

## **PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO EM LÂMINAS CORADAS DE *Leishmania* SP. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE): MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA**

Juliana Maria de MORAIS<sup>1</sup>; Liliâne Coelho da ROCHA<sup>2</sup>; Francimeire Gomes PINHEIRO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPCS/INPA; <sup>3</sup>Co-orientadora CPCS/INPA

### **1. Introdução**

As leishmanioses são zoonoses que apresentam duas principais formas clínicas, a leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. Segundo o Manual de Vigilância Sanitária (2007), a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) engloba uma variedade de manifestações clínicas como a leishmaniose cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. Essa variação está associada a diferentes espécies do parasito e a resposta imune do hospedeiro (Silveira e Lainson 2004). As principais espécies responsáveis por ocasionar a LTA no Amazonas são *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. O controle e tratamento da LTA têm sido difícil devido à diversidade de espécies de *Leishmania* e a falta de métodos de diagnósticos específicos para a espécie, o que facilitaria o direcionamento da terapêutica. A identificação do parasita é essencial em qualquer estudo clínico patológico da doença, uma vez que há variação específica na sua virulência e resposta terapêutica (Figueira *et al.*, 2008). Os métodos de diagnóstico sorológicos e histopatológicos têm uma precisão limitada, devido à sua baixa sensibilidade. A resposta imune celular mediada por reação de hipersensibilidade tardia geralmente identifica casos positivos com precisão. No entanto, os resultados dependem do estado imunológico do paciente, do tempo decorrido desde a infecção, das espécies infectantes de *Leishmania* e da qualidade dos reagentes utilizados (Marzochi *et al.* 1993; Berman 1997). A metodologia de diagnóstico utilizada atualmente é a observação direta de amastigotas em esfregaços corados ou culturas de material obtido a partir de lesões de pele. Porém, pela dificuldade em se discriminar estes parasitos com critérios extrínsecos, têm-se utilizado diversos marcadores moleculares capazes de identificar e classificar os organismos de acordo com as características comuns (Grimaldi e Tesh 1993). Ferramentas moleculares como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) têm se mostrado altamente eficazes no diagnóstico da leishmaniose (Reed 1996; Pirmez *et al.* 1999; Weigle *et al.* 2002; Disch *et al.* 2005). Atualmente o diagnóstico dos agentes de doenças infecciosas inclui o uso de tecnologias com base no ácido nucléico. O DNA, quimicamente mais estável do que enzimas e anticorpos, têm sido objeto de intensas pesquisas (Ellis e Crampton 1988; Guevara *et al.* 1992). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* que consiste na amplificação de seqüências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA) (Andrade 2007). Sua aplicação permite rápida detecção e identificação do DNA, mesmo que degradado (Saiki *et al.* 1988), dos parasitos sem a necessidade de isolamento (Andrade 2007). No diagnóstico de leishmaniose, um dos principais alvos das técnicas moleculares desenvolvidas é o DNA do cinetoplasto (kDNA) (Rodgers *et al.* 1990). Para estes estudos moleculares, a etapa de extração de DNA é muito importante e necessita de uma padronização para cada organismo estudado. Para tanto, pesquisar métodos alternativos de extração de DNA que sejam rápidos, com pouco custo, livres de contaminação e eficazes, pode possibilitar a aplicação da pesquisa em outros estudos, como diagnósticos retrospectivos e populacionais. Neste estudo, três métodos de extração de DNA foram selecionados e aplicados em lâminas coradas estocadas por mais de um ano.

### **2. Materiais e Métodos**

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas lâminas de imprint de biópsias de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/08/IM5584) e coradas pelo método de Giemsa, armazenadas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Dando-se preferência para as que estavam em bom estado, com alta quantidade de parasitos e que possuíssem duplicatas. As lâminas foram umedecidas com tampão de lise (NaCl 5M, sucrose, Tris 2M, EDTA 0,5M pH 9,1, H<sub>2</sub>O dd) e SDS 10%, para assim serem raspadas com lâmina de bisturi e depositadas em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Em seguida foram aplicados diferentes variações do

método de extração por fenol-clorofórmio. Foram estabelecidos três variações do método de extração do DNA: (1) **Overnight** (37°C): O material foi exposto à uma temperatura de 37°C, overnight (24 horas) sendo acrescido 10 µL de proteinase K (10mg/mL) e 10 µL RNase (10mg/mL) após o pré-tratamento. No dia seguinte as amostras foram submetidas ao método fenol-clorofórmio (Sambrook, 1989); (2) **Filtração direta**: Após o pré-tratamento o material foi filtrado com uma membrana de 0,22mm (Milipore) e mantido em banho-maria a 56°C por 2 horas. Logo em seguida foi submetida ao mesmo método fenol-clorofórmio; (3) **Banho-maria** (56°C): As amostras pré-tratadas foram colocadas em banho-maria à 56°C, por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 400 µL de TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0) e mantidas a -20° C. Posteriormente foram descongeladas à temperatura ambiente, adicionando-se 20 µL de proteinase K (10 mg/mL). Em seguida incubou-se em banho-maria a 56°C por 1 hora. Sendo submetidas ao método de fenol-clorofórmio. Após, as extrações (variações 1, 2 e 3) o DNA foi hidratado com 30 µL de TE.

A quantificação do DNA foi realizada num espectrofotômetro (Spectrophotometer Thermo Scientific Nanodrop 2000®), com amplitude variando de 220 a 750 nm, e verificada sua concentração em ng/µL, a pureza do DNA extraído e a quantidade de compostos fenólicos presente nas amostras. Foi utilizado um volume mínimo de 1 µL de DNA extraído para a obtenção da concentração em ng/µL de cada amostra. A região de ITS do rRNA foi amplificada utilizando os seguintes iniciadores IR1 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3') e IR2 (5'-GCGTTAGTCCTGCCAAACTCAGGTCTG-3'), utilizado por Cupolillo *et al.* (1995). Um total de 50ng de DNA da amostra foi adicionado na reação do *mix* contendo: 10pmol de cada um dos iniciadores; tampão (10mM Tris-HCl, pH 8.0/50 nMKCl); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100mM de cada dNTP; 1U Taq polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25µL em termociclador (Thermo Px2 Thermal Cycler) de Gradiente. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 min. e 35 ciclos de 94°C por 1 min., 58°C por 1 min., 72°C por 2 min., seguida por extensão de 72°C por 5 min. Os fragmentos de amplificação foram observados em gel de agarose de 1,5% com TAE 1% e corado com GelRed (Biotium).

### 3. Resultados e Discussão

A partir das diferentes variações do método de extração realizadas, foi possível compará-las de acordo com a concentração de DNA obtida (Tabela). Foi perceptível que a variação por overnight rendeu melhores resultados relacionados à concentração de DNA obtida, assim como nos estudos realizados por Barea (2001), que também obteve melhores resultados na extração de DNA a partir de fontes escassas, com maior tempo de incubação.

Tabela: Quantificação do DNA no espectrofotômetro Nanodrop (ND2000®) das amostras extraídas pelas variações: 1 – Overnight; 2 Filtração Direta e 3 – Banho-Maria.

Amostras	Método 1		Método 2		Método 3	
	Concentração (ng/µL)	Pureza (260/280)	Concentração (ng/µL)	Pureza (260/280)	Concentração (ng/µL)	Pureza (260/280)
1	5,1	2,43	10,1	3,19	17,4	2,78
2	42,8	1,90	4,9	3,12	6,6	3,30
3	5,0	6,25	3,6	4,87	4,8	4,80
4	6,3	2,72	49,1	1,58	5,3	1,60
5	98,6	1,49	11,6	3,53	16,8	2,21
6	121,3	1,55	3,5	4,24	18,2	2,19
7	51,4	1,57	4,1	1,80	8,7	2,26
8	55,5	1,64	4,8	1,58	8,4	1,79
9	40,0	1,64	7,9	2,08	9,5	2,08
10	19,0	1,63	4,2	8,50	12,5	1,71

A partir das amostras extraídas pela variação em overnight, foram selecionadas cinco amostras com as maiores concentrações para realizar a amplificação da região de ITS (Figura). Foi observada amplificação da região de ITS de apenas três (60%) destas amostras. É possível que a ausência de amplificação do DNA das outras duas amostras possa

ter ocorrido devido a presença de inibidores na reação ou mesmo pelas diferentes concentrações de DNA parasitário contidos nas impressões das lâminas utilizadas.

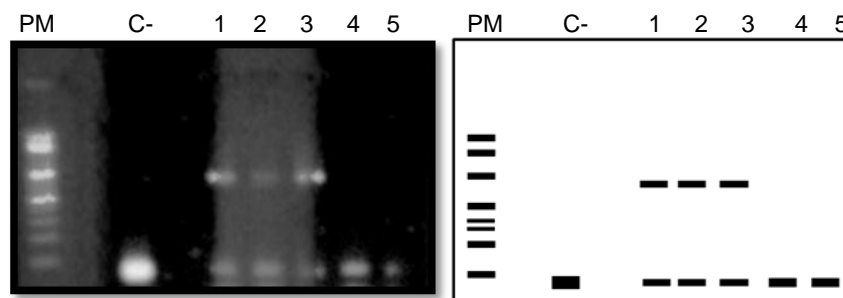


Figura: Resultado da PCR em Gel de agarose das amostras extraídas pelo método 1 (Overnight). **PM** - Peso Molecular; **C-** - Controle negativo; **1** - amostra com concentração de 42,8 ng/ $\mu$ L; **2** - amostra com concentração de 98,6 ng/ $\mu$ L; **3** - amostra com concentração de 121,3 ng/ $\mu$ L; **4** - amostra com concentração de 51,4 ng/ $\mu$ L e **5** - amostra com concentração de 55,5 ng/ $\mu$ L.

Os resultados comprovam que é possível realizar extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio, a partir de lâminas coradas por Giemsa, indicando que esta abordagem pode ser um método alternativo para a detecção e identificação de parasitos em exames diretos. Estudos com amastigotas de lâminas coradas por Giemsa amplificando a região de ITS foram realizados por Kazemi-Rad *et al.* (2008), com um percentual de 89.6% de positividade, demonstrando por estes resultados e também pelos nossos estudos, a possibilidade de diagnóstico com formas amastigotas de lâminas coradas. Além disso, tais informações também são importantes em estudos epidemiológicos onde a distribuição das espécies de *Leishmania* em hospedeiros humanos e animais, bem como em insetos vetores, é um pré-requisito para a implantação de medidas apropriadas de controle (El Tai *et al.* 2000; Schönian *et al.* 2003).

#### 4. Conclusão

Este estudo demonstrou que é possível realizar extração de DNA e amplificação de alvos genômicos a partir de lâminas coradas, pelo método fenol-clorofórmio, possibilitando assim novos recursos e métodos de diagnóstico utilizando a PCR, viabilizando maior confiabilidade e especificidade ao teste.

#### 5. Referências

- Andrade, R.V. 2007. Reação em Cadeia de Polimerase em biópsias de pele emblocadas em parafina compatíveis com Leishmaniose Tegumentar Americana. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas. 58 pp.
- Brasil. 2007. Ministério da Saúde: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Ed. Editora MS, Brasília. 184p.
- Barea, J.A. 2001. *Extração de DNA de material de arquivo e fontes escassas para utilização em Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 126 pp.
- Berman, J.D. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24: 684-703.
- Cupolillo, E.; Grimaldi, G. Jr.; Momen, H.; Beverley, S.M. 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 145-155.
- Disch, J.; Pedras, M.J.; Orsini, M.; Pirmez, C.; de Oliveira, M.C.; Castro, M.; Rabello, A. 2005. *Leishmania* (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51: 185-90.

El Tai, N.O., Osam, O.F., Elfari, M., Presber, W., Schönian, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Trop Med Hyg.* 94(5):575-79.

Figueira, L.P., Zanotti, M., Pinheiro, M.G., Franco, A.M.R. 2008. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41 (5): 512-514.

Grimaldi, G. Jr.; Tesh, R.B.; McMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 687-725.

Grimaldi, G. Jr., Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews.* 6: 230-250.

Kazemi-Rad, E., Mohebbali, M., Hajjaran, H. 2008. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J. Publ. Health.* Vol. 37(1): 54-60.

Marzochi, M.C.; Teixeira, P.C.; Marzochi, K.B.; da Conceição, N.F.; Coutinho, W.; de Brito, D.B. 1993. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo,* 35: 301-303.

Pirmez, C.; da Silva Trajano, V.; Paes-Oliveira Neto, M.; da-Cruz, A.M.; Gonçalves-da-Costa, S.C.; Catanho, M.; Degraive, W.; Fernandes, O. 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 37: 1819-1823.

Reed, S.G. 1996. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 14: 471-478.

Rodgers, M.R.; Popper, S.J.; Wirth, D.F. 1990. Amplification of kinetoplast as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology.* 75: 267-275.

Romero, G.A.; Guerra, M.V.; Paes, M.G.; Macêdo, V.O. 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 456-465.

Saiki, R.K. et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.

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

Silveira, F.T., Lainson, R., Corbett, C.E.P. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 99: 239-251.

Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Infect.* 47(1):349-58.

Weigle, K.A.; Labrada, L.A.; Lozano, C.; Santrich, C.; Barker, D.C. 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J. Clin. Microbiol.* 40: 601-606.