

DIAGNÓSTICO MOLECULAR UTILIZANDO MARCADOR ESPÉCIE ESPECÍFICO PARA *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) NA REGIÃO NORTE DO BRASIL.

Jéssica Lima SIDOU¹; Francimeire Gomes PINHEIRO²; Antonia Maria Ramos FRANCO³

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

1. Introdução

As leishmanioses que incluem a forma visceral (calazar), mucocutânea e cutânea (tegumentar), têm importância epidemiológica mundial e em todo o nosso País, sendo responsáveis por cerca de 20.000 casos/ano no Brasil (Brasil, 2005). O homem sofre como hospedeiro acidental de graves lesões destrutivas da pele e mucosas pela LTA. Em 1990 a OMS (Organização Mundial da Saúde) estimou a existência de 12 milhões de doentes com incidência anual de 400 mil novos casos, sendo que destes, 300 mil eram de leishmaniose tegumentar. As taxas de infecção variam entre os estados, sendo a maior incidência na região norte com 11.211 casos no ano de 2003. Surtos epidêmicos da LTA estão associados às derrubadas de matas para a construção de estradas ou implantação de novos povoados, fato este comum nessa região. A doença também ocorre com frequência em regiões de colonização antiga, onde se verifica o ciclo de transmissão urbana do parasito (Brasil, 2005)

É difícil discriminar os tripanosomatídeos ao nível de espécie apenas com base na morfologia. Semelhanças ao nível morfológico, biológico e molecular existem entre muitos exemplares desta família de protozoários, isolados de insetos e/ou hospedeiros vertebrados, dificultando a discriminação de parasitas de importância médica. Além disso, a distribuição geográfica dos vetores e dos hospedeiros vertebrados de diversos tripanosomatídeos, geralmente é simpátrica (Freitas *et al.* 1989; Arias & Naiff, 1981; Rey, 2001; Mayr, 1977).

Os métodos moleculares têm se mostrado de grande valor na identificação de tripanosomatídeos, fato importante na taxonomia, e por outro lado, no diagnóstico, terapêutica, epidemiologia e controle parasitário. Métodos moleculares, ao nível do DNA genômico, serão, sem dúvida, ferramentas necessárias aos estudos taxonômicos e evolutivos dos organismos. Em esquemas de classificações mais recentes, a análise dos resultados obtidos por diferentes métodos, tem sido feito através de parâmetros fenéticos e filogenéticos (Kreutzer *et al.*, 1987; Lainson & Shaw, 1987; Kreutzer *et al.*, 1991; Grimaldi *et al.*, 1992; Franco *et al.* 1996). Em alguns dos estudos já realizados, empregando-se a taxonomia numérica, baseado em análises fenética e cladística, a análise de eletroforese de isoenzimas obtida a partir do perfil da mobilidade eletroforética, também tem sido empregada em abordagens de evolução molecular e relações taxonômicas entre algumas espécies de tripanosomatídeos (Grimaldi *et al.*, 1991; Hashiguchi *et al.*, 1991; Franco *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 1997 a,b; Franco & Grimaldi, 1999; Franco *et al.*, 2000; Mayrink, 2000).

Este estudo baseia-se na aplicação da PCR utilizando os iniciadores espécie-específicos patenteados (no. PI0505330-7) pela equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (Sibajev, 2005) no diagnóstico da *Leishmania (Viannia) guyanensis* em materiais biológicos de diversas origens (parasitos isolados em meio de cultivo, flebotomíneos infectados, biópsias de lesão humana e animal), com o intuito de avaliar a eficácia deste marcador molecular e padronizar metodologias futuras para o diagnóstico molecular e identificação do agente etiológico da LTA em áreas endêmicas brasileiras, como é a Amazônia.

2. Material e Métodos

Coleta de amostras - Neste estudo foram utilizadas amostras de origens diversas (biópsias de lesões de hamsters experimentalmente inoculados, flebotomíneos naturalmente infectados e cepas padrões de leishmanias mantidas em cultivo) estocadas e mantidas no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA.

Foram utilizadas diferentes espécies representativas do gênero *Leishmania* cedidas e identificadas pelo Centro de Referência em tripanosomatídeos da FIOCRUZ do Rio de Janeiro e outras mantidas no lab. de Leishmaniose do INPA e identificadas pela doutoranda Luanda Figueira. Formas promastigotas de cultura em fase estacionária, cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 25°C foram amplificadas em frascos de 250 mL, lavadas em PBS (0.15M phosphate-buffered pH 7.4), centrifugadas e mantidas a 16°C até o processamento de extração de DNA.

As amostras coletadas a partir das lesões de hamster foram obtidas através da biópsia da lesão destes animais. Sendo o fragmento após a coleta mantido em etanol até a extração do DNA. As amostras de flebotomíneos foram coletadas e analisadas preliminarmente por Pinheiro (2005).

Extração de DNA- O DNA das amostras obtidas foi extraído, de acordo com protocolo modificado pelo método de Sambrook *et al.* (1989). O material biológico (quando inseto ou biópsia) foi reidratado em água destilada estéril (MilliQ) por 10 minutos para retirar o excesso de álcool em temperatura ambiente (TA). Para o pellet de cultura foi adicionado direto o tampão de lise. As amostras são maceradas, adicionando-se 2,5 uL de proteinase K (20 mg/mL) e 500 uL de solução de lise (125 mM EDTA, 500 mM Tris pH 8,0 e 2,3 % SDS) e aquecido por uma hora a 37°C. Em seguida é adicionado 1 (um) volume de fenol; homogeneizado por 15 minutos e centrifugado a 12000 g por 5 minutos. A fase aquosa é coletada, acrescentando-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio; homogeneizado por 15 minutos; centrifugado por 5 minutos a 12000 g; coletada a fase aquosa e repetidos novamente os passos a partir do acréscimo de fenol/clorofórmio. O DNA é precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto, sendo incubado a -20°C por 30 minutos. Após a incubação, a amostra é centrifugada por 5 minutos a 12000 g; o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensão em 50 uL de TE pH 8,0. As amostras foram mantidas a temperatura de - 80°C.

Quantificação de DNA- Após extração do DNA foi realizada a quantificação num espectrofotômetro com amplitude variando de 230 a 320nm, sendo admitido o valor viável para amplificação de pares de bases entre 260 e 280nm e verificada sua concentração em ug/uL. As amostras foram aliqüotadas numa diluição de 1:10, utilizando-se 10uL de DNA extraído acrescido de 90 uL de água mili-Q esterilizada. As amostras de DNA obtidas de flebotomíneos já haviam sido quantificadas anteriormente e devido ao pequeno volume foram utilizadas apenas para a amplificação pela PCR.

Reação da Polimerase em cadeia- A reação consiste no uso da amplificação do DNA através da técnica da reação em cadeia polimerase (PCR) para a identificação de uma região do genoma nuclear do protozoário do gênero *Leishmania* responsável pelo espaçamento do gene que codifica para o ribossomo celular. Tal região ITS do rDNA se apresenta capaz de diferenciar algumas espécies de *Leishmania* de importância médica na Região Norte. As técnicas anteriores somente permitiam diferenciar entre subgêneros de *Leishmania* ou não eram capazes de discriminar as duas mais importantes espécies responsáveis pela forma tegumentar da leishmaniose e que ocorrem na Região Norte do País, respectivamente a *L.(V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, sendo utilizada a metodologia e iniciadores patenteados pelo Dr. Alexander Sibajev e Dra. Antonia M R Franco (patente no. PI0505330-7).

Os reagentes são da marca Invitrogen® e foram utilizados conforme as condições padrão. A reação foi feita em 40 ciclos da amplificação com temperatura de anelamento de 52°C (Sibajev, 2005). Os oligonucleotídeos sintetizados pela Invitrogen® foram os iniciadores P2 e REVGUY, seguindo protocolo descrito na patente.

Deteção dos produtos da PCR - Aliqüotas de 15 uL dos produtos amplificados foram adicionadas a 3 uL de tampão (0.25% (v/v) azul de bromofenol, 0.25% (v/v) de xilenocianol 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 pH 8.0) durante 1 hora a 80 Volts. Foi utilizado marcador de peso molecular/100pb ladder (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) para a averiguação do peso molecular dos amplicons. Os géis corados com brometo de etídio (0,75%) foram visualizados através de luz ultravioleta em transiluminador a um comprimento de onda de 312 nm e os géis foram documentados usando o sistema fotográfico "Eagle Eye System" (Stratagene, La Jolla, USA) no Lab. de Biologia Molecular do INPA. Após o registro dos géis estes foram analisados, comparando-se com os controles e o tamanho dos amplicons.

3. Resultados e Discussão

Foram testadas 33 amostras de origens diversas, sendo cinco de lesões de hamster experimentalmente inoculados, quatro com *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/93/IM3919, MHOM/BR/95/IM4147, MHOM/BR/06/IM5344, MHOM/BR/08/IM5554) e um com *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/08/IM5584); 19 amostras de flebotomíneos naturalmente infectados com *Leishmania (V.)* sp. da espécie *Lutzomyia umbratilis* e nove cepas padrões de cultivo de *Leishmania* spp., sendo: *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M41 47), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) colombiensis* (IGOM/PA/85/E582.34, IGAR/CO/85/CL500), *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/93/M3936), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408), *L. (V.) panamensis*

(MHOM/PA/71/LS94), *L. (L.) deanei* (MCOE/BR/00/M5088) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8).

Das amostras estudadas verificou-se após a quantificação, concentrações de 0,1 a 0,4 ng/uL de DNA extraído. Inicialmente foram realizados testes quanto ao uso da enzima Taq polimerase (Invitrogen e Promega) e quanto a concentração dos iniciadores. Verificou-se que a melhor diluição dos iniciadores foi de 1: 100 e que a enzima Taq polimerase da marca Invitrogen mostrou os melhores resultados nestas condições do teste (Figura). Também observou - se neste primeiro ensaio e nas outras amostras testadas que os iniciadores utilizados possibilitaram discriminar as espécies de leishmanias obtendo-se uma banda reativa para *L. (V.) guyanensis* de 229 nt. Na figura abaixo, observa-se a amplificação e diferenciação de *L. (V.) guyanensis* de *L. (V.) panamensis*, obtendo-se produto amplificado fortemente intenso no tamanho de cerca de 229 nt. para a espécie *L. (V.) guyanensis*.

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

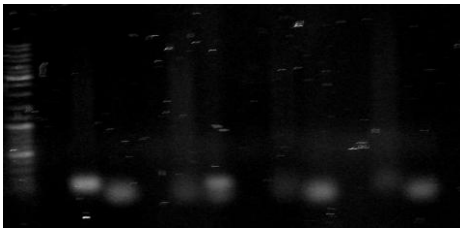


Figura. Amplificação pela PCR em diferentes condições, quanto a marca da Taq polimerase (amostras de no. 1 a 6 - Taq polimerase Invitrogen, amostras de 7 a 12 - marca Promega) e distintas concentrações dos iniciadores [diluições de 1:100 (no. 1-3 e 7-9) e 1:20 (no. 4-6 e 10-12)]. MW: marcador de peso molecular/100pb DNA ladder; amostras no. 1, 4, 7 e 10: controle negativo da reação; amostras no. 2, 5, 8 e 11: DNA de *Leishmania (Viannia) guyanensis*; amostras no. 3, 6, 9 e 12: DNA de *Leishmania (Viannia) panamensis*.

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, sejam elas de cultivo, inseto ou de fragmento de tecido obtido de biópsia de hamster.

5. Referências

Arias, J.R. & Naiff, R. D. 1981. The principal reservoir host of cutaneous Leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, 76 (3): 279-286.

Brasil Ministério da Saúde. www.saude.gov.br (atualizado 2005). Acesso 10.05.2009.

Franco, A.M.R., Momen, H., Naiff, R.D., Moreira, C.F.S., Deane, M. & Grimaldi Jr. G. 1996. Enzyme polymorphism in *Endotrypanum* and numerical analysis of isoenzyme data. *Parasitology*, 113: 39-48.

Franco, A M.R., Guzman, H., Deane, M., Tesh, R.B. & Grimaldi, Jr. G. 1997a. The experimental infections in species of New and Old World phlebotomine sand flies with *Endotrypanum* spp. *J. Med. Entomol.*, 34: 198-192.

Franco, A. M.R., Machado, G.M.C., Naiff, R.D., Moreira, C.F.S., McMahon-Pratt, D. & Grimaldi Jr., G. 1997b. Characterization of *Endotrypanum* parasites using specific monoclonal antibodies. *Mem, Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 63-68.

Franco, A.M.R. & Grimaldi Jr. G. 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 261-268.

Franco, A. M. R., Machado, G. M .C.; Moreira, C.F.S., & Grimaldi Jr., G. 2000. Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* discriminate parasites within this genus. *Mem. Instituto OswaldoCruz*.

- Freitas, R.A., Barrett, T.V. & Naiff, R.D. 1989. *Lutzomyia reducta* Feliciangeli, et al 1988, a host of *Leishmania amazonensis*, sympatric with two other members of the *flaviscutellata* complex in Southern Amazonas Rondônia, Brazil. (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:363-369.
- Grimaldi, Jr, G., Kreutzer, R.D., Hashiguchi, Y., Gomez, E.A., Mimory, T. & Tesh, R.B. 1992. Description of *Leishmania equatorensis* sp.n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87:221-228.
- Grimaldi, Jr. G., Momen, H., Naiff, R.D., McMahon-Pratt, D. & Barrett, T.B. 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region, Brazil. *Am.J. Trop. Med.Hyg.* 44(6).
- Hashiguchi, Y., Gomez, E.A, Coronel, V.V., Mimori, T., Kawabata, M., Furuya, M., Nonaka, S., Takaoba, H., Alexander, J. B., Quizhpe, AM., Grimaldi Jr., G., Kreutzer, R.D. & Tesh, R.B. 1991. Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major* like parasites. *Am. J.Trop.Med. Hyg.* 44: 90-165.
- Kreutzer, R.D., Souraty, N. & Semko, M.E. 1987. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 22-32.
- Kreutzer, R.D., Corredor, A., Grimaldi, Jr. G, Groge, M., Rowton, E.D., Young, D.G., Morales, C., McMahon-Pratt D., Guzman, H. & Tesh, R.B. 1991. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting humans, animais, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 662-675.
- Lainson, R. & Shaw, J.J. 1987. Evolution, Classification and geographical distribution. In: Peters W., Killick-Kendrick R eds .The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology Vol1 London *Acad. Press* 1-120.
- Mayr, E. 1977. Populações, espécies e evolução. São Paulo, S.P., Ed. Companhia Editora Nacional/EDUSP. 485 p.
- Mayrink, A.N. 2000. *Caracterização de antígenos de Endotrypanum e inquérito soropidemiológico da infecção em reservatórios naturais*. Tese de Mestrado, Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTÉ (1990) *Lutte contre les leishmanioses*. Serie de repports techniques. OMS. Geneve, 793, 176p.
- Pinheiro, F. G. *Infecção natural em Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado. INPA/ UFAM, Manaus. 101pp., 2004.
- Rey, L. Parasitologia 2001 Rio de Janeiro, R.J. Ed. Guanabara Koogan, 3ª Ed., 856 p.
- Sambrook, J.; Fritch, 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.