



## IDENTIFICAÇÃO DE PRIMERS PARA DETECÇÃO DE DNA DE FLEBOTOMÍNEOS ENVOLVIDOS NA TRANSMISSÃO URBANA DAS LEISHMANIOSES: UMA REVISÃO SISTEMATIZADA.

FREITAS, Gustavo Costa<sup>1</sup>; VASSALLO, Kaline Ribeiro de Almeida<sup>2</sup>; SOUSA, Guilherme Soares de<sup>3</sup>; SANTOS, Helcileia Dias<sup>4</sup>; BARBOSA, Silvia Minharro<sup>5</sup>.

### RESUMO

O trabalho apresenta uma revisão sistemática sobre a identificação de primers para detecção de DNA de flebotomíneos, vetores da leishmaniose, uma doença transmitida por parasitas do gênero *Leishmania*. Esses parasitas afetam o sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos, sendo transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados, como as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Devido à dificuldade na identificação morfológica das espécies de *Leishmania*, métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vêm ganhando destaque pela sua alta sensibilidade e especificidade. Este estudo revisou e avaliou os primers utilizados nesses métodos para detectar o DNA de flebotomíneos e vertebrados urbanos envolvidos na transmissão da leishmaniose. O trabalho foi realizado seguindo as diretrizes da Cochrane e do Ministério da Saúde. A pesquisa incluiu uma busca sistemática em bases de dados científicas, como PubMed, EMBASE e Cochrane, e a análise dos estudos foi feita utilizando a ferramenta QUADAS-2, para avaliar o risco de viés dos artigos selecionados. Os resultados apontam que primers baseados no gene da subunidade 1 do citocromo oxidase mitocondrial (mt-col) são altamente específicos e eficazes na detecção do DNA de flebotomíneos. Métodos como o código de barras de DNA e a PCR multiplex também se destacam pela capacidade de identificar múltiplas espécies em uma única análise. Embora a dissecação física ainda seja utilizada, a PCR oferece maior sensibilidade na detecção do parasita. A conclusão destaca que os primers baseados no gene mt-col são os mais eficazes para a detecção de DNA de flebotomíneos, com alta sensibilidade e especificidade, sendo recomendados para uso em programas de controle e vigilância da leishmaniose. Além disso, o estudo reforça a necessidade de padronização contínua dos primers para aumentar a eficiência diagnóstica e melhorar a detecção precoce dos vetores.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Epidemiologia. PCR.

### I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma antropozoonose causada por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitida por flebotomíneos em regiões quentes. Este protozoário afeta principalmente o sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos, disseminando-se por meio de divisão binária dentro dos macrófagos (NEVES et al., 2004; VERONESSI; FOCACCIA, 2015). O ciclo de vida da leishmaniose envolve a transmissão pelo

---

1 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde. e-mail: [gustavo.freitas@ufnt.edu.br](mailto:gustavo.freitas@ufnt.edu.br)

2 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde. e-mail: [kaline.vassallo@ufnt.edu.br](mailto:kaline.vassallo@ufnt.edu.br)

3 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde. e-mail: [guilherme.soares@ufnt.edu.br](mailto:guilherme.soares@ufnt.edu.br)

4 Professora Doutora do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), co-orientadora do projeto de extensão. e-mail: [helcileia.santos@ufnt.edu.br](mailto:helcileia.santos@ufnt.edu.br)

5 Professora Doutora do Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), coordenadora do projeto de extensão. e-mail: [silvia.barbosa@ufnt.edu.br](mailto:silvia.barbosa@ufnt.edu.br)



flebotomíneo infectado, que, ao se alimentar de sangue, ingere promastigotas que se transformam em amastigotas dentro das células fagocíticas, completando o ciclo ao infectar outros hospedeiros (NEVES et al., 2004; VERONESSI; FOCACCIA, 2015).

Os flebotomíneos, são os principais vetores da leishmaniose, transmitindo o parasita por meio da picada em hospedeiros vertebrados, principalmente em áreas onde a presença desses insetos é comum (CARVALHO et al., 2010). As espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são associadas à transmissão da leishmaniose visceral, enquanto várias outras espécies de flebotomíneos transmitem a leishmaniose tegumentar (QUEIROZ et al., 2012; SHIMABUKURO et al., 2011).

Dada a ampla variedade de primers usados na PCR para identificação de, flebotomíneos envolvidos na transmissão, este trabalho visa avaliar quais são os primers mais sensíveis para a detecção de DNA dessas espécies.

Devido à complexidade e importância da diferenciação entre as espécies de *Leishmania* e seus vetores, especialmente no contexto da transmissão das leishmanioses visceral e tegumentar, torna-se essencial utilizar metodologias rigorosas para avaliar as evidências disponíveis. Nesse sentido, a revisão sistemática foi escolhida como abordagem central deste trabalho, pois é amplamente reconhecida por sua confiabilidade em sintetizar e avaliar estudos científicos. Esse tipo de estudo é considerado o mais robusto no campo da epidemiologia, pois permite uma análise criteriosa e padronizada das evidências. Assim, o objetivo principal deste trabalho é identificar os primers com maior sensibilidade e especificidade para a detecção do DNA de flebotomíneos envolvidos na transmissão urbana das leishmanioses.

## II. BASE TEÓRICA

Durante a execução da pesquisa sobre leishmaniose e a detecção molecular de flebotomíneos, diversos autores foram consultados para fornecer embasamento teórico e metodológico. Neves et al. (2004) e Veronessi e Focaccia (2015) foram fundamentais na introdução da leishmaniose como uma antropozoonose, discutindo o ciclo de vida do parasita e a transmissão por flebotomíneos. Além disso, Faria e Andrade (2012) e Brasil (2017) forneceram diretrizes oficiais sobre métodos sorológicos, como o ELISA e a RIFI, utilizados para triagem e confirmação da infecção por *Leishmania*.

Autores como Gualda et al. (2015), Schallig e Oskam (2002) e Gontijo (2004) foram essenciais para discutir os avanços nas técnicas moleculares, especialmente a



PCR, que foi destacada por sua alta sensibilidade e especificidade na detecção de Leishmania. A pesquisa também contou com o apoio de Carvalho et al. (2010), Queiroz et al. (2012) e Shimabukuro et al. (2011), que abordaram os vetores da doença, particularmente as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, responsáveis pela transmissão da leishmaniose visceral.

A construção metodológica da pesquisa, foi realizada uma revisão sistemática, utilizando o Handbook da Cochrane Collaboration (Higgins e Thomas, 2022) e as Diretrizes do Ministério da Saúde (Brasil, 2014). A revisão foi baseada em dados secundários e agregados, dispensando a apreciação de um Comitê de Ética conforme a Resolução do Ministério da Saúde (Brasil, 2016). A busca de literatura foi ampla, com estratégias elaboradas para identificar estudos elegíveis nas bases de dados MEDLINE/PubMed, Cochrane Library, EMBASE, LILACS/BVS, SCIELO e Google Scholar. Os descritores foram definidos com base no DeCS/MeSH, combinando termos relacionados a flebotomíneos, PCR e amplificação de DNA.

Os estudos selecionados passaram por uma análise de qualidade metodológica seguindo o checklist para estudos analíticos transversais do Joanna Briggs Institute (JBI), conforme recomendado por Réus et al. (2021). Esta análise garantiu que os dados extraídos dos artigos incluídos fossem confiáveis e de alta qualidade, permitindo a identificação dos primers mais eficazes para a detecção de DNA de flebotomíneos, contribuindo assim para a robustez da pesquisa.

### **III. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral:**

Identificar e avaliar os primers mais sensíveis e específicos utilizados na detecção de DNA de flebotomíneos envolvidos na transmissão das leishmanioses, focado na transmissão urbana, visando aprimorar os métodos moleculares para diagnóstico e controle epidemiológico.

#### **Objetivos Específicos:**

1. Identificar primers eficazes para detecção do DNA das principais espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia intermedia*, *Migonemyia migonei* e *Nyssomyia whitmani*.
2. Avaliar as variações das técnicas de PCR utilizadas na literatura para o diagnóstico molecular dos flebotomíneos, comparando sua sensibilidade e especificidade em diferentes contextos epidemiológicos.



3. Realizar uma revisão sistemática da literatura científica para consolidar as evidências sobre os métodos moleculares mais eficazes para a detecção de DNA de flebotomíneos e de vertebrados urbanos envolvidos na transmissão das leishmanioses.

4. Descrever as técnicas de PCR mais avançadas, como multiplex PCR e DNA barcoding, que permitem a detecção simultânea de múltiplas espécies de flebotomíneos, contribuindo para a vigilância epidemiológica em áreas endêmicas.

Os resultados esperados incluem o avanço no conhecimento sobre os métodos diagnósticos moleculares, a aplicação prática em vigilância epidemiológica e a contribuição para a formação profissional de estudantes e pesquisadores na área de saúde pública e entomologia.

#### **IV. METODOLOGIA**

A pesquisa foi realizada por meio de uma revisão sistemática, conforme orientações do Handbook da Cochrane Collaboration (Higgins e Thomas, 2022) e das Diretrizes do Ministério da Saúde (Brasil, 2014). O método escolhido permite a avaliação crítica e sistemática dos estudos disponíveis sobre a detecção de DNA de flebotomíneos por técnicas moleculares, como a PCR. Não houve coleta de dados primários, pois a revisão sistemática utiliza dados previamente publicados, e dispensa a necessidade de aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os instrumentos de coleta de dados foram as bases de dados eletrônicas, incluindo MEDLINE/PubMed, Cochrane Library, EMBASE, LILACS/BVS, SCIELO e Google Scholar. As buscas utilizaram descritores previamente definidos no DeCS/MeSH, combinando termos como "flebotomíneos", "reação em cadeia da polimerase (PCR)" e "amplificação de DNA". A busca abrangeu estudos sem restrição de idioma, data de publicação ou localização geográfica, garantindo uma amostra ampla.

Quanto à participação no estudo, a pesquisa utilizou dados secundários, revisando artigos científicos publicados que utilizaram a técnica de PCR para identificar flebotomíneos e avaliaram a eficácia de primers.

O universo e a amostra do estudo referem-se aos artigos selecionados. A amostra foi composta por estudos observacionais transversais que usaram a técnica de PCR para identificar flebotomíneos. Após a busca nas bases de dados, os estudos foram triados e selecionados de acordo com os critérios de inclusão, como a relevân-



cia para o tema e a qualidade metodológica. Foram excluídos artigos que não forneceram informações suficientes ou que utilizavam metodologias diferentes das especificadas.

O local de estudo foi virtual, na qual as fontes de dados foram acessadas de bibliotecas digitais e bases de dados online. O estudo foi desenvolvido no ambiente acadêmico da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), na Faculdade de Ciências da Saúde, permitindo o acesso a fontes bibliográficas e recursos tecnológicos para a execução da pesquisa.

A forma de análise foi realizada de maneira quantitativa e qualitativa. Os estudos selecionados foram analisados quanto à taxa de sucesso dos primers para identificação de DNA de flebotomíneos. A qualidade metodológica dos artigos foi avaliada utilizando o checklist do Joanna Briggs Institute (JBI). A análise estatística incluiu a aplicação de testes de frequência relativa e absoluta, além de comparações por meio do teste de qui-quadrado com um nível de significância de 5%, possibilitando a avaliação da eficácia dos primers utilizados e suas possíveis aplicações na prática clínica e epidemiológica.

## **V. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos na pesquisa indicaram que a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma ferramenta altamente eficaz e sensível para a detecção de DNA de flebotomíneos, especialmente das espécies como *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Os primers mais utilizados nos estudos revisados apresentam alta sensibilidade e especificidade, sendo eficazes na amplificação de sequências genéticas desses vetores, pois permitem uma diferenciação precisa entre as espécies. Observou-se ainda que o uso da PCR pode superar limitações de métodos tradicionais de diagnóstico, como a microscopia e os testes sorológicos, especialmente em áreas com alta prevalência de infecção cruzada com outras parasitoses.

Os artigos analisados mostraram uma taxa de sucesso variável na identificação das espécies de flebotomíneos, com alguns estudos relatando 100% de eficácia na amplificação de DNA de flebotomíneos utilizando primers específicos, como o LCO1490 e HCO2198, empregados na amplificação da subunidade I da citocromo c oxidase mitocondrial (COI). Em contrapartida, a eficácia de primers utilizados em estudos mais antigos apresentou menores taxas de sucesso, o que pode estar relacionado ao aprimoramento das técnicas e à evolução tecnológica nos últimos anos.



As análises estatísticas realizadas compararam a taxa de sucesso dos diferentes primers e técnicas de PCR aplicados nos estudos. Foi realizado teste de qui-quadrado, com significância de 5%, para verificar a eficácia relativa dos primers e a qualidade dos dados extraídos. A análise dos dados confirmou a aplicabilidade dos primers mais modernos na identificação dos vetores da leishmaniose, que implicam diretamente na saúde pública e no controle de surtos da doença. Também foi possível concluir que a utilização de primers altamente sensíveis na PCR pode ser uma ferramenta crucial para pesquisas futuras e para o desenvolvimento de novas estratégias de controle epidemiológico.

Por fim, a pesquisa destacou a importância de continuar investindo em metodologias moleculares mais avançadas e padronizadas para a identificação de flebotomíneos, além da necessidade de fortalecer a integração entre a pesquisa científica e a prática clínica. A revisão sistemática consolidou a importância da PCR como método diagnóstico e sua contribuição potencial para o controle de doenças transmitidas por vetores, como a leishmaniose.

## VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações sobre a pesquisa destacam o impacto positivo da utilização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) no diagnóstico molecular de flebotomíneos, vetores da leishmaniose, evidenciando sua alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA dessas espécies. Essa abordagem não só aprimora o monitoramento epidemiológico e o controle da doença, superando as limitações dos métodos tradicionais, como também fortalece a integração entre ensino, pesquisa e extensão ao disseminar os resultados em eventos científicos. Além disso, a pesquisa contribui para o fortalecimento das políticas de saúde pública, permitindo uma detecção mais precisa e precoce, o que é essencial para a implementação de estratégias eficazes de prevenção e combate à leishmaniose.

## VII. REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Diretrizes Metodológicas: Elaboração de Revisão Sistemática e metanálise de estudos de Acurácia diagnóstica.** Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2014. 116 p.

CARVALHO, Sílvia Maria Santos, *et al.* Diversidade de flebotomíneos no Município de Ilhéus, Bahia. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 19 n. 3, p. 239-244, jul-set 2010.



Disponível em: < <https://open.iberoteca.net/shop/product/diversidade-de-flebotomíneos-no-município-de-ilheus-bahia-33293#attr=>>

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Minas Gerais, Vol. 7, Nº 3, pag. 338 – 349, setembro, 2004

GONZÁLEZ, Camila, *et al.* Diversity patterns, Leishmania DNA detection, and bloodmeal identification of Phlebotominae sand flies in villages in northern Colombia. **PloS one**, v. 13, n. 1, p. e0190686, 2018. Disponível em: <

[>](https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190686)

GUALDA, Kézia Peres *et al.* New primers for detection of *leishmania infantum* using Polymerase Chain Reaction. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 57 n. 5, p 377-83, 2015.

HIGGINS, Julian; THOMAS, James. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions** [Internet]. The Cochrane Collaboration; 2022 [acesso 08 out 2024].

Version 6.3. Disponível em: <https://training.cochrane.org/handbook/current>.

NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia humana**. 11º ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 498 p.

QUEIROZ, Mirian Francisca Martins, *et al.* Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 45, n. 3., p. 313-17, 2012. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/cgszdzdP6xr7hG5TfZHXmVfJ/?lang=en#>>

SANTOS, Thiago Vasconcelos dos, *et al.* Leishmania DNA detection and species characterization within phlebotomines (Diptera: Psychodidae) from a peridomicile-forest gradient in an Amazonian/Guianan bordering area. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0219626, 2019. Disponível em: <

[>](https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0219626)

SCHALLIG, Henk, D.F.H.; OSKAM, Linda. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**. Amsterdam, volume 7, n. 8, pag. 641–651, agosto, 2002.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12167091/>

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Checklist dos *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica. Inventários Biota Neotropica**. v. 11 (supl. 1), 2011. Disponível em: <

<https://www.scielo.br/j/bn/a/qQsp73KjxrgXmxjPdYvrVZf/abstract/?lang=en#>>

VERONESSI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. **Tratado de Infectologia**. 5º ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 2489 p.

## VIII. AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração de diversas pessoas e instituições, às quais expressou minha profunda gratidão. agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Silvia Minharro Barbosa, pela orientação liderada e pelo apoio contínuo ao longo de todas as etapas da pesquisa, assim como os colegas e colaboradores da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), cujo auxílio técnico e suporte logístico foram fundamentais. Reconheço, com especial gratidão, o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPTO), que foram imprescindíveis para a execução deste projeto, refletindo o compromisso com o avanço científico.