão os íons. Os peptídeos selecionados são fragmentados e formarão os canais de MS/MS onde é possível localizar cada fração pelo tempo de retenção na coluna cromatográfica e pela combinação dos canais que irão gerar espectros para seqüenciamento direto (Fig.21-22).

Os espectros de conteúdo alimentar de flebótomos revelaram a possibilidade de traçar um perfil de digestão de hemoglobinas para cada espécie. Estes perfis comparados mostram uma relação entre a composição da hemoglobina, as enzimas que atuam no processo e o tempo da digestão.

A hemoglobina de cão é digerida mais rapidamente que a hemoglobina humana que forma peptídeos tardiamente. Isto é comprovado nas figuras 23 e 24 onde histogramas mostram diferenças na digestão de ambos. Talvez a preferência alimentar de flebótomos tenha relação com a eficiência na digestão do sangue e a composição da hemoglobina influencie a cinética de digestão contribuindo para encontrar sangue após quatro dias do primeiro repasto.

Em laboratório, colônias de flebótomos mostram maior preferência por sangue de hamster e de galinha ao invés de sangue de cão ou sangue humano, fator este que influencia até na maior ou menor produção de ovos (Ready, 1978,1979) ao contrário de espécies como *Aedes aegypti* que tem alta preferência por sangue humano (Ponlawat e Harrington, 2005).

Outro meio de se distinguir espécies pelos fragmentos de hemoglobina gerados com a digestão é a análise discriminante (DA) de massas encontradas ao longo do processo digestivo. Com base, no método de Fischer que distingue variáveis pertencentes a determinados grupos excluindo a multicolinearidade de dados em um conjunto de amostras, DA mostra propriedades de grupos usando variáveis explanatórias e prediz a que grupo pertence cada observação (Huberty, 1994). O resultado é mostrado em um gráfico bidimensional onde são agrupadas as variáveis distintas de cada grupo (Fig. 25).

Por espectrometria de massa verificou-se que é possível sequenciar peptídeos de massa acima de 3 kDa (Fig.27A e 27B). Também é possível, localizar fragmentos de outras proteínas do sangue como a albumina (Fig.27C) que foi encontrada em conteúdo alimentar de sangue de hamster 48 horas após repasto.

6. Conclusões

Com base nos experimentos realizados foi possível concluir que:

1. A técnica padronizada usada para identificação de reservatórios vertebrados por espectrometria de massa é hábil para localizar e distinguir hemoglobinas de espécies animais no trato digestivo de flebótomos.
2. Por espectrometria de massa é possível distinguir-se espécies próximas filogeneticamente como cão e raposa. As técnicas usadas neste trabalho, assim como os resultados obtidos com elas são inéditas.
3. Os múltiplos repastos com misturas de sangue de fontes de diferentes animais vertebrados podem ser identificados e separados com precisão.
4. Por espectrometria de massa é possível acompanhar a dinâmica de digestão da hemoglobina em flebótomos até o quanto dia de digestão com a identificação dos fragmentos digeridos e diferenciação da fonte de sangue.
5. A espectrometria de massa embora tendo custos mais elevados em equipamento e manutenção, mostrou-se mais eficiente que as técnicas como ELISA, precipitina e PCR na identificação de espécies, pois permite a identificação de misturas e repastos tardios mesmo com a interferência do processo digestivo.
6. O seqüenciamento inédito da hemoglobina de *C.thous* revelou que esta raposa, reservatório silvestre de *L.chagasi*, possui composição semelhante à hemoglobina de cão, possuindo diferença apenas em um aminoácido da posição 130 da cadeia alfa, diferença constatada após fragmentação e seqüenciamento da molécula.
7. A hemoglobina extraída do trato digestivo quando em condições de estocagem mencionadas no material e método mantêm-se viável para análise por mais de um ano.

7. Referências Bibliográficas

- Abbas AB, Lichtman A. H, Poder. J. S. Cellular and Molecular Immunology. 2º Ed, Saunders, Philadelphia, 1998.
- Alencar JE, Almeida YM, Silva ZP, Paiva AS, Fonseca ME. Aspectos atuais do calazar no Ceará Rev. Bras Malar 26/27: 27-33, 1974/1975.
- Alencar JE, Holanda D, Cavalcante J.D.N. Calazar no Vale do Jaguaribe. Ceará, Rev. bras. Malar. 8:33-47, 1956.
- Alencar JE, Pessoa EP, Costa OR. Calazar em Santarém, Estado do Pará. Rev. Bras Malar 14:371-377, 1962.
- Alencar JE. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. Publ Med (Rio de Janeiro), 196:71-85, 1956.
- Ansell J, Hu J, Gilbert SC, Hamilton KA, Hill AVS, Lindsay SW. Improved method for distinguishing the human source of mosquito blood meals between close family members. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94: 572-574, 2000.
- Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging Inf. Dis. 2:145-146, 1996.
- B. J. Wild, B. N. Green, E. K. Cooper, M. R. A. Lalloz, S. Erten, A. D. Stephens, and D. M. Layton, 2001. Rapid Identification of Hemoglobin Variants by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Blood Cells, Molecules, and Diseases 27(3): 691–704, 2001.
- Boakye DA, Tang J, Truc P, Merriweather A, Unasch TR. Identification of bloodmeals in hematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. Med. Vet. Entomol. 13: 282-287, 1999.
- Brandim JR, Azar MS, Costa CHN. Exploração de fatores de risco para a ocorrência de morte em pacientes com leishmaniose visceral (LV), XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo-SP, p. 6,1995.
- Burkot TR, Goodman WG, Foliart GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 1336-1441, 1981.
- Chagas E, Ferreira LC, Deabe G, Deane L, Guimarães N. Leishmaniose visceral americana. Aspectos epidemiológicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 33:138-206, 1938.
- Chaniotis BN. Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. J. Med. Entomol. 11: 73-79, 1974.

- Chow-Shaffer E, Sina B, Hawley WA, de Benedicts J, Scott TW. Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 37: 492-502, 2000.
- Coelho MV, Falcão AR. Aspectos epidemiológicos de calazar em Minas Gerais. *J. Bras. Med.* 10: 259-262, 1966.
- Cornish, TJ e Cotter, RJ. Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 65, 1043-1047, 1993.
- Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Ferro de Carrasquilla C, DG, Kreutzer RD, Boshell J, Paláu MT, Caceres E, Peláez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 480-486, 1989b.
- Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M, Paláu MT. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 195, 1989a.
- Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de calazar no Estado do Piauí, Brasil. *Rev. Saúde Publica (São Paulo)*, 24:361-372, 1990.
- Costa CHN, Revisões e dados não publicados, 2002.
- Deane L, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 47: 75-87, 1955.
- Deane LM and Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em áreas de calazar no Ceará. *O Hospital* 48: 61-67, 1955.
- Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop S Paulo* 4:198-212, 1962.
- Dilip K. Rai, William J. Griffiths, Gunvor Alvelius, and Britta Landin. Electrospray Mass Spectrometry: An Efficient Method to Detect Silent Hemoglobin Variants Causing Erythrocytosis. *Clinical Chemistry*. 47, No. 7, 2001.
- Doenças Infecciosas e Parasitárias – Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medidas de Controle. 2^a. Ed. 2000. FUNASA/MS.
- Elnaiem DA, Ward RD and Young PE. Development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the second blood-meal of its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasitol. Res.* 80: 414-419, 1994.
- Elnaiem DE, Morton I, Brazil R and Ward RD. Field and laboratory evidence for multiple blood feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol* 6: 173-174, 1992c.

- Espinoza EO, Lindley NC, Gordon MK, Ekhoﬀ JA, and Kirms MA. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of blood for diﬀerentiation of species. *Analytical Biochemistry* 268: 252-261, 1999.
- Ferro C, Pardo R, Torres M and Morrison AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* 34: 719-728, 1997.
- Fisher R.A. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics*, 7: 179–188, 1936.
- Fundação Nacional de Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Normas técnicas. Brasília, 1996.
- Gibson G, Torr SJ. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Med. Vet. Entomol.* 13: 2-23, 1999.
- Gilson, M.E. The Identification of Kala Azar and the Discovery of *Leishmania donovani*. *Medical History*, 27: 203-213, 1983.
- H.D. Meiring, E. van der Heeft, G.J. ten Hove and A.P.J.M. de Jong. Nanoscale LC–MS⁽ⁿ⁾: technical design and applications to peptide and protein analysis. *J. Sep. Sci.* 25: 557–568, 2002.
- Huberty C. J. *Applied Discriminant Analysis*. Wiley-Interscience, New York, 1994.
- Jerônimo SMB, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz K.G, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:386-388, 1994.
- Jonsson AP. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58:868–884, 2001.
- Julia R. Hayter, Duncan H. L. Robertson, Simon J. Gaskell, and Robert J. Beynon. Proteome Analysis of Intact Proteins in Complex Mixtures. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2:85–95, 2003.
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ and Ready PD. A laboratory culture of *Lutzomyia longipalpis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 434, 1973.
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ and Ready PD. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 13: 429-440, 1977.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailay M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtli R, Ward RD, Guilvard E, Perieres J, Dubois H. Ecology of the leishmaniasis in the South of France. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59(6): 555-72, 1984.

- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17: 279-289, 1999.
- Lacerda MM. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89:489-495, 1994.
- Lainson R, Dye C, Shaw JJ, MacDonald DW, Courtenay O, Souza AAA, Silveira FT. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 135-137, 1990.
- Lainson R, Shaw JJ, Lins CZ. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of *Leishmania dovovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63: 741-745, 1969.
- Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63: 741-745, 1969.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, p. 1-120, 1987.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*. WH. 4th ed. Freeman and Company, New York, 2000.
- Lutz A and Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 4: 84-95, 1912.
- Mangabeira O. Sobre a sistemática e biologia do *Phlebotomus* no Ceará. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 21: 3-26, 1969.
- Marsden PD. Leishmaniasis. In: Walsh JA, Warren KS, eds. *Strategies for primary health care*. Chicago: The University of Chicago Press, 214-223, 1986.
- Mather TN, Wilson ML, Moore SI, Ribeiro JMC, Spielman A. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdoferi*). *Am J Epidemiol* 130: 143-150, 1989.
- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 119: 237-246, 1999.
- McComb ME, Oleschuk RD, Chow A, Ens W, Standing KG, Perreault H, Smith M. Characterization of hemoglobin variants by MALDI-TOF MS using a polyurethane membrane as the sample support. *Anal. Chem.* 70:5142-5149, 1998.

- Montoya-Lerma J. Autogeny in the neotropical sand fly *Lutzomyia lichyi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *J. Med. Entomol.* 29: 698-699, 1992.
- Mukabana WR, Takken W, Killeen GF, Hawley WA, Knols BGJ. Extent of digestion affects success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 92: 233-239, 2002.
- Mukabana WR, Takken W, Knols BGJ. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology.* 18: 505-509, 2002.
- Neves, D.P. *Parasitologia Humana 9ª*. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
- Pampiglione S, La Placa M, Schlick G. Studies on Mediterranean leishmaniasis 1. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68:349-59, 1974.
- Papayannopoulos, I. A, and Biemann K, 1994. Amino Acid Sequencing of Proteins, *Ace. Chem. Res.* 27, 370-378, 1994.
- Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Santos WS, Grimaldi Jr. G, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AL. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 39-44, 1996.
- Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petreski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena Mand Lemos FJA. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interactions with heme during blood digestion. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 32: 517-523, 2002.
- Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M and Sacks D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitol.* 115: 359-369, 1997.
- R. Ross, 'A new parasite of man', Thompson Yates and Johnston Laboratories Reports, new series. 5: 79-82, 1903.
- Ramalho-Ortigão JM and Traub-Cseko YM. Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 279-287, 2003.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF and Andrade CA. Biology of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 431-438, 1986.
- Ready PD. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 16: 413-423, 1979.
- Ready PD. The feeding habits of laboratorybred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 14: 545-552, 1978.

- Rogers ME, Chance ML and Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495-507, 2002.
- Scott, T. W., E. Chow, D. Strickman, P. Kittayapong, R. A. Wirtz, L. H. Lorenz, and J. D. Edman. Bloodfeeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J. Med. Entomol.* 30: 922-927, 1993.
- Sherlock IA and Sherlock VA. Criação e biologia, em laboratório do *Phlebotomus longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae). *Ver. Bras. Biol.* 19: 229-250, 1959.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79:511, 1984.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi G. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. VI. Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21: 23-27, 1988.
- Sherlock IA, Sherlock JC. Observations on the ecology of visceral leishmaniasis in Jacobina, State of Bahia, Brazil (1982 to 1986). In: Wijeyaratne P, Goodman T, Espinal C. *Leishmaniasis control strategies: a critical evaluation of IDRC-supported research*. International Development Research Center, México. 54-80, 1992.
- Sherlock IA. Observações sobre o calazar em Jacobina – I – Histórico e dados preliminares. *Rev. Bras Malar Doenças Trop* 21:523-534, 1969.
- Silva, V. C, Gomes, R.B. B, Barral, A., Costa, C.H.N. ELISA não diferencia sangue de cão doméstico de sangue de raposa. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 34 (Sup I):757, 2001.
- Siva R, Vianna GMC, Varonil C, Pires B, Nascimento MDSD, Costa JML. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30:359-368, 1997.
- Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E and Ilg T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell. Biol.* 78: 675-689, 1999.
- Tempelis, C. H. Review article: host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *J. Med. Entomol.* 11: 635-653, 1975.
- Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 150-156, 1971.

- Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97:887-892, 2002.
- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Vélez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 557-565, 1994.
- Travi BL, Osório Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. Exp. Parasitol. 88: 73-75, 1998a.
- Vivenes A, Oviedo M, Márquez JC, Montoya-Lerma J. Effect of a Second Bloodmeal on the Oesophagus Colonization by *Leishmania mexicana* Complex in *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 96(3): 281-283 2001.
- Walters LL, Modi GB, Chaplin GL, Tesh RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 41: 295-317, 1989.
- Ward RD. Some aspects of the biology of phlebotomine sand fly vectors. In: Harris KF (Ed.). Adv. Dis. Vector Res, New York: Springer-Verlag, p.91-126, 1990.
- Young D and Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem. Amer. Entomol. Inst. 54: 1-881, 1994.
- Modi GB, Tesh RB. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. J Med Entomol. Oct 5;20(5):568-9, 1983.