

AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE KINETOPLASTO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA POR PCR EM TEMPO REAL

Título da Sessão Temática: Clínica e Biotecnologias aplicadas em Medicina Veterinária

Evento: VII Encontro de Monitoria e Iniciação Científica

RESUMO

A Leishmaniose visceral (LV), é uma doença infecciosa sistêmica que pode ser causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*. É uma antroponose que atinge o homem e o cão, sendo transmitida por um inseto vetor flebotomíneo denominado *Lutzomyia longipalpis*. O presente trabalho teve como objetivo específico o desenvolvimento de estratégia de amplificação de DNA de kinetoplasto (kDNA) de *L. infantum*, para diagnóstico molecular da LV em humanos e cães. Para tanto, primers específicos para qPCR foram triados (experimento 1) e a concentração foi otimizada (experimento 2) para construção de uma curva padrão de amplificação (experimento 3). O par de primers upKDNA-SE/upKDNA-AS produziu os melhores resultados de qPCR, com eficiência de amplificação de 95% e sensibilidade para detecção de parasitemia inferior a 10 leishmanias/mL de sangue. Adicionalmente, o par de primers também pode ser usado para quantificação da carga parasitária, uma vez que os parâmetros quantitativos de amplificação foram apropriados. Essa condição é especialmente relevante pois, muitas vezes, o acesso à carga parasitária por qPCR, para acompanhamento de progressão da patologia, se faz necessária ou desejável.

Palavras-chave: Leishmania. Calazar. Homem. Cão. KDNA.

INTRODUÇÃO

As Leishmaníases têm como agentes causadores, protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania*. A classificação taxonômica mais atual divide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Estes diferentes complexos albergam as espécies de agentes etiológicos envolvidos no acometimento das leishmaníases tegumentar (LT) e visceral (LV) (OMS, 2016).

Na LV, a principal espécie envolvida na América do Sul é *Leishmania infantum* (DANTAS-TORRES, 2006), sendo caracterizada por lesões que afetam os órgãos internos, levando frequentemente a óbito na ausência de tratamento. Acomete principalmente pacientes imunodeprimidos, crianças e idosos. A forma visceral é demonstrada pelo intenso dano em órgãos vitais e anemia grave, sendo uma síndrome clínica, caracterizada por febre irregular de longa duração, desnutrição, hepatoesplenomegalia, leucopenia e trombocitopenia (BRASIL,

2006).

O diagnóstico das leishmaníases é realizado a partir do exame clínico, dados epidemiológicos e técnicas laboratoriais, que se constitui por métodos: parasitológico, imunológico e molecular (ALVES E BEVILACQUA, 2004). Atualmente, as técnicas diagnósticas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramenta para detecção de *Leishmania* em amostras clínicas de humanos e animais. Dentre as técnicas mais modernas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses, destacam-se as técnicas, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos e apresenta-se como método bastante sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania spp.* em ampla variedade de amostras biológicas (ALVAR et al., 2004). Como também a PCR em tempo real (qPCR), método quantitativo baseado no monitoramento dos ciclos de amplificação do DNA-alvo. Assim, pode ser utilizada para determinação da carga parasitária de forma acurada e sensível, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito (GALLETTI et al., 2011). A qPCR permite detecção dos produtos amplificados através de corantes fluorescentes que intercalam DNA fita-dupla ou de sondas de DNA marcadas com fluoróforos.

A escolha dos primers utilizados nas reações de PCR e qPCR é de fundamental importância para a técnica e permite diferenciar espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (NEITZKE-ABREU et al., 2013). Nesse sentido, vários genes-alvos têm sido estudados, tais como aqueles que codificam a enzima glicose-6-fosatodesidrogenase, as proteínas do choque térmico, a polimerase-alfa, a subunidade ribossomal 18S (BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011), a MTHD (proteína similar à metilenotetrahidrofolato desidrogenase), a RNase III, além do próprio DNA não-cromossomal de cinetoplasto, kDNA (RODRIGUES et al., 2014).

Assim, tanto a PCR convencional, quanto a qPCR, têm permitido a identificação da espécie de *Leishmania* em questão, e, conseqüentemente, o direcionamento das devidas ações epidemiológicas de controle e adequação ao tratamento utilizado. Nesse contexto, uma estratégia metodológica ideal para diagnóstico da LV deve ser capaz de aliar alta sensibilidade, especificidade de detecção e baixo custo de aplicação. Assim, a presente pesquisa tem por objetivo geral o desenvolvimento e validação de uma metodologia de PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico molecular da LV em cães (*Canis lupus familiaris*) e humanos (*Homo sapiens*). Adicionalmente, o objetivo específico é o desenvolvimento de estratégia para amplificação por qPCR de DNA de cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum*, visando diagnóstico molecular da LV. Para tanto, a detecção do DNA do parasito é condição

especialmente importante para adequada sensibilidade diagnóstica e a possibilidade de quantificação para determinação da parasitemia no paciente é desejável e útil em diversas circunstâncias clínicas.

METODOLOGIA

1. Amostras biológicas e ética animal

As amostras biológicas humanas (*Homo sapiens*) foram cedidas pelo Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará e fazem parte de projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará em 04 de fevereiro de 2016 (CAAE n.52626116.8.0000.5054) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CAAE n.52626116.8.3001.5044).

As amostras biológicas caninas (*Canis lupus familiares*) foram oriundas do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Um volume de 3mL de sangue periférico foi coletado de cada espécime, através de punção venosa jugular, em tubo contendo heparina. As amostras foram armazenadas a -80°C até a extração do DNA. O presente projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética para uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (n. 0753797/2018).

2. Extração de DNA

As amostras de DNA humano e canino foram obtidas através de protocolo (P-SV), baseado em ligação do DNA total em resina de sílica, utilizando o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carisbad, USA). Assim, o sangue periférico humano ou canino (200 μL) foi acrescido de 20 μL de Proteinase K e 20 μL de RNase A (ambos a 20 mg/mL) e incubado por 2min em temperatura ambiente. Após adição de 200 μL de Purelink Genomic Lysis Buffer, incubação por 10 min a 55°C e adição de 200 μL de etanol a 100%, o volume total foi transferido para a resina e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada com 500 μL de solução tampão de lavagem-1 e com 500 μL de solução tampão de lavagem-2. Cada amostra de DNA foi eluída com 50 μL de água livre de nucleases.

3. Desenho dos primers

Oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para amplificação do genoma de kinetoplasto de *Leishmania infantum* foram desenhados para serem usados no diagnóstico molecular da LV em cães e humanos. Três pares de primers (kDNA2-SE/kDNA2-AS, kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS e upkDNA-SE/upkDNA-AS) foram inicialmente projetados utilizando o software Primer-BLAST (YE et al. 2012), gerando *amplicons* de 50 a 250 pb de comprimento e usando a sequência do genoma de kinetoplasto de *Leishmania*

infantum (AF169138.1) como referência. Adicionalmente, os parâmetros do software foram ajustados para excluir ampliações em *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania braziliensis species complex*, HIV, *Hepatitis C vírus group*, *Human hepatitis B vírus*, *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium leprae*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Babesia canis*, *Trypanosomatidae*, *Anaplasma*, *Mycoplasmas*, *Hepatozoon*, *Hepatozoon canis* e *Leptospira* (GenBank taxids: 5660, 37617, 11676, 11102, 10407, 77643, 1769, 943, 5864, 5867, 5654, 768, 31969, 75741, 110120 e 171 respectivamente).

4. PCR em tempo real

Cada reação de PCR em tempo real (qPCR) consistiu de um volume total de 20µL, contendo 10µL de 2× Fast SYBR Green Master Mix (7,5µL; Applied Biosystems, Foster City, USA), 0,3µM de oligonucleotídeos iniciadores, 1µL da amostra e 7µL de água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e a ciclagem térmica consistiu em incubação inicial a 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95° C por 15 segundos e 60° C por 30 segundos.

5. Experimento 1: Triagem de primers

As amostras usadas nessa etapa foram preparadas para simular amostras de pacientes: caninos (CC+) ou humanos (CH+) com LV e caninos (CC-) ou humanos (CH-) saudáveis, sem o parasito que causa a doença. Para tanto, o método P-SV foi utilizado para obtenção de amostra de DNA canino, humano e de *Leishmania infantum* (foram promastigotas cultivadas, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Estadual do Ceará). As amostras CC+ (ou CH+) foram consistiram de 9,0 µL DNA extraído de sangue de cão (ou homem) saudável, adicionado de 1,0 µL de DNA de *L. infantum*. Adicionalmente, o DNA de *L. infantum* foi também utilizado sozinho como controle positivo das reações (L+). As amostras CC+, CC- e L+ foram submetidas a qPCR com os pares de primers kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS e upKDNA-SE/upKDNA-AS. Enquanto as amostras CH+, CH- e L+ foram submetidas a qPCR com kDNA2-SE/kDNA2-AS, kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS e upKDNA-SE/upKDNA-AS. O desempenho dos primers nas reações foi comparado conforme descrito a seguir.

6. Experimento 2: Ajuste de concentração dos primers

O par de primers com melhor desempenho no experimento 1 foi utilizado para ajuste de concentração na detecção de kDNA para diagnóstico da LV humana. Assim, reações de qPCR foram realizadas com a amostra de DNA canino obtida pelo método selecionado no experimento 1 e os referidos primers, nas seguintes concentrações finais: 0,3µM vs 0,6µM vs

1,0 μ M. Os desempenhos do primer nas diferentes concentrações foram comparados conforme descrito a seguir.

7. Experimento 3: Construção de curva padrão

O par de primers com melhor desempenho no experimento 1 foi testado quanto ao seu limite de detecção de DNA para diagnóstico da LV humana, na concentração selecionada no experimento 2. Assim, a sensibilidade das amplificações foi analisada através de curva padrão construída por diluição em série de DNA obtido de *L. infantum*, misturado a DNA humano. Adicionalmente, os parâmetros das curvas como Eficiência e Linearidade (R^2) foram avaliados qualitativamente.

8. Análise dos dados

As especificidades das reações de qPCR foram determinadas através de análise da curva de *melting* dos *amplicons* obtidos. Valores de *threshold cycle* (Ct) foram automaticamente determinados através de análise no QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). As comparações de desempenho dos primers no experimento 1 (kDNA2-SE/kDNA2-AS vs kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS vs upKDNA-SE/upKDNA-AS) ou das concentrações do iniciador (0,30 μ M vs 0,60 μ M vs 1,00 μ M) foram feitas por análise qualitativa da curva de *melting* e dos valores de Ct obtidos nas amplificações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três pares de primers desenhados para amplificação de kDNA de *L. infantum* estão apresentados na **Tabela 1**.

1. Experimento 1: Triagem de primers

Os pares primers kDNA2-SE/kDNA2-AS, kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS e upKDNA-SE/upKDNA-AS foram comparados através das reações de qPCR com as amostras de DNA que simulavam pacientes caninos (**Figura 1**) ou humanos (**Figura 2**).

Todos os pares de primers amplificaram as amostras de cães (CC+) ou humanos (CH+) com LV, bem como o DNA controle de leishmania (L+). As reações na presença de amostras de cães (CC-) ou de humanos (CH-) saudáveis (sem o parasito que causa a doença) apresentaram sinais de fluorescência variáveis. O kDNA2-SE/kDNA2-AS apresentou sinal inespecífico nítido. O kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS apresentou um ruído inespecífico. Enquanto o upKDNA-SE/upKDNA-AS apresentou o melhor desempenho, uma vez que não produziu nenhum tipo de amplicons nessas amostras.

2. Experimento 2: Ajuste de concentração dos primers

Os primers upKDNA-SE/upKDNA-AS foram submetidos à triagem de concentração. Os resultados obtidos podem ser observados na **Tabela 2**. O par de primers produziu amplicons em todas as reações, gerando valores de Ct decrescentes com o aumento da concentração. Assim, a concentração de 1,0µM foi selecionada como sendo a melhor.

3. Experimento 3: Curva padrão

Curva padrão de amplificação de kDNA de *L. infantum* por qPCR usando upKDNA-SE/upKDNA-AS no diagnóstico da LV humana está apresentada na **Figura 3**. A sensibilidade de amplificação foi equivalente à detecção de parasitemia inferior a 10 parasitos por mililitro de sangue (seta pontilhada). Os parâmetros mais relevantes dessa curva foram: Y-Intercept=40,863, $R^2=0,937$, Slope =-3,435 e Eficiência= 95,477. Assim, eficiência de amplificação dessas reações está dentro dos parâmetros indicados para qPCR (RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003), uma vez que o valor de eficiência está acima de 95%. O par de primers também apresentou adequada linearidade de amplificação.

Todas as plataformas comerciais de qPCR atualmente dependem da definição da posição relativa dos perfis de amplificação. Como tal, eles dependem da amplificação de um alvo diluído em série para fornecer uma estimativa da eficiência da amplificação, essencial para quantificações precisas e confiáveis (PFAFL, 2004).

Nossos dados em conjunto sugerem que upKDNA-SE/upKDNA-AS seja apropriado a ser usado no contexto do diagnóstico da LV humana, tanto para detecção quanto para quantificação de parasitemia. Essa condição é especialmente relevante pois, muitas vezes, o acesso à carga parasitária por qPCR, para acompanhamento de progressão da patologia, se faz necessária ou desejável. Nesse contexto, o par de primers pode ser usado para Quantificação Absoluta simples ou Normalizada (BATISTA et al, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa culminou com o desenvolvimento de uma estratégia apropriada para o diagnóstico molecular da LV, tanto no homem (*Homo sapiens*), quanto no cão (*Canis lupus familiaris*). O par de primers upKDNA-SE/upKDNA-AS produziu os melhores resultados de qPCR, com eficiência de amplificação de 95% e sensibilidade para detecção de parasitemia inferior a 10 leishmanias/mL de sangue. Adicionalmente, o par de primers também pode ser usado para quantificação da carga parasitária, uma vez que os parâmetros quantitativos de amplificação foram apropriados. Essa condição é especialmente relevante pois, muitas vezes, o acesso à carga parasitária por qPCR, para acompanhamento de progressão da patologia, se faz necessária ou desejável.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.P.E. Las Leishmaniasis. De la biología al control. **Junta de Castilla**, p. 20, 51, 59, 103, 104, León, 1997.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemiologia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n.1, p.259-265, 2004.
- BATISTA, R.I., et al. Methodological strategies for transgene copy number quantification in goats (*Capra hircus*) using real-time PCR. **Biotechnology Progress**, v.30, n.6, p.1390-400, 2014.
- BEZERRA-VASCONCELOS, D. R., et al. Real-time PCR to assess the Leishmania load in Lutzomyia longipalpis sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 234–239, 2011.
- BRASIL, Ministerio da Saude 2006 – Manual de vigilancia e Controle da Leishmaniose Visceral – Secretaria de Vigilancia em Saude – **Departamento de vigilância e epidemiologia- 3a imp.** Brasilia – DF.
- DANTAS-TORRES F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 117–118, 2006.
- GALLETTI, E., et al. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of Leishmania infantum in dog specimens. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 2, p. 243-245, 2011.
- NEITZKE-ABREU, Herintha Coeto et al. Detection of DNA from Leishmania (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.
- OMS (Organização Mundial de Saúde). Health topics: **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 02 de maio de 2016.
- PFAFFL, M. W. **Quantification strategies in real-time PCR**. Chapter3. Quantification strategies in real-time PCR. 87-112p., 2004.
- RODRIGUES, A. C. M. et al. Epidemiological survey of Lutzomyia longipalpis infected by Leishmania infantum in an endemic area of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 55-62, 2014.
- RUTLEDGE, R.G., CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.e93, 2003.

TABELAS

Tabela 1: Primers para amplificação de DNA mitocondrial humano por qPCR em tempo real.

Nome do primer	Sequência 3'-5'	Produto (pb)
kDNA2-SE	CTCCGGGTAGGGGCGTTC	122
kDNA2-AS	GCCCTATTTTACACCAACCCC	
kDNALinfH-SE	TTGTGTGCTGTGTGTAGTAGT	118
kDNALinfH-AS	CCAGAATTTACGACACCCCC	
upkDNA-SE	GGGGGTGTCGTAAATTCTGGA	79
upkDNA-AS	CCCGGAGGACCAGAAAAGTT	

Tabela 2: Ajuste de concentração dos pares de primers upKDNA-SE/upkDNA-AS para amplificação de kDNA de *L. infantum* em amostras humanas.

Concentração (μM)	Ct (média \pm DP)
0,3	19,33 \pm 0,07
0,6	17,96 \pm 0,08
1,0	17,57 \pm 0,19

FIGURAS

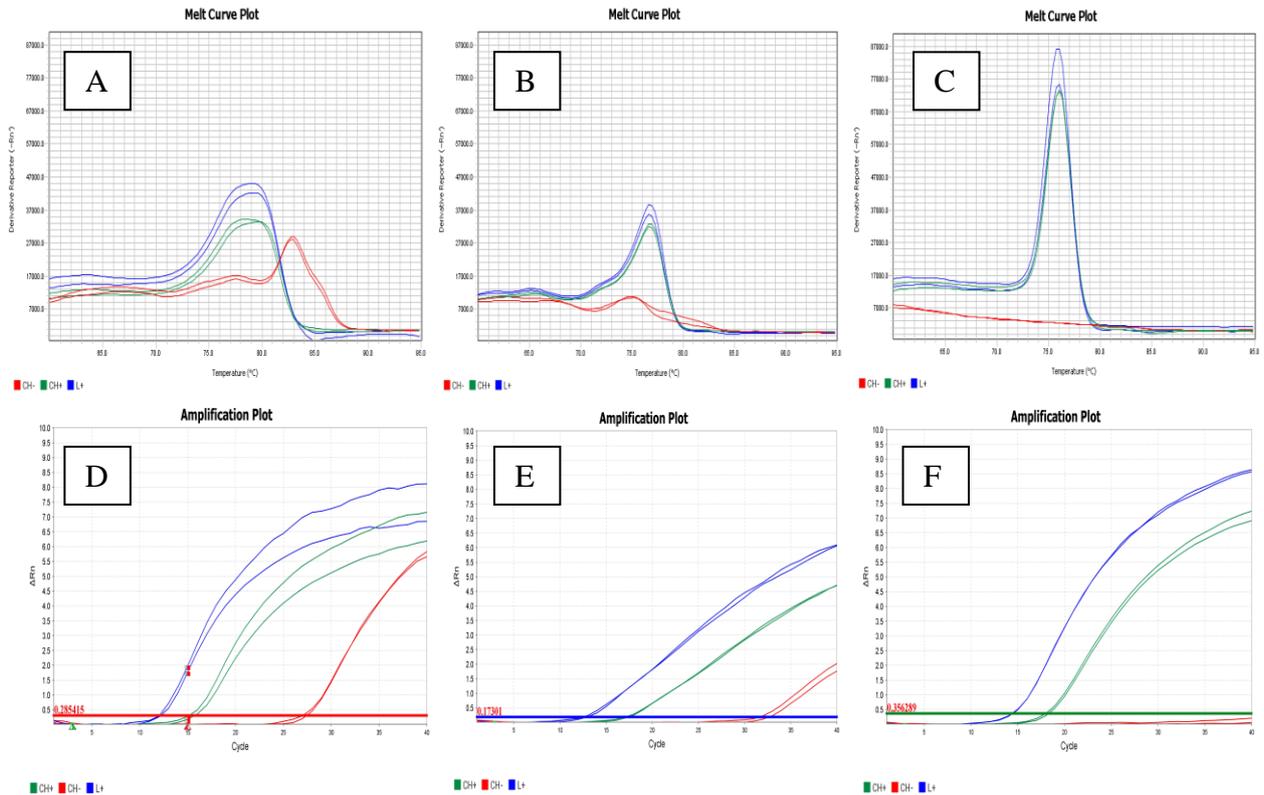


Figura 1: Triagem de primers para amplificação de kDNA de *L. infantum* em amostras humanas por qPCR. As curvas de *melting* dos produtos de qPCR para kDNA2-SE/kDNA2-AS (A) kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS (B) e upKDNA-SE/upKDNA-AS (C) estão apresentadas no topo da imagem. As plotagens das amplificações em escala linear kDNA2-SE/kDNA2-AS (D), kDNALinfH-SE/kDNALinfH-AS (E) e upKDNA-SE/upKDNA-AS (F) estão apresentadas na parte inferior da imagem.

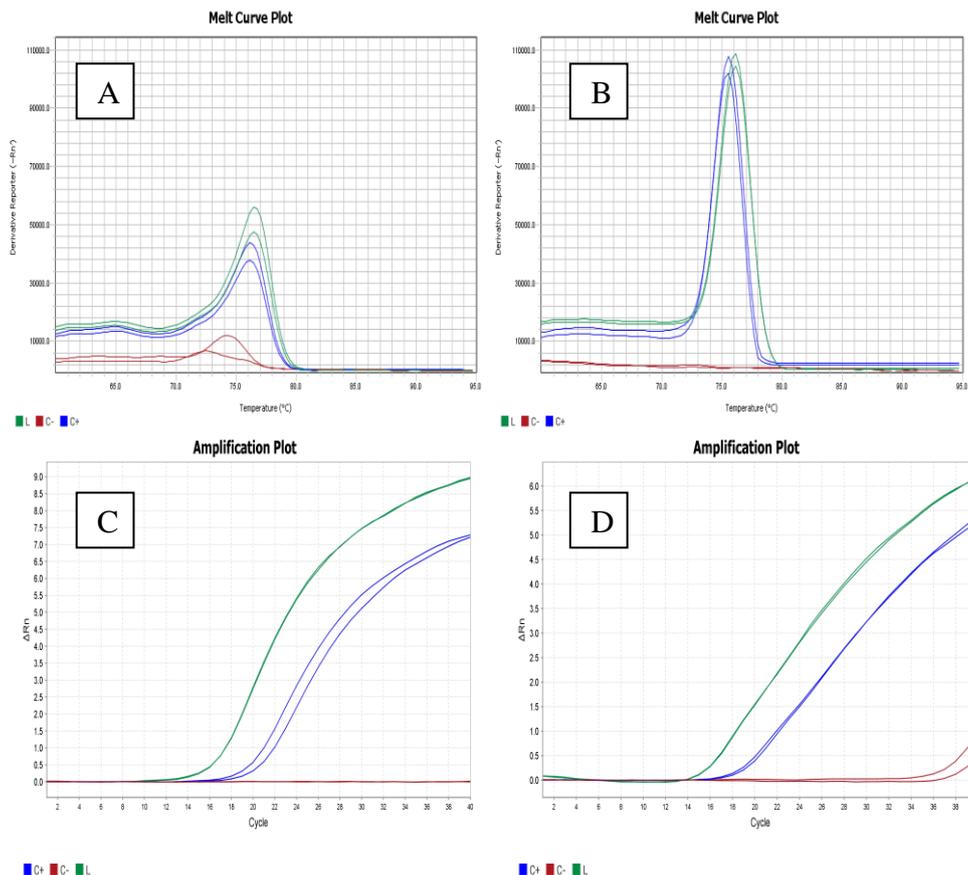


Figura 2: Triagem de primers para amplificação de kDNA de *L. infantum* em amostras caninas por qPCR. As curvas de *melting* dos produtos de qPCR para kDNA LinfH-SE/kDNA LinfH-AS (A) e upKDNA-SE/upKDNA-AS (B) estão apresentadas no topo da imagem. As plotagens das amplificações em escala linear kDNA LinfH-SE/kDNA LinfH-AS (C) e upKDNA-SE/upKDNA-AS (D) estão apresentadas na parte inferior da imagem.

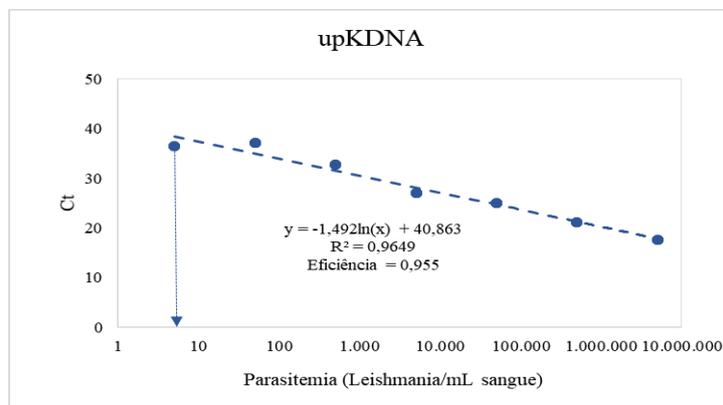


Figura 3: Curva padrão de amplificação de kDNA de *L. infantum* por qPCR usando upKDNA-SE/upKDNA-AS no diagnóstico da LV humana. A sensibilidade de amplificação foi equivalente à detecção de parasitemia inferior a 10 parasitos por mililitro de sangue (seta pontilhada).