

## AMPLIFICAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL HUMANO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL 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

Devido ao crescente número de casos humanos para Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil, as pesquisas relacionadas a essa doença, realizando modernas estratégias de diagnóstico, como PCR em tempo real (qPCR), são de extrema importância. O presente trabalho tem como objetivo específico o desenvolvimento de estratégia de amplificação de DNA mitocondrial (mtDNA) humano por qPCR, visando diagnóstico da LV. Para tanto, o melhor método de extração de mtDNA (experimento 1) foi investigado, bem como os primers específicos para qPCR foram triados através da construção de suas curvas padrão (experimento 2). O método de extração de DNA baseado em resina de sílica foi o mais apropriado para diagnóstico molecular da LV em humanos, com mtDNA como controle endógeno. Um par de primers, Hmt3-SE/Hmt3-AS, foi desenhado e produziu os melhores resultados, com eficiência de amplificação de 98%. Esses resultados são muito relevantes, uma vez que a amplificação do DNA do hospedeiro é condição imprescindível para o correto diagnóstico de pacientes não-parasitados por *L. infantum*. Adicionalmente, esse par de primers pode ainda ser aplicado para acesso à parasitemia, com monitoramento de resolução ou progressão da patologia.

**Palavras-chave:** Leishmania. Calazar. Homem. Genoma mitocondrial.

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, porém não contagiosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Os parasitas vivem e se multiplicam no interior das células que fazem parte do sistema de defesa do indivíduo, chamadas macrófagos. É uma antropozoonose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, dos quais 22 espécies são patogênicas para o homem. Apresenta diferentes formas clínicas sendo a forma visceral mais grave, com evolução para óbito em 90% dos casos não tratados adequadamente. (OPAS, 2017).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente fatal com distribuição mundial em 76 países, sendo endêmica em 12 países das Américas. Cerca de 96% dos casos nesta região, destes 95,41% dos casos estão concentrados no Brasil. A LV segue apresentando uma ampla distribuição geográfica de casos humanos no Brasil, onde se destacam a região Nordeste. No Ceará em 2017 foram confirmados 439 casos, com incidência de 4,9 e letalidade 8,2 com 36 óbitos (OPAS, 2017; BRASIL, 2019; CEARÁ, 2018).

A leishmaniose pode ser confirmada por vários métodos diagnósticos como, incluindo laboratorial ou clínico-epidemiológico (CEARÁ, 2018). No Critério laboratorial, os casos clinicamente suspeitos devem ser confirmados por, no mínimo, um método laboratorial: Teste rápido imunocromatográfico, pesquisa do agente no exame parasitológico direto ou cultura, imunofluorescência reativa com título de  $\geq 1:80$ . No Critério clínico-epidemiológico, o paciente com suspeita clínica é considerado positivo quando encontra-se em área com transmissão de LV e apresenta resposta favorável ao tratamento terapêutico.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, aspirados de linfonodos, baço e fígado, biópsias cutâneas, conjuntiva, sangue, liquor, cortes histológicos de tecidos parafinados e congelados.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) é promissora no diagnóstico de LV em humanos uma vez que requer concentrações muito menores de material genético; possibilita a quantificação; o risco de contaminação é menor, o que eleva a especificidade do teste; o tempo de reação é reduzido; há maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão e há a possibilidade de detecção de mais de um patógeno por vez. E possibilita a identificação de quantidades mínimas de DNA (como  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  DNA do parasita por mL), o que corresponde a menos de um parasita por mL de amostra.

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 humanos (*Homo sapiens*). Para tanto, além da detecção do DNA do parasito *L. infantum*, a amplificação do DNA do hospedeiro é condição especialmente importante nos casos de pacientes negativos (não-parasitados por *L. infantum*). Assim, o objetivo específico da pesquisa é o desenvolvimento de estratégia de amplificação por qPCR de DNA mitocondrial (mtDNA) humano, visando diagnóstico molecular da LV nessa espécie.

## **METODOLOGIA**

### **1. Amostras biológicas e ética animal**

As amostras biológicas humanas 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

Infeciosas (CAAE n.52626116.8.3001.5044).

## **2. Extração de DNA**

Dois protocolos de extração de DNA foram utilizados. No primeiro (P-PT), baseado em precipitação seletiva de proteínas e do DNA, foi utilizado o Wizard Genomic DNA Purification System Kit (Promega, Madison, USA). O sangue humano (300µL), acrescido de solução de lise celular (900µL), foi incubado por 10min, a temperatura ambiente, centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O procedimento de lise celular foi repetido com o pellet por quatro vezes. Após homogeneização, foram acrescidos 300µL de solução de lise nuclear e 1,5µL de RNase A a 20 mg/mL. Após incubação por 15 minutos a 37°C, 100µL de solução de precipitação protéica foram acrescidos e o material foi novamente centrifugado. O sobrenadante foi acrescido de 300µL de isopropanol, centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi lavado com 300µL de solução de etanol a 70%. O DNA foi seco ao ar e, em seguida, ressuspensão em 50µL de solução de água livre de nucleases.

No segundo protocolo (P-SV), baseado em ligação do DNA total em resina de sílica, foi utilizado o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carisbad, USA). O sangue periférico humano (200µL) foi acrescido de 20µL de Proteinase K e 20µL de RNase A (ambos a 20 mg/mL) e incubado por 2min em temperatura ambiente. Após adição de 200µL de Purelink Genomic Lysis Buffer, incubação por 10 min a 55°C e adição de 200µL de etanol a 100%, o volume total foi transferido para a resina e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada com 500µL de solução tampão de lavagem-1 e com 500µL de solução tampão de lavagem-2. O DNA foi eluído com 500µL de água livre de nucleases.

## **3. Desenho dos primers**

Oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para amplificação do genoma mitocondrial humano foram desenhados para serem usados no diagnóstico molecular da LV. Dois pares de primers mitocondriais (Hmt2-SE/Hmt2-AS e Hmt3-SE/Hmt3-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 mitocondrial humano (NC\_012920.1) como referência. Adicionalmente, os parâmetros do software foram ajustados para excluir amplificações em *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania braziliensis species complex*, *HIV*, *Hepatitis C vírus group*, *Human hepatites B vírus*, *Mycobacterium tuberculosis complex* e *Mycobacterium leprae* (GenBank taxids 5660, 37617, 11676, 11102, 10407, 77643 e 1769, respectivamente).

## **4. PCR em tempo real**

Cada reação de PCR em tempo real (qPCR) consistiu de um volume total de

20 $\mu$ L, contendo 10 $\mu$ L de 2 $\times$  Fast SYBR Green Master Mix (7,5 $\mu$ L; Applied Biosystems, Foster City, USA), 0,3 $\mu$ M de oligonucleotídeos iniciadores, 1 $\mu$ L da amostra e 7 $\mu$ L 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: Escolha do método de extração de DNA**

As amostras de DNA obtidas pelos protocolos P-PPT e P-SV foram comparadas através de quantificação fluorimétrica e por qPCR. Para tanto, as amostras de DNA foram quantificadas usando o reagente Quant-iT dsDNA de alta sensibilidade ou Quant-iT dsDNA de amplo espectro e o equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carisbad, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Adicionalmente, métodos de extração de DNA (P-PT e P-SV) foram comparados por quantificação relativa do mtDNA usando o método DDCt (LIVAK E SCHIMITTGEN, 2001). Assim, as amostras foram submetidas a qPCR com Hmt3-SE/Hmt3-AS e a normalização dos dados foi realizada através da amplificação de uma sequência Long Interspersed Nuclear Element, (LINE), utilizando os iniciadores L1-F: GCTGGATATGAAATTCTGGGTTGA e L1R: AGGAAATACAGAGAACGCCACAA, relatados anteriormente por PAL et al. (2010). Todas as reações foram definidas com iniciadores 0,6 $\mu$ M e 0,5ng de DNA total. Os controles negativos consistiram em reações sem DNA molde. O desempenho das amostras nas reações foi comparado conforme descrito anteriormente.

### **6. Experimento 2: Construção de curvas padrão**

Os pares de primers Hmt2-SE/Hmt2-AS e Hmt3-SE/Hmt3-AS foram testados quanto ao seu limite de detecção de DNA. Assim, as sensibilidades das amplificações foram analisadas através de curvas padrão construídas por diluição em série de DNA obtido de sangue humano, sendo as mesmas plotadas de 0,01pL a 1 $\mu$ L de sangue. A sensibilidade foi estabelecida pelo menor volume sanguíneo que poderia ser amplificado com sucesso nas reações em triplicado. Adicionalmente, os parâmetros das curvas como Eficiência e Linearidade ( $R^2$ ) foram comparados qualitativamente.

### **7. 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 determinados automaticamente no QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, USA). As concentrações totais de DNA e os níveis de amplificação do mtDNA foram expressos como média ( $\pm$  DP) de três ou quatro repetições. Os grupos (P-PT e P-SV) foram comparados usando a ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. O software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, EUA) foi utilizado, com valor de  $P < 0,05$  para significância estatística.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois pares de primers desenhados para amplificação de mtDNA humano estão apresentados na **Tabela 1**.

### 1. Experimento 1: Escolha do método de extração de DNA

O objetivo preliminar da presente investigação foi escolher o melhor método de extração de DNA humano a ser aplicado em diagnóstico molecular da LV por qPCR. Assim, inicialmente, a quantidade total de DNA produzida pelos métodos foi comparada (**Figura 1**). O protocolo P-SV produziu  $274,0 \pm 6,2$ ng de DNA total que foi maior que ( $P < 0,0001$ ) P-PT ( $203,0 \pm 17,0$  ng). Em seguida, as quantificações do mtDNA foram alcançadas por amplificação de amostras de DNA com os iniciadores Hmt3-SE/Hmt3-AS e L1-F/L1-R. Apesar de todos os métodos de extração de DNA serem capazes de produzir amplicons por meio de qPCR, o kit comercial à base de resina (P-SV) foi adequado para maior amplificação do mtDNA humano quando comparado ao P-PT ( $P < 0,0001$ ).

A maioria dos métodos de extração baseada em coluna de sílica disponíveis comercialmente dependem de altas concentrações de sais caotrópicos e baixo pH para promover a ligação de esqueletos de fosfato de DNA, com carga negativa, à sílica, com carga positiva. A quantidade total de DNA que adsorve à sílica depende do pH da solução, força iônica, tipo de eletrólito, valência e conformação do DNA (ou seja, forma linear ou circular e nível da bobina) (SVOZIL et al., 2008).

No presente trabalho, foi possível indicar o método P-SV para extração de DNA, quando o objetivo for diagnóstico molecular usando como controle endógeno o mtDNA humano. Esse método forneceu melhor nível de amplificação de mtDNA, quando comparado ao P-PT. Apesar desse último método ter produzido quantidades apropriadas de DNA total (mensurado por fluorimetria), ele produziu o menor sinal de amplificação de mtDNA. Como esse método se baseia em uma série de etapas de precipitação para purificar o DNA de alto peso molecular, o mtDNA parece não ser efetivamente recuperado por essa abordagem, pois o genoma mitocondrial tem um baixo peso molecular, ou seja,  $\pm 16$  Kbp (JESSIE et al., 2001).

## 2. Experimento 2: Curvas padrão

As curvas padrão para os pares de primers Hmt2-SE/Hmt2-AS e Hmt3-SE/Hmt3-AS estão apresentadas na **Figura 2**. Adicionalmente, os parâmetros quantitativos das amplificações, como Inclinação (S), Eficiência e Linearidade ( $R^2$ ) estão apresentados na **Tabela 2**. As amplificações com Hmt2-SE/Hmt2-AS foram cerca de 1.000 vezes mais sensíveis do que com Hmt3-SE/Hmt3-AS. Assim, enquanto Hmt2-SE/Hmt2-AS foi capaz de detectar até 10pL de sangue, Hmt3-SE/Hmt3-AS detectou 10nL. Contudo, os parâmetros de amplificação de Hmt3-SE/Hmt3-AS demonstram que esse par de primers é o mais apropriado para fins quantitativos. Assim, a eficiência de amplificação com Hmt3-SE/Hmt3-AS ( $E = 0,98$ ) está dentro dos parâmetros indicados para qPCR (RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003). Esse mesmo critério exclui Hmt2-SE/Hmt2-AS para fins quantitativos ( $E = 0,87$ ), uma vez que o valor de eficiência está abaixo de 95%. Ambos os pares de primers apresentaram adequada linearidade de amplificação ( $R^2=0,999$ , Hmt2-SE/Hmt2-AS e  $R^2=0,994$ , Hmt3-SE/Hmt3-AS).

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, 2007).

Nossos dados em conjunto sugerem que Hmt3-SE/Hmt3-AS seja o par de primers mais apropriado a ser usado no contexto do diagnóstico da LV humana, onde a quantidade de DNA mitocondrial não é limítrofe. Nessa condição, o acesso à carga parasitária por qPCR, para acompanhamento de progressão da patologia, pode ser necessária. Nesse contexto, o par de primers pode ser usado para Quantificação Absoluta Normalizada, que é uma estratégia mais acurada e precisa do que a Quantificação Absoluta simples (BATISTA et al, 2014).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa indica que o método de extração de DNA baseado em resina de sílica é o mais apropriado para diagnóstico molecular da LV em homem (*Homo sapiens*), quando a amplificação do mtDNA da espécie for usada como referência (controle endógeno). O par de primers Hmt3-SE/Hmt3-AS produziu os melhores resultados de qPCR, com eficiência de amplificação de 98%. Esses resultados são especialmente relevantes, uma vez que a amplificação do DNA do hospedeiro é condição imprescindível para o correto diagnóstico de amostras negativas, oriundas de pacientes não-parasitados por *L. infantum*. Adicionalmente, esse par de primers pode ainda ter aplicação em acompanhamento de parasitemia, para monitoramento de resolução ou progressão da patologia.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral**. Disponível: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>> Acesso em: 20 jun. 2019.
- CEARÁ. Secretária de Saúde do Estado do Ceará. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Visceral** (24 de outubro de 2018). Disponível: <<https://www.saude.ce.gov.br/download/boletins/>> Acesso em: 20 jun. 2019.
- JESSIE, B.C., et al. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of diferente ages. **Expimental Gerontology**, v.37, p.169-174, 2001.
- MA H., et al. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**, v.2, n.3, p.1-15, 2006.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the DDcT method. **Methods**, v.25, p402–408, 2001.
- MACHADO, C.B.; FONSÊCA-NETO, M. D. **Situação da saúde no Ceará**. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, 80p., 2011.
- OPAS, Organização Mundial da Saúde - Américas. **Neglected infectious diseases in the Americas: success stories and innovation to reach the neediest**. Organização Pan-Americana da Saúde. Washington, DC, 2016. <<http://www.paho.org/neglectedinfectious-diseases-stories/>> Acesso em: 25 maio. 2017
- PAL, A., et al. Aberrant methylation and associated transcriptional mobilization of Alu elements contributes to genomic instability in hypoxia. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.26, p.46-54, 2010.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.2002-2007, 2001.
- PFAFFL, M. W. **Quantification strategies in real-time PCR**. Chapter3. Quantification strategies in real-time PCR. 87-112p., 2004.
- RUTLEDGE, R.G., CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.e93, 2003.
- SVOZIL, D., et al. DNA conformations and their sequence preferences. **Nucleic Acids Reserarch**, v.36, p.3690–3706, 2008.

## TABELAS

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

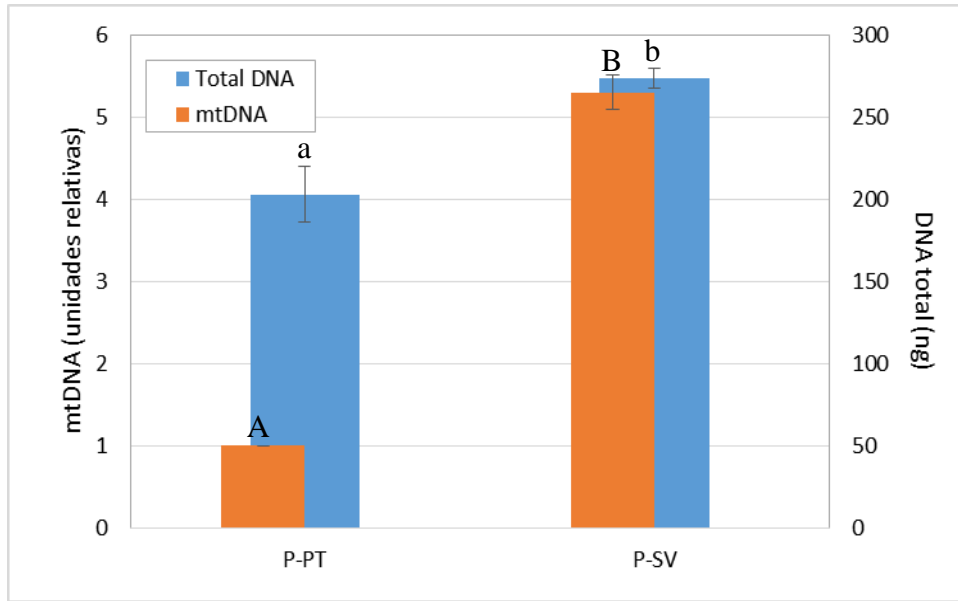
Nome do primer	Sequência 3'-5'	Tamanho do produto (pb)
Hmt2-SE	AATCATACAAAGCCCCCGCA	162
Hmt2-AS	TGGGGTTAGCGATGGAGGTA	
Hmt3-SE	TACCTCCATCGCTAACCCCA	195
Hmt3-AS	GGTGTGGTCGGGTGTGTTAT	

**Tabela 2:** Parâmetros de curvas padrão de amplificação dos pares de primers Hmt2-SE/Hmt2-AS e Hmt3-SE/Hmt3-AS usando DNA humano.

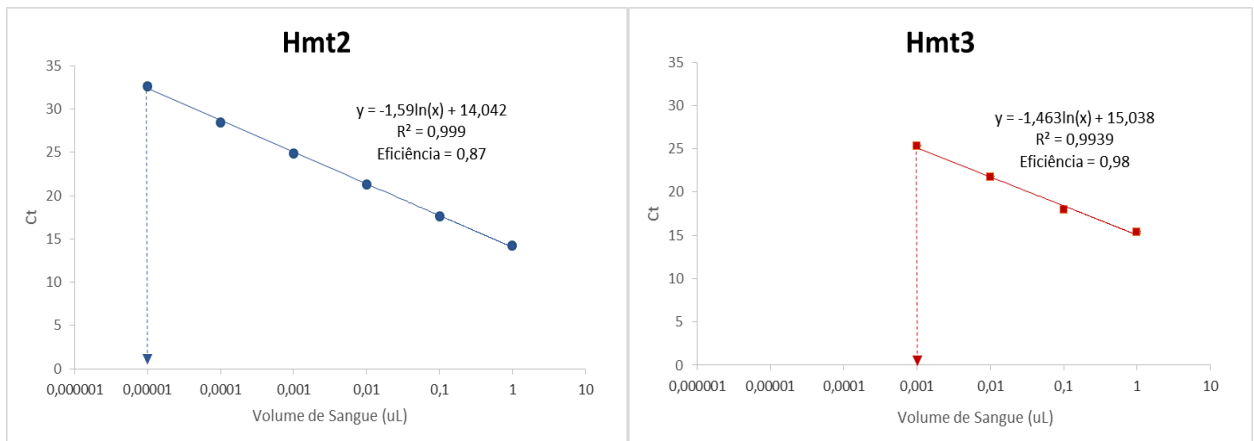
Primers	Inclinação (S)	-1/S	Eficiência	Linearidade (R <sup>2</sup> )
Hmt2-SE/Hmt2-AS	-3,662	0,273	0,875	0,999
Hmt3-SE/Hmt3-AS	-3,368	0,297	0,981	0,994



FIGURAS



**Figura 1:** Comparação dos métodos de extração de DNA humano para amplificação de mtDNA por qPCR. Quantificação de DNA total e mtDNA. P-PT: kit baseado em precipitação de proteína e de DNA; P-SV: kit baseado em ligação de DNA total em resina de sílica. Os kits de extração de DNA foram comparados nas quantificações de mtDNA (A, B:  $P < 0,05$ ) ou DNA total (a, b:  $P < 0,05$ ).



**Figura 2:** Curvas padrão de amplificação de mtDNA humano por qPCR. As sensibilidades foram acessadas por diluição em série do DNA obtido a partir de 50µL de sangue humano. As curvas foram plotadas de 0,01pL a 1µL de sangue. As sensibilidades das reações (setas pontilhadas) foram estabelecidas pelo menor volume sanguíneo que poderia ser amplificado com sucesso nas reações de qPCR. Hmt2: Amplificações com o par de primers Hmt2-SE e Hmt2-AS. Hmt3: Amplificações com o par de primers Hmt3-SE e Hmt3-AS.