



Detecção de DNA de *Leishmania infantum* por técnicas moleculares em amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - HUMAP/UFMS EBSEH

Emanuela Corrêa da Costa de Souza Soares¹, Natalia Oliveira Alves², Aline Casari², Alessandra Gutierrez de Oliveira².

¹FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

²INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

Introdução

As leishmanioses, afecções cosmopolitas, são desencadeadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*, cuja propagação se dá por meio de vetores. As manifestações clínicas dessas enfermidades exibem uma gama de variações, que estão intimamente associadas às espécies envolvidas na infecção e à dinâmica entre parasita e hospedeiro. Destaca-se, dentre essas, a *Leishmania (Leishmania) infantum* responsável pela leishmaniose visceral (LV) e caracterizada por sua expressão grave, de natureza crônica e sistêmica, potencialmente letal quando negligenciada. A persistência e o incremento dos casos de LV em determinados focos endêmicos, notavelmente no Brasil e, mais especificamente, no Estado de Mato Grosso do Sul, apesar de esforços consideráveis em intervenções de controle, suscitam indagações quanto à possível relação com cepas refratárias aos tratamentos atuais e às variações genéticas do parasita.

O diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) pode ser abordado tanto por meio da análise das formas clínicas e epidemiológicas como através de exames laboratoriais. A avaliação clínica, embora seja uma ferramenta valiosa, apresenta consideráveis desafios, uma vez que os sintomas compartilham similaridades com outras patologias. Em contrapartida, os exames laboratoriais desempenham um papel crucial na confirmação diagnóstica.

O método considerado padrão-ouro e adotado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) consiste na coleta de aspirado de medula óssea, permitindo a identificação direta da presença do parasita através de microscopia óptica. Contudo, o advento de tecnologias moleculares têm revolucionado a abordagem diagnóstica da LV. Destaca-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que se destaca como uma ferramenta diagnóstica eficaz.

Nesse contexto, torna-se iniludível a realização de estudos que visem à identificação e à caracterização molecular da *Leishmania infantum* em indivíduos diagnosticados com LV e que manifestam resistência aos agentes quimioterápicos. A PCR oferece vantagens significativas, especialmente na detecção de cargas parasitárias reduzidas, apresentando uma sensibilidade elevada. Esse avanço tecnológico representa um marco na precisão diagnóstica da LV, contribuindo para uma abordagem mais assertiva e precoce da doença. Estes estudos, conduzidos com pacientes do Hospital Maria Aparecida Pedrossian, pertencente à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (HUMAP/UFMS), emergem como imperativos na busca por estratégias mais eficazes de enfrentamento dessa grave enfermidade. Assim, o objetivo do estudo consistiu em identificar a presença de DNA de *Leishmania infantum* em amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, por meio de técnicas moleculares.

Método

O presente estudo está inserido no contexto do projeto de pesquisa intitulado “BUSCA DE MARCADORES GENÉTICOS DE *Leishmania infantum* EM PACIENTES REFRACTÁRIOS AO TRATAMENTO CONVENCIONAL”, o qual recebeu aprovação tanto do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEP/UFMS - 4.628.192), quanto do Comitê de Ética do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da mesma instituição (nº 6/2021/SGPIT/GEP/HUMAP- UFMS-EBSEH).

**Autor correspondente:
Emanuela Corrêa da Costa de S Soares,
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS.
E-mail do autor correspondente: emanuela.correa@ufms.br

A pesquisa abarcou 133 pacientes diagnosticados clinicamente e parasitologicamente com leishmaniose visceral (LV), os quais foram atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian. Para tal propósito, foram utilizadas amostras de aspirado de medula óssea (AMO), colhidas durante o exame laboratorial rotineiramente empregado no diagnóstico de pacientes com sintomas e histórico clínicos compatíveis.

O DNA genômico foi extraído das amostras de AMO e das culturas positivas de *Leishmania* sp. obtidas dos pacientes diagnosticados para LV, os quais foram atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP/UFMS EBSERH). A extração e purificação do material genômico foram realizadas segundo as recomendações do fabricante, utilizando o PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA). Para validar a extração e servir como controle endógeno na reação, foi conduzida uma PCR tendo como alvo o gene *Betactina*. A reação consistiu na utilização de 1,5 µL da amostra de DNA, 22,5 µL de PCR SuperMix (Invitrogen, USA), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo FWD (5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3') e REV (5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3') para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com pós-extensão a 72°C por 5 minutos. Para o controle negativo, utilizou-se uma amostra sem DNA, contendo apenas água, enquanto que para o controle positivo empregou-se uma amostra de DNA humano extraído de sangue periférico.

Posteriormente, foi conduzida uma PCR convencional, visando uma região de aproximadamente 300 pares de bases (bp) do espaçador transcrito interno do gene ribossômico de *Leishmania* (ITS1). Para esta reação, foram utilizados 8 µL da amostra, 10 µL de MasterMix PCR Convencional 2x (quatroG, Brasil), 1 µL de cada oligonucleotídeo LITSR (5'-CTGGATCATTTCGGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (SCHÖNIAN et al., 2003), sendo adicionados 5 µL de água purificada, totalizando um volume final de reação de 25 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com pós-extensão a 72°C por 5 minutos. Como controles positivos, foram utilizados DNA de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e *L.(L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) extraídos de culturas, enquanto que como controle negativo foi adicionada água purificada no lugar do DNA.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em 100 mL de tampão Tris-borato-etilenodiamina tetraacético (TBE 1X) corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 80 minutos em tampão TBE 1X. A visualização das bandas foi efetuada sob luz ultravioleta.

Adicionalmente, os registros médicos dos pacientes foram empregados para a obtenção dos seguintes dados: gênero, faixa etária, local de origem do paciente, data de diagnóstico, data de início e término do tratamento, medicações administradas, dosagens dos medicamentos, resultados quanto à cura ou recidiva, e número de recidivas observadas.

Todos os pacientes envolvidos no estudo foram devidamente informados sobre os propósitos da pesquisa em questão e, após manifestar consentimento, foram solicitadas suas assinaturas nos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em conformidade com as diretrizes éticas, os participantes foram assegurados de sua liberdade para retirar-se do estudo a qualquer momento, sem quaisquer repercussões adversas.

Os dados coletados foram meticulosamente registrados e organizados em planilhas, detalhando os itens obtidos nos registros médicos. Tal abordagem possibilitou a correlação e a agregação dos resultados das análises moleculares realizadas.

Resultados e discussão

Um total de 127 pacientes com sintomatologia clínica compatível com leishmaniose visceral foi incorporado ao estudo. Consequentemente, amostras de medula óssea foram coletadas de todos os participantes, além de material genético para análise por PCR. Dos 127 pacientes avaliados, 36 indivíduos foram diagnosticados com LV após a detecção de amastigotas no aspirado de medula óssea. Destes 36 pacientes diagnosticados, todas as reações de PCR resultaram positivas.

As leishmanioses representam enfermidades de transmissão vetorial, causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No contexto brasileiro, a espécie *Leishmania infantum* figura como agente etiológico da leishmaniose visceral (LV), destacando-se pela sua manifestação grave e crônica, com potencial de resultar em óbito na ausência de intervenção terapêutica adequada (LAINSON; RANGEL, 2005). A LV é reconhecida como uma zoonose, pois a transmissão do parasita ao ser humano ocorre durante a alimentação sanguínea por parte da fêmea dos flebotomíneos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). O Brasil figura em posição de destaque entre os sete países responsáveis por mais de 90% dos casos globais de LV, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2020). Em 2020, nas Américas, foram registrados 3.562 novos casos, dos quais 3.466 foram reportados apenas no Brasil, representando 97% do total. Contudo, ressalta-se que tais números podem estar subnotificados em decorrência da pandemia de COVID-19 (OPAS, 2020). No estado do Mato Grosso do Sul, durante o primeiro semestre de 2022, foram notificados 142 casos de LV, dos quais 50 foram confirmados e resultaram em 7 óbitos, refletindo uma taxa de letalidade de 14%. Dentre os municípios destacados pelo intenso registro de transmissão no estado encontram-se Campo Grande, Três Lagoas, Corumbá, Coxim e Aquidauana (MATO GROSSO DO SUL, 2020).

A *Leishmania infantum* apresenta duas formas evolutivas primárias: amastigota e promastigota. A forma amastigota, de morfologia arredondada, apresenta o cinetoplasto próximo ao núcleo e o flagelo internalizado, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. Por outro lado, a forma promastigota exibe um flagelo evidente e o cinetoplasto situado entre o núcleo e a extremidade anterior, podendo ser encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (BATES; ROGERS, 2004).

O diagnóstico da LV pode ser realizado mediante abordagens clínicas, epidemiológicas e exames laboratoriais. A avaliação clínica/epidemiológica enfrenta desafios significativos devido à sobreposição de sintomas comuns a outras enfermidades, como malária, febre tifóide e tuberculose, além da possibilidade de coinfeção (Sundar & Rai, 2002). Os exames laboratoriais podem abranger técnicas imunológicas, parasitológicas e moleculares, sendo que o aspirado de medula óssea, analisado por microscopia óptica, constitui o padrão-ouro preconizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para identificação da presença da forma amastigota do parasito. A técnica implica a aplicação de corantes como Giemsa, Wright ou Leishman em esfregaços, possibilitando a visualização das formas amastigotas. A detecção de parasitos depende da avaliação de múltiplos campos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Nos últimos anos, as tecnologias moleculares têm desempenhado um papel crescente no diagnóstico da LV, destacando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como uma abordagem eficaz. Tais métodos são reconhecidos pela sua capacidade de detectar cargas parasitárias reduzidas, apresentando elevada sensibilidade. Consequentemente, os ensaios baseados em PCR assumem uma posição de destaque no diagnóstico molecular (CARDOSO, 2013).

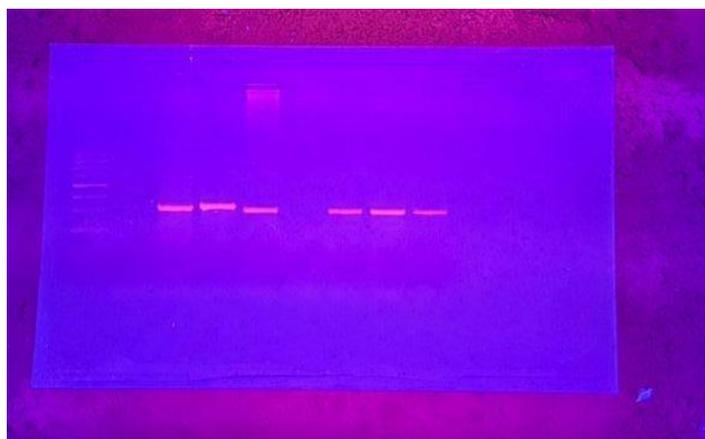
Diversos alvos moleculares têm sido explorados para a detecção de *Leishmania infantum* em amostras biológicas, incluindo regiões dos micirculos do DNA do cinetoplasto (kDNA), o gene do miniexon, o Espaçador Transcrito Interno (ITS-1), a subunidade 18S do RNA Ribossômico (18S rRNA), a glicoproteína-63 kDa (gp-63) e a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (SILVA, 2011). Destaca-se a região do ITS-1 como altamente específica para *Leishmania* spp., possibilitando a identificação da espécie por meio da análise de produtos de digestão obtidos com a enzima de restrição HaeIII. A técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), baseada na digestão enzimática dos produtos de amplificação, permite a diferenciação das espécies de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al., 2003).

Devido à natureza crônica e potencialmente fatal da leishmaniose visceral, aliada ao status endêmico no estado do Mato Grosso do Sul, torna-se imperativo o estabelecimento de métodos diagnósticos rápidos e eficazes. A utilização de múltiplas abordagens diagnósticas, como a PCR, complementa a prática clínica ao possibilitar uma identificação mais precisa do parasito nos pacientes atendidos no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian. Tal abordagem contribui para uma conduta terapêutica assertiva diante da complexidade dos sintomas associados à LV, minimizando os riscos de diagnósticos equivocados e otimizando a gestão clínica dos pacientes.

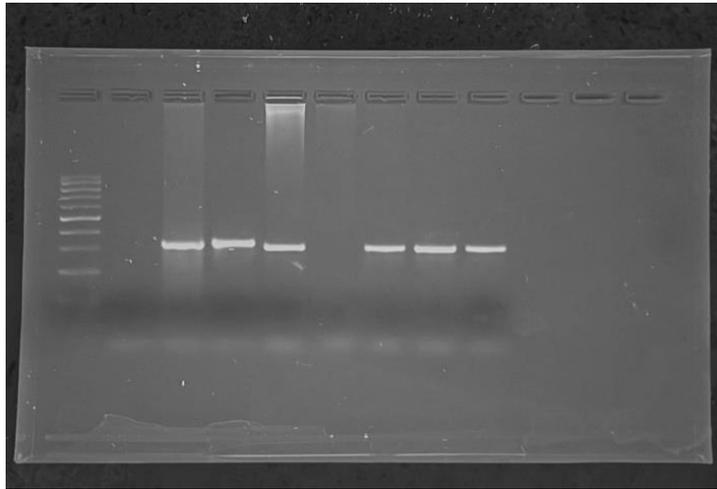
Além disso, outros 17 pacientes, embora não tenham tido o diagnóstico confirmado por meio de análises laboratoriais, foram diagnosticados com leishmaniose visceral pela equipe médica do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) e, portanto, foram tratados de acordo com os protocolos estabelecidos. Contudo, é relevante destacar que a PCR realizada em amostras desses pacientes resultou negativa.

Adicionalmente, houve o registro de 5 pacientes que não foram diagnosticados pela equipe médica do Hospital Universitário, embora apresentassem sintomas compatíveis com leishmaniose visceral. Surpreendentemente, a análise por PCR realizada nesses pacientes revelou resultados positivos.

Por fim, os 75 pacientes restantes tiveram amostras de medula óssea coletadas para investigação parasitológica da doença. Entretanto, não foram identificadas amastigotas nas amostras colhidas, e nenhum diagnóstico clínico foi estabelecido pela equipe médica. Além disso, os resultados da PCR também foram negativos para esses pacientes.



Fonte: Autora



Fonte: Autora

Conclusão

Diante dos desafios significativos apresentados pelo diagnóstico da leishmaniose visceral (LV), a pesquisa apresentada emerge como um marco crucial na busca por estratégias mais eficazes de enfrentamento dessa grave enfermidade. A combinação de abordagens clínicas, epidemiológicas e exames laboratoriais, especialmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), demonstrou ser fundamental na identificação precisa do parasito em pacientes diagnosticados com LV. Os resultados obtidos proporcionam insights valiosos sobre a eficácia das metodologias empregadas, destacando a importância da PCR na detecção de cargas parasitárias reduzidas e na diferenciação das espécies de *Leishmania*.

A utilização dessas abordagens complementares não apenas permite uma intervenção terapêutica mais assertiva, mas também contribui para a gestão clínica otimizada dos pacientes. Além disso, a pesquisa revela questões intrigantes, como a presença de pacientes com sintomas compatíveis com LV, mas com resultados negativos nos exames laboratoriais, e vice-versa. Esses achados ressaltam a complexidade do diagnóstico da LV e destacam a necessidade contínua de aprimoramento das técnicas diagnósticas disponíveis.

Por fim, os resultados deste estudo oferecem uma base sólida para futuras investigações, visando a identificação e caracterização molecular da *Leishmania infantum* em pacientes refratários ao tratamento convencional. Esses esforços são essenciais para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e prevenção da leishmaniose visceral, especialmente em áreas endêmicas como o Estado de Mato Grosso do Sul.

Descritores: Leishmaniose visceral. PCR. Diagnóstico. Material genético.

Referências

- BATES, P. A.; ROGERS, M. **New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania**. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n. 6, p. 601–609, set. 2004
- BRASIL, M. da S. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Editora MS, 2014. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-22>.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
- CARDOSO, Fernanda Alvarenga. **Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico**. 2013. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/6791/disserta%20c3%a7%20Fernanda%20Alvarenga%20Cardoso%201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 nov. 2022.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. **Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 811–827, dez. 2005.
- MATO GROSSO DO SUL, SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MATO GROSSO DO SUL. **Leishmaniose Visceral - Mato Grosso do Sul. Informe epidemiológico**, n. 01/2020. Campo Grande: SES/MS, 2020. Disponível em: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/informe-epidemiologico-no-1-2020-leishmaniose-visceral/>. Acesso em: 23 nov 2022.
- OPAS, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas**. Informe Epidemiológico, n. 8. Washington, D.C.: OPS, 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>. Acesso em: 23 nov. 2020.
- SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, set. 2003.

SILVA, M. A. L. da; MEDEIROS, R. A.; FILHO, S. B.-.; MELO, F. L. de; MEDEIROS, Z. ALVOS **Moleculares Utilizados Em PCR Para O Diagnóstico Da Leishmaniose Visceral Humana**. Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 15, 2011. DOI: 10.5216/ref.v7i3.12947. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/12947>. Acesso em: 29 nov. 2022.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniose**. 2019b. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 23 nov. 2022.



Esta obra está licenciada com uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional