

Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR.

New molecular targets for PCR identification of Leishmania

Lucile Maria Floeter-Winter

Departamento de Fisiologia. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

As primeiras detecções de parasitas em amostras de pacientes foram feitas por William Leishman, seguido por Charles Donovan, que se valeram da microscopia ótica para evidenciar formas amastigotas dentro de macrófagos de pacientes acometidos de febre Dum-dum, na Índia, em 1900. O exame microscópico de esfregaços de pele, aspirados de tecido linfóide ou de punção de medula ou fígado é utilizado até hoje como método seguro de busca do patógeno. No entanto, a sensibilidade desse método é muito baixa e ocasiona um grande número de falsos negativos.

A cultura *in vitro* pode ser obtida pelo uso de meios de cultura adequados e condições especiais de laboratório; no entanto, a chance de contaminação é muito alta e nem sempre a multiplicação do número de parasitas é conseguida. De qualquer forma a observação microscópica leva apenas à identificação da presença do parasito, mas devido a poucas diferenças morfológicas é quase impossível a distinção entre as espécies. Claro, que este procedimento depende de técnico experiente e leva muito tempo. Além disso, os resultados negativos não são conclusivos. A cultura bem-sucedida pode, no entanto, produzir material suficiente para testes bioquímicos, imunológicos e moleculares.

Os métodos clássicos de identificação de espécies do gênero *Leishmania* são os perfis de isoenzimas e as reações por anticorpo monoclonal.^{1,2} Ambos dependem de organismos em cultura e se baseiam na expressão fenotípica de características das espécies. O desenvolvimen-

to das técnicas de anticorpos monoclonais revolucionou a identificação de organismos do gênero *Leishmania*.² Com essa técnica é possível identificar formas em cultura sem que um grande número de parasitas seja necessário. É possível, por exemplo, identificar parasitas presentes no intestino de flebótomos infectados sem a necessidade de isolá-los.³ Entretanto, existem limitações no preparo de anticorpos, e a identificação necessita de um painel de reações com diferentes anticorpos para resultar confiável. Além disso, existe a necessidade de se estabelecer a cultura, uma vez que a maioria dos anticorpos reconhece apenas antígenos presentes em formas promastigotas que não são expressos em amastigotas.

Na maioria dos organismos a informação genética está codificada em uma molécula de DNA. Todos os organismos estão relacionados entre si. Desse modo, existe uma parte da informação que é comum, enquanto outra parte é única, exclusiva de cada indivíduo. Assim, uma parte do DNA de cada organismo é sua marca registrada e não necessariamente está expressa fenotipicamente. Essas particularidades do DNA vêm sendo exploradas nos últimos anos na identificação de indivíduos, os já famosos testes de DNA. Ainda por serem relacionadas, algumas regiões do genoma podem ser utilizadas no estabelecimento de relações filogenéticas entre os organismos.

Além da aplicação óbvia em medicina forense, a utilização das novas ferramentas moleculares pode ser considerada nas doenças

infecciosas. O enfoque molecular levou à identificação de patógenos e consequentemente levou ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Esses, por sua vez, levam as novas formas de tratamento e abrem perspectivas nos estudos de epidemiologia e ecologia. No contexto das leishmanioses, a introdução de ferramentas de identificação e diagnóstico de *Leishmania* vem sendo utilizadas com sucesso já há algum tempo.

A leitura dos parágrafos anteriores deixa claro que a busca de novos alvos para identificação de organismo deve se basear em descrever sequências de DNA que sejam exclusivas do parasito, uma vez que o DNA do hospedeiro vai estar presente na amostra. Essa exclusividade será responsável pela especificidade do alvo. Por outro lado, estas sequências não devem ser raras ou pouco abundantes, uma vez que isso pode prejudicar a sensibilidade de detecção.

A identificação de sequências de DNA está baseada primeiramente na estrutura da molécula. O DNA é constituído por desoxiribonucleotídeos monofosfatos ligados entre si por ligação fosfodiéster entre o carbono 3 “da desoxiribose e o fosfato ligado ao carbono 5” do nucleotídeo adjacente. Essa cadeia covalentemente ligada constituiu uma fita do DNA. A molécula é formada por duas fitas que interagem entre si pela formação de pontes de hidrogênio entre bases nitrogenadas dos nucleotídeos que, por serem hidrofóbicas, se voltam para dentro da molécula. Na manutenção dessa estrutura é que reside o “segredo da vida”. Ao descreverem esse modelo de DNA, Watson e Crick⁴ mostraram que a complementariedade dos pares de bases, uma de cada fita, ao fazer o pareamento da molécula explicava como se dá a replicação e a transcrição. Posteriormente, ao se analisar os mecanismos biológicos do fluxo de informação,

verificou-se que a complementariedade é responsável pela tradução, pela estrutura do ribossomo conduzida pelo rRNA, pelo processamento do RNA mensageiro entre outros.

Ao se estudar a estrutura do DNA logo se percebeu que suas características poderiam ser utilizadas não só para entender como a informação estava armazenada e o que queria dizer, mas também para comparar organismos e encontrar peculiaridades que distinguíssem os organismos ao mesmo tempo em que os relacionassem.

Ao se desnaturar uma molécula de DNA é possível fazer com que as fitas se renaturem novamente, refazendo as pontes de hidrogênio entre as bases complementares. Se, de alguma forma, uma das fitas puder ser marcada, ao reassociar esta servirá de sonda para indicar a fita correspondente.

Como já mencionado, a escolha do alvo depende de alguns parâmetros, tanto biológicos, como físico-químicos. Para que uma sequência de DNA possa ser considerada um marcador molecular, ela deve estar sujeita a tal pressão de seleção na evolução de organismos de modo que as diferenças apresentadas sejam encontradas em famílias, gêneros, espécies ou indivíduos, de acordo com o tempo evolutivo da divergência e com o papel fisiológico do produto da informação da sequência em questão.

Os primeiros testes que se utilizaram de DNA na identificação de *Leishmania* se baseavam na descrição de sondas para hibridação em dot-blot, com DNA total da amostra. A associação com a aplicação de digestão do DNA com enzimas de restrição levou à utilização em Southern blot.⁵⁻⁸ No entanto, pela característica dessas técnicas, essas sondas limitavam os alvos a sequências de DNA presentes em cópias múltiplas no genoma do parasito. O aparecimento da técnica de reação em cadeia de amplificação do DNA (PCR) resolveu o proble-

ma e essa passou a ser a técnica de escolha em identificação utilizando alvos moleculares.⁹

Em nosso ataque experimental escolhemos inicialmente sequências que codificam o RNA ribossômico (rRNA) que são muito conservadas. Essas sequências demonstraram que podem ser ferramentas poderosas na determinação de relações filogenéticas entre organismos de diferentes taxa.^{10,11} No entanto, as diferenças de nucleotídeos encontradas na sequência que codifica o RNA da subunidade menor do ribossomo (SSU rRNA) permitiu a distinção limitada entre espécies de *Leishmania*,^{10,11} apesar de permitir o estabelecimento de grupos distintos.¹²

Até então, essa escolha era contraponto à utilização de sequências que apresentam evolução muito rápida, como aquelas que constituem o DNA de cinetoplasto (kDNA) ou sequências com espaçadores de mini-exon. Essas sequências são capazes de distinguir isolados, mas não produzem grupos de espécies. Assim, o grau de discriminação entre famílias, gêneros, grupos, espécies, populações e isolados depende da pressão de seleção a que a sequência alvo está submetida, que por sua vez depende do papel fisiológico desempenhado pelo produto codificado, na sobrevivência do organismo.^{5,6,13-22} A alta heterogeneidade das sequências de minicírculo de kDNA entre as diferentes espécies restringe a utilização de determinados pares de “primers” entre isolados próximos ou apenas permite a identificação de grupos ou isolados de mesma área ou, por outro lado, apenas de um grande grupo mesmo só de *Leishmania* em determinadas situações.

As sequências que codificam o RNA presente na subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA), por outro lado, também apresentam em sua organização regiões conservadas

e regiões variáveis, combinação bastante atrativa para PCR. Além disso, esses genes são multicópias e apresentam alta conservação entre as cópias. Dessa forma é possível amplificar uma região variável, que é flanqueada por regiões conservadas, partindo-se dessas para o desenho dos “primers”. A informação discriminatória contida no segmento variável pode ser acessada por sequenciamento ou por hibridação, sem que haja o problema de heterogeneidade.^{23,24,12} Como a função de cada uma das regiões está muito bem estabelecida na formação do ribossomo, as diferenças de sequência são muito informativas tanto para a identificação como [para o estabelecimento](#) de relações filogenéticas. De fato, a história evolutiva desse segmento gênico é tal que permite traçar paralelos desde bactérias até metazoos mais complexos.¹⁰

Como as sequências conservadas estão presentes em todas as espécies do gênero, esse tipo de enfoque leva vantagens sobre os alvos anteriores, uma vez que o resultado de uma PCR é positivo na presença de organismo, independente da linhagem, grupo ou mesmo espécie, diminuindo a possibilidade de falsos negativos, fato mais comum quando há heterogeneidade de sequência, como o que ocorre em alvos de kDNA ou mini-exon. Em nossa experiência, o método atingiu 100% de correspondência em um estudo pareado com perfil de anticorpos monoclonais.²⁵ Por outro lado, como as sequências do SSU são muito conservadas, relações filogenéticas não puderam ser resolvidas com esse alvo.²⁶

Como as espécies pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* não puderam ser discriminadas pelo alvo SSU, iniciamos um estudo abordando o gene que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, uma das

enzimas utilizadas no painel de isoenzimas.²⁷ Embora sendo um gene de cópia única, os avanços na produção de enzimas para PCR permitiam aumentar a sensibilidade do método. A grande vantagem em se utilizar um gene cópia única é a produção de um único produto de PCR, que facilita a visualização e interpretação da eletroforese. A utilização de conjunto de “primers” por amostra evita o problema de falso-negativo. Dessa forma conseguimos ter em uma primeira PCR a resposta de positividade a amostra, seguida por uma segunda reação que indica se o organismo é do subgênero *L. (Leishmania)* ou *L. (Viannia)*. Nesse caso, uma reação subsequente indica se o organismo é da espécie *L. (V.) braziliensis* ou não.

É importante ressaltar que a ocorrência de diferentes espécies de *Leishmania* na mesma área endêmica pode ser distinguida ou mesmo um caso de coinfeção de um cão com *L. (L.) chagasi* e *T. evansi*.²⁸ Em estudos com diferentes fármacos torna-se interessante saber a qual espécie pertence o agente infeccioso em relação à resposta apresentada ao fármaco.²⁹

Como afirmado acima, o aparecimento de novas metodologias de detecção de moléculas de DNA auxiliam no avanço das técnicas de identificação. Uma dessas novas metodologias consiste no PCR em tempo real. Essa técnica permite a quantificação do número de moléculas formadas ao longo da reação de amplificação, o que, ao se ter uma reação calibrada, permite estimar o número de moléculas iniciais do alvo. Assim, ao lado da identificação, pela formação do produto específico, obtida pelo par de “primers” utilizado, consegue-se também a quantificação do número de parasitos presentes em uma determinada amos-

tra.³⁰ A composição de bases do amplicon pode ser verificada por uma ferramenta do aparelho que determina a temperatura de fusão do fragmento e assim calcula seu conteúdo de G+C. Desse modo amplicons diferentes (por exemplo, o mesmo produto de PCR em espécies que apresentam diferenças de sequência interna e que, portanto, altera a T'm, podem ser identificados por esse parâmetro). É interessante ressaltar que todo o processo é automatizado, eliminando a necessidade de técnico treinado na leitura de padrões de eletroforese de DNA em géis de agarose. Pela eliminação desse tipo de análise temos também uma vantagem muito interessante em laboratórios que trabalham com DNA e PCR, que consiste na redução de manipulação de produtos de PCR e, portanto, diminuem drasticamente a chance de contaminação de amostras.

Evidentemente, todos os avanços metodológicos que levam à identificação mais específica e sensível promovem progresso em áreas correlatas no estudo da leishmaniose, como a epidemiologia e a ecologia. Assim, pela aplicação das técnicas de maneira isolada, ou em conjunto, foi possível implicar como hospedeiros silvestres de *Leishmania (V.) braziliensis* roedores como *Bolomys* e *Rattus*.³¹

Um último comentário se faz necessário neste momento. A identificação por técnicas que envolvem moléculas de DNA ou RNA apresenta uma limitação quanto à qualidade da amostra inicial. Claro que a riqueza de parasitos auxilia na sensibilidade de qualquer método, uma vez que os testes devem ser considerados como diretos, já que detectam a presença do parasito na amostra.

Ambos, DNA e RNA, este último em maior intensidade, sofrem lise quando a amostra não é bem conservada. Desse modo, é fundamental que a amostra seja preservada desde da sua coleta até a chegada ao laboratório onde será processada. Para obtenção de DNA, o recomendado é EDTA (quelante de metal que inibe DNase) e para RNA recomenda-se coletar a amostra já em tampão de extração (normalmente kit de Trizol, que contém alta concentração de inibidores de RNases). Em reações de amplificação, quanto maior for o tamanho do amplicon mais sensível será a reação à um DNA de baixa qualidade. A presença de inibidores teciduais, tal como hemina, também deve ser levada em consideração, assim como sais que ficam como

resíduos nos processos de extração e aumentam a força iônica da solução na qual ocorre a reação, alterando indiretamente, o ótimo de temperaturas de associação, além de inibir a *Taq* polimerase.

AGRADECIMENTOS

Deixo expressa a minha gratidão a todos os colaboradores que, em algum momento, participaram ativamente da busca por alvos para identificação de *Leishmania* e aos órgãos financiadores Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas e auxílios.

REFERÊNCIAS

1. Chance ML, Peters W, Shchory L. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol*. 1974;68:307-16.
2. McMahon-Pratt D, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*. 1981;291:581-3.
3. Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81:69-72.
4. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 171:737-8.
5. Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*. 1989;99 (Suppl):S125-46.
6. Barker DC, Butcher J. The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77:285-97.

Nota: Artigo referente à palestra apresentada no II Fórum de Discussão da Sociedade Paulista de Parasitologia: leishmaniose visceral americana, situação atual e perspectivas futuras. Organizado por Regina M. B. Franco, da Sociedade Paulista de Parasitologia, Vera L. F. de Camargo-Neves e Cecília S. S. Abdalla, da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, o evento foi realizado em 3 de julho de 2007, no auditório Luiz Mussolino (SES-SP).

7. Guizani I, Van Eys GJ, Ismail RB, Dellagi K. Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:632-40.
8. Schoone GJ, Van Eys GJ, Ligthart GS, Taub FE, Zaai J, Mebrahtu Y, Laywer P. Detection and identification of *Leishmania* parasites by in situ hybridization with total and recombinant DNA probes. *Exp Parasitol.* 1991;73:345-53.
9. De Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992;52:45-58.
10. Pace NR, Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell.* 1986;45:325-6.
11. Huss VA, Sogin ML. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol.* 1990;31:432-42.
12. Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41:324-30.
13. Arnot DE, Barker DC. Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. II. Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1981;3:47-56.
14. Ashall F, Miles MA. Diagnosis of parasitic diseases using DNA-to-DNA hybridization. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82:235-6.
15. Kennedy WP. Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and in situ hybridisation. *Mol Biochem Parasitol.* 1984;12:313-25.
16. Lopes UG, Momen H, Grimaldi GJr, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol.* 1984;70:89-98.
17. Massamba NN, Mutinga MJ. Recombinant kinetoplast DNA (kDNA) probe for identifying *Leishmania tropica*. *Acta Trop.* 1992;52:1-15.
18. Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84:565-9.
19. Wirth DF, McMahon-Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci.* 1982;79:6999-7003.
20. Spithill TW, Grumont RJ. Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. *Mol Biochem Parasitol.* 1984;12:217-36.
21. Das Gupta S, Ghosh DK, Majumder HK. A cloned kinetoplast DNA mini-circle fragment from a *Leishmania spp.* specific for post-kala-azar dermal leishmaniasis strains. *Parasitology.* 1991;102:187-91.
22. Jackson PR, Lawrie JM, Stiteler JM, Hawkins DW, Wohlhieter JA, Rowton ED. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet Parasitol.* 1986;20:195-215.
23. Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence

- of the 18S ribosomal RNA sequence. Exp Parasitol. 1991;72:157-63.
24. van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol Biochem Parasitol. 1992;51:133-42.
25. Uliana SR, Ishikawa E, Stempliak VA, De Souza A, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. Geographical distribution of neotropical *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotide probes. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94:261-4.
26. Briones MR, Nelson K, Beverley SM, Affonso MHT, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Mol Biochem Parasitol. 1992;53:121-7.
27. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003;41:540-6.
28. Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IM, Camargo MC, D'auria SR, Floeter-Winter LM. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:739-41.
29. Amato VS, Rabello A, Rotondo-Silva A, Kono A, Maldonado TP, Alves IC, Floeter-Winter LM, Amato VN, Shikanai-Yasuda MA. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. Acta Trop. 2004;92:127-32.
30. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. 1997;245:154-60.
31. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;97:291-6.

Correspondência/Correspondence to:

Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter
Profa. Titular do Departamento de Fisiologia
Instituto de Biociências - USP
Rua do Matão, travessa 14,101
CEP: 05508-900 São Paulo, SP, Brasil
Tel/fax 55 11 3091 7503
E-mail: lucile@ib.usp.br