



Investigação de um potencial alvo molecular para a discriminação de espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil

Palavras-Chave: *Leishmania* spp.; diagnóstico molecular; DNA mitocondrial.

Giovanna Bedin Caetano^{1,2}

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho (Orientador)²

1 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNICAMP; 2 Instituto de Biologia, UNICAMP

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. Os parasitos deste gênero pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae caracterizada pela presença de um cinetoplasto rico em DNA mitocondrial e um único flagelo [1]. As espécies de *Leishmania* são classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. O primeiro está presente nas Américas, Europa, Ásia e África, enquanto o segundo está presente apenas nas Américas [1]. No Brasil, foram identificadas pelo menos 8 espécies de *Leishmania* associadas a diferentes formas clínicas da doença, como leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. Esta parasitose é considerada grave se não tratada, e no caso da leishmaniose visceral, pode levar o paciente ao óbito [2]. Levantamentos epidemiológicos recentes têm notificado aproximadamente cerca de 20 mil novos casos por ano de leishmaniose tegumentar e de cerca de 3 mil casos por ano no Brasil [3].

O diagnóstico de leishmaniose humana baseia-se na demonstração do parasito no tecido infectado, seja biópsia ou punção de lesões cutâneas ou mucosas no caso da leishmaniose tegumentar ou aspiração de medula óssea principalmente, no caso da leishmaniose visceral. A desvantagem da visualização direta dos parasitos é a impossibilidade de diferenciação das espécies de *Leishmania*, limitando-se apenas a identificação do gênero do parasito [4]. Para a discriminação das espécies do parasito, várias sequências de DNA do parasito podem ser utilizadas como alvo de amplificação, o que possibilita o diagnóstico espécie-específico. Dentre as sequências utilizadas, pode-se destacar os seguintes genes nucleares: miniexon, o espaçador transcrito interno do DNA ribossômico e o gene da proteína de choque térmico (*hsp70*); e o gene *citocromo B* localizado nos maxicírculos do DNA mitocondrial (kDNA)[5]. O DNA mitocondrial de *Leishmania* consiste em aproximadamente 10.000 cópias de minicírculos de 0,5 a 2 kb e cerca de 20 a 40 cópias de maxicírculos de aproximadamente 20 a 40 kb, denominados como cinetoplasto ou kDNA [6]. Os minicírculos são constituídos por uma região conservada e uma variável. A região conservada pode ser utilizada para a discriminação de algumas espécies endêmicas no Brasil, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, através de PCR seguido por digestão com enzimas de restrição [7]. No entanto, o potencial dos minicírculos como alvo molecular para a discriminação das demais espécies de *Leishmania* é pouco conhecido, particularmente aquelas endêmicas no Brasil.

Portanto neste projeto foi proposto determinar a sequência de nucleotídeos da região conservada dos minicírculo de *Leishmania* spp. circulantes no Brasil, e avaliar seu potencial de uso como alvo

molecular para discriminação das espécies do parasito, através de polimorfismos nas sequências de nucleotídeos.

METODOLOGIA

Cultivo dos parasitos

Promastigotas das espécies de *Leishmania* foram cultivadas em meio M199 estéril (Sigma-Aldrich), preparado a partir da diluição do pó em água destilada. Este foi complementado com HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina, hemina, suplementado com soro fetal bovino inativado e estéril, penicilina/estreptomicina e urina humana masculina estéril. As culturas foram mantidas em estufa a 25°C e os repiques realizados semanalmente. As promastigotas foram cultivadas para realizar a extração do DNA genômico.

Amplificação da região conservada dos minicírculos nas espécies de *Leishmania*

A região conservada dos minicírculos das espécies de *Leishmania* foi amplificada a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os primers utilizados são específicos e amplificam um fragmento de aproximadamente 120 pares de base. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose em tampão TBE 1x. Após a corrida, foi adicionado 4µL brometo de etídio e os produtos amplificados foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

Clonagem dos produtos amplificados do PCR

O produto amplificado de cerca de 120 pb foi purificado em gel de agarose, utilizando o kit PureLink Quick Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific). Os fragmentos purificados foram ligados no vetor pGEM-T easy (Promega). O produto da ligação foi incubado a 4°C por pelo menos 16 horas. No dia seguinte, o produto da ligação foi transformado, utilizando bactérias competentes de *Escherichia coli* (cepa DH5α), preparadas conforme previamente na literatura [8]. As placas de LB ágar foram preparadas com IPTG e X-Gal (substrato da enzima β-galactosidase) para a diferenciação das colônias de bactérias que contém ou não o inserto de DNA de 120 pb. Para o isolamento do DNA plasmidial, as bactérias recombinantes foram selecionadas e incubadas em LB líquido contendo ampicilina a 37°C sob agitação constante por 16 horas. No dia seguinte, o DNA do plasmídeo foi purificado utilizando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA plasmidial foi quantificado e armazenado a 4°C. Para a confirmação dos clones que foram ligados ao pGEM-T, o DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose, conforme previamente descrito e então os clones contendo os respectivos insertos foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

Sequenciamento dos produtos amplificados da região conservada dos minicírculos

O sequenciamento de nucleotídeos dos insertos da região conservada dos minicírculos foi realizado segundo o método Sanger [9]. As sequências consenso da região do kDNA dos minicírculos de cada um dos clones de cada espécie foram geradas a partir de pelo menos duas sequências senso e duas sequências anti-senso. As análises das sequências foram realizadas usando os softwares Lasergene DNASTAR e Clone Manager 9.0. As sequências de nucleotídeos dos minicírculos dos clones de cada espécie foram alinhadas e editadas manualmente para as respectivas análises de identidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas e isolados utilizadas neste estudo foram *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2017/AAB), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/ M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/2022/HC001), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/79/M5533), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) e *L. (V.) lindenbergi* (MHOM/BR/96/M15732) e *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), representantes das espécies endêmicas no Brasil.

Os minicírculos de kDNA apresentam-se como uma alternativa no diagnóstico por PCR por ser um alvo definido como multicópia e a capacidade de sua região conservada ser utilizada para detectar o DNA das espécies de *Leishmania*, gerando um fragmento de aproximadamente 120 pares de bases [10] [11]. Os primers utilizados são capazes de amplificar esse fragmento em todas as espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil e que foram incluídas neste projeto.

Após os fragmentos amplificados serem clonados no vetor pGEM-T easy, pelo menos quatro clones de cada cepa ou isolado foram sequenciados. O alinhamento das sequências revelou uma variação de 82-100% de identidade entre os clones de uma mesma cepa ou isolado. Foram observadas pequenas diferenças no número total de nucleotídeos, devido a deleções, inserções e/ou polimorfismos entre as sequências dos clones. Pode-se observar que em cepas de uma mesma espécie (M2269 e PH8), a identidade variou de 96% a 100%, enquanto que para a cepa AAB, os valores variaram de 85% a 100%. Resultados semelhantes foram observados entre as sequências dos clones das cepas M4147 e HC001, ambas tipadas como *L. (V.) guyanensis*.

Tabela 1. Lista das cepas e isolados com as respectivas porcentagens de identidade entre os clones e número total de pares de bases (pb) da sequência conservada dos minicírculos.

Cepas/isolados	Número de clones sequenciados	Intervalo de identidade	Produto de PCR (pb)
<i>L. (L.) amazonensis</i> (AAB)	5	85% - 100%	124
<i>L. (L.) amazonensis</i> (PH8)	5	98% - 100%	123
<i>L. (L.) amazonensis</i> (M2269)	5	96% - 100%	123
<i>L. (L.) infantum</i> (LD)	4	86% - 100%	122
<i>L. (V.) braziliensis</i> (M2903)	5	87% - 98%	122
<i>L. (V.) guyanensis</i> (HC001)	5	82% - 100%	123
<i>L. (V.) guyanensis</i> (M4147)	5	86% - 98%	123
<i>L. (V.) lainsoni</i> (M6426)	6	87% - 99%	123
<i>L. (V.) naiffi</i> (M5533)	5	89% - 96%	123
<i>L. (V.) shawi</i> (M8408)	4	88% - 96%	123
<i>L. (V.) lindenbergi</i> (M15732)	5	84% - 92%	123

Posteriormente ao alinhamento das sequências de nucleotídeos (Figura 1), pode-se observar que os consensos dos clones de *L. (L.) amazonensis* apresentaram alta identidade entre as cepas e isolados da mesma espécie, em comparação com outras espécies (Tabela 2). Ainda no subgênero *Leishmania*, o consenso da cepa *L. (L.) infantum* apresentou maior identidade com as cepas de *L. (L.) amazonensis*

conforme era esperado, mas essa identidade mostrou-se menor do que a identidade entre as cepas de *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que essa divergência possa ser útil para a discriminação destas espécies.

No subgênero *Viannia*, uma maior variabilidade foi observada entre as sequências consenso. Conforme pode ser observado na Tabela 2, as porcentagens de identidade obtidas entre os consensos dos clones das espécies são mais altas do que as porcentagens obtidas entre as sequências dos clones da mesma espécie. Dessa forma, considera-se inviável distinguir a espécie que se trata uma sequência analisada entre as espécies do subgênero *Viannia*.

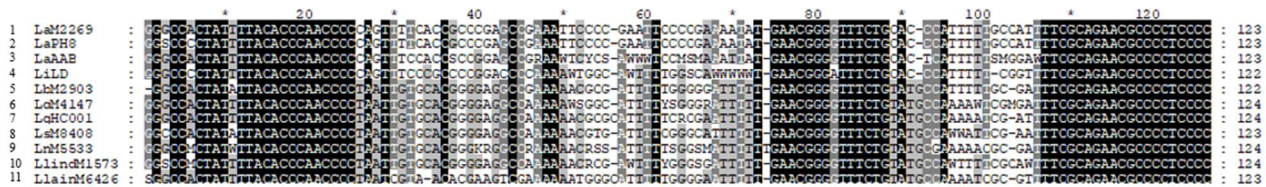


Figura 1. Alinhamento das sequências consenso dos clones de cada espécie realizado pelo software GeneDoc. Legenda: (1) *L. (L.) amazonensis* (M2269); (2) *L. (L.) amazonensis* (PH8); (3) Isolado clínico de *L. (L.) amazonensis* AAB; (4) *L. (L.) infantum* (LD); (5) *L. (V.) braziliensis* (M2903); (6) *L. (V.) guyanensis* (M4147); (7) Isolado clínico de *L. (V.) guyanensis* HC001; (8) *L. (V.) shawi* (M8408); (9) *L. (V.) naiffi* (M5533); (10) *L. (V.) lindenbergi* (M15732); (11) *L. (V.) lainsoni* (M6426).

Tabela 2. Matriz da porcentagem de identidade entre o consenso dos minicírculos sequenciados entre as espécies de *Leishmania* utilizadas neste projeto.

Espécies	M2269	PH8	AAB	LD	M2903	M4147	HC001	M8408	M5533	M15732	M6426
M2269	-	98%	82%	75%	72%	67%	72%	67%	64%	70%	66%
PH8	98%	-	80%	75%	70%	66%	70%	66%	64%	70%	64%
AAB	82%	80%	-	75%	69%	65%	66%	65%	62%	66%	61%
LD	75%	75%	75%	-	70%	69%	67%	67%	64%	68%	68%
M2903	72%	70%	69%	70%	-	86%	87%	88%	84%	87%	83%
M4147	67%	66%	65%	69%	86%	-	88%	87%	84%	85%	82%
HC001	72%	70%	66%	67%	88%	88%	-	88%	83%	86%	84%
M8408	67%	66%	65%	67%	88%	87%	88%	-	81%	88%	80%
M5533	64%	64%	62%	64%	84%	84%	83%	81%	-	81%	80%
M15732	70%	70%	66%	68%	87%	85%	86%	88%	81%	-	77%
M6426	66%	64%	61%	68%	83%	82%	84%	80%	80%	77%	-

CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise do sequenciamento da região conservada dos minicírculos mostra-se promissora para distinção entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, ambas espécies representantes do subgênero *Leishmania*. No entanto, no caso das espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, os valores de identidade obtidos foram semelhantes, tornando impossível a distinção entre essas espécies usando as sequências dos minicírculos.

BIBLIOGRAFIA

1. Pace, D., *Leishmaniasis*. J Infect, 2014. **69 Suppl 1**: p. S10-8.
2. Burza, S., S.L. Croft, and M. Boelaert, *Leishmaniasis*. Lancet, 2018. **392**(10151): p. 951-970.
3. Uliana, S.R., *Leishmania e Leishmanioses*, in *Parasitologia Contemporânea*, G. Koogan, Editor. 2012: Rio de Janeiro. p. 47-56.

4. Gontijo, C.M.F. and M.N. Melo, *Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas*. Revista Brasileira de Epidemiologia, 2004. **7**.
5. Reimão, J.Q., et al., *Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods*. Microorganisms, 2020. **8**(11).
6. Jensen, R.E. and P.T. Englund, *Network news: the replication of kinetoplast DNA*. Annu Rev Microbiol, 2012. **66**: p. 473-91.
7. de Andrade, H.M., et al., *Use of PCR-RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs*. Vet Parasitol, 2006. **140**(3-4): p. 231-8.
8. Sambrook, J.F., E. R.; & Maniatis, T.;; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)*. 1989: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
10. Fernandes O., Catanho M.P., Segura I., Labrada L.A., Derre R., Saraiva N. and Degrave W. *Minicircle variable region probes for characterization of Leishmania (Viannia) species*. The Journal of Parasitology, 1999. **85**:563-568.
11. Volpini, A.C., Passos V.M., Oliveira G.C. and Romanha A.J. *PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis*. Acta Trop. 2004 Mar;**90**(1):31-7.