

ELISÂNGELA DE FÁTIMA ARRUDA PEREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA *Leishmania* spp.,  
PELAS TÉCNICAS DE RAPD E PCR, NO ESTADO DO PARANÁ E CASOS  
IMPORTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol

Curitiba

2005

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:  
Ao meu esposo, Sabino.  
Se não fosse por ele,  
meu céu cairia.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, pelos muitos ensinamentos, pelas sugestões, pela amizade e dedicação em todos os momentos, pelo auxílio na correção e na elaboração deste trabalho, pela compreensão, pela ajuda no laboratório, pela paciência e apoio profissional. Muito obrigada!

À Professora Dra. Edilene Alcântara de Castro, pelo apoio e profissionalismo e à professora Rosângela Clara Paulino, que sempre esteve pronta a me ajudar.

Ao Professor Dr. João Carlos Minozzo, pela amizade e incentivo e ao Professor Dr. Rogério Kopp, pela ajuda e apoio.

À Professora Dra. Ana Leuch Lozovei, pelo carinho, apoio e amizade e ao Professor Dr. Ennio Luz, pela amizade e palavras de motivação.

Aos Professores, responsáveis por todos os conhecimentos adquiridos.

A amiga Samira Chahad Ehlers, pelo apoio, ajuda, amizade e por fazer meu Abstract.

As amigas, Regiane Szargiki, Fabiane Petry, Dicler Barbieri, Juliana Tracz, Luciane Hennig, Viviane Milczewsk, Cristina Sotomaior , pela dedicação e amizade durante este período. E ao amigo André Melo, pelas alegrias no laboratório.

Aos meus pais, Elso Rigueira de Arruda e Marialba Monteiro Arruda, que dedicaram suas vidas à boa formação de seus filhos e aos meus irmãos André e Márcia que sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu esposo, Antonio Sabino Pereira, que tem sido paciente, companheiro e compreensivo em todos os momentos.

A Deus, pelas bênçãos e tudo de bom que recebi na minha vida.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,  
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa  
mais preciosa que temos”.

Albert Einstein

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURA E LISTA DE SIGLAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Agente etiológico e Ciclo Biológico.....	5
2.2 Sistemática.....	7
2.3 Patologia.....	7
2.4 Diagnóstico.....	9
2.5 Epidemiologia.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Isolados.....	16
3.2 Cultivo.....	16
3.3 Cepas Referência.....	18
3.4 Recuperação da Biomassa.....	18
3.5 Extração de DNA genômico.....	18
3.6 Quantificação do DNA genômico.....	19
3.7 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD).....	19
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
3.9 Eletroforese Horizontal.....	21
3.10 Análise de Dados.....	21
4 RESULTADOS.....	23
4.1 População estudada.....	23
4.2 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD).....	24
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.3.1 Iniciadores MP1L e MP3H.....	32
4.3.2 Iniciadores B1 e B2.....	34
4.3.3 Iniciadores b1 e b2.....	35

4.3.4 Iniciadores a1 e a2.....	37
4.3.5 Iniciadores RV1 e RV2.....	39
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS .....	48
ANEXO I .....	60
ANEXO II .....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Leishmania</i> na forma amastigota.....	5
<b>Figura 2</b> <i>Leishmania</i> na forma promastigota.....	6
<b>Figura 3</b> Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i> .....	6
<b>Figura 4a</b> Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com o iniciador A2.....	25
<b>Figura 4b</b> Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com o iniciador A2.....	26
<b>Figura 5</b> Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com o iniciador A3.....	27
<b>Figura 6</b> Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com o iniciador A9.....	28
<b>Figura 7a</b> Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com o iniciador A10.....	29
<b>Figura 7b</b> Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com o iniciador A10.....	30
<b>Figura 8</b> Dendrograma construído para isolados e cepas referência de <i>Leishmania</i> gerado pelo programa NTSYS software com agrupamento pelo método de UPGMA e coeficiente de distância de Jaccard, usando os dados obtidos pela eletroforese de RAPD com quatros iniciadores:(A2,A3,A9 e A10).....	31
<b>Figura 9</b> Perfil dos produtos de amplificação do kDNA pela técnica de PCR dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com os iniciadores MP1L e MP3H.....	33
<b>Figura 10</b> Perfil dos produtos de amplificação do kDNA pela técnica de PCR dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com os iniciadores B1 e B2.....	35
<b>Figura 11</b> Perfil dos produtos de amplificação do kDNA pela técnica de PCR dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com os iniciadores b1 e b2.....	37
<b>Figura 12</b> Perfil dos produtos de amplificação do kDNA pela técnica de PCR dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com os iniciadores a1 e a2.....	38
<b>Figura 13</b> Perfil dos produtos de amplificação do kDNA pela técnica de PCR dos isolados e cepas referências de <i>Leishmania</i> com os iniciadores RV1 e RV2.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Formas Clínicas de leishmaniose.....	8
<b>Tabela 2</b> Leishmanioses no Novo Mundo: agentes etiológicos e distribuição geográfica (Modificado de MARZOCHI et al., 1999).....	13
<b>Tabela 3</b> Lista de isolados obtidos de humanos e de cães com lesões compatíveis para leishmaniose.....	17
<b>Tabela 4</b> Cepas referência de <i>Leishmania</i> .....	18
<b>Tabela 5</b> Seqüência dos iniciadores utilizados para amplificação aleatória de DNA de <i>Leishmania</i> pela técnica de RAPD.....	20
<b>Tabela 6</b> Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação de DNA <i>Leishmania</i> pela técnica de PCR.....	21
<b>Tabela 7</b> Resultados em porcentagem de três técnicas (pesquisa de amastigota, cultivo em meio N.N.N. e Biologia Molecular) para a detecção de <i>Leishmania</i> em isolados de cães e humanos.....	23
<b>Tabela 8</b> Condição de reação da PCR usando como iniciadores MP1L e MP3H.....	32
<b>Tabela 9</b> Condição de reação de PCR usando como iniciadores B1 e B2.....	34
<b>Tabela 10</b> Condição de reação da PCR usando como iniciadores b1 e b2.....	36
<b>Tabela 11</b> Condição de reação da PCR usando como iniciadores a1 e a2.....	38
<b>Tabela 12</b> Condição de reação da PCR usando como iniciadores RV1 e RV2.....	39

**LISTA DE ABREVIATURAS E LISTA DE SIGLAS**

CUR – Curitiba

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxinucleotídeos trifosfatos

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

Iniciador – primer

ITS – Internal Transcribed Spacer (região interna transcrita)

kDNA – DNA do Cinetoplasto

Ladder – Escada (Marcador molecular)

LC – Leishmaniose Cutânea

*L.(L.) – Leishmania Leishmania*

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

*L.(V.) – Leishmania Viannia*

LV – Leishmaniose Visceral

LPM – Laboratório de Parasitologia Molecular

*Lu. – Lutzomyia*

N.N.N – Novy McNeal e Nicolle

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RNA – Ácido ribonucléico

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SFM – Sistema monocítico fagocitário

TAE – Tris-EDTA-Acetato

Taq DNA polimerase – *Termus aquaticus* DNA polimerase

TE – Tampão de Lise

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UPGMA – Unweighted Pair-Group Method with arithmetic averages

## RESUMO

As leishmanioses compõem um grupo de doenças zoonóticas transmitidas para humanos e animais pela picada de fêmeas de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) e representam um dos maiores problemas de saúde pública em muitos países. A leishmaniose cutânea é endêmica no Brasil, e a incidência vem aumentando nos últimos anos. Os métodos clássicos de diagnóstico, incluindo eletroforese de isoenzimas, anticorpos monoclonais e cariótipos moleculares, são limitados na identificação desse agente por apresentarem alguns inconvenientes como, necessidade de grandes quantidades de promastigotas, procedimentos trabalhosos e dificuldade na interpretação de dados. As técnicas de Biologia Molecular como o RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) e a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), surgem como novas alternativas para o diagnóstico molecular por serem métodos rápidos, precisos e por apresentarem grande sensibilidade e especificidade. Seriam importantes para um tratamento eficaz visando devolver rapidamente a salubridade da população. O objetivo deste trabalho foi estudar e caracterizar a diversidade genética de *Leishmania* no estado do Paraná usando a técnica de RAPD e desenvolver método diagnóstico rápido por técnicas moleculares como PCR. Para estudar a diversidade genética e padronização do PCR foram utilizadas cepas referência da Organização Mundial da Saúde, e cepas isoladas de humanos e cães procedentes de diferentes regiões do Paraná, do Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Argentina. De 52 isolados 3 eram de cepas referência, 41 eram de humanos (38 do Paraná, 1 de São Paulo e 2 da Argentina) e 8 isolados de cães (4 de Minas Gerais, 1 do Ceará e 3 do Paraná). Regiões do DNA genômico foram amplificadas utilizando quatro diferentes iniciadores (primers) randômicos A2, A3, A9 e A10 através de RAPD, visualizados em géis de agarose 1,6% e corados por brometo de etídeo. Através dos perfis originados foi possível detectar polimorfismo genético entre os isolados analisados e agrupar os isolados em três grupos distintos: *L. (V.) braziliensis* (cepa referência e isolados de várias regiões do Paraná e uma de São Paulo), *L. (L.) amazonensis* (cepa referência e isolados da Argentina) e *L. (L.) infantum* (cepa referência e isolados importados de Minas Gerais e Ceará). Esses resultados indicam que o RAPD pode ser usado com sucesso nos estudos de variabilidade em *Leishmania*, e também na diferenciação das espécies. Neste trabalho também foi avaliado o desempenho da PCR enquanto técnica de diagnóstico. Foram usados cinco diferentes iniciadores previamente descritos na literatura para o diagnóstico de *Leishmania*. Dois destes iniciadores (MP1L/MP3H e B1/B2) eram dirigidos para amplificarem seqüências conservadas encontradas no minicirculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*, exclusivos para o Complexo *Leishmania braziliensis*. A PCR usando os iniciadores acima amplificou um produto de 70 pb e 750 pb respectivamente que identificam este Complexo. Os outros dois iniciadores (b1/b2 e a1/a2) são espécie-específica sendo que o primeiro detecta *L. (V.) braziliensis* e o segundo *L. (L.) amazonensis*. Eles foram desenhados baseados nas seqüências dos fragmentos F10 e F4 derivados dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, respectivamente. Estes iniciadores apresentaram um perfil de amplificação de 103 pb e 62 pb, produtos diagnósticos para as espécies de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Um quinto par de iniciadores RV1 e RV2 foi desenhado com base no DNA alvo altamente repetitivo do minicirculo kDNA de *Leishmania donovani sensu lato*, e produziram amplificações de bandas de

145 pb, que é produto que identifica a espécie de *Leishmania infantum* em cães. Portanto, a utilização dos iniciadores para determinar o Complexo junto com os iniciadores para identificar as espécies permitirá um rápido e confiável diagnóstico para diferenciar estas espécies de *Leishmania* que causam a maior incidência da leishmaniose cutânea no Novo Mundo. Assim será possível obter resultados mais rápidos para reduzir a seqüela nos pacientes, e disponibilizar à rede pública de saúde um método diagnóstico mais eficiente.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of zoonotic diseases transmitted to humans and animals by the bite of Phlebotomine sandflies females (Diptera: Psychodidae). These diseases represent an important public health problem for many countries. Cutaneous Leishmaniasis is considered endemic in Brazil and in Parana State, the incidence has been increasing rapidly in recent years. Classic diagnostic methods such as the use of isoenzymes electrophoresis, monoclonal antibodies and molecular cariotypes are considered insufficient for the identification of the agents because they are time consuming, large amount of sample is necessary and the data interpretation is difficult. The Molecular Biology techniques such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and PCR (Polymerase Chain Reaction) have emerged as new alternatives for rapid and precise molecular diagnostic by presenting high specificity and sensitivity, playing an important role for treatment efficacy improving health and population life quality. The objective of the present work was to characterize the genetic diversity and to develop a methodology for diagnostic of *Leishmania* isolates from Parana State by using the molecular techniques RAPD and PCR. Aiming for more rapid results and reducing patient sequels, the present research intends to provide for the public health a sensitive method for Leishmaniasis diagnostic. Hence, reference strains, recommended by World Health Organization, and strains isolated from humans and dogs from different regions of Parana State and States of Ceara, Minas Gerais and Sao Paulo, and Argentina were here utilized. A total of 41 strains were isolated from humans (38 from Parana, one from Sao Paulo and two from Argentina) and 8 dogs (four from Minas Gerais, one from Ceará and 3 from Paraná) were used. Genomic DNA regions were amplified utilizing four different random primers A2, A3, A9 and A10 by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). RAPD products were separated by electrophoresis in 1.6% agarose gels and visualized under UV light after being stained with ethidium bromide. The profile products showed genetic polymorphism among the isolates. They were grouped into three distinct groups: *L. (V.) braziliensis* (reference strain and isolates from different regions of Parana and one of São Paulo), *L. (L.) amazonensis* (reference strain and isolates from Argentina) and *L. (L.) infantum* (reference strain and isolates from Minas Gerais and Ceara). These results indicate that RAPD can be successfully used in studies concerning the variability in *Leishmania* as well as for their species differentiation. As for the PCR technique for *Leishmania* diagnosis, five different primers already described in literature were used. Two of them (MP1L/MP3H and B1/B2) were utilized for amplification of the conserved sequences in the minicircle of *Leishmania* kinetoplast DNA (kDNA), exclusive to *Leishmania braziliensis* Complex. The PCR using the aforementioned primers has amplified a product of 70 bp and 750 bp in which the complex was identified. Two other primers (b1/b2 and a1/a2) used are specie-specific and was employed to detect *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* respectively. They were designed based on sequences of fragments F10 and F4 derived from subgenus *Viannia* and *Leishmania* respectively. These primers showed an amplification profile of 103 bp and 62 bp, products of diagnostic for species *L. braziliensis* and *L. amazonensis*. The fifth (and last) pair of primers RV1 and RV2 were designed based on the target DNA highly repetitive found in the kDNA minicircle of *Leishmania donovani sensu lato*, producing fragments of 145 bp that is the product in which *Leishmania infantum* is identified in dogs. Therefore, the combination of primers used to determine the complex with primers to identify

species will allow a rapid and reliable diagnostic for differentiation of *Leishmania* species, which is the main cause of cutaneous Leishmaniasis in the New World.