

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): SUZANA DANIELE DE ALMEIDA

Diagnóstico molecular de leishmaniose em cães da cidade de Montes Claros, Minas Gerais

Introdução

As leishmanioses são doenças parasitárias, causadas por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, sendo transmitidas pela picada de um inseto vetor do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (ALEXANDER; MAROLI, 2003). Os parasitas possuem um ciclo heteroxênico, que alternam entre estágios de vida de hospedeiros mamíferos e invertebrados, desta forma, duas formas distintas em seu ciclo biológico: promastigotas e amastigotas. Os flebotomíneos, hospedeiros invertebrados, são infectados por meio de reservatórios contaminados, que são cruciais para a instalação da doença. A *Leishmania* se desenvolve no tubo digestivo do inseto, passando as promastigotas por várias mudanças até se diferenciarem em promastigotas metacíclicas, forma infectante para o hospedeiro vertebrado (BATES, 2007).

A Leishmaniose Visceral (LV) ocorre no Brasil em quase todas as regiões, indo do norte e nordeste até as regiões centro-oeste e sudeste.

Os cães desempenham um papel importante no ciclo de transmissão doméstico de LV, pois compõem o reservatório principal de *L. infantum chagasi*. O avanço da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) devido a infecção por *Leishmania*, possui respostas diferentes entre cães infectados, haja vista que alguns animais são acometidos por sintomas graves que podem levar à morte precoce, enquanto outros podem nunca desenvolver a doença (ALVAR et al., 2004). Logo, precauções epidemiológicas, são necessárias não só para identificação de parasitas, mas também para identificação das espécies. É importante o conhecimento das espécies de *Leishmania*, em se tratando da epidemiologia das leishmanioses, principalmente em regiões endêmicas com ocorrência simultânea de formas visceral e tegumentar da doença (QUARESMA et al., 2009).

Medidas de controle para a Leishmaniose são necessárias. No Brasil, as mais dominantes estão relacionadas na descontinuidade do ciclo de transmissão envolvendo diagnóstico e tratamento nos humanos, uso de inseticidas para controle vetorial e triagem sorológica seguida de eutanásia em cães positivos para a doença (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

A leishmaniose tem sido diagnosticada por vários métodos descritos na literatura. Os diagnósticos sorológicos mais utilizados em levantamentos epidemiológicos, por conseguinte, os mais empregados são o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e teste imunocromatográfico rápido DPP. Estudos tem demonstrado que a PCR é a técnica mais vantajosa de diagnóstico usando amostras como pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos. A sensibilidade e a especificidade da técnica permitem a detecção de parasitas em pacientes que estão clinicamente saudáveis há muitos anos, sendo, portanto, um método diagnóstico confiável e promissor. Com isso, o objetivo do trabalho é estabelecer um protocolo eficiente de diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral por PCR na cidade de Montes Claros.

Material e métodos

A. Coleta das amostras

Foram coletadas 100 amostras da secreção ocular de cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em Montes Claros – Minas Gerais, sendo estas colhidas dos olhos esquerdo e direito de cada animal utilizando swabs estéreis, totalizando 50 cães diferentes. Após cada coleta, os swabs foram então cortados e as regiões com as secreções foram depositadas individualmente em eppendorfs e congeladas à -20°C no Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da UNIMONTES.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio descrito por SAMBROOK E RUSSELL (2001). Para lise celular, no mesmo tubo contendo parte do swab, foi adicionado 1 mL de tampão de lise I (Tris-HCl 2M, MgCl 2M, NaCl 3M), sendo depois homogeneizado por inversão e manter resfriado por 10 min. Foi centrifugado a

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

3.000 rpm por 10 min a 4°C e desprezado o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta com cuidado de não se perder o pellet formado. A fim de romper a membrana nuclear, desproteinar e obter o DNA, foi adicionado 10 µL de proteinase K 10mg/mL e ressuspendido o pellet no fundo do tubo com leves batidas pela adição de 490 µL de tampão de lise II (Tris-HCl 2M, EDTA 0,4M, NaCl 7M, SDS 10%). Posteriormente as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C por 3 h. Para purificação do DNA com Fenol – Clorofórmio, após o período de incubação, o tudo foi retirado do banho- maria e foi pipetado 500 µL de solução de Fenol: Cloroformio: álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi então agitada em vortex até a solução ficar com aparência leitosa. Depois será centrifugada a 8.000 rpm por 5 min a 4°C. Foram observadas três fases no tubo após a etapa anterior. Pipetou-setoda a fase aquosa, que contém o DNA, para outro tubo. Todas as etapas da purificação do DNA foram repetidas. Adicionou-se à fase aquosa 500 µL de Clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1 e agitar em vórtex, até a solução ficar com aparência leitosa. Foi centrifugada a 8.000 rpm por 5 min. Toda a fase aquosa foi pipetada para outro tubo. A fim de precipitar as proteínas, foi adicionada 250 µL de solução de precipitação de proteínas (43,35g de acetato de amônio mais 75mL de água destilada) e posteriormente foi homogeneizada, até formar grumos e incubar em banho-maria a 55°C por 15 min. Centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para a precipitação de DNA, foi acrescentado 750 µL de álcool isopropílico absoluto previamente resfriado no freezer. Homogeneizar por inversão até a formação do novelo de DNA. Foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. O álcool isopropílico foi desprezado. Adicionou-se 750 µL de etanol 70% resfriado. Foi então centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. Todo o álcool foi desprezado por inversão sob o papel absorvente por 5 min. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE. O DNA total foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

B. Reação em Cadeia da Polimerase

Foi realizada a PCR convencional, utilizando os primers D1 (5'-CCAGTTTCCCGCCCCG -3') e D2 (5'-GGGGTTGGTGGTGTAATAAG-3') que amplificam aproximadamente 780- 36 800pb, tendo como alvo o minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) das espécies de *Leishmania* sp. causadoras de LV (SMYTH et al., 1992).

A reação de PCR foi feita para um volume total de 10µl, contendo Tampão de Taq (10 mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,4mM de dNTPs, 0,6mM MgCl₂, 0,9mM de cada iniciador, 1 U Taq DNA polimerase e 2µl de DNA extraído. A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos para desnaturação das fitas duplas de DNA, seguido de 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 50°C por 1 minuto para anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão das novas fitas de DNA.

Posteriormente o produto da PCR foi corrido em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídio, para avaliação do padrão de bandas.

Resultados e discussão

Das amostras coletadas dos 50 cães, apenas 9 (13, 14, 16, 21, 37, 39, 42, 47, 50) obtiveram êxito na extração de DNA. O alto número de insucesso nas extrações de DNA obtidas pode ter relação com a ausência de solução temponada para conservação da amostra, como é utilizada em outros trabalhos (ARAÚJO, 2013), ou por falhas no protocolo.

Das 9 extrações de DNA que obtiveram bom resultado, utilizando o iniciador que tem como alvo kDNA do parasita, apenas 4 amplificaram no padrão de banda desejado, de 780pb (13E, 14D, 16D, 39D).

Diversos outros iniciadores foram desenvolvidos para pesquisa de DNA de *Leishmania* tendo como alvo o kDNA. Bem como o uso de iniciadores com alvos distintos no parasita *Leishmania*: R221 tendo como alvo o gene SSU-rRNA; LITSR tendo como alvo o gene SSU-rRNA; L5.8S com alvo o gene 5.8S-rRNA; primers com alvo nos genes Mini-Exon; dentre outros.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Os resultados obtidos permitem concluir que é possível a realização de um método para diagnosticar Leishmaniose Visceral Canina que não seja tão invasivo para o animal. Porém a técnica utilizada de detecção da doença utilizando swab com secreção ocular ainda necessita de melhoras no protocolo.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Referências bibliográficas

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2003.

ALVAR, J. et al. **Advances in Parasitology Volume 57**. [s.l.] Elsevier, 2004. v. 57

ARAÚJO, Ana Isabele. **Avaliação do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de pernambuco, brasil**. 2013. 92 f. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2013.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510–7, 2001.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3 ed ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SMYTH AJ et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 183-192, 1992.