DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Dafne Monteiro Piovesana (PIBIC/CNPq), Camila Alves Mota (Coorientadora), Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora)
E-mail: tgvsilveira@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá-PR

Área e subárea do conhecimento: Saúde Pública

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, carga parasitária

Resumo:

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) se apresenta de formas cutâneas e mucosas resultando em lesões desfigurantes o que pode influenciar no psicossocial do paciente. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade e tem sido utilizada para detecção de diferentes alvos em DNA. O objetivo desse estudo foi determinar a carga parasitária em amostras de lesão de pacientes com LTA. Foi realizada a curva padrão para quantificação de *Leishmania* e β-actina e determinada a carga parasitária nas amostras de lesão de pacientes. Não houve diferença estatística na carga parasitária entre os grupos de pacientes analisados. A análise de um maior número de amostras mostrará a importância do parâmetro proposto na epidemiologia e tratamento da LTA.

Introdução

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo (World Health Organization, 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o registro anual é de 1 a 1,5 milhões de casos. No Brasil, entre 1990 a 2017 foram registrados 705.308 casos, sendo 15.147 na região sul e 95% deles no estado do Paraná (Ministério da saúde, 2017).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania* resultando em lesões cutâneas ou mucosas que podem ser destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Goto et. al, 2010).

O tratamento é um desafio pois pode ocorrer recidiva, falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e resistência ao tratamento. As

drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade e nenhuma delas é totalmente eficaz (Lima et. al, 2007).

A quantificação da carga parasitária presente nas lesões pode oferecer respostas importantes sobre a epidemiologia, prevenção e tratamento da LTA. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) por apresentar alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade, vem sendo utilizada em muitos estudos para detecção, quantificação e identificação de parasitos *Leishmania* (Jara et. al, 2013).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar a carga parasitária e a espécie de *Leishmania* infectante em amostras de lesão de pacientes com LTA.

Materiais e métodos

Pacientes e amostras: As amostras de lesão foram obtidas por escarificação da borda interna da lesão de pacientes encaminhados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) para diagnóstico de LTA. Todos foram esclarecidos quanto ao projeto e aqueles que concordaram, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Obtenção de DNA: As amostras foram incubadas a 95 ^{o}C por 30 min em termociclador Veriti® (Applied Biosystems), centrifugados a 13.000g por 1 minuto e o sobrenadante transferido para outro microtubo. Adicionou-se etanol absoluto para a precipitação do DNA, o sedimento foi lavado com etanol 70% e armazenado a 4 ^{o}C até o uso.

Carga parasitária por qPCR: Para a quantificação do parasito foram utilizados iniciadores que amplificam uma região do gene que codifica a subunidade 18S ribossomal de parasitos do gênero *Leishmania*. Como gene endógeno, utilizou-se iniciadores que amplificam o gene da β-actina humana. Uma *melting curve* e uma temperatura de *melting* (Tm) foram geradas e por meios delas avaliadas a especificidade da reação e espécie de *Leishmania* infectante. A quantificação absoluta foi feita usando a curva de diluição seriada do DNA purificado, considerando o tamanho do genoma da *Leishmania* e o número de copias do gene da β-actina humana por célula.

Análise estatística: Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis usando o software Past 3.20, com significância para $p < 0,05$.

Aspectos éticos: Este projeto PIBIC faz parte de um projeto de doutorado que foi aprovado (parecer: 2.392.327) pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá.

Resultados e Discussão

Para a construção da curva padrão para detecção da *Leishmania* foi utilizado o DNA obtido de cultura de *Leishmania (Viannia) braziliensis.* Foi realizada a diluição seriada (1:10) obtendo sete pontos de diluição, partindo de $3x10^{5}$ a $3x10^{-1}$ parasitos. Para a quantificação das células, foi construída uma curva padrão para detecção de β-actina humana utilizando o DNA obtido diluído em seis pontos (1:10) partindo de 99 ng a 0,99 pg de DNA, que equivale $3x10^{4}$ a $3x10^{-1}$ células. Como a β-actina é um gene de cópia única, foi considerado que cada 3,3 pg de DNA humano equivalem a uma célula (Figura 1).

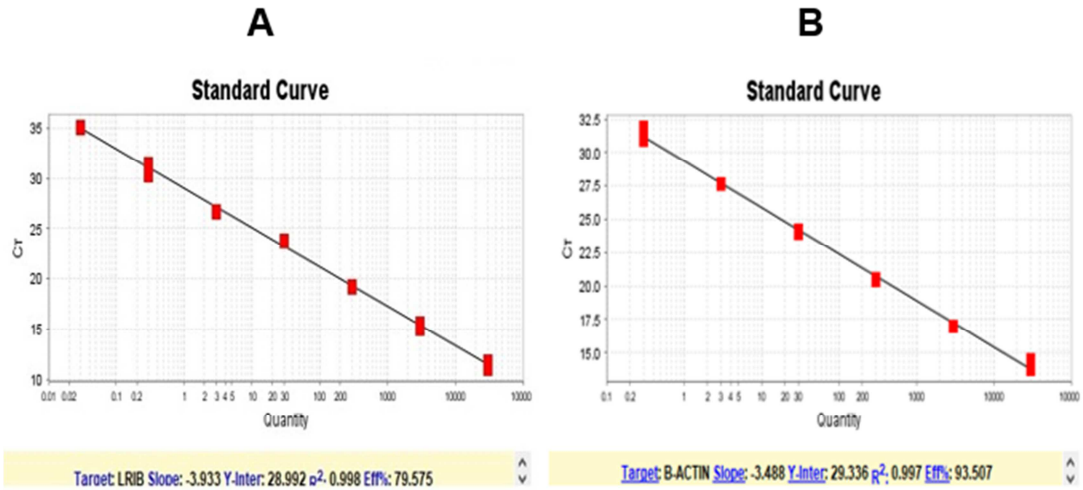

Figura 1 - Curvas padrão obtidas com PCR em tempo real baseado em SYBR Green. (A) Amplificação do DNA de *Leishmania* expressa como o número de parasitas por reação. (B) Amplificação do DNA de β-actina expressa como o número de células nucleadas humanas por reação.

Com as duas curvas padronizadas, foi avaliada a carga parasitária em amostras de pacientes que tiveram diagnóstico positivo para LTA, agrupadas na seguinte forma: pacientes que tinham 1 lesão (grupo 1), pacientes retorno (grupo 2) e pacientes com mais de 1 lesão (grupo 3) (Tabela 1). A carga parasitária média dos grupos 1, 2 e 3 foram de 18.214,65, 5.673,30, e 66.602,59 parasitos/milhão de células, respectivamente, e os valores não diferiram significativamente entre eles (p = 0,7414).

Os iniciadores utilizados neste estudo permitem distinguir espécies de *Leishmania* pela Tm. A temperatura de *melting* média obtida para as amostras testadas foi de 87,20 ºC, que é compatível com o subgênero *Viannia.*

Embora não tenhamos encontrado uma diferença estatística significativa na carga parasitária entre os grupos de pacientes avaliados, os pacientes com LTA recorrente (grupo 2) apresentaram, em média, menor carga parasitária.

Tabela 1 – Carga parasitária de amostras de pacientes diagnosticados com LTA.

	Pacientes	Idade/Sexo	IFI	Microscopia	N° de parasitos/milhão de células
Grupo 1	1	23/M	P	P	**873,38**
	2	39/M	P	P	**28,36**
	3	20/M	P	P	**53.742,20**
Grupo 2	4	68/M	P	N	**21.750,21**
	5	33/M	P	N	**295,98**
	6	78/F	P	P	**489,64**
	7	33/M	P	N	**157,38**
Grupo 3	8	36/M	P	P	**1.483,58**
	9	65/M	N	P	**48,57**
	10	39/M	P	P	**2.880,10**
	11	42/M	P	P	**261.998,11**

IFI- Imunofluorescência Indireta, M – Masculino, F- feminino, P- positivo, N- negativo

Conclusões

Foi possível determinar o número de parasitos por milhões de células presente nas amostras dos pacientes. Um maior número de amostras deve ser analisado para melhor avaliação do parâmetro proposto e a sua aplicabilidade em estudos de epidemiologia e monitoramento do tratamento da LTA.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. **Brasil M da saúde**. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2017. 159 p.
2. Goto, H.; Lindoso, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010
3. Jara, M.; Adaui, V.; Valencia, B.M.; Martinez, D.; Alba, M.; Castrillon, C. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826-1833, 2013.
4. Lima, E. B.; Porto, C.; Motta J. O. C.; Sampaio, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.
5. **World Health Organization**. Leishmaniasis/Fact sheet. April. 2017. Available from: **http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/**