

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) UTILIZANDO A PCR

Jéssica Lima SIDOU¹; Francimeire Gomes PINHEIRO²; Antonia Maria Ramos FRANCO³
¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Co-orientadora CPCS /INPA; ³Orientadora CPCS /INPA

1. Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença caracterizada por lesões de pele, cartilagem e mucosas do trato respiratório superior, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) e transmitida ao homem pela picada de insetos flebotomíneos (Gontijo e Carvalho 2003).

Na região amazônica a forma mais comum da leishmaniose é a cutânea, causada por várias espécies de leishmânias, sendo a *Leishmania (Viannia) guyanensis* a espécie predominante. As lesões apresentam bordas salientes, podendo ser únicas ou múltiplas (Rey 2001).

No Estado do Amazonas, foi notificado em 2009 pelo Serviço de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde 1.439 casos (17,3%) de LTA de 8.272 casos totais na região norte do Brasil. O maior número de casos autóctones notificados de leishmaniose pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas ocorreu na cidade de Manaus, seguido pelo município de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva. A LTA pode ser, portanto, considerada como uma endemia de importância na região Amazônica (SINAN 2009).

O diagnóstico parasitológico da leishmaniose cutânea é feito pelo encontro dos parasitos nas lesões, que são visualizados ao microscópio após coloração pelo método de Giemsa; pelo isolamento do parasito em meio de cultivo (Hendricks *et al.* 1978; Jaffe *et al.* 1984; Walton *et al.* 1977) ou infecção em animais de laboratório como o hamster (*Mesocricetus auratus*) e posterior isolamento do parasito a partir das lesões nesses animais. Testes imunológicos intradérmicos como a reação de Montenegro, a pesquisa de anticorpos para *Leishmania*, também auxiliam no diagnóstico. No entanto, são métodos genéricos que não identificam especificamente o agente etiológico e que demandam tempo e profissionais treinados para a visualização e pesquisa do parasito. Portanto, é necessária a busca de métodos mais confiáveis, específicos e rápidos para o diagnóstico desta doença, como é o caso da reação em cadeia da polimerase (Coura *et al.* 1996).

Este estudo baseia-se na aplicação da PCR e utilizando a PCR-RFLP a partir de amplificação da região de ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) utilizando enzimas de restrição e também o uso de iniciadores espécie-específicos patenteados (no. PI0505330-7) pela equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (Sibajev 2005) no diagnóstico da *Leishmania (V.) guyanensis* em materiais biológicos de diversas origens (parasitos isolados em meio de cultivo, flebotomíneos infectados, biópsias de lesão animal), com o intuito de avaliar a eficácia destes marcadores moleculares.

2. Material e Métodos

Coleta de amostras – Foram utilizadas neste estudo, amostras de origens diversas (lesões de hamsters experimentalmente infectados, flebotomíneos naturalmente infectados e cultivo de tripanosomatídeos), bem como espécies representativas do gênero *Leishmania* como controle das reações, estocadas e mantidas no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA. Formas promastigotas de cultura em fase estacionária, cultivadas em meio completo RPMI (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) a 25°C foram amplificadas em frascos de 250 mL, lavadas em PBS (0.15M phosphate-buffered saline pH 7.4), centrifugadas (2500g, 4°C, 15 minutos) e mantidas a -80°C até o processamento de extração de DNA. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética do INPA (nº 001/2010). O DNA das amostras foi extraído, de acordo com protocolo modificado pelo método de Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. Após a extração, as amostras foram mantidas a temperatura de -80°C. Foi realizada a quantificação do DNA das amostras utilizando espectrofotômetro (Spectrophotometer Thermo Scientific Nanodrop 2000®), com amplitude variando de 220 a 750nm verificando-se sua concentração em ng/uL. Inicialmente a PCR foi realizada amplificando-se a região de ITS, que é conservada e variavelmente franqueada entre os vários tripanosomatídeos, como *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Crithidia* (Hernandez *et al.* 1990). As condições para a realização da reação de

cadeia em polimerase para a amplificação do fragmento ITS foram de 94° C/3 min; 94° C/1 min, 55° C/1 min, 72° C/2 min (32 vezes); 72° C/1 min. O produto desta reação foi submetido a uma segunda PCR, utilizando-se a metodologia e iniciadores patenteados pelo Dr. Alexander Sibajev e Dra. Antonia M R Franco (patente no. PI0505330-7). A reação foi feita em 40 ciclos da amplificação com temperatura de anelamento de 58°C (Sibajev 2005). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen® utilizando-se os iniciadores P2 e REVGUY (Invitrogen®) seguindo protocolo de acordo com o descrito na patente.

Os produtos das reações (PCR) de amplificação da região de ITS foram também submetidos à digestão com enzimas de restrição (*Hae* III, *Taq* I, *Hpa* II e *Eco* RI). O protocolo de utilização das enzimas foi seguido conforme a recomendação do fabricante (Invitrogen®). Também foram digeridas cepas de referência de *Leishmania* controles da reação. Os produtos amplificados e digeridos enzimaticamente foram comparados com os obtidos com as cepas de referência. Aliquotas dos produtos amplificados foram adicionadas ao tampão azul de bromofenol (0,25% (v/v) e xilenocianol 0,25% (v/v) em 40% de solução aquosa de sacarose e fracionadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão de corrida TAE (40mM de Tris-Acetato e 1mM de EDTA em pH 8,0) sob voltagem constante (90V) durante aproximadamente 1 hora. Utilizou-se o marcador de peso molecular/ DNA ladder 100pb (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) para a averiguação do peso molecular dos amplicóns. Os géis corados com GelRed (Sigma) foram visualizados através de luz ultravioleta em transiluminador e documentados utilizando o sistema fotográfico "Eagle Eye System" (Stratagene, La Jolla, USA) no Laboratório de Biologia Molecular do INPA. Após o registro dos géis estes foram analisados, comparando-se com os controles e o tamanho dos amplicóns. Essa análise foi feita em conjunto ao trabalho desenvolvido por Sibajev (2005).

3. Resultados e Discussão

Foram testadas 39 amostras de origens diversas, sendo quatro de lesões de hamster experimentalmente inoculados, três com *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/93/IM3919, MHOM/BR/06/IM5344, MHOM/BR/08/IM5554) e uma com *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/08/IM5584); 15 amostras de flebotomíneos infectados com *Leishmania (Viannia) sp.* da espécie *Lutzomyia umbratilis*, oito cepas padrões de cultivo de *Leishmania spp.*, sendo: *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) colombiense* (IGOM/PA/85/E582.34), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *L. (V.) lainsoni* (MCOE/BR/82/1367), *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/93/M3936), *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) e *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) e 12 amostras de cultivo de isolados humanos, sendo: uma com *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/03/IM5039) e onze com *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/97/IM 4365, MHOM/BR/99/IM 4595, MHOM/BR/00/IM 4771, MHOM/BR/04/IM 5219, MHOM/BR/04/IM 5224, MHOM/BR/04/IM 5225, MHOM/BR/04/IM 5227, MHOM/BR/04/IM 5237, MHOM/BR/04/IM 5238, MHOM/BR/05/IM 5253, MHOM/BR/05/IM 5281).

Das amostras estudadas observou-se que a amplificação da região de ITS nos ensaios de PCR, estas amplificaram dentro do peso molecular esperado com cerca de 1.2 kb. Nos ensaios utilizando os iniciadores patenteados foi possível discriminar as espécies de leishmanias obtendo-se produtos reativos para *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, além de outras espécies de *Leishmania*. Na figura 1, observa-se o resultado da amplificação e diferenciação de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis*, obtendo-se produtos amplificados com tamanhos distintos da reação de amplificação para a espécie *L. (V.) guyanensis*, comprovando a especificidade dos iniciadores para a identificação de *L. (V.) guyanensis*.

PM C- 1 2 3 4 5 6 7 8

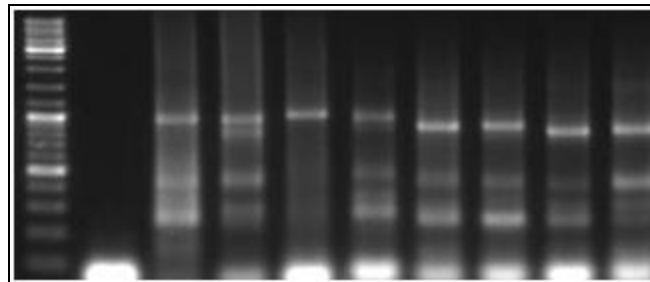


Figura 1 - Reação da PCR utilizando 40 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 58°C. Teste com DNA extraído de amostras de cultivo de cepas de referência. PM: marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder; C-: Controle negativo. Identidade das amostras: 1- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; 2- *L. (Viannia) braziliensis*; 3- *L. (V.) colombiense*; 4- *L. (V.) guyanensis*; 5- *L. (V.) lainsoni*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (V.) panamensis*; 8- *L. (V.) shawi*.

Após amplificação pela PCR da região de ITS foi realizada a digestão do produto utilizando-se as enzimas *Hae* III, *Taq* I, *Hpa* II e *Eco* RI, das amostras de DNA amplificadas de cepas de referência e isolados humanos com a técnica PCR-RFLP. Todas as amostras testadas foram inicialmente caracterizadas por análise isoenzimática. De acordo com o padrão dos fragmentos obtidos pela PCR/RFLP, verificou-se a distinção entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Quanto ao padrão obtido pela enzima *Eco* RI, verifica-se heterogeneidade entre os diferentes isolados de *L. (V.) guyanensis*, fato também observado entre as diferentes espécies do subgênero *Viannia* (cepas de referência) com esta enzima (Figura 2). Naiff em 1998 demonstrou que ao contrário da aparente homogeneidade bioquímica dos isolados de *L. (V.) guyanensis* ocorre uma variação de fragmentos de ITS detectada entre os isolados revelando 10 perfis distintos, fenômeno ligado provavelmente a diversidade de hospedeiros. Quanto a padrão dos fragmentos obtidos com as outras enzimas de restrição observa-se uma aparente homogeneidade tanto entre os diferentes isolados humanos de *L. (V.) guyanensis* como entre as espécies representantes do subgênero *Viannia* (Figura 3).

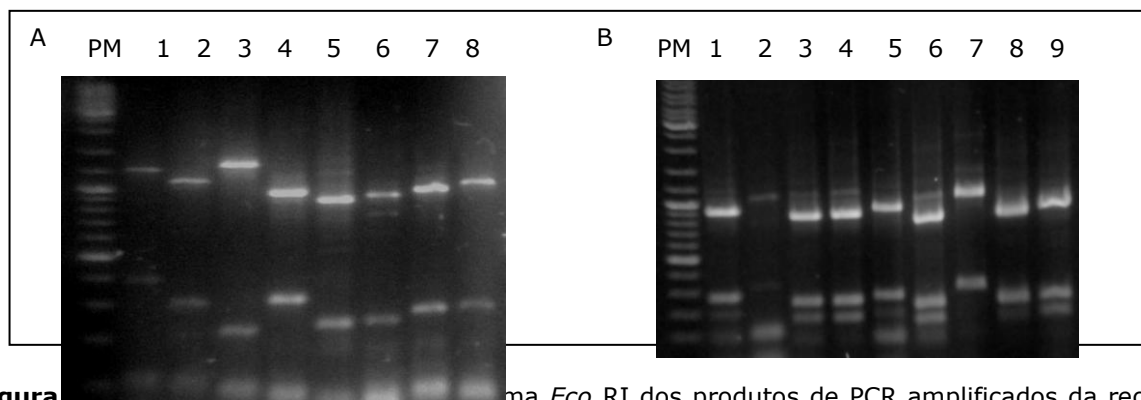


Figura 2 - Digestão com a enzima *Eco* RI dos produtos de PCR amplificados da região ITS. (A) Amostras de cultivo de cepas de referência: PM marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder. Identidade das amostras: 1- *L. (L.) amazonensis*; 2- *L. (V.) braziliensis*; 3- *L. (V.) colombiense*; 4- *L. (V.) guyanensis*; 5- *L. (V.) lainsoni*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (V.) panamensis*; 8- *L. (V.) shawi*. (B) Amostras de isolados em cultivo de indivíduos humanos. PM marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder. Identidade das amostras: (1-8) *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/97/IM 4365, MHOM/BR/99/IM 4595, MHOM/BR/00/IM 4771, MHOM/BR/04/IM 5219, MHOM/BR/04/IM 5224, MHOM/BR/04/IM 5225, MHOM/BR/04/IM 5227, MHOM/BR/04/IM 5237); 9- *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/03/IM5039).

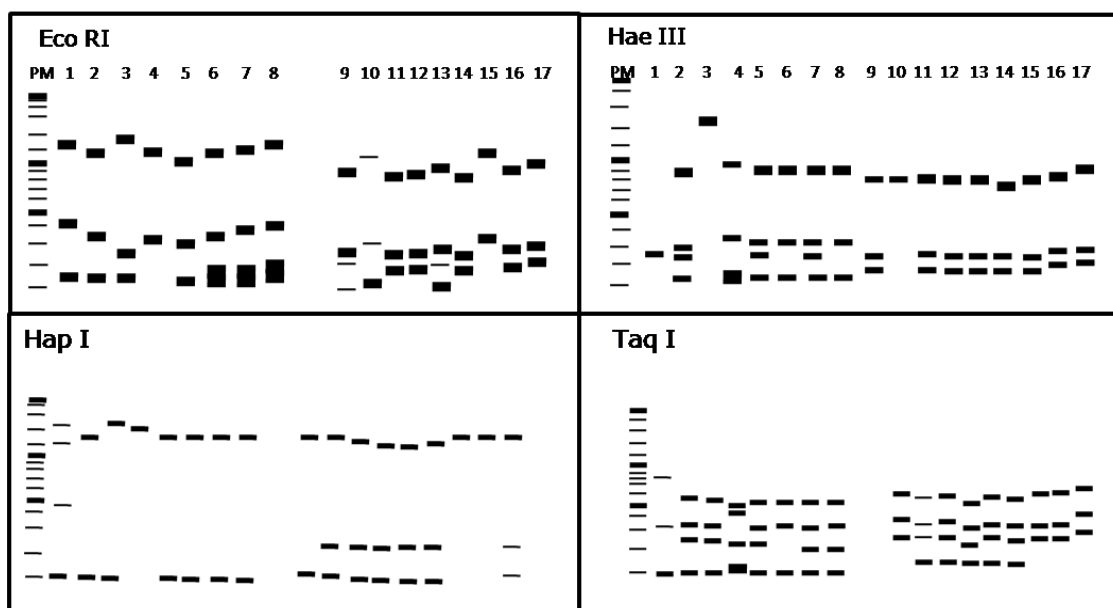


Figura - 3 Comparação dos perfis de fragmentos de ITS, digeridos pelas enzimas de restrição (*Eco* RI, *Hae* III, *Hap* I, *Taq* I). Identidade das amostras: (1-8) Amostras de cultivo de cepas de referência. PM: marcador de peso molecular/ 100 pb DNA ladder. 1- *L. (L.) amazonensis*; 2- *L. (V.) braziliensis*; 3- *L. (V.) colombiensis*; 4- amostra de *Leishmania* sp.; 5- *L. (V.) lainsoni*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (V.) panamensis*; 8- *L. (V.) shawi*. (9-17): Amostras de isolados em cultivo de indivíduos humanos; (9-16): *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/97/IM 4365, MHOM/BR/99/IM 4595, MHOM/BR/00/IM 4771, MHOM/BR/04/IM 5219, MHOM/BR/04/IM 5224, MHOM/BR/04/IM 5225, MHOM/BR/04/IM 5227, MHOM/BR/04/IM 5237); 17- *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/03/IM5039).

4. Conclusão

Não houve diferença quanto a amplificação da região do rDNA do ITS utilizando-se os iniciadores P2 e REVGUY, quanto a origem das amostras testadas. A variação de fragmentos de ITS observada através da técnica de PCR-RFLP confirmou a existência de variabilidade genética dentro das populações de *L. (V.) guyanensis* (micro-heterogeneidade populacional demonstrada pela enzima *Eco* RI) além da variabilidade entre amostras de subgêneros distintos. Entre as espécies do subgênero *Viannia* apenas foi possível distinguir pelas enzimas *Hae* III e *Hap* I a *L. (V.) colombiensis* quando comparado com as demais.

5. Referências

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). *Sistema de Informações de Agravos de Notificação*. LTA, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. Brasília, Ministério da Saúde, 2009.
- Coura J.R., Fernandes O., Arboleda M., Barrett T.V., Carrara N., Degraive W. & Campbell D.A. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 90: 278-279.
- Gontijo B.; de Carvalho M.L. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:71-80.
- Hendricks, L.D., Wood, D.E. & Hadjuk, M.E. 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76: 309-316.
- Hernandez R., Rios P., Valdes AM., Pinero D. 1990. Primary structure *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other Trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 41: 207-212.
- Jaffe, C.L., Grimaldi Jr., G.; McMahon-Pratt, D. 1984. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel, C.M- (ed.), Genes and Antigens of Parasites. *A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Fundação Oswaldo Cruz, RJ, pp.47-91.

Naiff, M.F. *Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região*. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1998.

Rey, L. *Parasitologia* 2001 Rio de Janeiro, R.J. Ed. Guanabara Koogan, 3ª Ed., 856 p.

Roos, R. 1903. Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J* 11: 1401.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sibajev, A. 2005. *Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para o Diagnóstico de Variedades de Leishmania Circulantes na Região Norte do Brasil*. Tese (Doutorado) – UFAM, Manaus, Am.

Volpini, A. C.; Passos, V. M. A.; Oliveira, G. C.; Romanha, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis, *Acta Trop.*, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

Walton, B.C.; Shaw, J.J. ; Lainson, R. 1977. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania brasiliensis*. *J. Parasitol.* 63: 118-119.