



COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DO DNA DE TECIDO ANIMAL PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CANINA

Paulo Marcos Amaral Silva¹, Gabriela Porfirio-Passos², Lenir Cardoso Porfirio³, Marcos Santos Zanini⁴

1. Graduando em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias (paulomarcos1@hotmail.com)
2. Pós-Graduada em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias
3. Professora Doutora da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias
4. Professor Doutor da Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário, s/nº, CEP 29500-000, Alegre, Espírito Santo

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) está relacionada a diversos agentes etiológicos, como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* que são as principais espécies causadoras da enfermidade no Brasil. Os cães, não possuem papel bem definido na epidemiologia da doença, portanto, necessita-se de diagnóstico, preciso e precoce para LTA. O objetivo deste trabalho visa comparar três protocolos de extração de DNA a partir de biópsias de lesões sugestivas de LTA presentes no pavilhão auricular de cães sorologicamente positivos para esta enfermidade. Os protocolos utilizados neste experimento tiveram como base o Fenol-Clorofórmio, Acetato de Potássio e uma associação entre as duas metodologias. Em comparação com os padrões moleculares de concentração de DNA concluiu-se que, o protocolo que utiliza Acetato de Potássio foi o mais indicado para o tipo de tecido empregado, pois em comparação ao padrão molecular de concentração resultou em bandas nítidas e compactas, o que indica ausência ou níveis reduzidos de contaminação.

PALAVRAS-CHAVE: Acetato de Potássio, *Leishmania*, cães.

PROTOCOLS COMPARISON FROM DNA EXTRACTION OF ANIMAL TISSUE FOR DIAGNOSIS OF CANINE TEGUMENTARY LEISHMANIASIS AMERICAN

ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is related to various etiologic agents such as *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* which are the main species that cause disease in

Brazil. Dogs do not have well-defined role in the epidemiology of the disease, therefore, is needed accurate and earlier diagnosis for LTA. This study aims to compare three protocols from DNA extraction from lesions biopsies suggestive of LTA present in ear of dogs serologically positive for this disease. The protocols used in this experiment were based on Phenol-Chloroform, Potassium Acetate and an association between the two methodologies. Compared to the molecular standard DNA concentration was concluded that the protocol that uses Potassium Acetate was the most suitable for the type of tissue used, as compared to standard molecular concentration resulted in sharper bands and compact, which indicates no or low levels of contamination.

KEYWORDS: Potassium acetate, *Leishmania*, dogs.

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são antropozoonoses consideradas grandes problemas de saúde pública por apresentarem um importante complexo de doenças, que possuem altos espectros clínicos e diversidade epidemiológica. Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 350 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco e aproximadamente dois milhões de novos casos surgem a cada ano (BRASIL, 2010).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por diversas espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, que acometem pele e mucosas de humanos e em várias espécies de animais silvestres e domésticos (BRASIL, 2006). A LTA está relacionada a diversos e múltiplos agentes etiológicos, em que, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* são as principais espécies causadoras da enfermidade no Brasil (GRIMALDI & TESH, 1993). No caso da LTA a lesão gerada é resultante da transmissão do protozoário causador da enfermidade por picadas de flebotomíneos (*Lutzomyia* spp.) contaminados previamente ao se alimentarem do sangue de mamíferos silvestres ou outros animais que servem de reservatório da doença (SANTAELLA *et al.*, 2011).

Nos cães, a úlcera cutânea sugestiva costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal (BRASIL, 2010) (Figura 1). No entanto, devido as suas diversas formas clínicas, o diagnóstico da LTA necessita de especificidade, já que se assemelha a alterações dermatológicas causadas por bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, úlceras e infecções fúngicas (AMRO *et al.*, 2012).

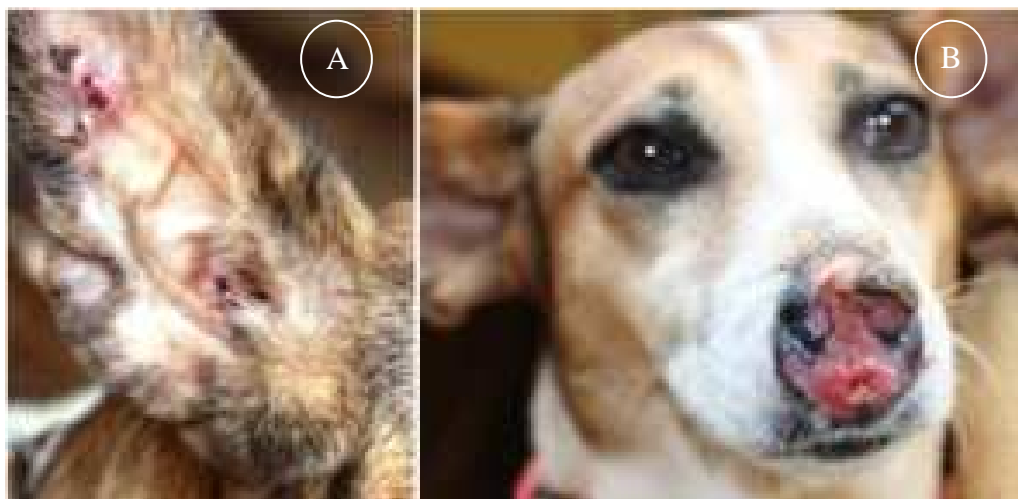


FIGURA 1: (A) Cão com lesão característica de LTA no pavilhão auricular.
(B) Cão com lesão característica de LTA no focinho Fonte: Dr. M.S. Zanini.

Ferramentas moleculares são cada vez mais utilizadas no diagnóstico e em estudos epidemiológicos de leishmaniose tegumentar americana, no intuito de detectar a infecção e caracterizar a espécie do protozoário causador da enfermidade (TALMI-FRANK *et al.*, 2010). O diagnóstico molecular é particularmente útil no caso da LTA em decorrência da necessidade da confirmação parasitológica diante da possibilidade de tratamento. Além disso, as técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da leishmaniose apresentam baixa sensibilidade para detectar anticorpos anti-*Leishmania* nas fases iniciais da infecção, já os métodos moleculares podem revelar a presença do DNA do protozoário muito precocemente, mesmo antes da soroconversão (COURA-VITAL *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos em área de endemismo para a leishmaniose canina, por meio de ferramentas de biologia molecular, demonstram que a prevalência da infecção por *Leishmania* nos indivíduos caninos é mais elevada do que a soroprevalência. O que favorece a hipótese de que a utilização de técnicas moleculares contribui para um diagnóstico sensível, preciso e acurado (MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

No entanto, para uma análise molecular segura, é importante observar as condições ideais de concentração de cada reagente no momento da extração de DNA, pois não existe um protocolo padrão que possa ser aplicado em todas as situações. Outro fator fundamental para extração de DNA de qualidade está relacionado à fonte da qual o material genético será extraído. Deve-se levar em consideração a presença de inibidores da DNA polimerase durante o processo de extração, os quais podem interferir no procedimento subsequente a extração que é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entre estes inibidores estão substâncias que podem estar presentes na extração, como o Fenol – Clorofórmio, o qual pode inibir a ação enzimática; a proteinase K, que pode degradar a DNA polimerase, entre outros componentes presentes tanto na coleta, armazenamento e extração do material que podem interferir no resultado final do exame (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, a técnica de PCR se torna muito adequada para procedimentos de diagnóstico. Estes fatores estão diretamente ligados ao conjunto de *primers* utilizados para a amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR (SALAM *et al.*, 2010).

Dada à importância de um diagnóstico preciso, e sem a interferência de fatores externos e possíveis contaminações inerentes às técnicas aplicadas em rotinas laboratoriais, o presente trabalho visa comparar três protocolos distintos de extração de DNA a partir de biópsias de lesões sugestivas de leishmaniose tegumentar americana em cães sorologicamente positivos, como forma menos onerosa e alternativa aos *kits* comerciais de extração de DNA.

METODOLOGIA

Os protocolos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFES), sob o número de protocolo 006/2009.

Os testes foram realizados em agosto de 2012, para determinar qual o método mais adequado para extração de DNA em amostra de tecido de biópsias de lesões sugestivas de LTA em cães sorologicamente positivos.

A extração de DNA foi feita a partir de biópsias de lesões clinicamente sugestivas de leishmaniose tegumentar americana, em cães sorologicamente positivos para esta doença. Os animais foram previamente sedados com drogas dissociativas (10% de Cetamina 15mg/kg/IM e 20% de Xilasina 2mg/kg/IM) e anestesiados localmente na região em que o procedimento foi realizado, com lidocaína 0,2% (diluída 1:10). Fragmentos de aproximadamente 3cm² da lesão presente no pavilhão auricular foram coletados e armazenados a -20°C até o momento da extração de DNA. Após a biópsia, as amostras foram submetidas a três protocolos diferentes: Fenol – Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001), Acetato de Potássio (BARRERO *et al.*, 2008 – modificado) e uma associação Acetato de Potássio – Fenol – Clorofórmio. O experimento foi realizado em duplicata, ou seja, dois fragmentos de lesão foram submetidos a cada protocolo.

Para o protocolo Fenol – Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001), os fragmentos de lesão foram macerados em Nitrogênio líquido, acondicionados em microtubos e ressuspensos em 500µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100mM NaCl e SDS 1%) e 20µL de proteinase K (20mg/mL), os quais foram incubados em banho-maria a 56°C por duas horas. Posteriormente, o DNA foi purificado com uma extração de Fenol – Clorofórmio (1:1) e uma vez com Clorofórmio. A precipitação foi feita em Isopropanol Absoluto gelado que permaneceu *overnight* a -20°C. Em seguida, o Isopropanol foi retirado por centrifugação e inversão de tubos, e foi possível observar o *pellet* de DNA, o qual foi lavado com Etanol 70%, secado a temperatura ambiente e ressuspensado em 30µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), as amostras foram tratadas com 30µg/mL de RNase, incubadas em banho-maria a 37°C por 60 minutos e armazenadas a -20°C.

Na realização do protocolo que emprega Acetato de Potássio (BARRERO *et al.*, 2008 – modificado), as amostras de tecido foram maceradas em Nitrogênio líquido e depositadas em microtubos juntamente com 550µL de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100mM NaCl e SDS 1%) e 15µL de proteinase K (20mg/mL). Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 60°C por duas horas. Em seguida, 350 µL de Acetato de Potássio 5M foram adicionados a cada amostra e centrifugadas por 30 minutos a 13000rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos em que o DNA foi precipitado com 900µL de Etanol Absoluto gelado e posteriormente refrigerado a -20°C *overnight*. As amostras de DNA foram centrifugadas, lavadas com 1mL de Etanol

70% e ressuspendidas em 100µL de tampão TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA), as amostras foram tratadas com 30µg/mL de RNase, e incubadas em banho-maria a 37°C por 60 minutos. O DNA obtido foi estocado a -20°C.

O terceiro protocolo testado foi uma associação entre os dois anteriores com o acréscimo de alguns procedimentos. Os fragmentos de tecidos provenientes das biópsias foram macerados em Nitrogênio líquido e depositados em microtubos com 500µL de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0, 25mM EDTA, 100mM NaCl e SDS 1%) e 20µL de proteinase K (20mg/mL). Os microtubos foram incubados em banho-maria a 70°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 400µL de Acetato de Potássio 5M e mantidos em gelo por 30 minutos. Posteriormente foram centrifugados a 10000rpm por 10 minutos, a fase líquida foi transferida para outro microtubo onde foram realizadas duas desproteinizações com Fenol – Clorofórmio – Álcool Isoamílico (24:24:1). O DNA foi precipitado com 600µL de Isopropanol absoluto e mantido a -20°C *overnight*. As amostras foram centrifugadas e o *pellet* formado foi lavado com Etanol 70%, por fim, o DNA foi ressuspendido em 30µL de TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA), as amostras foram tratadas com 30µg/mL de RNase, incubadas em banho-maria a 37°C por 60 minutos e armazenadas a -20°C.

A integridade e a qualidade do DNA extraído, pelos três protocolos, foram analisadas em espectrofotômetro (Nanodrop 2000C®) e em gel de agarose 0,7%, corados com Brometo de Etídio 1% (Hexapur®), visualizados sob luz ultravioleta. A quantificação em gel de agarose 0,7% foi feita por comparação da espessura das bandas do DNA das amostras com aquelas obtidas com o marcador de peso molecular derivado do fago Lambda (Fermentas®) de concentração conhecida (25ng/µL), em três volumes diferentes, 1, 2 e 3µL, respectivamente. A eletroforese do gel foi conduzida em 100 volts por uma hora, em tampão TBE 1X (0,89M de Tris, 0,89M de Ácido Bórico e 0,02M de EDTA).

Não houveram análises estatísticas, visto que a caracterização proposta esta de acordo com a nitidez e espessura das bandas geradas em gel de agarose 0,7% a partir do DNA extraído, comparadas com as produzidas pelo marcador de peso molecular empregado no presente trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados foram baseados na análise de dados fornecidos tanto pelo espectrofotômetro quanto pela imagem gerada a partir do gel de agarose 0,7%. As amostras obtidas a partir do protocolo o qual empregou Acetato de Potássio (BARRERO *et al.*, 2008 – modificado), utilizou como referência o marcador de peso molecular aplicado, que geraram bandas nítidas e compactas, e indicaram ausência ou níveis reduzidos de contaminação e degradação do DNA. O protocolo Fenol – Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001), resultou em amostras degradadas e com altos índices de contaminação, já que as bandas geradas a partir das amostras oriundas desta metodologia, em comparação ao marcador de peso molecular, apresentaram arrastes, um padrão que não é adequado para análises moleculares. O procedimento em que foi feita uma associação de Fenol – Clorofórmio e Acetato de Potássio resultaram em amostras de DNA com níveis de degradação em pelo menos uma das duas amostras obtidas, pois foi possível notar em comparação com o padrão molecular de concentração, que a repetição B2 apresentou arraste característico de degradação e/ou contaminação do DNA. No entanto, o índice de degradação foi menor nas amostras resultantes do protocolo em que foi realizada

uma associação entre Fenol – Clorofórmio e Acetato de Potássio, do que o material proveniente da metodologia em que se emprega somente Fenol – Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001) (Figura 2).

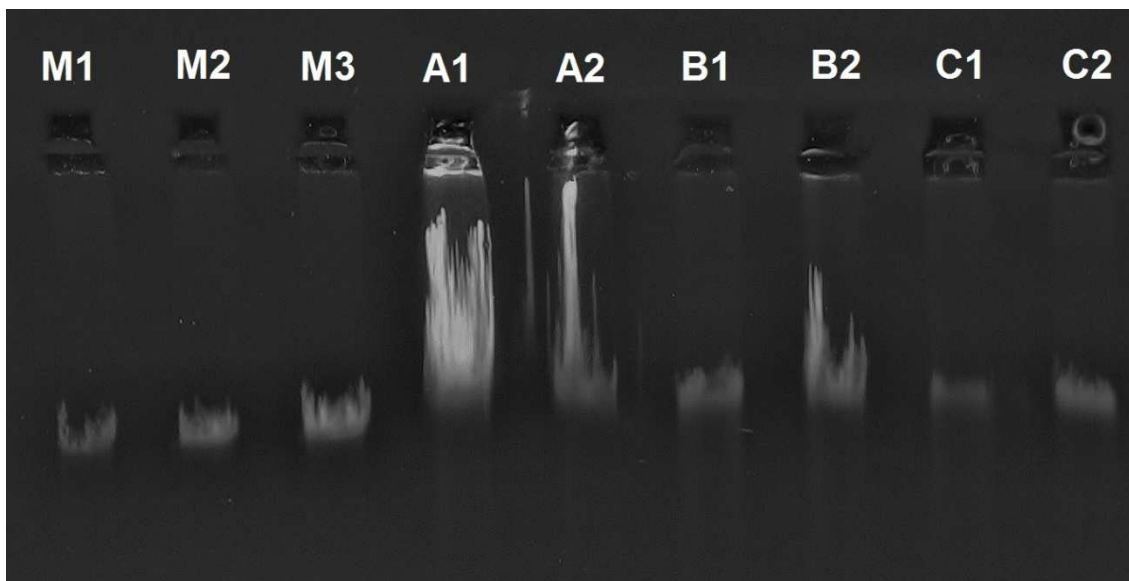


FIGURA 2: Análise da extração de DNA em gel de agarose 0,7%. M1, M2 e M3: marcador de peso molecular derivado do fago Lambda (Fermentas®) de concentração conhecida (25ng/μL), em três volumes diferentes, 1, 2 e 3μL respectivamente. A1 e A2 = repetições do Protocolo Fenol – Clorofórmio; B1 e B2 = repetições do Protocolo de associação de metodologias; C1 e C2 = repetições do Protocolo Acetato de Potássio.

Diversos protocolos de extração de DNA têm sido descritos na literatura, em que, metodologias padronizadas são aplicadas com algumas alterações, com o intuito de eliminar dificuldades específicas da espécie estudada. Vale ressaltar que a forma de coleta e o armazenamento do tecido são considerados de suma importância para a extração de um DNA de qualidade e quantidade satisfatória (SOLLERO *et al.*, 2004). Estes fatores são afetados significativamente pela condição do tecido posteriormente a biópsia, com base nisto, recomenda-se à utilização de material o mais recentemente coletado possível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Fatores que foram seguidos durante a realização do procedimento de coleta e armazenamento das amostras no presente trabalho. O tipo de tecido escolhido também é um fator que pode interferir no resultado final do diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Para SOLANO-GALLEGO *et al.*, (2001), a pele é um tecido importante no que diz respeito à instalação do parasita em cães, e que a PCR de biópsias de pele é um método sensível para diagnosticar a enfermidade. O que é reflexo da interação vetor-parasita-hospedeiro, já que a pele é o tecido mais acessível ao flebotomíneo. O que confere ao tipo de tecido empregado neste experimento, ou seja, fragmentos do pavilhão auricular, submetidos à extração de DNA, amostras que fornecem resultados confiáveis em relações a outros tipos de tecidos.

De acordo com BARERRO *et al.*, (2008), durante extração de material genético da nadadeira de peixe foi alcançada maior quantidade de DNA quando se aplicou protocolo que utilizava sal em comparação com Fenol – Clorofórmio. O que

corroborar com os resultados obtidos neste experimento, já que o protocolo em que se empregou Acetato de Potássio forneceu um DNA de qualidade e em quantidade superior quando comparado à técnica de Fenol – Clorofórmio. Além do que, o protocolo que emprega Fenol – Clorofórmio utiliza uma metodologia muito laboriosa, e são utilizadas substâncias para a extração do DNA consideradas nocivas para o organismo humano como o Fenol e o Clorofórmio. Já o método com Acetato de Potássio é rápido, simples e não tóxico, e resulta numa extração de DNA de boa qualidade e com rendimento satisfatório.

Todavia, PARPINELLI & RIBEIRO (2009) concluíram que, em relação à concentração de DNA, o protocolo Fenol – Clorofórmio foi o recomendado para estudos moleculares em peixes, por apresentar um produto final puro. O que não ocorreu neste estudo, pois a partir de comparações das amostras de DNA obtidas em relação ao padrão molecular de concentração, juntamente com os dados obtidos em espectrofotômetro, o protocolo que emprega Acetato de Potássio (BARRERO *et al.*, 2008 – modificado) utilizado neste estudo forneceu um produto final íntegro e livre de contaminação. Todavia, estes resultados apoiam a ideia de que não há um protocolo padrão que possa ser aplicado para todos os tecidos.

Como alternativa aos *kits* comerciais para extração de DNA de tecido animal, acredita-se que outros protocolos ainda devam ser testados, pois possibilita a redução de custos com diagnósticos.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o protocolo que utiliza Acetato de Potássio (BARRERO *et al.*, 2008 – modificado), é o mais indicado para o tipo de amostra empregada nos testes (biópsia da parte interna do pavilhão auricular), pois em comparação ao padrão molecular de concentração, resultou em bandas nítidas e compactas, o que indica ausência ou níveis reduzidos de contaminação.

AGRADECIMENTOS

A FAPES, CAPES e UFES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AMRO, A.; GASHOUT, A.; AL-DWIBE, H.; ALAM, M. Z.; ANNAJAR, B.; HAMARSHEH, O.; SHUBAR, H.; SCHÖNIAN, G. First Molecular Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Libya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.6, 2012.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância-Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** 2ª ed. atualizada. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2010.

COURA-VITAL W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L. MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 5, n. 8, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: **EMBRAPA**, 1998.

GRIMALDI, G. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiological Review**, v. 6, p. 230-250, 1993.

MARTÍNEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, X.; FRANCINO, O.; ALTET, L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 57, 2011.

PARPINELLI, R.S.; RIBEIRO, R.P. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 22-33, 2009.

SALAM, M. A. et al. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. **Acta tropica**, v. 113, p. 52-55, 2010.

SAMBROOK, J. et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, ed. 2, 1989.

SAMBROOK, J. FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. V. 3 2nd edition. , New York; **Cold Spring Harbor**, 2001.

SANTAELLA, J.; CAMPO, C. B. O.; SARAVIA, N. G.; MÉNDEZ F.; GÓNGORA, R.; GOMEZ, M. A.; MUNSTERMANN, E. L.; QUINNELL, R. J. *Leishmania (Viannia)* Infection in the Domestic Dog in Chaparral, Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 674–680, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.;

PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: **Anais** VI CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, XIII CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA. Brasília. SBZ, 2004.

TALMI-FRANK, D.; NASEREDDIN, A.; SCHNUR, L. F.; SCHÖNIAN, G.; TÖZ, S. Ö.; JAFFE, C. L.; BANETH, G. Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.1, 2010.