



PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE qPCR PARA O DIAGNÓSTICO DE *LEISHMANIA INFANTUM*

Palavras-Chave: LEISHMANIOSE (1); *LEISHMANIA INFANTUM* (2); qPCR (3).

Autores(as):

ANALILDE FERREIRA ALVES (autora), IB – UNICAMP

GUILHERME AUGUSTO SANCHES ROQUE (co-autor), IB - UNICAMP

LEONARDO FERNANDES GERES (co-autor), IB - UNICAMP

JÚLIA MIRALHA RODRIGUES MORAES LEITE (co-autora), IB - UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. SELMA GIORGIO (orientadora), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. São estimados que ocorram anualmente entre 700.000 a 1 milhão novos casos da doença no mundo. Em 2020, o Brasil se destacou entre os países da América com maior número de casos. O diagnóstico da Leishmaniose Visceral (LV), a forma mais severa da doença, é essencial para que danos maiores sejam evitados, como a morte do paciente (WHO, 2022). Portanto, o objetivo principal deste projeto é padronizar o ensaio da PCR quantitativa em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose induzida pela *Leishmania infantum*.

METODOLOGIA

Cultivo

Para o cultivo dos parasitas, a *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/LD) será mantida na forma de promastigota em meio Schneider com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 5% de urina humana, em estufa a 26°C (ZORGI *et al*, 2020).

Curva de proliferação

Após o cultivo, serão utilizadas cerca de 5×10^5 promastigotas/ml de *L. infantum* para o cultivo em meio Schneider com 10% de SFB e 5% de urina humana em frascos de 25 cm² e incubadas a 26°C durante 10 dias, sem a renovação do meio. As alíquotas serão coletadas diariamente e fixadas com solução de formaldeído 0,1% e tampão fosfato salino (PBS) para que os parasitas sejam contados em câmara de Neubauer no microscópio ótico (ARAÚJO, 2019).

Extração de DNA

A extração do DNA genômico (gDNA) da linhagem de *L. infantum* será feita seguindo as recomendações do próprio fabricante do kit QIAamp DNA Mini Kit (250) (tanto para o sangue quanto para as amostras dos tecidos). Posteriormente, estas amostras de gDNA serão usadas para avaliar o desempenho da qPCR juntamente de primers que serão descritos na sequência (CAVALCANTI *et al*, 2009).

Primers

Para a realização da qPCR foram sintetizados os seguintes iniciadores: G6PDH-F (5'-CGYCTYCCAGACGCYTACGA-3') e G6PDH-R (5'-AGCGGYGTGAAGATGCGCCA-3') (COSER *et al*, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da viabilidade e curva de proliferação

Para analisar a viabilidade dos promastigotas desses parasitas, utilizamos a *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/LD) para o cultivo *in vitro*. O experimento foi realizado em triplicada e abaixo está a Figura 1 representando a média dos resultados encontrados:

Curva de proliferação de *Leishmania infantum* WT (média)

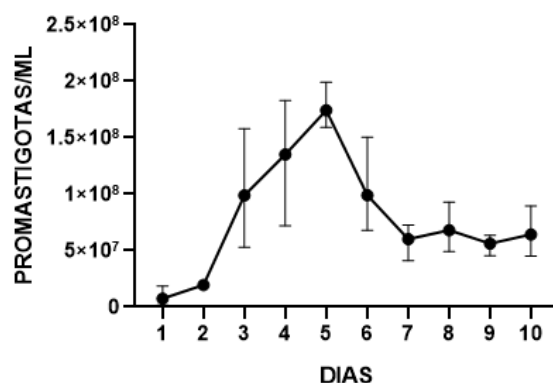


Figura 1: Curva de proliferação de *L. infantum*. Para dar início a curva de proliferação, 5×10^5 promastigotas foram cultivados em meio Schneider suplementado com 10% de SFB e 5% de urina humana, mantidos em estufa à 26°C. As promastigotas foram contados durante 10 dias consecutivos em câmara de Neubauer, sem a troca do meio de cultura e em triplicata.

Como observado no gráfico, por volta do 5º dia de cultivo do parasita é possível observar um aumento da quantidade de promastigotas, ou seja, a fase logarítmica. Logo, há um pico de sua proliferação e, por volta do 6º/7º dia a quantidade de parasitas encontrados em cultura passa a declinar.

Em paralelo foram montadas lâminas da mesma cultura de parasitas, fixadas em álcool metílico (metanol) e corados com Giemsa, como mostrado na Figura 2.

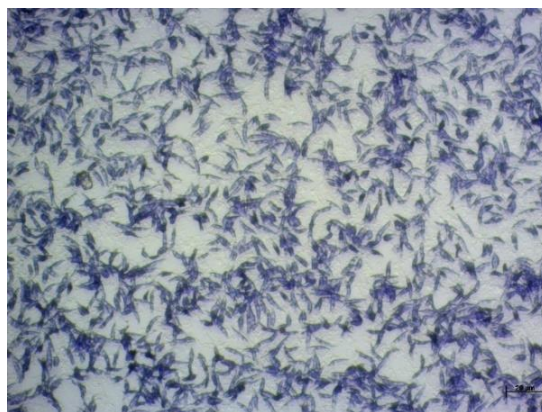


Figura 2: Cultura de *L. infantum* fixadas após 4 dias desde o início da curva de proliferação.

Através das lâminas foi possível confirmar a presença dos parasitas, além de ser notável o aumento da quantidade dos mesmos ao longo dos dias e posteriormente, a partir do 6 dia de cultivo sem que o meio de cultura fosse renovado, houve o declínio dessa quantidade de promastigotas.

Extração de DNA

Para que ocorra a corrida da PCR quantitativa em tempo real, é necessário a extração do material genético de diferentes amostras contendo o DNA genômico do protozoário. Neste caso, foram feitas as extrações de DNA tanto de tecidos (sendo eles baço, medula e fígado) quanto do sangue. Os experimentos foram feitos em dias alternados, portanto há amostras frescas e congeladas, desta forma também foi possível testar se havia ou não diferença significativa entre esses materiais visto que passaram por condições diferentes, como de temperatura. Todas foram quantificadas através do Nanodrop e em seguida foi realizada eletroforese com gel de agarose 1% (Figura 3).

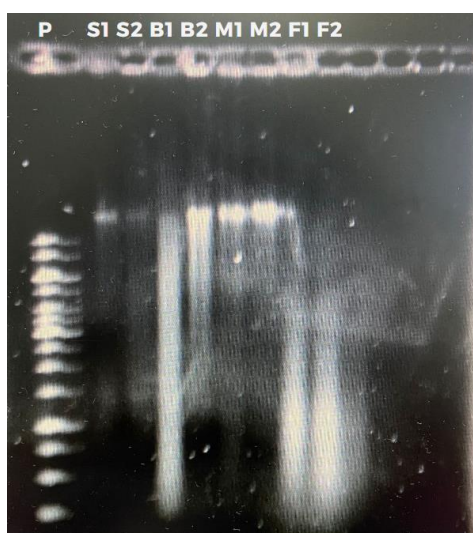


Figura 3: Extração de DNA genômico em gel de agarose 1%, validando a presença de DNA, sendo: P – Peso molecular; S1 – Amostra de sangue congelado; S2 – Amostra de sangue fresco; B1 – Amostra de baço congelado; B2 – Amostra de baço fresco; M1 – Amostra de medula congelada; M2 – Amostra de medula fresca; F1 – Amostra de fígado congelado; F2 – Amostra de fígado fresco.

Através da eletroforese foi possível evidenciar a presença de material genético, pois houve a formação de bandas do peso molecular almejado. Em algumas dessas amostras houve a degradação do material extraído.

Ensaio da q-PCR

Para que seja feita a carga parasitária e padronizado o ensaio da PCR quantitativa em tempo real para o diagnóstico da *L. infantum*, inicialmente foi necessário criar uma curva padrão para dar início à corrida da qPCR, onde utilizamos como base as alíquotas de concentrações conhecidas do nosso alvo molecular. Foram incluídas duplicatas contendo DNA genômico equivalente a 2×10^7 até 2 parasitas, em diluições seriadas de 10 vezes.

Para o Master Mix foram utilizados 4 μ l de cada uma das amostras citadas anteriormente (Figura 3), 1 μ l do primer F, 1 μ l do primer R, 10 μ l do SYBR Green, 4 μ l de água DEPC e 0,4 μ l de ROX, totalizando 20 μ l nessa reação. O equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System foi ajustado para o ciclo inicial de 3 minutos à 95°C (desnaturação), seguido de 40 ciclos de amplificação, sendo 15 segundos à 95°C e 30 segundos à 60°C. Após estas etapas, obtivemos o seguinte resultado (Figura 4):

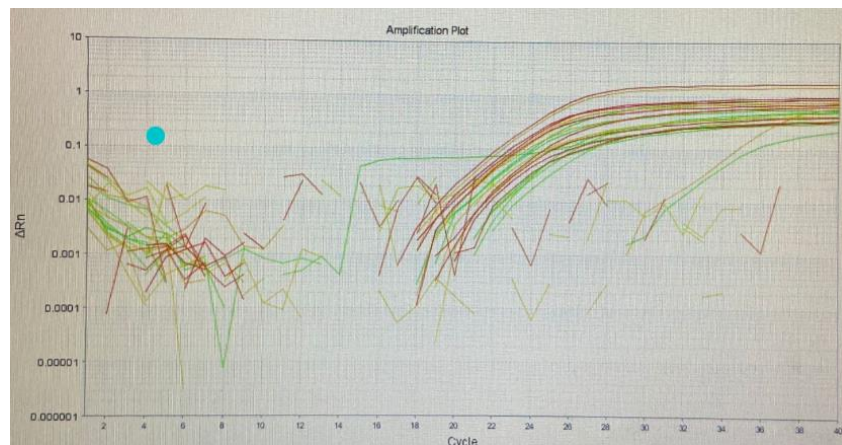


Figura 4: Curva de quantificação do DNA genômico presente em baço, medula, fígado e sangue de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 promastigotas de *Leishmania infantum* por via intraperitoneal. Os mesmos foram eutanasiados após 5 semanas e seus órgãos foram retirados para que fossem realizados a quantificação e extração do DNA.

Por meio da imagem obtida com a realização da qPCR (Figura 4), foi possível notar que houve a amplificação do material genético presente nas amostras extraídas de animais infectados com *Leishmania infantum*.

CONCLUSÕES

Nossos resultados foram totalmente satisfatórios e dentro do que esperávamos. Foram realizadas a curva de proliferação dos promastigotas de *L. infantum*, além da extração de DNA do parasita em diferentes amostras obtidas através de materiais infectados com os mesmos, houve ainda a análise da qualidade e a concentração do DNA genômico extraído. Posteriormente, serão realizados novos testes confirmatórios e então, serão montados protocolos a serem utilizado em rotina de laboratório conforme os objetivos propostos neste projeto.

BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, T. F. (2019). **Estudos fenotípicos de isolados clínicos de *Leishmania infantum***. Dissertação apresentada ao colegiado do curso de pós-graduação em Biologia Animal, como requisito para obtenção do grau de mestre. Campinas, SP.

CAVALCANTI *et al* (2009). **The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood**. The Veterinary Journal, 182(2), 356–358.

COSER *et al* (2020). **Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility in vitro and the treatment outcome in vivo**. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v.14, p.91- 98.

ZORGI *et al* (2020). ***Leishmania infantum* Transfected with Toxic Plasmid Induces Protection in Mice Infected with Wild Type *L. infantum* or *L. amazonensis***. Mol. Immunol. 127, 95–106.

WHO (World Health Organization) (2022). **Leishmaniasis**. Home/News/Fact Sheet/Detail/Leishmaniasis. Disponível em:<<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 de julho de 2023.