

## AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE DNA EM SANGUE PERIFÉRICO PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* POR PCR

BATALINI, Letícia Surian<sup>1</sup> (leticia.sbatalini@gmail.com); CASTRO, Silvana de Oliveira<sup>2</sup> (silvanadeocastro@gmail.com);  
LIMA JUNIOR, Manoel Sebastião da Costa<sup>3</sup> (manoel.costa.lima@outlook.com); NEITZKE-ABREU, Herintha Coeto<sup>4</sup> (HerinthaAbreu@ufgd.edu.br)

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC do curso de Medicina da UFGD

<sup>2</sup>Discente do curso de Medicina da UFGD;

<sup>3</sup>Pesquisador da FIOCRUZ-PE;

<sup>4</sup>Docente da Faculdade de Ciências da Saúde/UFGD e coordenadora do projeto de pesquisa.

### INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*. A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum que produz úlceras nas partes expostas do corpo. A leishmaniose visceral (LV) é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso substancial, inchaço do baço e do fígado e anemia.

O desenvolvimento de PCR fornece uma abordagem poderosa para a aplicação no diagnóstico das leishmanioses. Nos últimos anos têm sido descritos métodos de diagnósticos baseados em PCR com uma ampla gama de sensibilidade e especificidade.

O objetivo do presente projeto foi de comparar três diferentes técnicas de extração de DNA para realização da PCR segundo os critérios: agilidade da extração, custo da técnica, quantidade de DNA purificado e melhor resultado da PCR.

### METODOLOGIA

Foram utilizados três métodos de obtenção de DNA: com Duodecil Sulfato de Sódio 20% (SDS) (Araújo et al., 2009), com Guanidina-Fenol (GT) (Neitzke-Abreu et al., 2013) e KIT comercial (GE HealthCare®). As técnicas foram aplicadas em 30 amostras de sangue periférico de humanos, acrescidas de 10<sup>4</sup> promastigotas de *Leishmania infantum* e o produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro. Após a obtenção e quantificação de DNA, foi realizada a PCR com os iniciadores 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') (Rodgers et al., 1990) para detecção de *Leishmania* spp., e o DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A quantidade de DNA foi obtida em espectrofotômetro, resultando em uma média de 221,2 ng/μL para a extração com GT, 27,3 ng/μL para o SDS e apenas 11,4ng/μL para o KIT.

Quanto ao grau de pureza do DNA é avaliado pela razão entre as absorvâncias a 260nm e 280nm. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteínas. Essa media ótima foi alcançada pelo KIT comercial (1,913), porém as médias da técnica SDS e da GT não se enquadram nesses valores satisfatórios. O critério da razão entre 1,8 e 2,0 para o grau de pureza é importante, mas a eficiência pode variar desde de que não afete a PCR.

O tempo de realização entre os protocolos foi de 50 minutos para o SDS, 1 hora e 35 minutos com GT e 30 minutos com o KIT comercial.

Os protocolos *in house* demonstraram vantagem significativa quanto ao custo, numa extração de 100 amostras os valores foram SDS - R\$ 31,80, com GT - R\$ 53,10 e KIT comercial - R\$ 2.300,00. Os kits comerciais para extração de DNA apesar de serem previamente testados e aprovados, muitas vezes são inviáveis devido ao custo elevado.

Apesar da abundância de kits comerciais a tentativa de se usar protocolos *in house* pode fornecer desempenho similar ou superior sem valores elevados e conseqüentemente maior autonomia financeira. Em nossos estudos essa possibilidade foi confirmada: todas as amostras de DNA apresentaram bandas bem definidas, o que confirma a integridade do DNA.

### CONCLUSÕES

Todas as técnicas atingiram o principal objetivo: uma adequada identificação de *Leishmania* spp em sangue periférico humano, mas a que mostrou melhor resultado em todos os critérios estudados foi a técnica de Guanidina-Fenol (GT).

### REFERÊNCIAS

1. RODGERS, MR; POPPER, SJ; WIRTH, DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.*, 1990.
2. ARAÚJO, FR; et al. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. *Embrapa*, 2009.
3. NEITZKE-ABREU, HC; et al. Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE*, 2013.

Apoio  
financeiro

**UFGD**  
Universidade Federal  
da Grande Dourados

**Fundect**

**CNPq**

Realização:

**UFGD**  
Universidade Federal  
da Grande Dourados

**UEMS**  
Universidade Estadual  
de Mato Grosso do Sul

Parceiros:

**CAPES**

**CNPq**  
Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico

