PESQUISA DE DNA de *Leishmania* sp. EM AMOSTRAS DE SALIVA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E MUCOCUTÂNEA

Mariana Zanin (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Karla Larissa Trassi Ganaza (PCS/UEM), Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré (PCS/UEM), Izabel Galhardo Demarchi (Coorientador/UFSC), Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientador/PCS-UEM), e-mail: mvclonardoni@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências da Saúde/Florianópolis, SC.

Ciências da Saúde, Saúde coletiva.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, Saliva, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Resumo:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem a partir da picada de insetos flebotomíneos, podendo formar lesões na pele ou mucosas. O diagnóstico parasitológico é realizado pela pesquisa do parasito na lesão, por microscopia direta ou reação em cadeia da polimerase (PCR). Porém, a coleta de material para essas técnicas é considerada invasiva e desconfortável para os pacientes. Um recente estudo mostrou a presença de DNA de *Leishmania* em amostras de saliva humana, indicando que este tipo de amostra biológica tem vantagens pois não é invasiva. Neste estudo pesquisou-se a presença de DNA de *Leishmania* em amostras de saliva de pacientes com suspeita de LTA, provenientes da 15º Regional de Saúde de Maringá. Após a aprovação pelo Comitê de Ética para pesquisa em humanos, foi aplicado um questionário semi-estruturado, e realizou-se a coleta de saliva *in natura* e com *swab* bucal, para posterior realização da técnica de PCR convencional. Participaram 39 pacientes, sendo oito destes indivíduos com resultados positivos para LTA (parasitológico ou sorológico). No entanto, todas as amostras apresentaram resultado negativo. Embora neste estudo piloto o DNA do parasito não tenha sido detectado na saliva de pacientes com LTA, o uso da saliva para diagnóstico da doença ainda permanece sob investigação.

Introdução

As leishmanioses representam um desafio à saúde pública por constituir um complexo de doenças infecto-parasitárias com um amplo espectro clínico (desde lesões cutâneas, mucosas até viscerais), diversidade epidemiológica e ampla distribuição mundial (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A transmissão da leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas, que inoculam os parasitos na pele do hospedeiro.

As formas clínicas cutânea e mucocutânea ocorrem na região das Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (CURTI et al, 2011).
O diagnóstico laboratorial convencional da LTA é realizado pela demonstração do parasito em amostras biológicas. O procedimento é de fácil execução, rápido e de baixo custo. No entanto, apresenta limitações quanto à sensibilidade, especialmente para lesões crônicas em que a parasitemia é baixa (GONTIJO, 2003). Outro método de diagnóstico laboratorial é a pesquisa sorológica de anticorpos IgG anti-*Leishmania* por imunofluorescência indireta (IFI). Essa técnica apresenta baixo custo, é de simples execução e boa sensibilidade. No entanto, como utiliza antígenos brutos, tem a desvantagem apresentar reatividade cruzada entre anticorpos contra antígenos de *Leishmania* e anticorpos induzidos por outros cinetoplastídeos (VEXENAT et al, 1996).
O diagnóstico muitas vezes é difícil devido à escassez de parasitos nas amostras e à baixa sensibilidade das técnicas tradicionais. Assim, modernas tecnologias, com alvo na identificação genômica, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizadas na investigação diagnóstica da doença. Diante da possibilidade de detecção de parasitos em diferentes fluídos corporais a saliva se destaca pela facilidade de obtenção e pelo fato de ser uma técnica minimamente invasiva (CORVALAN et al, 2011). O objetivo deste estudo foi investigar a detecção do DNA de *Leishmania* pela técnica PCR na secreção salivar de pacientes suspeitos de LTA.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo piloto prospectivo do tipo observacional. Amostras de saliva foram obtidas de pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC/UEM, Maringá-PR), encaminhados para diagnóstico de LTA a partir de Unidades Básicas de Saúde de Maringá, ou de outras regionais de saúde do Estado do Paraná. De todos os pacientes foi coletada uma amostra de sangue e daqueles com lesões foi obido material por escarificação da borda da lesão. Para diagnóstico convencional da LTA foi usada a técnica de microscopia direta para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* em lesão, e a técnica de IFI para a pesquisa de anticorpos específicos. Ambas as técnicas são realizadas como rotina laboratorial no LEPAC. A seguir, os pacientes que aceitaram participar do estudo responderam a um questionário para a obtenção de dados epidemiológicos e de suas condições de saúde.
Logo após, foram realizadas as coletas de saliva por meio de dois métodos, a saliva *in natura* obtida a partir do descarte de aproximadamente 1 mL de saliva do paciente em frasco estéril, e a coleta de saliva por *swab* estéril aplicado por meio de movimentos na mucosa oral do paciente. Para a detecção de DNA do parasito na saliva, a extração do DNA foi realizada com o reagente Chelex 5%, e após a verificação da pureza e qualidade do material extraído, foi realizada a técnica de PCR convencional (95°C/5'; 35 ciclos) utilizando os iniciadores MP3H/MP1L, que amplifica um fragmento de 70 pares de base do kDNA dos parasitos. A análise dos produtos foi realizada por eletroforese em gel de agarose em (10-15 V/cm) e a presença de bandas foi observada sob um transiluminador. Para obtenção do controle positivo da reação de PCR amostras de saliva humana foram contaminadas com *Leishmania (V.) braziliensis* (5 x 10^4 parasitos/mL). Os resultados da PCR-saliva e dos exames sorológicos e parasitológicos diretos foram comparados para

avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR utilizando saliva humana. Os dados dos questionários e resultados laboratoriais foram armazenados em planilhas no Microsoft Excel ® e analisados no software Epi Info versão 3.5.4. Este estudo foi autorização do Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da UEM (Parecer Nº 2.609.591). Os pacientes que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Resultados e Discussão

Foram coletadas amostras de saliva *in natura* e *swab* bucal de 39 pacientes com suspeita de LTA. Deste total de pacientes, oito foram incluídos para pesquisa de DNA de *Leishmania* em amostras de saliva, uma vez que apresentado resultado positivo em menos um dos exames convencionais.
A maioria pertencia ao sexo masculino (7/ 87,5%), e a idade variou de 21 a 76 anos, sendo que a média foi de 44 ±16 anos. Os pacientes incluídos neste estudo relataram como provável local de infecção tanto o ambiente urbano quanto rural, sendo que seis (75%) foram provenientes da região urbana, um (12,5%) da região rural e um (12,5%) não relatou qual a possível região de infecção. Sete pacientes (87,50%) relataram ter animais domésticos, como cães e gatos, sendo importante ressaltar que esses animais podem fazer parte do ciclo evolutivo do parasito.
Observou-se que cinco dos pacientes (62,50%) já tinham ouvido falar sobre leishmaniose; três (37,50%) não sabiam do que se tratava; sete (87,50%) não sabiam como prevenir a doença e um (12,50%) relatou saber fazer a correta prevenção. Três (37,50%) faziam uso de repelente e cinco (62,50%) relataram quase nunca utilizar repelente. Em relação aos resultados de exames realizados para diagnóstico laboratorial da LTA, observou-se que dentre os oito pacientes, sete obtiveram diagnóstico laboratorial confirmado pelo exame parasitológico direto, oito tiveram resultados positivos para IFI e sete foram positivos pela PCR da lesão. No entanto, nas amostras de saliva destes pacientes não foram visualizadas bandas que confirmassem a detecção do DNA do parasito. Como perspectiva futura, pretende-se continuar este estudo introduzindo modificações técnicas para melhorar a sensibilidade do teste, como a concentração do DNA das amostras a partir do protocolo técnico utilizado para PCR de lesão. Entretanto, por conta da pandemia pelo novo coronavírus e as ampla reformas em andamento no bloco J-90 (onde fica o laboratório de imunologia), os experimentos sofreram interrupção momentânea.

Conclusões

A técnica de PCR para pesquisa de DNA de *Leishmania* em amostras de saliva de pacientes com LTA, até esta etapa, não atingiu a sensibilidade desejada. Os estudos sugerem que ela tem potencial para aplicação no diagnóstico da LTA, especialmente pela facilidade na obtenção do material biológico (saliva). Os estudos para a sua otimização continuam em andamento.

Agradecimentos

Agradecemos à CNPq e Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

CORVALAN F. H. et al. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases,** v. 17, n. 1, p. 98-102, 2011.

CURTI, M. C. M. et al. Epidemiological and clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis and their relationship with the laboratory data, south of Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 15, n. 1, p. 12-6, 2011.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

VEXENAT, A. C. et al. Cross-reactivity of antibodies in human infections by kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 38, p 177-85, 1996.