

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FÁTIMA HERITIER CORVALAN

DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* ATRAVÉS DA  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM SALIVA DE  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional  
de Pós-graduação em Ciências da Saúde –  
Convênio Rede Centro-Oeste, Universidade de  
Brasília, Universidade de Goiás e Universidade  
Federal de Mato Grosso Sul, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Campo Grande

2011

# FÁTIMA HERITIER CORVALAN

## DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM SALIVA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Universidade de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso Sul, para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2011

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio  
Presidente  
Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yvone Maia Brustoloni  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nára Rejane Santos Pereira  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Dr. Renato Andreotti e Silva  
EMBRAPA Gado de Corte

---

Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva  
Suplente  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

*Dedico este trabalho a Deus, o princípio, o meio e o fim ...  
Aos meus pais Demétrio e Rosita, in memoriam, onde tudo começou ...  
Ao meu filho Víctor Hugo, a razão da minha vida ...  
Com todo amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Pai de todos nós por iluminar sempre o nosso caminho.

À Professora Dra Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, incansável na arte de pesquisar e ensinar, pelos ensinamentos, ética, profissionalismo e apoio incondicional. Com ela tenho aprendido muitas lições, mas destaco o amor aos pacientes e ao estudo das doenças como a leishmaniose. Agradeço a confiança que depositou na minha pessoa e a sua orientação nesta pesquisa. O carinho e dedicação com que me apoiava nas horas de necessidade, sempre esmerada nas suas atitudes, foram de muito valor e estímulo. Honradez e ética são princípios em sua vida. Como foi bom tê-la encontrado. Meu mais profundo agradecimento. Que Deus a abençoe.

À Professora Doutora Yvone Maia Brustoloni pelo apoio irrestrito desde a escolha do fluído salivar como substrato para pesquisa e nas horas de dúvida. Em todos os momentos que senti necessário, me socorria prontamente sempre solícita e carinhosa. Agradeço a disponibilidade constante em auxiliar, ensinar e sugerir idéias no desenvolvimento do projeto. Seu apoio foi muito valioso. Meu mais profundo agradecimento. Que Deus a abençoe.

Ao pesquisador Doutor Renato Andreotti por ter acreditado quando falei para ele da possibilidade da PCR em saliva assim como pelo apoio na parte técnica como também na elaboração do projeto da FUNDECT. Obrigada pela atenção, pelo laboratório e pelo projeto, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho. Meu mais profundo agradecimento. Que Deus o abençoe.

Ao pesquisador Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior pelas realizações da PCR. Se não fosse ele, as reações não seriam realizadas. Foi fundamental na execução deste projeto. Meu mais profundo agradecimento. Que Deus o abençoe.

Aos pacientes com humildade e credibilidade, que solícitos, aceitaram participar deste estudo. Meu mais profundo agradecimento. A benção de Deus Pai.

Aos meus pais Demétrio e Rosita, sempre incentivadores do meu estudo e foram quem norteou minha vida em todos os sentidos. Com eles conheci o princípio da ética, moral, solidariedade, respeito e amor. Agradeço por ser essa pessoa que sou hoje. Obrigada meus pais por vocês terem feito parte da minha vida. Com saudades e amor, que Deus os tenha em seus braços.

Ao meu filho Víctor Hugo, pela sua compreensão, apoio, incentivo e dedicação. Pela compreensão quando da necessidade de minha ausência e momentos que mesmo presente, estava ocupada e não podia dedicar a atenção de uma mãe a seu filho. Com amor. Que Deus o abençoe.

À minha família, principalmente minhas irmãs Magdalena, Ana Rosidelma e Rosana e ao meu sobrinho Thiago, pelo apoio, principalmente quando da minha ausência, nos cuidados do meu filho. Que Deus os abençoe.

À faculdade de Odontologia da UFMS, meu local de trabalho, por proporcionar a oportunidade da realização dessa pós-graduação.

Ao Hospital Dia Professora Esterina Corsini, NHU/UFMS pelos pacientes.

À Fundação para o Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte e ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (BIOMOL/UFMS) pelo apoio laboratorial.

A todos aqueles que de uma ou outra forma colaboraram na realização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos.

*“A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível.”*

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma parasitose de grande repercussão médica e social no Brasil. Como seu diagnóstico muitas vezes é difícil devido à escassez parasitária nas amostras clínicas e à baixa sensibilidade das técnicas tradicionais, modernas tecnologias com alvo na identificação genômica como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido utilizadas na investigação diagnóstica da doença. Diante da possibilidade do encontro de parasitas em vários fluídos corporais no diagnóstico das leishmanioses e sendo a saliva um produto do organismo humano, cogitou-se a possibilidade da identificação de *Leishmania* nesse tipo de material orgânico. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a possibilidade da detecção do DNA de *Leishmania* através da PCR na secreção salivar de pacientes com o diagnóstico de LTA. Coletou-se, antes de instalado o esquema terapêutico, a saliva de quatro pacientes com LTA para a realização da PCR. Quando utilizados os primers b1 e b2, específicos para a espécie *L.(V.) braziliensis*, a detecção de fragmentos de aproximadamente 103pb, tamanho estimado para essa espécie, determinou resultados positivos nas amostras de secreção salivar de um paciente com a forma cutânea da doença e de outros dois com a forma mucosa. Demonstrou-se, pela primeira vez, ser possível a amplificação de DNA de *Leishmania* na saliva de pacientes com LTA, identificando-se a espécie presente. Não existem relatos na literatura médica sobre a presença dos agentes etiológicos da LTA no fluido oral de pacientes com a enfermidade, o que confere originalidade ao estudo. Novas pesquisas são necessárias com um maior número de participantes de forma a padronizar o tipo de coleta, verificar a sensibilidade e especificidade do teste e assim demonstrar a utilidade do fluído salivar como substrato não invasivo a ser utilizado para investigação diagnóstica da LTA através da PCR.

Palavras-chave: Saliva; Reação em Cadeia da Polimerase; *Leishmania*; Diagnóstico não invasivo; Leishmaniose Tegumentar Americana.

## ABSTRACT

The Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a parasitic disease of great medical and social repercussions in Brazil. As its diagnosis is often difficult due to lack parasite in clinical samples and the low sensitivity of traditional techniques with modern technology to identify genomic targets as the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been used in the laboratory diagnosis of disease. Facing the possibility of the presence of parasites in various body fluids in the diagnosis of leishmaniasis and the saliva is a product of the human body, he considered the possibility of identification of Leishmania in this type of organic material. The aim of this study was to evaluate the possibility of detection of Leishmania DNA by PCR in the salivary secretion of patients with the diagnosis of ACL. Was collected before installing the regimen, the saliva of four patients with ACL for PCR analysis. When used the primers b1 and b2, specific to the species *L. (V.) braziliensis*, the detection of fragments of approximately 103pb, estimated size for this species, determined positive results in samples of saliva from a patient with the cutaneous form of disease and two with the mucosal form. It was demonstrated for the first time, be possible to amplify Leishmania DNA in the saliva of patients with ATL, identifying the species present. There are no reports in the medical literature about the presence of the etiologic agents of leishmaniasis in the oral fluid of patients with the disease, which gives originality to the study. Further research is needed with a larger number of participants in order to standardize the type of collection, verify the sensitivity and specificity of the test and thus demonstrate the usefulness of salivary fluid as a noninvasive substrate to be used for diagnosis of ACL using PCR.

Keywords: Saliva; Polymerase Chain Reaction; Leishmania; Non-invasive diagnostic; American Cutaneous Leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1 – Face lateral direita do paciente n°1 com 2 lesões pápulo-infiltrativas na região pré-auricular e 1 pápulo-vesiculosa na região cervical .....	46
Figura 2 – Face lateral esquerda do pacienten°1 com cicatriz atrófica deprimida na têmpora, lesões pápulo-infiltrativas na região pré-auricular, lesão descamativa no ângulo da boca e pustular na região mentoniana.....	46
Figura 3 – Cicatriz de lesão leishmaniótica circundando o tornozelo direito de aspecto atrófico, superfície lisa e hipocrômica no paciente n°2 portador de LCM ....	48
Figura 4 – Infiltração difusa do nariz no paciente n°2 portador de LCM.....	48
Figura 5 – Lesão cicatricial sugestiva de LC no antebraço esquerdo do paciente n°3 com LCM.....	50
Figura 6 – Infiltração mucosa do palato mole com lesões granulomatosas no paciente n°3 com LCM.....	50
Figura 7 – Infiltração nasal e labial superior no paciente n°4 com LM .....	52
Figura 8 – Lesões granulomatosas no palato mole no paciente n°4 com LM .....	52
Figura 9 – Infiltração nasal com ulceração na parte anterior do septo, base e asas nasais após 1 semana de tratamento com desoxicolato de anfotericina B no paciente n°4 com LM .....	52
Figura 10 – Infiltração do lábio superior, úlceras labiais, na língua e narina direita após 1 semana de tratamento com desoxicolato de anfotericina B no paciente n°4 com LM .....	52
Figura 11 – Melhora da infiltração nasal e labial com cicatrização das úlceras após 20 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal no paciente n°4 com LM.....	52
Figura 12 – Regressão das lesões mucosas no palato após 20 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal no paciente n°4 com LM .....	52
Figura 13 – Cura clínica das lesões nasais e labiais no paciente n°4 com LM após 3 meses da conclusão do tratamento antileishmaniótico .....	53
Figura 14 – Cura clínica das lesões orais no paciente n°4 com LM após 3 meses da conclusão do tratamento antileishmaniótico.....	53

- Figura 15 – Diagrama do fluxo da dinâmica na fase de coleta dos substratos para realização da PCR em pacientes com diagnóstico de LTA do estudo .....55
- Figura 16 – Produtos da PCR provenientes de amostra de secreção salivar de pacientes com LC e LV, demonstrando amplificação por PCR de *L.(V.) braziliensis*, em substrato de um paciente com LTA. Canaletas 1,3,4,5,6 e 7 pertencentes às amostras dos pacientes com LV; canaleta 8 – amostra do paciente com suspeita de recidiva de LTA (n°1); canaleta 2 – controle saudável; canaleta 9 – controle positivo; canaleta 10 – controle negativo; canaleta 11 – marcador que determina o tamanho molecular.....62
- Figura 17 – Eletroforese identificando os produtos da amplificação da PCR em amostras da saliva dos pacientes n°2 e n°3 com LCM usando os iniciadores b1 e b2, cepa referência *L.(V.) braziliensis*. Canaleta 1 – marcador que determina o padrão de tamanho molecular; canaleta 2 – saliva do paciente n°2; canaleta 3 – saliva do paciente n°3; canaleta 4 – esfregaço da lesão do palato do paciente n°3 coletada com cotonete; canaleta 5 – controle positivo; canaleta 6 – controle negativo .....62
- Figura 18 – Eletroforese identificando os produtos da amplificação da PCR em substratos provenientes do paciente n°4 com LM, usando os iniciadores b1 e b2, cepa referência *L.(V.) braziliensis*. Canaleta 1 – marcador que determina o padrão de tamanho molecular; canaleta 2 – esfregaço da lesão da mucosa nasal coletada com cotonete; canaleta 4 – substrato da secreção salivar coletada com cotonete; canaleta 5 – controle positivo; canaleta 6 – controle negativo .....63
- Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando amplificação de DNA de *L.(V.) braziliensis* na canaleta 3 – secreção salivar do paciente n°2; canaleta 4 – secreção salivar do paciente n°3; canaleta 5 – lesão do palato colhida com cotonete e mantida sem o meio de transporte (gel) do paciente n°3; canaleta 10 – substrato de lesão nasal do paciente n°4 coletado com cotonete e conservado com o meio de transporte do swab (gel) .....63

## LISTA DE QUADROS

	p.
Quadro 1 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas no primeiro episódio (2007) e na recidiva (2008) do paciente n°1 com LC .....	47
Quadro 2 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas no primeiro episódio de LC (1997), nas recidivas (1999, 2000 e 2002) e nos episódios de LCM (2004, 2006, 2008 e 2009) do paciente n°2 com LCM .....	49
Quadro 3 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas no episódio de LC em 2004 e no de LCM em 2009 do paciente n°3 com LCM.....	50
Quadro 4 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas do paciente n°4, inicialmente diagnosticado como portador de processo neoplásico (1998-2008), posteriormente confirmando-se a LM.....	51
Quadro 5 – <i>Primers</i> para as espécies <i>L.(L.) chagasi</i> , <i>L.(L.) amazonensis</i> e <i>L.(V.) braziliensis</i> utilizados na PCR para identificação de DNA de leishmânia na saliva e nos raspados das lesões mucosas dos pacientes com diagnóstico de LTA atendidos no Hospital Dia Professora Esterina Corsini do NHU/UFMS.....	57
Quadro 6 – Elementos e condições da PCR utilizando os <i>primers</i> para as espécies <i>chagasi</i> , <i>amazonensis</i> e <i>braziliensis</i> em substratos de pacientes com diagnóstico de LTA .....	59
Quadro 7 – Ciclos da PCR utilizando os <i>primers</i> para as espécies <i>chagasi</i> , <i>amazonensis</i> e <i>braziliensis</i> em substratos de pacientes com diagnóstico de LTA....	59
Quadro 8 – Relação identificação espécie <i>Leishmania</i> /substrato utilizado para amostras/pacientes e amplificação do DNA de <i>L.(V.) braziliensis</i> .....	61
Quadro 9 – Relação resultados da PCR nas amostras dos pacientes com LTA do estudo .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

A – Adenina

AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome*

C – Citosina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxirribonucleotídeos trifosfatos

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNDECT – Fundação para o Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia

G – Guanina

°C – Graus centígrados

h – horas

HIV – *Human immunodeficiency virus*

IRM – Intradermoreação de Montenegro

IFI – Imunofluorescência Indireta

Kg – quilograma

*L.* – *Leishmania*

LC – Leishmaniose cutânea

LCM – Leishmaniose cutâneo mucosa

LM – Leishmaniose mucosa

LT – Leishmaniose tegumentar

LTA – Leishmaniose tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

mg – miligrama

MG – Minas Gerais

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

min – minuto

ml – Mililitro

mM – milimolar

MS – Mato Grosso do Sul

n° – número

NHU – Núcleo de Hospital Universitário

Ng – nanograma

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de base

pMol – picoMol

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP – PCR- *restriction fragment length polymorphism*

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – *transcriptase reversa-PCR*

s – segundos

S. – *streptococcus*

T – Timina

TAD – Teste de aglutinação direta

TCILE – Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido

U – unidade

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UV – ultravioleta

V. – *Viannia*

µl– microlitro

% – Porcento

## SUMÁRIO

	p.
CAPÍTULO I	
1 INTRODUÇÃO .....	15
CAPÍTULO II	
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana	
2.1.1 A Doença .....	19
2.1.2 Aspectos epidemiológicos .....	21
2.1.3 Etiologia .....	22
2.1.4 Expressão clínica .....	24
2.1.5 Diagnóstico .....	27
2.2 PCR	
2.2.1 Considerações sobre PCR .....	30
2.2.2 PCR e Leishmaniose	
2.2.2.1 PCR no diagnóstico da LTA .....	30
2.2.2.2 Sensibilidade da PCR .....	36
2.2.2.3 PCR na identificação parasitária .....	37
2.2.2.4 Comparação da PCR com métodos tradicionais de diagnóstico da LTA ....	39
2.2.3 PCR no fluido salivar .....	40
CAPÍTULO III	
3 OBJETIVOS	
3.1 Geral .....	44
3.2 Específicos .....	44
CAPÍTULO IV	
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 Sujeitos da pesquisa .....	45
4.2 Pacientes incluídos na fase preliminar do estudo .....	53

4.3 Procedimentos clínicos	
4.3.1 Avaliação clínica dos sujeitos da pesquisa e coleta da secreção salivar .....	54
4.3.2 Exame intra-oral.....	54
4.3.3 Coleta do material das lesões .....	55
4.4 Extração do DNA .....	56
4.5 Controles.....	57
4.6 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR .....	57
4.7 Análise dos produtos resultantes da PCR .....	59
4.8 Aprovação pelo Comitê de Ética .....	60
4.9 Financiamento.....	60
CAPÍTULO V	
5 RESULTADOS .....	61
CAPÍTULO VI	
6 DISCUSSÃO .....	65
CAPÍTULO VI	
7 CONCLUSÕES .....	70
REFERÊNCIAS .....	71
APÊNDICE A – Ficha clínica.....	79
APÊNDICE B – Termo de consentimento informado, livre e esclarecido.....	81
APÊNDICE C – Declaração de consentimento .....	83
APÊNDICE D – Declaração do pesquisador .....	84
APÊNDICE E – Short communication aceita para publicação .....	85
ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	90
ANEXO B – Apresentação em Congresso Internacional.....	91
ANEXO C – Aceite para publicação da short communication .....	94
ANEXO D – Resumo short communication publicado .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

O impacto das infecções parasitárias entre os seres humanos é enorme. Diferenças no comportamento da evolução das moléstias infecciosas revelam a complexidade dos fatores envolvidos em sua determinação. Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada com parasitas.

As leishmanioses estão no quadro das protozooses heteroxênicas com alta prevalência em regiões tropicais e neotropicais. São afecções complexas que se desenvolvem como resultado da infecção por diferentes espécies do protozoário intracelular *Leishmania*, parasita pró-ativo por necessitar intermediário (vetor) para ter acesso ao ser humano. Os responsáveis pela transmissão do parasita são pequenos insetos hematófagos denominados flebotomíneos.

Patologias não contagiosas do grupo das moléstias infecciosas, as leishmanioses aparentemente subsistirão por longo tempo no nosso meio em razão de terem sido subestimadas por muitos anos. Afecções típicas do passado e do subdesenvolvimento persistem ou ressurgem nos contextos atuais. Inegavelmente, a urbanização e expansão das leishmanioses a enquadram entre as doenças emergentes e reemergentes, com aumento da incidência nas últimas décadas. Por este incremento faz-se necessário o aperfeiçoamento de um sistema diagnóstico diferencial, precoce, preciso, efetivo e de alta sensibilidade.

As leishmanioses constituem um complexo de doenças que atingem o homem, determinadas por diferentes espécies de parasitas morfológicamente semelhantes, diferenciados por métodos bioquímicos, imunológicos, moleculares ou mesmo patológicos. A expressão clínica da leishmaniose está vinculada à linhagem do patógeno envolvido e à relação parasita-hospedeiro pela habilidade imunogênica, ou seja, a faculdade do agente infectante em estimular uma resposta imune. Além da espécie do parasita, o vetor, a constituição genética e imunológica do hospedeiro, também são fatores predisponentes para as manifestações clínicas (1). A forma mais agressiva é a Leishmaniose visceral (LV) ou Calazar, doença sistêmica que pode ser fatal se não tratada. A do tipo tegumentar que afeta a pele e mucosa, denominada de Leishmaniose tegumentar (LT), conhecida no Brasil como LT Americana (LTA), pode apresentar-se na forma de Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucosa (LM) ou Leishmaniose cutâneo mucosa (LCM).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a enfermidade (2). Aproximadamente dois milhões de novos casos ocorrem por ano, sendo 1,5 milhões de formas tegumentares e 500.000 de formas viscerais (2,3,4).

Desde os primórdios do Século XX, quando a colonização agrícola expunha trabalhadores aos vetores da doença, a LTA já era uma parasitose de grande repercussão social e médica no Brasil (5). Na década de 40, afirmava-se que a progressão da derrubada de matas e a diminuição das possibilidades de criação dos insetos transmissores, aliada à imunidade adquirida pela infecção, resultariam na diminuição da enfermidade. Entretanto, o que se observou e ainda se verifica, é o recrudescimento da doença, aumentando consideravelmente em todo o mundo.

O Brasil, por ser um país tropical e região de alta biodiversidade, apresentou a partir de 2003, a expansão geográfica da enfermidade, quando foi confirmada a autoctonia da LTA em todos os estados da Federação (2).

Passados mais de 100 anos da primeira descrição da LTA no Brasil, apesar da evolução de métodos diagnósticos, a afecção continua vivamente presente na nosologia atual, constituindo-se em importante problema de saúde pública, em diversas regiões do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Nomeada como "Doença Órfã" e, em razão de ser praticamente inexistente nos chamados países do Primeiro Mundo, se encontra na lista das enfermidades negligenciadas, fato que justifica a LTA não ser alvo de interesse em pesquisa por grandes grupos científicos (6). Essa ocorrência reforça ser a moléstia, em grande parte, um problema associado à pobreza e, portanto, oferece pouco incentivo comercial para as companhias farmacêuticas, protelando-se ainda mais o incremento de medicamentos efetivos e baratos para tratamento (6).

Os clássicos métodos disponíveis para o diagnóstico das leishmanioses não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas. Para diagnosticar estas enfermidades, é necessário avaliar a história epidemiológica (procedência e aspectos do habitat) e social (hábitos e profissão), como também os aspectos clínicos (sinais e sintomas), usar métodos laboratoriais (pesquisa parasitológica, testes sorológicos e diagnóstico imunológico) e, nas últimas décadas do século XX, os testes moleculares. Para se chegar ao diagnóstico final, habitualmente a interassociação epidemiológica, social, clínica e laboratorial é imperativa.

Entre os métodos moleculares desenvolvidos com alta sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicados no diagnóstico taxonômico das leishmanioses, a reação em cadeia da polimerase (PCR) - *Polymerase Chain Reaction* - apresenta-se como opção nesse grupo, constituindo uma ferramenta cada vez mais valorizada (7,8,9). Quando comparada aos métodos tradicionais, a PCR fornece um resultado em menor tempo (9).

A metodologia da PCR é uma técnica relativamente simples, baseada na amplificação *in vitro* de um fragmento de ácido desoxirribonucléico (DNA) devido à extensão simultânea das cadeias pela ação de *primers* complementares (10). PCR consiste em fazer cópias de DNA utilizando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA.

Após o desenvolvimento da PCR, quantidade insuficiente de DNA deixou de ser limitação em biologia molecular e no diagnóstico clínico de doenças infecciosas bacterianas, virais e parasitárias. A partir de amostras de diferentes materiais biológicos como sangue, urina, fluídos corporais, cabelo e tecidos, pode-se amplificar qualquer seqüência específica de DNA presente. O avanço concreto na compreensão gênica permitiu que a ciência encontrasse na tecnologia molecular, um forte aliado para a investigação diagnóstica de inúmeras enfermidades, com efetividade e sensibilidade em relação às outras técnicas utilizadas para diagnóstico.

A aplicabilidade clínica da técnica é bastante extensa. Por ser dotada de alta sensibilidade, a PCR é capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma do DNA de uma *Leishmania*, o equivalente a 1/10 do parasita (11).

O diagnóstico de certeza de um processo infeccioso por protozoários é feito pelo encontro do microorganismo ou de seus produtos nos tecidos ou fluídos biológicos dos hospedeiros, constatado antes do início do tratamento (2).

O agente etiológico da LV pode ser detectado em secreções ou superfícies das mucosas nasais e orais (12), sangue (13) e urina (14) de seres vivos quando infectados e, os da LTA, em esfregaços das lesões (15,16), escarificação e aspirados das bordas das úlceras, biópsias (2,3,4,6,11,17), *imprints* de tecidos da lesão (15) e cultura (16) *in vitro* e *in vivo* (11).

Diante da possibilidade do encontro de parasitas em vários fluídos corporais no diagnóstico das leishmanioses e sendo a secreção oral um produto do organismo humano, cogitou-se a possibilidade da identificação de *Leishmania* nesse tipo de material orgânico.

O uso da saliva como substrato diagnóstico avançou extraordinariamente nas últimas décadas transformando-se de teoria em realidade. É um fluido singular cujo interesse em torno deste líquido está no fato de ser uma amostra biológica de fácil obtenção e baixo custo que, em termos de biossegurança, o risco de contaminação é praticamente inexistente. Um importante fato a ser considerado é o de que a coleta de secreção salivar é um procedimento simples e, principalmente, não invasivo. Por ser dispensada diretamente da boca do paciente no recipiente utilizado para transporte e conservação, o processo é relativamente rápido, barato, além de diminuir a possibilidade de ocorrência de falhas técnicas por não necessitar intervenção direta de técnicos durante o processo de obtenção da amostra para investigação diagnóstica.

A saliva é um humor aquoso resultante da atividade das glândulas salivares, composta na maior parte por água e, em quantidade expressiva por substâncias orgânicas e inorgânicas, componentes sangüíneos, células, secreções gengivais, microorganismos, produtos de metabolismo e excreção da flora bucal. No fluido salivar pode-se encontrar desde resquícios de DNA do próprio paciente como também detectar possível presença de qualquer outro material genético aí presente.

O rápido progresso das tecnologias médicas, em particular das técnicas moleculares permitiu um maior aproveitamento da saliva como meio diagnóstico. Por ser uma metodologia relativamente rápida cuja principal característica é a elevada sensibilidade e especificidade, essas propriedades habilitam a PCR como técnica qualificada para uma investigação de rotina nesse fluido corporal, contribuindo neste contexto, para que a secreção salivar possa ser considerada válida entre o arsenal de amostras para exames diagnósticos.

Considerando-se esses aspectos, propôs-se, através deste trabalho, verificar a possibilidade de utilização de ferramentas moleculares específicas como a PCR para verificar e analisar a presença de DNA de *Leishmania* no fluido oral de pacientes com diagnóstico de LTA. Como não há relatos na literatura científica sobre a presença dos agentes etiológicos da leishmaniose na secreção salivar de pacientes com a enfermidade, o propósito desse estudo foi envolver o fluido salivar como recurso auxiliar na investigação diagnóstica da LTA a partir de amostra não invasiva.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

#### **2.1.1 A Doença**

A LT é uma parasitose de distribuição mundial que, apesar de existirem métodos estabelecidos para seu diagnóstico, protocolo para o tratamento e controle de vetores, a carga por morbidade pela enfermidade no mundo persiste e inclusive tende a aumentar (18).

É uma patologia de alta prevalência em muitas áreas tropicais, neotrópicas e subtropicais mundiais (6,11). Em vários países da América Latina (19) como em alguns do Novo Mundo (11), a LT constitui um grave problema de saúde pública pelo impacto negativo nas esferas psicológica, sociocultural e econômica (19). Mesmo que tenha sido há muito tempo endêmica nos países em desenvolvimento, a globalização econômica e o aumento de viagens internacionais favoreceram a ocorrência da leishmaniose em países desenvolvidos (20).

A suscetibilidade à afecção é universal e a doença não confere imunidade ao paciente (4). É considerada como um processo infeccioso não contagioso, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosa da nasofaringe, de forma localizada ou difusa (21). Primariamente manifesta infecções de caráter zoonótico, afetando humanos e, de maneira secundária, seus animais domesticados (21).

Segundo dados do Ministério da Saúde, a enfermidade está entre uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido sua ampla distribuição pelo território nacional, à ocorrência de formas clínicas graves e pelas dificuldades referentes tanto ao diagnóstico como ao tratamento (22).

A relevância da afecção reside não somente na sua alta incidência e extensa distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (11).

Patologia com comportamento endêmico, a LTA tem seu valor fundamentado na expansão e nos diferentes quadros clínicos complexos conhecidos que, se não diagnosticados ou incorretamente diagnosticados, podem evoluir determinando severas mutilações (23).

É uma das infecções dermatológicas mais significantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas deformidades e seqüelas que pode acarretar (2,24), pelo envolvimento psicológico, com reflexos na esfera social e econômica (2), além da magnitude, dificuldades terapêuticas, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle (24).

A LT é reconhecida como grave zoonose endêmica em razão da abrangência demográfica, associação com outras enfermidades e significativos níveis de morbidade. A doença é a expressão clínica da resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico ou de seus antígenos. Independentemente da terapia empregada e da forma de apresentação cutânea ou mucosa, a patologia é dependente da resposta imune. (20)

A leishmaniose está relacionada aos fatores de virulência do próprio parasita (espécie *Leishmania* infectante) e da resposta imune estabelecida pelo hospedeiro (homem). Para Medeiros e Roselino (1999) não só esses fatores, mas também a variedade de parasitas que afetam diferentes populações, assim como a relação daqueles com vetores e animais reservatórios característicos, proporcionam amplo espectro de síndromes. Portanto, dependendo da espécie infectante e da resposta imunocelular do indivíduo infectado, podem ser observadas desde uma infecção subclínica, lesões localizadas, generalizadas até a forma anérgica. (25)

Entre os importantes aspectos de doenças como a leishmaniose ressaltados por Reis *et al.* em 2006, está a imunidade concomitante resultante do longo tempo de persistência do patógeno no hospedeiro. Essas infecções podem levar a uma resposta imunológica por parte do indivíduo e, paralelamente a essa reação, a sobrevivência e a persistência parasitária dependem de escape da resposta imune adaptativa. A intensidade da resposta humoral parece estar relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção. (26)

O tratamento para a LTA é baseado em drogas como os antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metilglucamina (2,4,6,11,20,27,28) e stibogluconato (11), o isotionato de pentamidina e anfotericina B (2,4,6,20,27,28). No Brasil o medicamento de primeira escolha (2,4,11,20,27,29), e mais comumente usado é o N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) (20), indicado para tratar todas as expressões clínicas da LTA, embora as formas mucosas exijam maior cautela, podendo responder mais lentamente e apresentar maior possibilidade de recidiva (2,4,27), no entanto, apresenta limitações: não pode ser administrado a mulheres grávidas e

pacientes com insuficiência renal ou hepática, arritmia cardíaca e doença de Chagas (29). Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial ou na impossibilidade de seu uso, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina (2,4,11,20,27,28). As diferenças responsivas às drogas leishmanicidas podem estar relacionadas às formas da doença e, pelas freqüentes variações na resposta terapêutica, pesquisadores estão empenhados na busca de medicamentos mais efetivos e terapias menos tóxicas (20).

### **2.1.2 Aspectos epidemiológicos**

Diversos aspectos epidemiológicos estão relacionados à expansão da enfermidade. O surgimento de epidemias provavelmente está relacionado à ecologia humana e a contribuição relativa entre associação de fatores ambientais gera predisposição à doença e distribuição da infecção (6). Nas últimas décadas, análises epidemiológicas sugeriram mudanças comportamentais na difusão da LTA (2,4). O denominador comum é a população rural (30) e, ainda que a população mais afetada segue sendo homens jovens e adultos por exposição ocupacional, a doença ganha importância no contexto doméstico, afetando crescente número de mulheres e crianças (2,4,9). Alterações no ecossistema (9) e modificações sócio-ambientais (3) são fatores indutivos à urbanização e peridomiciliação da parasitose (21).

Enfermidade emergente e reemergente, a leishmaniose tem um aumento relacionado entre fatores demográficos, sociais e econômicos como também mobilidade populacional, induzindo à promoção de adaptações ao meio pelos microorganismos responsáveis pela doença, dificultando seu diagnóstico e tratamento por métodos convencionais (9). A propagação da LT é relativa ao processo desordenado de colonização, permanecendo endêmica em vastas áreas da América Latina, acometendo com maior freqüência, trabalhadores que invadem as florestas tropicais ou que morem em suas proximidades (11).

A LT constitui uma afecção de crescente incidência no mundo (6) considerada um problema de saúde pública distribuídos nos continentes europeu, africano, asiático (2) e no americano no qual está presente do sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina (2,11,27). Para a OMS, do total de casos já

registrados da doença no mundo, 90% ocorreram em apenas 6 países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru (30), mas o foco mais importante é o sul-americano (3).

A incidência da LTA no Brasil aumentou nas últimas duas décadas (3). Em expansão no território brasileiro (2,4,31), praticamente presente em todas as Unidades Federativas (2,4,20,21,31), sob diferentes perfis epidemiológicos (21,27), a enfermidade demonstrou um crescimento progressivo no final da década de 1980, ocorrendo surtos em todas as regiões do país (24), com frequência constante a partir do ano 2000 (19), quando em 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (2).

Os padrões epidemiológicos brasileiros, característicos da LTA são: silvestre, ocupacional, lazer rural e periurbano. Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e pelo aparecimento de casos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença. (2,4)

Já foi observada a ocorrência de surtos epidêmicos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e região Amazônica, em função do processo predatório de colonização dessas localidades (3,11,20). A região Norte é a de maior incidência (4,27), seguida da Nordeste (4), Centro-Oeste (4,20,22), Sudeste e Sul (20,27). Já em relação ao coeficiente de prevalência da doença na região Norte é de 93.8/100 mil habitantes, na Centro-Oeste 42.70 e na Nordeste 26.50 (4).

A LT é uma afecção que apresenta ocorrência geográfica restrita em muitas regiões da Colômbia e a forma cutânea é a de maior prevalência. É o país andino de maior incidência, com aumento sustentado nos últimos anos da década de 90. (18)

### **2.1.3 Etiologia**

A LTA é uma doença antroponóptica causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (2,4,6,21,26,27,31). Uma característica comum

em infecções por esse parasita, após regressão clínica da doença, é a persistência desses microorganismos (20,25), tornando assim possível a reativação (20).

A enfermidade é determinada por espécies pertencentes aos subgêneros *Viannia* (V.) e *Leishmania* (L.) (11,21,25). Já foram identificadas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* responsáveis pela doença humana, e oito espécies descritas somente em animais (2). Os principais agentes responsáveis pela enfermidade na América Latina são a *L.*(V.) *braziliensis*, *L.*(L.) *mexicana*, *L.*(V.) *panamensis* (11,32), *L.*(V.) *guyanensis* e *L.*(L.) *amazonensis* (32). A existência de diversas espécies de *Leishmania*, como ainda a relação parasita-hospedeiro, contribui para a ambigüidade da LTA (1).

No Brasil são reconhecidas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do *Leishmania* (2). As principais são: *L.*(V.) *braziliensis*, *L.*(V.) *guyanensis* e *L.*(L.) *amazonensis* (2,3,4,11,21,27). Mais recentemente, as espécies *L.*(V.) *lainsoni*, *L.*(V.) *naiffi*, *L.*(V.) *shawi* (2,4,27) e *L.*(V.) *lindenberg* (2) foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste.

A distinção das espécies do gênero *Leishmania* é praticamente impossível apenas pelo reconhecimento de caracteres morfológicos. A diferenciação é feita em laboratório, por métodos bioquímicos, identificação de isoenzimas ou utilização de métodos de biologia molecular. (3)

Em 2004, Basano e Camargo (21) comentaram que até a década de 70, no Brasil, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L.*(V.) *braziliensis*, parasitas predominantes geograficamente (4,21), principalmente fora da região amazônica (4,33). Na América do Sul o agente mais comum da LMC ou LM é a *L.*(V.) *braziliensis* (11,20,25,34) e apresenta nessa expressão clínica, características de alta agressividade aos tecidos cutâneos e mucosos, escassez (17,28) e difícil isolamento assim como resistência ao tratamento por antimoniais, responsabilizados por freqüentes recidivas da doença (28). Demonstra ainda baixo percentual de crescimento em cultura e visualização em esfregaço (17).

A *L. braziliensis* é responsável pela forma mais destrutiva da LT no Novo Mundo (25). Espécie mais prevalente no homem, encontrada em todas as zonas endêmicas do Brasil, desde o norte até o sul, tanto em áreas de colonizações antigas como recentes, geralmente está associada à presença de animais silvestres e sinantrópicos (3).

O modo de difusão é através da picada de fêmeas de insetos hematófagos infectados (2). Os vetores responsáveis pela transmissão da LT são os flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*) pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo (3,6,11) e, no Novo Mundo os dos gêneros *Lutzomyia* (2,3,4,6,11,21,24,27) e *Psychodopygus*, dependendo da localização geográfica (2,4,27). Os flebótomos são freqüentemente encontrados em ambientes úmidos, escuros, onde têm muitas plantas, ocasionalmente próximo de casas e são pouco antropofílicos (31).

Estudos têm descrito a especificidade entre o parasita e o vetor responsável pela sua transmissão. A identificação de uma espécie vetora e a determinação da taxa de infecção natural são de fundamental importância na entomologia médica, sobretudo nas regiões endêmicas. (24)

#### **2.1.4 Expressão clínica**

A expressão clínica da LTA apresenta um polimorfismo muito grande e, geralmente a primo-infecção aparece após um período de incubação variável, podendo ou não manifestar-se (23) e está relacionada à espécie do parasita envolvido em sua etiologia e da relação do hospedeiro com o mesmo, da constituição genética e imunológica do paciente (1,25,26), além do vetor e de suas características epidemiológicas (1,26).

A LTA é freqüentemente referida como um complexo grupo de doenças em relação ao seu variado espectro de formas clínicas (6). A manifestação da enfermidade requer mecanismos que permitam a replicação no hospedeiro e sua resistência, pelo menos inicialmente, às defesas imunes inatas e adquiridas do indivíduo (26). As manifestações clínicas variam de pequenos nódulos cutâneos (6), lesões cutâneas, que tendem para a regressão espontânea (2,4,11,23,25,26,33) até graves lesões muco-cutâneas mutilantes (26,34) com destruição tecidual (6).

São mencionadas várias expressões clínico-epidemiológicas relacionadas a diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania* (27). As formas tegumentares compreendem uma síndrome cujas manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a *Leishmania* envolvida e a relação do parasita *versus* hospedeiro

(11). A presença de lesões na pele descreve a LC (11) e o envolvimento das mucosas evidencia a LM, forma crônica da infecção cutânea (20).

A complexidade do quadro clínico da LTA permite diversas classificações das expressões clínicas da doença. Caracteriza-se por comprometimento da pele e/ou da mucosa, abrangendo desde formas inaparentes, lesões de pele discretas com evolução para cura espontânea, até formas com ulcerações múltiplas e envolvimento das mucosas, com tendência a recorrências (35).

Em todas as formas clínicas da LTA pode haver recidiva das lesões, pois tais processos se caracterizam por fatores imunes inerentes ao hospedeiro. Recidiva e recorrência, em anatomia são termos sinônimos e caracterizam os sintomas ou lesões que reaparecem depois de remissão do processo mórbido. (35)

A resposta imune-celular é importante tanto para a recuperação do paciente quanto para a resistência à reinfeção em todas as expressões clínicas da leishmaniose. A recidiva da LTA pode ser devida a uma infecção persistente ou à reincidência infecciosa. Já a reativação está relacionada à falência do tratamento ou então, à hipótese que, pelo menos na afecção por *L. braziliensis*, a cura clínica é alcançada sem a erradicação dos parasitas. (5)

A apresentação cutânea é a manifestação mais comum da LT cujas lesões de pele podem ser únicas ou múltiplas (2,4,35), evidenciando o acometimento tegumentar primário, caracterizado por lesão do tipo úlcera com tendência à regressão natural (2,4,11,23,25,26,35) se não tratada (2,4) ou então ativa por muitos anos (2,4). É representada por lesão cutânea primária (25) geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo de aspecto papulo-vesiculoso (11,23) que se desenvolve no local da inoculação do parasita. Um número elevado de lesões pode surgir pela disseminação local (11). As lesões iniciais costumam ser nodulares, localizadas profundamente na hipoderme, ou pequenas pápulas que evoluem insidiosamente (2,4,25), aumentando em tamanho e profundidade, com aspecto de lesão ulcerada franca (2,4), distinguida por úlcera com bordas elevadas em moldura, de fundo granulomatoso, com ou sem exudação, em geral indolores (2,4,25,36), porém lesões úlcero-crostosa, impetigóide, ectematóide, úlcero-vegetante e verrucosa também podem ser observadas (2,4,35). A sobreinfecção, fundamentalmente, pode alterar o aspecto característico e configurar aparência similar a outras enfermidades (18). É freqüente ocorrer cicatrização espontânea das lesões cutâneas (35) e essas, ao evoluírem para cura,

normalmente determinam cicatrizes atróficas deprimidas, com superfícies lisas, áreas hipo ou hipercoradas, porém algumas vezes podem passar despercebidas em razão da coloração, forma e localização (2,4).

O quadro da LC normalmente é assintomático, e as lesões se desenvolvem normalmente nas áreas corpóreas descobertas (1,11,29) como face, pescoço e membros (23,29). Pode ter decurso abortivo ou assumir caráter tórpido, de evolução lenta, para acabar em regressão espontânea (11). Na maioria dos casos, a infecção progride e, após um período de latência clínica, surgem lesões cutâneas e/ou mucosas, conseqüentes à disseminação parasitária (11)

O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade, ou anos após sua cicatrização, sendo esse tempo bastante variável, de acordo com a predisposição imunológica do paciente (34). A presença de uma ou várias cicatrizes em pele ou história de úlcera cutânea com evolução prolongada, reforçam o diagnóstico clínico de LCM (2,4,27,36) ou então não ser evidenciado nenhuma cicatriz indicativa de LC, sugerindo ter sido a infecção inaparente (2,4).

A forma mucosa é uma doença crônica e progressiva, de diagnóstico complexo e de difícil tratamento, pode levar a lesões destrutivas do trato respiratório superior (30,34). Na maioria das vezes suas lesões são metastáticas (23), secundárias às afecções cutâneas (2,4,29), habitualmente sendo expressas passado algum tempo considerável após a resolução dessas (2,4,23,25,34) como também estar associada concomitantemente às lesões de pele (2,4,34). O comprometimento mucoso é à distância da lesão ativa de pele (2,4,23,25) ou contígua, onde ocorre por extensão da injúria cutânea situada próxima de mucosas (2,4,25) ou devido à disseminação linfática ou hematogênica (11,25,29). A invasão do trato respiratório, incluindo laringe, traquéia e brônquios, resulta em comprometimento respiratório e da deglutição, com conseqüente má nutrição e pneumonia (25). Na apresentação mucosa, as feridas podem ser discretas com poucos sintomas, e freqüentemente comprometem as cavidades nasais (2,4,11,36) com queixa de obstrução nasal, epistaxes, rinorréia e crostas. Com a evolução apresenta importante comprometimento do septo, seguindo-se em ordem de freqüência o envolvimento da mucosa oral (11). Já quando afeta a faringe induz a odinofagia e, na laringe, rouquidão e tosse (2,4,36). Se a cavidade oral for comprometida, surgem feridas na mucosa bucal (2,4,34). Ao exame clínico de suspeita de LCM, pode-se observar na mucosa afetada desde uma infiltração (2,4),

edema (23) até ulceração (2,4,23,36) com lesões úlcero-vegetantes, úlcero-crostosas ou úlcero-destrutivas (2,4,35), podendo ainda ocorrer perfuração de septo nasal (2,4,23,36), destruição parcial ou total da pirâmide nasal (2,4,35).

### 2.1.5 Diagnóstico

O amplo espectro da LTA dificulta o diagnóstico de casos passados e presentes (6). Sempre que possível, a leishmaniose tem que ser diagnosticada clínica, epidemiológica e laboratorialmente (1,4,11,15,33,36,37), e na ausência de recursos laboratoriais, clínica e epidemiologicamente (2,4,36). A identificação microscópica e cultivo de parasitas ainda são ferramentas preliminares de investigação diagnóstica em regiões onde a doença é endêmica e, embora altamente específicas para diagnosticar a leishmaniose, não são suficientemente sensíveis (15). A confirmação diagnóstica é limitada pela dificuldade da cultura das diferentes espécies de *Leishmanias* e a possibilidade de contaminação da amostra (16).

Clinicamente o diagnóstico dessa patologia é difícil porque os sinais e sintomas podem ser confundidos com outras enfermidades (30,38) e é feito através de observação das lesões cutâneas e mucosas, porém faz-se necessário o diagnóstico diferencial (2,36,38), pois muitas vezes a LT é erroneamente diagnosticada como diferentes doenças dermatológicas (37).

As lesões cutâneas impõem a diferenciação principalmente não só com neoplasias cutâneas malignas, hanseníase, úlceras de pele, paracoccidiodomicose, esporotricose (1,2,11,27,33) como também com outras dermatoses (37). Na LM deve ser considerada a paracoccidiodomicose, sífilis terciária, hanseníase, neoplasias malignas como os carcinomas, entre outras afecções das mucosas no diagnóstico diferencial (2,11,27).

Quanto ao inquérito epidemiológico, as alterações cutâneas têm por base as informações sobre a procedência do paciente, residências anteriores, atividades profissionais com desmatamento ou atividades de lazer em florestas. Nas formas mucosas, além dessas informações, deve-se investigar a preexistência de lesão cutânea. (36)

O desempenho dos métodos laboratoriais tradicionais, aplicados para o diagnóstico da enfermidade, varia em uma proporção considerável de pacientes e quando aplicados rotineiramente, têm sensibilidade variável (37).

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente em exames parasitológicos e em provas imunológicas (4,27). A confirmação é obtida através da demonstração do parasita em diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e indireta (3,11,17,25).

Devido à escassez dos protozoários que geralmente estão presentes nas amostras clínicas e à baixa sensibilidade das técnicas convencionais, a confirmação diagnóstica nem sempre é possível (15). O padrão ouro nessa afecção é o diagnóstico parasitológico, mas a sua sensibilidade tende a ser baixa e pode ser altamente variável, dependendo do número e dispersão do parasita nas amostras, técnicas de pesquisa e meio de cultura (6).

A escarificação (2,11,25,36), impressão por aposição (2,25,36), punção aspirativa (2,11,35), e o exame histopatológico que é realizado a partir de biópsia da lesão (2,3,11,27), são métodos para a pesquisa direta. Os meios de cultura permitem observar o parasita de forma indireta (2,3,11).

O exame microscópico direto é simples e rápido, porém não detecta parasita em todos os casos e, a capacidade de isolar a leishmânia de aspirados de lesões cutâneas ou de espécimes obtidos por biópsia é dependente tanto da espécie parasitológica, quanto do meio de cultura utilizado (15). A chance de se encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão, e a sensibilidade do método nos casos produzidos por *L. braziliensis* está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (11).

A histopatologia das lesões biopsiadas pode ser indicativa, mas raramente específica o suficiente para se poder fazer a confirmação, sem a evidenciação parasitária (15), pois o diagnóstico histopatológico de certeza da LTA só é possível mediante o achado dos parasitas (11). Caso contrário, as alterações histopatológicas são, no máximo, sugestivas do diagnóstico (11).

O cultivo pode ser *in vitro* através de cultura em meios artificiais (4) como ainda cultura *in vivo* através da inoculação em animais experimentais (*hamster*) (2,4,17,27,36). O meio mais empregado para isolamento em cultura é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicole, cuja sensibilidade global está em torno de

50% para *L. braziliensis* (11). A inoculação em animais de laboratório, necessita longo tempo (2 a 9 meses, em média) para a evolução da lesão no modelo animal (11,17) e a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie da *Leishmania* (11).

O diagnóstico imunológico pode ser feito por teste cutâneo através da intradermoreação de Montenegro (IRM) (2,11) que traduz a resposta alérgica de hipersensibilidade celular retardada (2,5,11,27,29,36,38) e por sorologia pela reação de imunofluorescência indireta (IFI) e/ou testes imunoenzimáticos - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que expressam os níveis de anticorpos circulantes (2,4,21,27,36).

A primeira forma de avaliação da imunidade da LTA foi a IRM (5) cujos índices de positividade oscilam entre 82.4 a 100%, permanece positiva durante toda a vida do indivíduo, permitindo o diagnóstico retrospectivo (25). É um exame de grande valor presuntivo devido à sua sensibilidade específica (25,36). Em situações de até quatro meses do início da lesão cutânea, na leishmaniose cutânea difusa (LCD), na LV e em pacientes imunodeprimidos com LTA, pode apresentar-se negativo (25,36).

Para o diagnóstico sorológico, distintas técnicas têm sido utilizadas. Os testes diferem em sensibilidade, especificidade, a aplicação prática, as condições de campo e disponibilidade de reagentes (29). Metodologias sorológicas têm sido empregadas, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos da LTA (38). As reações sorológicas de IFI e ELISA são muitos úteis, principalmente nos casos com lesões extensas e múltiplas. A IFI é um dos métodos mais utilizados, todavia apresenta resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes (11,31) além do que pode apresentar reação cruzada com a LV e a doença de Chagas (36) como ainda ser freqüente a negatividade sorológica em pacientes com infecções recentes (1 a 6 meses de evolução) (11,31) além de ter que ser realizado em centros de referência (2).

Entre os tradicionais métodos sorológicos de detecção de anticorpos, o ELISA é o mais específico e sensível dos testes, porém, bastante caro. O teste de aglutinação indireta (TAD) requer poucos reagentes, mas precisa de um longo período de incubação. (15)

O perfil de anticorpos na LTA já foi também avaliado para investigação diagnóstica da doença. A infecção por leishmânia, normalmente leva à indução de resposta imune complexa, caracterizada tanto por reações mediadas por células como pela produção de anticorpos. A natureza da resposta celular imunológica desempenha papel fundamental na determinação da resposta imune humoral pela indução da produção de anticorpos de isotipos específicos de imunoglobulinas. Como em outras doenças infectoparasitárias, o monitoramento da produção de anticorpos a antígenos, envolvidos nos diferentes estágios da infecção, pode fornecer informações valiosas, auxiliares na compreensão dos mecanismos de controle do sistema imune sobre os parasitas. A análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da patologia, bem como fornecer dados sobre as características de sua resposta imune, contudo, o papel de anticorpos específicos na imunidade ainda não está completamente esclarecido. (39)

Para Passos *et al.* (2001), a presença desses anticorpos após tratamento, poderia significar persistência do parasitismo e ser fator preditivo para a recidiva da patologia, sendo que o risco é aumentado na presença de uma resposta negativa da IRM após o tratamento (5).

Nos casos de dúvida podem ser aplicados métodos mais sensíveis e específicos para a detecção de formas amastigotas. Com o conhecimento do genoma das leishmânias, importantes avanços no diagnóstico dessa parasitose têm ocorrido. A técnica de hibridização ou PCR tornou possível a rápida detecção e identificação desses parasitas. (15)

Os testes moleculares que, além do diagnóstico, permitem o acompanhamento do tratamento e estudos epidemiológicos (1,29) e, entre esses, a PCR é particularmente útil em casos de baixa carga parasitária (6,40) e monitoração de terapias (6). Representam uma nova perspectiva no diagnóstico da LTA (4).

## 2.2 PCR

### 2.2.1 Considerações sobre a PCR

O conceito básico de síntese de seqüências específicas dos ácidos nucleicos possibilitou a amplificação de pequenas amostras de DNA até um nível grande o

suficiente para permitir a identificação genômica. A amplificação do DNA por essa técnica é simples, entretanto de extraordinário impacto nas ciências biológicas. (41)

O arsenal de técnicas de biologia molecular tem crescido consideravelmente nos últimos anos. PCR, PCR - *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) (2,8,40), Transcriptase reversa PCR (RT-PCR) (2,40), seqüenciamento de DNA (41), PCR Real Time e PCR Glucose-6-Phosphato-Desidrogenase (PCR G6PhD) (2) estão entre as mais modernas metodologias moleculares. Para as técnicas de PCR (hibridização de minicírculos) e seqüenciamento utiliza-se DNA extraído da amostra a ser analisada (40). A PCR-RFLP (2) ou PCR do kDNA (16) usa a região conservada dos minicírculos do kDNA - DNA do Cinetoplasto (2,16). Já a RT-PCR não utiliza DNA e sim o ácido ribonucleico (RNA) (40). A PCR Real Time, uma variante da PCR convencional, permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um só passo e seu resultado indica infecção ativa (2).

A aplicação da técnica de PCR poderá ampliar, de um lado, a qualidade do diagnóstico e tratamento, e de outro, as chances de investigação efetiva em doenças (41).

Desde sua introdução, a tecnologia da PCR tem sido reconhecida como uma ferramenta de diagnóstico rápida, sensível e específica que pode ser aplicada a qualquer situação que exija ampliação de DNA para que ele possa ser detectado, principalmente quando a quantidade é limitada. Bactérias encontradas clinicamente em pequena porção e que dificilmente seriam percebidas por um cultivo bacteriano, podem ser identificadas com alta sensibilidade por esta metodologia. (41)

Em 2006, Sing relatou que entre os métodos moleculares utilizados para diagnóstico clínico, a PCR provou ser mais sensível e específica, o que lhe confere potencial para se transformar em uma ferramenta adicional para diagnosticar várias patologias, permitindo o estabelecimento de um diagnóstico e prognóstico mais preciso como também tratamento individualizado. É uma metodologia relativamente simples, exigindo cuidados de otimização da reação para cada situação cuja especificidade pode ser adaptada às necessidades específicas, visando a conservação do DNA. (38)

A amplificação genética através da PCR apresenta várias vantagens em relação às técnicas tradicionais devido à sensibilidade extremamente elevada da reação, rapidez e a capacidade com que pode ser executada com uma ampla gama

de espécimes clínicas, possibilitando ainda a identificação do agente etiológico diretamente de amostras clínicas (38).

Com a descoberta da molécula do DNA, o estudo dos tecidos e das células passa da observação morfológica, macroscópica ou microscópica, para a molecular. Vírus, bactérias e qualquer outra forma de vida utilizam o código genético para a expressão protéica. Um gene representa a unidade codificadora de uma proteína. O DNA, molécula composta por vários genes, é empacotado por proteínas, formando os nucleossomos. Cada cromossomo é formado por única molécula de DNA de dupla fita em forma de hélice supercondensada com proteínas. (40)

Cada fita é constituída pelas bases nucleotídicas adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T) que estão ligadas entre si, numa mesma fita de DNA, por um esqueleto formado por moléculas de deoxi-ribose. O arranjo das letras A, C, G e T no DNA gera uma seqüência (seqüência gênica). Através de ligações por pontes de hidrogênio a base A de uma fita de DNA sempre pareia com a base T da outra fita, enquanto que a base C pareia com a base G (princípio da complementaridade). Devido a isso, as duas fitas de DNA são chamadas complementares. (42)

Se o objetivo é amplificar um segmento de DNA entre duas regiões de seqüência conhecida, a metodologia melhor indicada é a PCR. Assim, dois oligonucleotídeos (com seguimentos diferentes e complementares) são usados como *primers*. O iniciador a ser utilizado é definido com base em encadeamento já conhecido, específico para o agente a ser pesquisado. (43)

A PCR utiliza DNA extraído da amostra a ser analisada, quer seja sangue, células ou tecido. Na análise das células mantidas em meio de cultura, torna-se necessário separá-las por centrifugação. O princípio da reação se baseia na síntese de milhares de cópias de DNA *in vitro* catalisada pela *Taq* polimerase, enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus* que, por viver na natureza em fontes de água quente, evoluiu para sobreviver em altas temperaturas, portanto mantém-se estável depois de repetidas exposições a 94°C, temperatura atingida pela PCR. (40)

O êxito da técnica da PCR depende da preservação da integridade do material genético evitando a degradação por ação das nucleases. A reação requer componentes essenciais como desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) que são os quatro nucleotídeos do DNA (A, C, G e T), para prover a energia e um par de oligonucleotídeos (*primers*) para iniciar a síntese de DNA; DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase); um molde de DNA (*template*), *buffer* contendo

magnésio, o cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) para garantir a atividade da enzima e tampão para manter o pH. (10)

O método pelo qual a PCR funciona compreende a desnaturação do DNA obtido da amostra, anelamento dos *primers* e extensão ou síntese do DNA. Na fase de desnaturação do DNA da dupla fita de DNA, a temperatura é elevada a 94-98°C para que ocorra a ruptura das pontes de hidrogênio, que ligam a dupla hélice do DNA. Na etapa seguinte a temperatura é reduzida entre 37-65°C por 30 segundos (s) para permitir o anelamento dos *primers*. Em seguida a temperatura é elevada a 72°C em intervalo que varia de 2 a 5 minutos (min) para que ocorra a extensão ou síntese do DNA pela *Taq* polimerase, ocorrendo incorporação das bases nitrogenadas às fitas copiadas. O ciclo se repete em torno de 25 a 35 vezes. (40)

Uma vez obtido o DNA amplificado, ele pode ser observado em gel de agarose através da eletroforese, verificando-se o tamanho da banda esperada. Para ser visualizado nesse gel, torna-se necessária incubação com corante fluorescente, o brometo de etídeo, cujas moléculas se intercalam entre os nucleotídeos da dupla hélice, tornando-se fluorescente à radiação ultravioleta (UV). (40)

## **2.2.2 PCR e Leishmaniose**

### **2.2.2.1 PCR no diagnóstico da LTA**

A PCR é um método que, na rotina de diagnóstico das leishmanioses, acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais (2). Por permitir amplificar em escala exponencial seqüências de DNA do agente etiológico da enfermidade, constitui importante método no diagnóstico em razão de sua precisão, rapidez e segurança (11). É extensivamente utilizada tanto no diagnóstico molecular de doenças humanas como a LTA, e ainda em estudos epidemiológicos em razão de sua alta sensibilidade (44).

Métodos moleculares são opções na tecnologia diagnóstica, de grande valor como ferramenta para o diagnóstico rápido e eficiente da LTA e, por permitirem a conhecimento do genoma leishmaniótico, são considerados relevantes para o diagnóstico e tratamento, pois pela identificação parasitária, possibilita a seletividade

do fármaco adequado a cada espécie. A PCR complementa as provas bioquímicas e microbiológicas empregadas comumente no diagnóstico da afecção. (9)

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, a PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico da LTA, mostrando alta sensibilidade e especificidade, pois torna possível a obtenção de milhares de cópias de DNA (8), em poucas horas e a partir de uma quantidade genética mínima. Para ser utilizada, a reação necessita ser específica para a seqüência do genoma do microorganismo em estudo e não hibridizar o DNA do hospedeiro (25). A prova pode ser realizada em substratos obtidos de fluídos corpóreos ou tecidos, como também em arquivo de tecido parafinado para detecção de organismos infectantes (25), porém a quantidade gênica presente na amostra fixada em formol e conservada em parafina é pobre (40,41) e, freqüentemente o produto resultante da PCR irá conter fragmentos curtos de DNA (41).

A PCR é uma ferramenta útil no diagnóstico dessa entidade clínica, mas é uma técnica que deve ser aperfeiçoada, a fim de remover inibidores sem perder a sensibilidade em razão da dificuldade na identificação de parasitas das lesões de LM e os baixos desempenhos dos métodos tradicionais (30).

Para superar esses empecilhos, várias tecnologias moleculares foram desenvolvidas na última década. Por ser particularmente difícil de diagnosticar a LM por métodos convencionais, a PCR tem demonstrado ser uma ferramenta útil para o diagnóstico desta forma clínica. Na região de endemicidade no estado do Rio de Janeiro, Brasil, local do estudo, provou tanto ser uma excelente ferramenta para melhorar a taxa de diagnóstico da leishmaniose como também no diagnóstico diferencial de lesões ulcerativas cutâneas de outras etiologias, nos pacientes que vivem em áreas endêmicas. Os dados obtidos a partir de testes com amostras de biópsias de lesões cutâneas ou mucosas validaram a PCR como método diagnóstico para a LTA no Novo Mundo, especialmente para LM. (45)

A possibilidade de automatização de técnicas como a PCR e a simplificação da obtenção do material, tornam essa ferramenta molecular atraente para o processamento de grandes números de amostras em regiões endêmicas da LTA. Para a detecção de diferentes espécies de *Leishmanias*, a PCR é valiosa não só para o diagnóstico diferencial de úlceras dérmicas, mas também para a investigação das relações entre agentes etiológicos, manifestações clínicas e epidemiologia da doença. (46)

O diagnóstico de pacientes crônicos com LC é de grande desafio pelos critérios clínicos porque as lesões são muitas vezes atípicas além de apresentarem pouca ou até mesmo nenhuma *Leishmania*, tornando os exames laboratoriais tradicionais inadequados e, pela baixa resposta imunológica, os testes sorológicos não são gratificantes. Por essa razão, a PCR pode ser a metodologia adequada para o diagnóstico, capaz ainda de detectar parasitemia algumas semanas antes do aparecimento de quaisquer sinais ou sintomas clínicos. Na tecnologia molecular, vários tipos de amostras podem ser utilizados, tais como biópsias de pele, raspado dérmico do fundo da úlcera, bem como aspirados por seringa de exsudatos de lesões ulcerativas. (38)

A PCR pode ser uma alternativa para o diagnóstico de LTA em casos de evidência parasitária negativa, especialmente em indivíduos com lesões crônicas que receberam tratamento específico, ou em casos recorrentes que pode ocorrer em pacientes quando o agente etiológico é o parasita *L.(V.) braziliensis*. (47)

Ante o crescente número de pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento com antimoniais, estudos na biologia molecular possibilitam a compreensão da resistência parasitária aos medicamentos anti-*Leishmania* como fator contribuinte nas falhas terapêuticas. A PCR permite adequada avaliação, com resultado mais efetivo e em menor tempo. (9)

Para distinguir as principais espécies de *Leishmania* que causam a LC no Novo Mundo, Mimori *et al.*, em 1998, usaram *primers* desenhados para distinguir o polimorfismo em seqüências de bandas de DNA amplificado. As amostras foram obtidas de biópsia de pele humana (lesões cutâneas) fixadas em formalina 10%. Após extração do DNA pelo método fenol/clorofórmio seguido de precipitação de etanol, o material genético foi submetido à análise pela PCR. Os produtos da PCR amplificados a partir de cepas de *Leishmania* utilizando *primers* b1 e b2 (MHOM/BR/75/M2904) para a espécie *L.(V.) braziliensis*, separados em géis de agarose 2% corados com brometo de etídeo, permitiram uma amplificação de 103pb para a *L.(V.) braziliensis*. As amostras de biópsias fixadas em formol podem ser transportadas sem refrigeração e seu uso é extremamente benéfico para o diagnóstico porque o procedimento pode ser realizado rapidamente. (7)

Foram divulgados por Mimori *et al.* em 2002 os resultados de um estudo em que utilizaram o método da PCR para diagnosticar a LC em amostras obtidas com cotonetes de exsudatos após remoção de um pequena amostra de pele. Os

cotonetes absorveram a secreção misturada com sangue. O DNA foi obtido através do método fenol/clorofórmio e precipitado com etanol. A PCR amplificou material proveniente de amostras de exsudato de lesões com cotonete usando *primers* específicos separados em géis de agarose 2% contendo brometo de etídio. Quando comparada ao exame microscópico para a LC causada por *L.(V.) braziliensis*, resultou em uma grande sensibilidade alcançando 93.8%. A coleta de material exsudato com cotonete de algodão é fácil, indolor e conveniente tanto para os pacientes, bem como para os técnicos em comparação com outros métodos de amostragem. Pelo procedimento ser inócuo ao paciente, sugere que as amostras de exsudato obtidas por cotonete, possam ser alternativa às amostras de biópsias para o diagnóstico da LC, especialmente nas condições de campo. A biópsia é um procedimento que, além de invasivo, é doloroso. (32)

#### 2.2.2.2 Sensibilidade da PCR na LTA

Entre os métodos moleculares para diagnóstico clínico da LTA, a PCR tem provado ser o método mais adequado pela sensibilidade (16,44) e especificidade da técnica, independente do número, estágio e localização do parasita (44). A sensibilidade é correlacionada com o número de cópias da região amplificada (16).

Essa metodologia molecular vem demonstrando ser uma técnica rápida, sensível e específica no diagnóstico da LC (10), provando alta sensibilidade (25), com relatos em torno de 100% (38), com rápida detecção do parasita, podendo ser utilizada na tipagem de leishmânias isoladas de material clínico, insetos vetores, reservatórios ou cultura (25).

Por ser um método extremamente sensível para proporcionar resultados concretos e detectar diferentes espécies de *Leishmania*, a PCR é susceptível de ser ferramenta valiosa, tanto para o diagnóstico diferencial de doenças cutâneas (40,46), como na investigação das relações entre os agentes etiológicos e nas manifestações clínicas e epidemiologia da LTA (46). Em amostras tegumentares de pacientes com LC confirmada, Rodrigues (2002) evidenciou uma sensibilidade de 95.4% (46).

A sensibilidade da PCR foi testada por Bracho *et al.* (2007) em amostras de tecidos de pacientes com diagnóstico de LT e suspeita clínica de LM. Dos espécimes utilizados, 20% apresentaram inibidores e, nas amostras que foram submetidas à PCR, a sensibilidade foi de 68.6% e especificidade de 92%. (30)

Para verificar quão sensível é a PCR no diagnóstico da LT e LM através de biópsias, Garcia *et al.* em 2005 avaliaram a reação e tiveram um resultado de 85.1% positivo e 14.9% negativo na confirmação diagnóstica da forma cutânea e, na expressão muco-cutânea, 66.6% foram positivos contra 33.4% negativa (8).

A sensibilidade e reprodutibilidade da PCR foi testada por Romero *et al.* em 2009 com o objetivo de ampliar DNA de *Leishmania*, utilizando material genético extraído de biópsia da pele das bordas da úlcera de pacientes com LC, impressas em papel filtro e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram processadas em três laboratórios onde foram codificadas. Em 68.8% dos pacientes foram isolados parasitas e identificados como *L.(V.) braziliensis*. Do total, 80.5% mostraram acordo global para o filtro de papel. A sensibilidade no papel filtro foi satisfatória e poderá ser usada em ensaios clínicos e trabalhos de campo. A reprodutibilidade pode ser aprimorada usando duas partes distintas de uma mesma amostra de biópsia. (48)

A sensibilidade da PCR foi avaliada em 2001 por Romero *et al.* em pacientes com LT causada por *L.(V.) guyanensis*, utilizando, como padrão-ouro, o isolamento *in vitro* do parasita através da cultura da secreção das úlceras cutâneas. Os resultados apresentados indicaram que a PCR foi uma ferramenta sensível para diagnóstico de pacientes com lesões tegumentares de evolução recente causadas por esse microorganismo em uma área endêmica do Brasil. A eletroforese dos produtos amplificados da PCR permitiram a visualização de 120 pares de base (pb) em gel de agarose corado com brometo de etídeo através de luz UV. (50)

#### 2.2.2.3 PCR na identificação parasitária

Em 1994, Rodriguez *et al.* (49) avaliaram a eficácia da PCR em estabelecer o diagnóstico como também a identificação do agente etiológico da LC em pacientes de áreas endêmicas na Venezuela, demonstrando que esta técnica serve tanto para

o diagnóstico da enfermidade, como também para a discriminação taxonômica, essencial para a epidemiologia e terapia da doença.

Em 2001, a utilidade dessa técnica molecular na avaliação epidemiológica de focos da afecção permitiu a identificação do ciclo biológico da *L. braziliensis* e *L. infantum* em seu ambiente natural com rapidez, sensibilidade e especificidade. Nos estudos realizados, a identificação taxonômica permitiu conhecer a distribuição dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, constatando ser a *L.(V.) braziliensis* responsável por 80% dos casos de LC, evidenciado somente quando se analisaram o subgênero *Viannia*, o que permitiu concluir que os 20% restantes eram do subgênero *Leishmania*. (10)

A identificação precisa e a classificação das leishmânias é importante, em razão de que diferentes espécies causam distintas características clínicas da afecção. Para Mimori *et al.* (1998), a PCR é altamente específica e permitiu analisar a presença de DNA das cinco principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LC do Novo Mundo, oferecendo importante abordagem para análise padronizada em exames de campo. (7)

Para a detecção do agente etiológico da LTA por essa metodologia, foram utilizados *primers* específicos para a duplicação do DNA sendo que já se pode identificar a espécie em um único passo da PCR (25).

A determinação precisa das espécies de *Leishmania* para confirmação diagnóstica é imprescindível em razão da coexistência da LC com outras doenças tropicais e manifestações clínicas similares além do que, o diagnóstico diferencial permite a instalação de um pronto tratamento (51). A PCR permitiu a detecção da *L.(V.) braziliensis*, demonstrando ser esse parasita responsável pela LC em diferentes áreas endêmicas na Venezuela (51), como também em Pernambuco (46).

Altamente específica e sensível a PCR foi capaz de detectar parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* e da diferenciação entre os microorganismos *L.(L.) mexicana* e *L.(V.) braziliensis*. A identificação das espécies nas diferentes formas clínicas da LTA é possível com o uso dessa ferramenta molecular. (52)

Ao utilizarem a metodologia molecular para identificação parasitária em amostras cutâneo-mucosas, Garcia *et al.* em 2005 concluíram que exames subsidiários como o seqüenciamento de DNA evidenciou 39.2% de casos para a espécie *L.(V.) braziliensis*, 19.6% para *L.(L.) amazonensis*, 1% para *spp.*, 1% para *L.(V.) guyanensis* e 39.2% de resultados não identificados. A PCR-RFLP identificou

as espécies *L.(V.) braziliensis* em 52% das amostras, *L.(L.) amazonensis* em 10,7%, *L.spp.* em 15.3%, e 22% apresentaram resultados negativos. (8)

#### 2.2.2.4 Comparação da PCR com métodos tradicionais de diagnóstico da LTA

Os métodos de identificação da *Leishmania* em amostras de tecido por exame microscópico em esfregaço ou análise histológica (46) ou cultura (16) são simples e baratos, porém com limitada sensibilidade (16,46). Em 2002 Rodrigues *et al.* avaliaram uma sensibilidade de 95.4% da PCR em pacientes com LC que foi significativamente superior a dos métodos convencionais de pesquisa direta: microscopia (66.7%), histopatológico (66.2%); isolamento por cultura (46.5%); IFI (82.9%) (46). Já Benssoussan *et al.* em 2006 obtiveram 98.7% de sensibilidade para a PCR enquanto a cultura isolada foi de 62.8% e a microscopia 74.8% e, quando juntas, a sensibilidade global ficou em 83.3% (16).

A metodologia molecular têm se apresentado mais eficaz para o diagnóstico da LTA e, para afirmarem isso, Garcia *et al.* (2005) compararam os resultados da IRM, presença de leishmânia em biópsia, IFI e PCR. Esta última mostrou-se superior, em relação à IRM, ao exame histopatológico e à IFI, na detecção dos casos de LTA. Ao confrontaram os resultados da PCR com a IRM, observaram que dos 81.6% dos pacientes com positividade na reação molecular, 60% tiveram resultado positivo na IRM, e 21% negativo. Dos 18.4% com amostras negativas à PCR, 13.3% apresentaram resultado positivo na IRM e 5.6% foram negativo. Quanto a IFI, foi positiva em 59.7% das amostras. Já nos exames histopatológicos de biópsias de pele e mucosas, a presença da leishmânia foi constatada em 30.6%. (8)

Divulgado por Pirmez *et al.* em 1999 um estudo em uma região endêmica de LTA citando que os métodos convencionais foram positivos em apenas 17% dos pacientes com LM, enquanto a PCR juntamente com hibridização foi positiva em 71% dos casos. Já quando os pacientes tinham diagnóstico clínico sugestivo de LTA, a sensibilidade da PCR foi de 94%. (45)

A habilidade dessa reação para detecção de *Leishmania* foi comparada em 1994, por Rodriguez *et al.* com as metodologias convencionais: teste cutâneo (IRM), a microscopia de esfregaços obtidos por biópsia e corados por *Giemsa* e a cultura *in*

*vitro* de tecido de biópsia. A técnica de PCR detectou a presença de *Leishmania* em 98% dos pacientes diagnosticados clinicamente e IRM positiva. Em comparação, a positividade da cultura foi de 42% e a da microscopia 64%. (49)

Já no ano de 2001 em um estudo similar e em uma amostra maior, avaliaram pacientes com úlceras indicativas de LC avaliados por profissionais clínicos e IRM positiva. Procederam à biópsia para o diagnóstico parasitológico mediante cultura e PCR. No diagnóstico da LC, a PCR apresentou uma sensibilidade de 88.86%, sendo mais efetiva que a cultura que foi positiva somente em 18% dos casos. (10)

No ano seguinte (2002) ao confrontaram a sensibilidade da PCR com métodos subsidiários no diagnóstico da LTA em amostras de biópsias de pele, essa metodologia molecular foi mais sensível que o histopatológico e cultura de esfregaços, detectando 80%, dos casos, enquanto nas amostras avaliadas a histopatologia apresentou 72% de positividade e a cultura 42% (51).

Objetivando avaliar a PCR com outras técnicas tradicionais para o diagnóstico da LTA, em 2006 Venazzi *et al.* examinaram pacientes com lesões cutâneas e sintomatologia suspeita de LTA. O material da borda da lesão foi obtido usando uma espátula de metal estéril. O DNA foi amplificado com os iniciadores MP1L/MP3H. No estudo, 50.6% dos pacientes apresentavam resultado positivo para pesquisa direta dos parasitas e, 51.9% IRM positiva. Já, quando avaliados juntamente, a pesquisa direta e o teste intradérmico, o resultado positivo da PCR foi em 57.7% dos indivíduos. A sensibilidade da PCR foi de 91.1% daqueles com positividade na pesquisa direta e IRM. (47)

### **2.2.3 PCR no fluído salivar**

A capacidade de controlar o estado de saúde, o início e a progressão da doença como também o resultado do tratamento, além de um diagnóstico por meios de técnicas não invasivas, é uma meta altamente desejável na promoção da saúde. O fluído oral é um meio perfeito para ser explorado para confirmação e seguimento de inúmeras enfermidades. Esforços coletivos e a convergência das tecnologias diagnósticas moleculares apresentam oportunidades sem paralelo para explorar o potencial diagnóstico da saliva em afecções bucais e sistêmicas. (53)

A saliva é o espelho do nosso sangue, por isso, estamos conduzindo novos estudos, usando-a como um possível fluido de diagnóstico para outras doenças e outros tipos de câncer. David Wong, 2006. (53)

O fluido salivar cada vez mais vem sendo usado como substrato auxiliar na investigação diagnóstica de doenças sistêmicas (53,54) e orais (53). O seu valor como meio de diagnóstico, tem sido objeto de estudo com o intuito de acrescentar possibilidades como exame complementar (55). A natureza não invasiva dos testes salivares o habilita como meio de diagnóstico baseado em fluídos orais (54). Obter a secreção salivar em quantidades suficientes para análise geralmente é simples e os custos de armazenagem e transporte são inferiores aos do soro e urina (56).

A análise da secreção salivar, similar aos exames baseados no uso do sangue, é identificar a enfermidade e seguir a sua evolução, avaliando a efetividade do tratamento empregado. Dentre as vantagens do uso desse recurso pode-se enfatizar a facilidade de coleta do material bem como do seu manuseio, pontos importantes na operacionalização técnica. (54)

Progressos nos estudos de métodos diagnósticos que empregam saliva como substrato biológico de amostragem já apresentaram resultados promissores, o que estimula a sua utilidade como meio de exame na rotina investigatória (55). A PCR pode ser executada em fluídos bucais na detecção de DNA de vírus e bactérias (55,56).

O fluido oral além de prover DNA microbiano, fornece ainda DNA humano, o que tem se mostrado útil para identificação forense. À medida que se avança na era da medicina genômica, o uso crescente de diagnósticos salivares auxilia a catalisar mudanças no diagnóstico das enfermidades. (54)

Com os avanços em microbiologia, imunologia, bioquímica e biologia molecular, testes salivares em clínica e pesquisa, revelaram-se como um meio prático e confiável de reconhecer sinais de doença sistêmica e exposição a fatores de risco. A eficácia do papel da saliva no diagnóstico da saúde sistêmica e na investigação do câncer de mama é evidente em razão de que, testes salivares para marcadores da doença estão sendo estudados com uso potencial em conjunto com a mamografia. (56)

Por conter os mesmos marcadores biológicos que se encontram no sangue, só que em níveis muitos mais baixos, a saliva foi utilizada por Hu *et al.* em 2008 para avaliar a presença de biomarcadores de RNA visando a detecção de células escamosas do carcinoma oral. O “RNA mensageiro”, intermediário molecular entre o

gene e a proteína, pode ser mensurável na saliva indicando um tumor em desenvolvimento. A combinação dos biomarcadores resultou em uma sensibilidade de 90% e especificidade de 83% na detecção de células escamosas do carcinoma oral. (57)

A infecção por *Plasmodium falciparum* já foi detectada pela PCR em urina e amostras de saliva do hospedeiro humano. O aperfeiçoamento da técnica de extração do DNA desses espécimes produziu amplificação em grande escala no rastreio do parasita da malária, ilustrando assim a aplicação da técnica na genotipagem da doença em secreções humanas, possibilitando levantamentos epidemiológicos sem a necessidade de coletar sangue. O fato que a amplificação tenha sido possível em infecções de baixa densidade parasitária, demonstrou o potencial da aplicação da PCR em secreção salivar no diagnóstico de doenças infecciosas. (58)

O uso de saliva tem sido sugerido como alternativa para testar anticorpos no caso da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), hepatite A, B e C, identificando os vírus em secreções das glândulas salivares, através de PCR podendo relacionar a positividade com a presença viral na glândula. (59)

Genes do vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da AIDS, já foram detectados em amostras salivares utilizando a metodologia da PCR. Após coleta, essa secreção foi disposta em discos de papel filtro, secos e desinfetados por temperaturas elevadas. Foi possível identificar o DNA do HIV a partir da saliva e os resultados não tem relação com o estágio da doença ou a via de infecção. (60)

A PCR foi capaz também de amplificar fragmentos de DNA específicos para *Streptococcus (S.) mutans* e *S. sobrinus* a partir de 1ml de amostras de saliva (60,61), indicando ser essa ferramenta molecular simples, rápida e confiável, podendo ser aplicada em estudos na relação entre bactérias cariogênicas e cárie (61). A especificidade da PCR nas amostras da saliva para o *S. mutans* foi de 50% e a sensibilidade de 95% e, para o *S. sobrinus* foi 95% e 100% respectivamente (62), demonstrando ser essa metodologia capaz de avaliar o nível de prevalência desses microrganismos identificados, como também pode ser usada em secreções salivares para estudos epidemiológicos (63) e da transmissão intrafamiliar (62).

Considerando a importância do isolamento, identificação e detecção de microrganismos na compreensão da inter-relação entre essa microbiota e seu

hospedeiro, Shimada *et al.* em 2008 avaliaram o uso da PCR no fluído salivar e biofilme gengival. Foram realizadas coletas de saliva não estimuladas. Os autores verificaram uma concordância de 79% a 86% entre as amostras de saliva e do biofilme subgengival para a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium nucleatum*. Os resultados apresentados evidenciaram que a microbiota presente na saliva refletiu ser a mesma subgengival. A obtenção de saliva conta com vantagem sobre o biofilme gengival, uma vez que é considerada não invasiva. (63)

O vírus do sarampo foi detectado por RT-PCR na saliva por Oliveira *et al.* em 2003. Essa metodologia não utiliza o DNA de cadeia dupla como molde e sim RNA de cadeia simples. A partir do RNA, a enzima *transcriptase* reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar, agora chamado de cDNA e a esse se aplica a técnica de PCR. A positividade da PCR em três casos com história de vacinação indicou que os indivíduos previamente imunizados, ainda podem ser infectados e contribuir para a circulação do vírus do sarampo. O estudo demonstrou a utilidade de RT-PCR em amostras clínicas não invasivas para a investigação de casos de sarampo. (64)

Com o advento da técnica de estudo do DNA viral pelo método da PCR, Lazarini *et al.* em 2006 detectaram o vírus herpes *simplex* tipo I no líquido cefalorraquidiano e na saliva de pacientes com paralisia de Bell, relacionando-a com a evolução clínica da doença. A positividade para o DNA viral correspondeu a 29% das amostras salivares. A identificação de DNA do vírus herpes *simplex* tipo I pode ainda, apontar provavelmente esse microorganismo como principal agente etiológico da enfermidade. A detecção do vírus na secreção salivar dos pacientes não influenciou o prognóstico da doença. (65)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a possibilidade de detecção do DNA de *Leishmania* por meio da PCR em secreção salivar de pacientes com diagnóstico de LTA.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a presença de DNA de leishmânia no fluido oral de pacientes com diagnóstico de LTA.
- Detectar a presença de DNA de leishmânia em raspado de lesão mucosa nasal e oral.
- Identificar o subgênero e as espécies dos complexos de *Leishmanias* no material amplificado.

## 4 METODOLOGIA

Foi elaborada uma ficha própria (Apêndice A) com espaço para inserção de dados quanto à identificação do paciente assim como a história social (procedência, profissão, hábitos, residências anteriores, aspectos habitat, presença de animais), histórico médico (doenças presentes, localização e aspecto das lesões, evolução da doença e tratamento), sinais e sintomas que antecederam o diagnóstico evidenciando os que precederam o diagnóstico, exames complementares realizados e suas respostas além dos procedimentos médicos executados. Constaram ainda espaços para informações da avaliação clínica oral, descrição e localização das lesões além dos processos executados, como por exemplo, coleta da saliva, processamento e avaliação da PCR. As informações pertinentes (clínicas, laboratoriais, terapêuticas e médicas) foram recolhidas retrospectivamente, dos respectivos prontuários médicos dos pacientes, e constaram de informações quanto ao seguimento da doença, tratamento médico, medicamentoso, intercorrências e exames específicos no transcorrer de seu atendimento.

Todos os participantes foram informados através do Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido (TCILE) (Apêndice B) quanto ao propósito do estudo, assinando a declaração de consentimento (Apêndice C).

### 4.1 SUJEITOS DA PESQUISA

Participaram do estudo quatro pacientes portadores de LTA, identificados por números de 1 a 4, atendidos no Hospital Dia Professora Esterina Corsini do Núcleo de Hospital Universitário (NHU) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

O paciente de número (nº) 1 apresentava suspeita de recidiva de LC tratada 9 meses antes. Os de nº 2 e 3 no momento do atendimento eram portadores de quadro clínico sugestivo de LCM, por provável recidiva de LC tratada anteriormente. O de nº4 apresentava diagnóstico prévio de carcinoma basocelular em face e carcinoma epidermóide em cavidade oral, e na oportunidade da avaliação,

suspeitou-se de LM. Todos os pacientes apresentaram, em algum momento, confirmação diagnóstica de LTA, seja através de métodos sorológicos, histopatológicos, imunológicos ou prova terapêutica satisfatória.

Todos eram do gênero masculino, procedentes de região endêmica para a enfermidade.

A identificação, o histórico médico, manifestações clínicas, evolução da doença, tratamento e resultado da PCR dos pacientes do estudo estão descritas a seguir.

1- Indivíduo de 35 anos, trabalhador rural, procedente de Pedro Gomes, MS, que em agosto de 2007 teve diagnóstico de LTA, na forma cutânea, pela história clínica, epidemiológica, exame físico com lesão na panturrilha esquerda e têmpora esquerda, IRM positiva e resposta terapêutica com cura clínica ao tratamento com N-metilglucamina, 20mg SbV/kg/dia, durante 20 dias. Foi encaminhado em maio de 2008 ao Hospital Dia do NHU/UFMS Universitário da UFMS com queixa de lesões cutâneas na face e suspeita de recidiva de LC. A IRM foi repetida, porém com resultado negativo. Durante a avaliação apresentou uma lesão descamativa localizada próximo ao ângulo esquerdo da boca, três lesões pápulo-infiltrativas na região pré-auricular esquerda e duas no lado direito. Na face esquerda, uma pústula na região mentoniana e uma lesão pápulo-vesiculosa na lateral direita do pescoço semelhante a uma picada de mosquito além de uma cicatriz atrófica deprimida na região temporal (Figuras 2 e 3).



Figura 1 – Face lateral direita do paciente n°1 com 2 lesões pápulo-infiltrativas na região pré-auricular e 1 pápulo-vesiculosa na região cervical



Figura 2 – Face lateral esquerda com cicatriz atrófica deprimida na têmpora, lesões pápulo-infiltrativas na região pré-auricular, descamativa no ângulo da boca e pústula na região mentoniana

Para uma melhor compreensão, o quadro 4 descreve a localização, o aspecto das lesões, as informações laboratoriais e terapêuticas relativas ao paciente de nº1.

Quadro 1 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas no primeiro episódio (2007) e na recidiva (2008) do paciente nº1 com LC

Ano	Lesões cutâneas	Aspecto	Exames laboratoriais	Tratamento
2007	Panturrilha esquerda Têmpora esquerda	Sem informações	IRM positiva	N-metilglucamina Resposta favorável
2008	Ângulo esquerdo da boca Região pré-auricular esquerda Região mentoniana esquerda Região temporal esquerda Região pré-auricular direita Região cervical direita	Descamativo Pápulo-infiltrativo Pústula Cicatriz atrófica deprimida Infiltrativo Pápulo-vesiculoso	IRM negativa	Sem informações

2- Paciente procedente de Jardim, MS, 64 anos, lavrador, com suspeita de reativação de LCM. Em 1997 teve diagnóstico de LC, em razão de uma lesão no tornozelo direito e resultado da IFI de 1:80, iniciando tratamento com o antimoníato N-metilglucamina, 2 ampolas de 5 ml/dia. No ano de 1999 apresentou tosse produtiva com secreção sangüínea e lesão fistular na região submandibular direita diagnosticada através de biópsia como paracoccidiodomicose. Em razão das recorrências das lesões no mesmo local, envolvendo todo o tornozelo, recebeu o mesmo esquema terapêutico em 1999, 2000 e 2002. Foram evidenciadas lesões crostosas nasais de aspecto granuloso cuja biópsia foi sugestiva de LCM, sorologia por IFI 1:80, recebendo novamente tratamento com N-metilglucamina em 2004. Em 2006, ocorreu edema nasal com secreção amarelada e, na impossibilidade da biópsia, foi prescrito empiricamente, por 28 dias, o antimonial dos tratamentos anteriores. Em 2008 surgiram extensas lesões intranasais, bilaterais, de aspecto granuloso, lesões esbranquiçadas no palato duro e relatou coriza amarelada, odinofagia, emagrecimento e cefaléia noturna. A biópsia do palato foi sugestiva de LCM e a IFI 1:80, sendo mantido o esquema terapêutico anterior por 30 dias. Queixou ainda de dispnéia aos mínimos esforços e arritmia cardíaca trans-terapia.

Já em 2009, apresentou lesão ulcerada purulenta em palato mole, lesão granulosa na tonsila e úvula palatina cuja biópsia foi sugestiva de LCM. Considerado refratário ao antimonial, o tratamento eleito foi com anfotericina B lipossomal. Ao exame clínico relatou obstrução nasal e pode ser observada cicatriz atrófica de superfícies lisas com áreas hipocrômicas ao redor de todo o tornozelo direito (Figura 4), infiltração nasal com deformidade do nariz e mucosa nasal hiperemiada (Figura 5).



Figura 3 – Cicatriz de lesão leishmaniótica circundando o tornozelo direito de aspecto atrófico, superfície lisa e hipocrômica no paciente nº2 portador de LCM

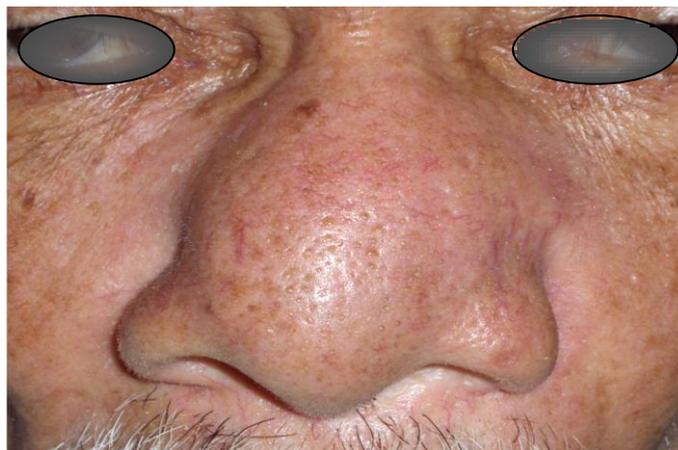


Figura 4 – Infiltração difusa do nariz no paciente nº2 portador de LCM

As informações quanto à localização, aspecto das lesões, informações laboratoriais e terapêuticas no período de 1997 a 2009 estão apresentados no quadro 5.

Quadro 2 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas no primeiro episódio de LC (1997), nas recidivas (1999, 2000, 2002) e nos episódios de LCM (2004, 2006, 2008, 2009) do paciente n°2 com LCM

Ano	Lesões	Aspecto	Exames laboratoriais	Tratamento
1997/99	Tornozelo direito	Sem informações	IFI - 1:80	N-metilglucamina: melhora clínica das lesões
1999	Mandíbula direita	Fístula	Biópsia: Paracoccidioidomycose	
2000/02	Tornozelo direito		IFI 1:80	N-metilglucamina
2004	Nasais	Granuloso	IFI - 1:80 Biópsia: sugestiva de LCM	N-metilglucamina
2006	Nasais	Edema e secreção		N-metilglucamina
2008	Nasais extensas	Granuloso		N-metilglucamina
	Palato duro	Esbranquiçado	IFI - 1:80 Biópsia: sugestiva de LCM	N-metilglucamina
2009	Palato mole, tonsila, úvula	Ulcerado/purulento Deformidade nasal	Biópsia: sugestiva de LCM	Anfotericina B lipossomal

3- Indivíduo procedente de aldeia indígena da região de Bodoquena, MS, 63 anos de idade, de profissão agricultor, com diagnóstico de LCM. Em 2004 relatou lesão cutânea no antebraço esquerdo com IRM positiva e cura pós-tratamento com Glucantime® (SIC). Na anamnese em dezembro de 2009, o paciente relatou anorexia, emagrecimento, tosse seca, obstrução nasal, saliva e secreção nasal com sangue desde setembro do mesmo ano e dor orofaríngea, tipo queimação ao ingerir alimentos líquidos e sólidos desde 2007. Na avaliação clínica em 2009, observou-se lesão cicatricial sugestiva de LC no antebraço esquerdo (Figura 6) e comprometimento do palato mole onde foram evidenciadas lesões de aspecto exulcerado granulomatoso (Figura 7) cujo exame sorológico (IFI) foi 1:40 e o diagnóstico presumido foi de LCM. O tratamento prescrito foi desoxicolato de anfotericina B, 30mg diária. A resposta terapêutica permitiu confirmar o diagnóstico de LCM. A PCR amplificou o DNA de leishmânia tanto na secreção salivar quanto no substrato do raspado com cotonete da lesão em mucosa oral conservada sem o gel do swab (meio de transporte). O quadro 6 descreve as Informações quanto a localização, aspecto das lesões, dados laboratoriais e terapêuticos.

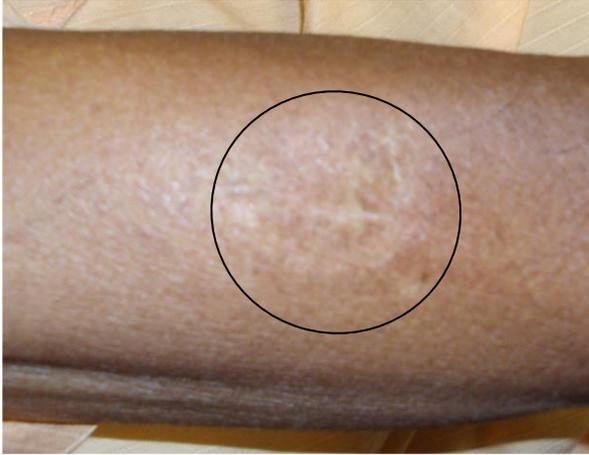


Figura 5 – Lesão cicatricial sugestiva de LC no antebraço esquerdo no paciente n°3 com LCM



Figura 6 – Infiltração mucosa do palato mole com lesões granulomatosas no paciente n°3 com LCM

Quadro 3 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas no episódio de LC em 2004 e no de LCM em 2009 do paciente n°3 com LCM

Ano	Lesões cutâneas	Aspecto	Exames laboratoriais	Tratamento
2004	Antebraço esquerdo	Sem informações	Sem informações	N-metilglucamina: resposta favorável
2009	Palato mole	Exulcerado/ Granulomatoso	IFI 1:40	Anfotericina B

4- Indivíduo residente em Campo Grande, 84 anos de idade, lavrador e morador em zona rural por mais de 30 anos. Em 1998 através de biópsia cutânea da região temporal direita, teve como diagnóstico carcinoma basocelular na face, cujo tratamento foi radioterapia (35 doses). No prontuário médico estava descrito que, em outubro de 2003, comentou ter odinofagia além de dor de garganta constante desde 2002. Em setembro de 2008, o paciente relatou dor à deglutição, ardência na garganta e obstrução nasal desde 2007. Ao exame clínico, na época, foi evidenciada lesão ulcerada no palato mole atingindo a transição com o palato duro, além de destruição da úvula e pilar amigdaliano anterior, com resultado através de biópsia de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado e o tratamento indicado foi radioterapia nas faces laterais perfazendo um total de 25 doses. As lesões mucosas de palato persistiram e, em junho de 2009 acometeu a mucosa nasal e da orofaringe com lesão ulcerada sem perfuração do septo e hiperemia da orofaringe. A biópsia nasal foi sugestiva de LM e a do palato, processo inflamatório exsudativo com ausência de malignidade, sendo encaminhado para tratamento antileishmaniótico. A resposta sorológica pela IFI foi não reagente. Realizada nova biópsia da laringe cujo

resultado foi discreto processo inflamatório crônico, e do meato nasal direito e esquerdo, processo inflamatório crônico sugestivo de leishmaniose. Iniciou tratamento com anfotericina B, que foi interrompido após quatro dias, pois outro resultado da biópsia apresentou diagnóstico sugestivo de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado de úvula e palato mole, estágio IV (T3N2M0). Encaminhado para tratamento oncológico, porém como apresentou IRM de 60x45mm, retornou então para tratamento antileishmaniótico em dezembro de 2009. Durante a anamnese em dezembro de 2009 relatou feridas antigas no nariz não sabendo precisar o tempo transcorrido. Na avaliação clínica apresentava infiltração labial superior e nasal (Figura 8) e lesões no palato de aspecto granulomatoso (Figura 9). O esquema terapêutico foi feito com desoxicolato de anfotericina B. Com uma semana de tratamento, apresentou úlceras nasais (Figura 10), no lábio superior e região anterior da língua (Figura 11) como também insuficiência renal estabelecida por intolerância ao desoxicolato, iniciando tratamento com anfotericina B lipossomal. Ao exame clínico observou-se melhora no quadro clínico, pois as lesões mucosas do palato regrediram (Figuras 12 e 13). Para uma melhor compreensão o quadro 7 descreve as características clínicas, localização e aspecto das lesões assim como os dados laboratoriais e terapêuticos do paciente n°4.

Quadro 4 – Características clínicas, laboratoriais e terapêuticas do paciente n°4, inicialmente diagnosticado como portador de processo neoplásico (1998-2008) posteriormente confirmando-se LM (2009)

Ano	Lesões	Aspecto	Exames laboratoriais	Tratamento
1998	Região temporal direita	Sem informações	Biópsia: Carcinoma basocelular	Radioterapia
2008	Palato mole e duro, uvula, pilar amigdaliano	Ulcerado/granulomatoso	Biópsia: Carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	Radioterapia
2009	Mucosa nasal e orofaringe	Infiltração nasal e labial superior Granulomatoso (palato mole)	IFI: negativa  IRM:positiva (65x45mm)  2 biópsias nasais sugestivas de LM Biópsia de orofaringe sugestiva de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado	Anfotericina B
	Narinas, lábio superior e língua	Úlceras		Anfotericina B lipossomal



Figura 7 – Infiltração nasal e labial superior no paciente nº4 com LM



Figura 8 – Lesões granulomatosas no palato mole no paciente nº4 com LM



Figura 9 – Infiltração nasal com ulceração na parte anterior do septo, base e asas nasais após 1 semana de tratamento com desoxicolato de anfotericina B no paciente nº4 com LM



Figura 10 – Infiltração do lábio superior e úlceras labiais, nasais e na língua, após 1 semana de tratamento com desoxicolato de anfotericina B no paciente nº4 com LM



Figura 11 – Melhora da infiltração nasal e labial com cicatrização das úlceras após 20 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal no paciente nº4 com LM



Figura 12 – Regressões das lesões mucosas no palato após 20 dias de tratamento com anfotericina B lipossomal no paciente nº4 com LM

Em maio de 2010, o paciente foi encaminhado para reabilitação da cavidade oral na Divisão Clínica de Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia Professor Albino Coimbra Filho da UFMS, com indicação de prótese total superior e inferior, objetivando proporcionar uma melhor qualidade de vida. Ao exame clínico foi observado ausência de lesões tanto orais quanto nasais, permitindo constatar a cura clínica, fato confirmado pelo otorrinolaringologista (Figuras 14 e 15).



Figura 13 – Cura clínica das lesões nasais no paciente nº4 com LM após 3 meses da conclusão do tratamento antileishmaniótico



Figura 14 – Cura clínica das lesões orais no paciente nº4 com LM após 3 meses da conclusão do tratamento antileishmaniótico

#### 4.2 PACIENTES INCLUÍDOS NA FASE PRELIMINAR DO ESTUDO

Na fase inicial do estudo, foi colhida ainda a saliva de seis pacientes com suspeita diagnóstica de LV para verificar a possibilidade de presença de DNA de *L.(L.) chagasi* nesse fluido salivar quando do uso do *primer* específico para essa espécie. No entanto, esses pacientes foram excluídos do estudo, permanecendo apenas os portadores de LTA.

### 4.3 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

#### 4.3.1 Avaliação clínica dos sujeitos e coleta da secreção salivar

O fluído oral não estimulado dos pacientes foi obtido no dia do atendimento médico, antes do início da terapia medicamentosa.

A secreção salivar do paciente nº1 foi recolhida com uma seringa descartável de 3ml, estéril e sem agulha, e depois transferida para microtubos tipo *Eppendorf* estéreis de 1,5ml.

Já nos pacientes de nº2 e 3, preferiu-se dispensar a saliva diretamente nos microtubos (2 microtubos = 3ml). No indivíduo de nº4, em razão da xerostomia que o mesmo apresentava devido a ter sido submetido a tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço, tentou-se coletar alguma quantidade de saliva através de cotonete estéril.

Após a coleta das amostras salivares, estas foram lacradas, identificadas e acondicionadas em recipiente resfriado, tipo isopor com gelo reciclável para transporte até os laboratórios para execução da PCR onde ficou conservada em uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o procedimento de extração do DNA.

#### 4.3.2 Exame intra-oral

O exame clínico bucal foi realizado após a coletada saliva com a finalidade de identificar possíveis lesões intra-orais. A avaliação da cavidade bucal foi executada com espelho bucal odontológico para melhor visualização da cavidade oral e espátula de madeira descartável para afastamento da mucosa (bochecha). Em presença de lesões orais, procedeu-se raspagem e obtenção do material para realização da PCR.

Os procedimentos clínicos foram dentro dos padrões e normas de biossegurança com uso de instrumentais esterilizados e materiais clínicos apropriados.

### 4.3.3 Coleta do material das lesões

Nos pacientes com lesões mucosas, foram coletadas amostras provenientes de raspado com cotonete do swab.

No paciente de nº3 foi realizado esfregaço da lesão mucosa de palato com espátula de madeira e com cotonete (swab), cujas pontas foram quebradas e as amostras foram acondicionadas no tubo (estéril).

No paciente de nº4 foram realizadas coletas de lesões nasais e orais com espátula de madeira e cotonete de algodão, ambos estéreis. A ponta da espátula de madeira ou a parte do cotonete que procedeu à raspagem das lesões mucosas e nasais foram quebradas e colocadas no tubo do swab.

Após serem lacradas e identificadas, as amostras foram acondicionadas em recipiente de isopor com gelo reciclável para transporte e posterior conservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  até extração do DNA.

A dinâmica do estudo na fase de avaliação dos pacientes de estudo seguiu o fluxograma apresentado na figura 1.

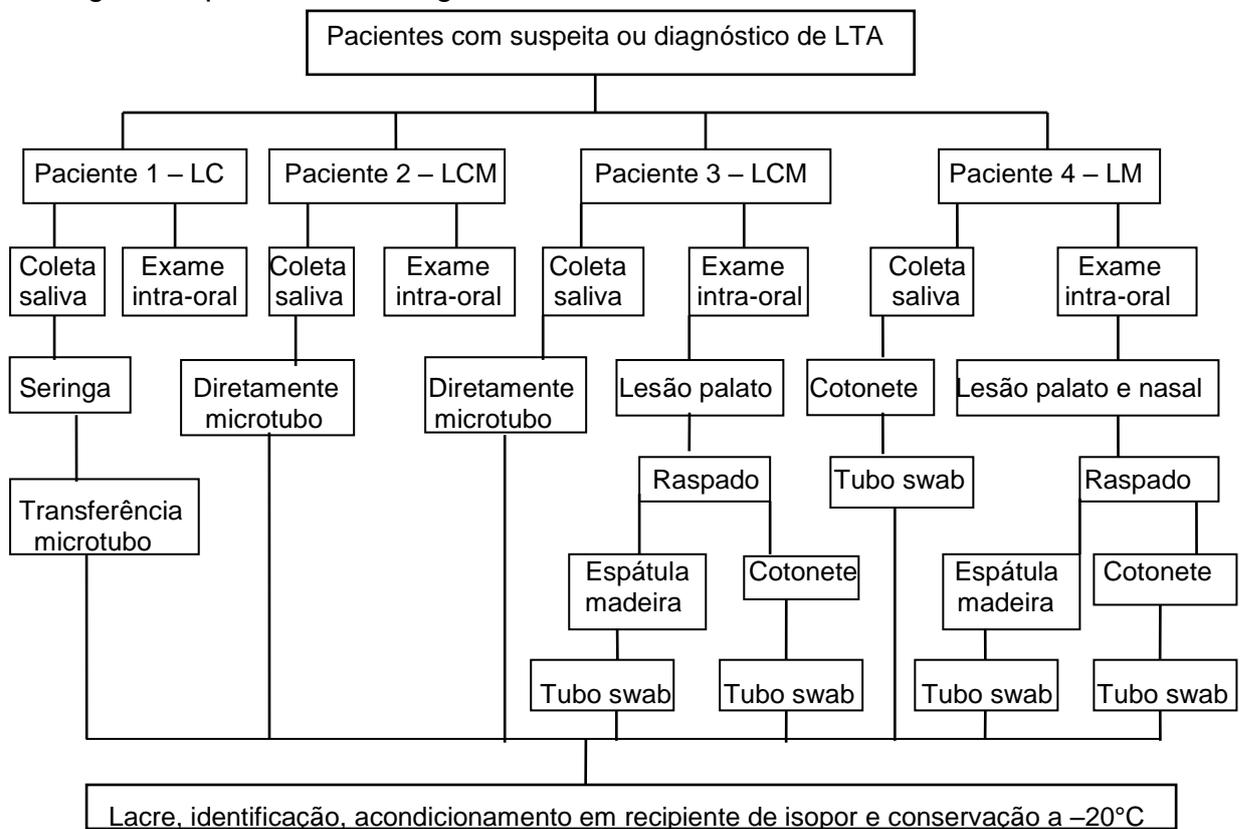


Figura 15 – Diagrama do fluxo da dinâmica na fase de coleta dos substratos para realização da PCR em pacientes com diagnóstico de LTA do estudo

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

Os procedimentos necessários à metodologia da PCR inicialmente foram realizados no laboratório de sanidade animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte, laboratório de Biologia Molecular 2 e, posteriormente, no laboratório de Biologia Molecular da UFMS.

O protocolo para extração do DNA foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Gado de Corte e consistiu dos seguintes passos:

- As amostras homogeneizadas em vortex, coletadas através de pipeta de 1 mililitro (ml) do material em um microtubo tipo *Eppendorf* de 2ml e centrifugada a 10.000 rotações por minuto (rpm) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e acrescentado no material centrifugado, 400 microlitros ( $\mu$ l) de tampão de lise e posterior homogeneização. O volume final consistiu aproximadamente de 500 $\mu$ l. Adicionada Sulfato duodecil de sódio a 1% do volume final juntamente com 50 $\mu$ l de solução estoque e novamente homogeneizado. Acrescentou-se proteinase K a 200 $\mu$ g/ml e foi feita a incubação por no mínimo 2 horas (h) em banho-maria a 55°C. Adicionou-se clorofórmio V/V e homogeneizou em vortex (500 $\mu$ l). Procedeu-se o acréscimo de 250 $\mu$ l de solução de precipitação protéica e homogeneização em vortex (metade do volume do clorofórmio). Centrifugada a 10.000 rpm/10 min. A fase aquosa foi pipetada e transferida para outro microtubo de 2ml, acrescido etanol absoluto resfriado duas vezes do volume obtido, e incubado a -20°C *overnight*. Após centrifugagem a 13.000 rpm/ 15min a 4°C, com descarte do sobrenadante. Lavagem do sedimento com 300 $\mu$ l de etanol 70% resfriado. Centrifugado a 13.000 rpm/5 min a 4°C e descarte do sobrenadante. A lavagem e centrifugação foram novamente repetidas. O *pellet* foi secado por 10 min em temperatura ambiente. Feita a ressuspensão do *pellet* em 100 $\mu$ l de água milliQ estéril, incubado a 55°C por 20 min, executada dosagem do DNA e conservado a -20°C.

#### 4.5 CONTROLES

Foram utilizadas cepas padrões de DNA cada espécie (*chagasi*, *amazonensis* e *braziliensis*) em questão para cada síntese como controle positivo nos quais eram acrescidos os reagentes necessários à amplificação e com o DNA molde em questão. Para excluir a possibilidade de reações cruzadas foi empregado um controle negativo, amostra composta somente de água sem adição de DNA.

#### 4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

Os protocolos de PCR foram testados com preparações de DNA de amostras de secreção salivar e dos substratos das lesões mucosas de pacientes com diagnóstico de leishmaniose, acompanhados da amostra do indivíduo saudável. Foram utilizados pares específicos de *primers* para detecção do DNA de *Leishmania*. A reação foi padronizada com DNAs controles fornecidos pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ (Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brasil), considerando o tamanho da amplificação aguardada e as temperaturas de anelamento dos *primers*. Para confirmação dos resultados, a PCR foi repetida em todas as amostras.

As seqüências do *primers* RV1 e RV2, a1 e a2, b1 e b2, específicos para as espécies *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* respectivamente assim como o DNA controle e os produtos de amplificação padrão utilizados para amplificação na PCR do estudo estão descritas no quadro 1.

Quadro 5 – *Primers* para as espécies *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* utilizados na PCR para identificação de DNA de leishmânia na saliva e nos raspados das lesões mucosas dos pacientes com diagnóstico de LTA atendidos no Hospital Dia Professora Esterina Corsini do NHU/UFMS

Espécie		<i>Primers</i>	DNA Controle	Produto esperado
<i>L.(L.) Chagasi</i>	RV1	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	MHOM/BR/74/PP/75	145pb
	RV2	CCACCTGGCCTATTTTACACCA		
<i>L.(L.) amazonensis</i>	a1	TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA	IPLA/BR/67/PH8	62pb
	a2	GTGCCCTGACTTGATGTCTA		
<i>L.(V.) braziliensis</i>	b1	GTGGGCGTATCTGCTGATGAC	MHOM/BR/75/M2903	103pb
	b2	CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA		

As condições da PCR empregando os *primers* RV1/RV2, específicos para a espécie *L.(L.) chagasi*, que proporcionaria uma amplificação de 145pb, produto para essa espécie quando do uso do DNA controle MHOM/BR/74/PP/75, os reagentes e proporção utilizados foram: 25µl tampão *Phoneutria* 2X ((Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda., Brazil); 0.2 milimolar (mM) dNTPs; 0.3mM MgCl<sub>2</sub>; 0.16 picomol (pMol) *primers* RV1/RV2; 0.5µl de DNA a 40 nanograma (ng)/µl; 0.2 µl *Taq Polimerase Phoneutria* 4 unidades (U); 19.4µl H<sub>2</sub>O.

A reação usando os iniciadores para a espécie *L.(L.) amazonensis*, *primers* a1/a2, com expectativa de amplificação de 62pb, foi realizada utilizando-se um *mix* composto pelos seguintes reagentes: 25µl tampão *Phoneutria* 2X (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda., Brazil); 0.2mM dNTPs; 0.3mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 0.4pMol *primers* a1/a2; 0.5µl de DNA a 40 ng/µl; 0.2 µl *Taq Polimerase Phoneutria* 4U; 18.8µl de água (H<sub>2</sub>O).

Ao se utilizar os iniciadores b1/b2, os oligonucleotídeos correspondentes para o complexo *L.(V.) braziliensis*, com geração de um fragmento de 103 pb, as substâncias utilizadas foram: 25µl tampão *Phoneutria* 2X (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda., Brazil); 0.2mM dNTPs; 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.0 pmol *primers* b1/b2; 0.5µl de DNA a 40ng/µl; 0.2 µl; 0.2 µl *Taq Polimerase* 4U; 17,3µl de H<sub>2</sub>O.

Para amplificação das seqüências, a reação foi realizada em termociclador automático modelo BIOER XP *cycler* (BIOER Technology, Ltd, China). Após introdução dos microtubos com o *mix* contendo os iniciadores específicos para cada espécie, na primeira etapa que corresponde à desnaturação da dupla fita de DNA, a temperatura foi elevada a 95°C/5min para separação inicial das fitas e, nas fases seguintes foi de 95°C durante 30s. Na etapa correspondente ao anelamento, para que os *primers* se liguem por complementaridade com o DNA alvo, a temperatura foi reduzida a 70°C durante 1 min para a espécie *chagasi*, 55°C/90s para a *amazonensis* e de 70°C/90s para a *braziliensis*. Já na relativa à extensão ou amplificação, isto é, o início da polimerização, a temperatura foi elevada a 72°C/90s e, a extensão final foi a 72°C durante 10 min para todas as espécies. Os materiais resultantes do primeiro ciclo foram desnaturados, anelados aos *primers* no segundo, e então amplificados pela DNA *polimerase* no terceiro e, assim o ciclo se repetiu por 40 vezes para a espécie *chagasi* e 35 vezes para as espécies *amazonensis* e *braziliensis*. As condições para realização da PCR e o *mix* para cada espécie utilizado na reação estão descritos no quadro 2, e os ciclos da PCR, no quadro 3.

Quadro 6 – Elementos e condições da PCR utilizando os *primers* para as espécies *chagasi*, *amazonensis* e *braziliensis* em substratos de pacientes com diagnóstico de LTA

Espécie	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
<i>Primer</i>	RV1/RV2	a1/a2	b1/b2
Mix	25µl tampão <i>Phoneutria</i> 2X; 0.2mM dNTPs; 0.3mM MgCl <sub>2</sub> ; 0.16 pMol <i>primers</i> RV1/RV2; 0.5µl de DNA 40ng/µl; 0.2µl <i>Taq Polimerase</i> 4U; H <sub>2</sub> O – 19.4µl.	25µl tampão <i>Phoneutria</i> 2X; 0.2mM dNTPs; 0.3mM MgCl <sub>2</sub> ; 0.4 pMol <i>primers</i> a1/a2; 0.5µl DNA 40ng/µl; 0.2µl <i>Taq Polimerase</i> 4U; H <sub>2</sub> O – 18,8µl.	25µl tampão <i>Phoneutria</i> 2X; 0.2mM dNTPs; 0.3mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 pMol <i>primers</i> b1/b2; 0.5µl DNA 40mg/µl; 0.2 µl <i>Taq Polimerase</i> 4U; H <sub>2</sub> O – 17,3µl.

Quadro 7 – Ciclos da PCR utilizando os *primers* para as espécies *chagasi*, *amazonensis* e *braziliensis* em substratos de pacientes com diagnóstico de LTA

Espécie	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
PCR	40 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
Ciclos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturação</li> <li>- Inicial – 95°C/5 min</li> <li>- Seguinte – 95°C/30 s</li> <li>• Anelamento – 70°C/60 s</li> <li>• Extensão – 72°C/90 s</li> <li>Extensão final – 72°C/10 min</li> <li>40 vezes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturação</li> <li>- Inicial – 95°C/5 min</li> <li>- Seguinte – 95°C/30 s</li> <li>• Anelamento – 55°C/90 s</li> <li>• Extensão – 72°C/90 s</li> <li>Extensão final – 72°C/10 min</li> <li>35 vezes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturação</li> <li>- Inicial – 95°C/5 min</li> <li>- Seguinte – 95°C/30 s</li> <li>• Anelamento – 70°C/90 s</li> <li>• Extensão – 72°C/90 s</li> <li>Extensão final – 72°C/10 min</li> <li>35 vezes</li> </ul>
Produto Padrão	145pb	62 pb	103 pb

#### 4.7 ANÁLISE DOS PRODUTOS RESULTANTES DA PCR

Os fragmentos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética submarina horizontal em gel de agarose 2%, em tampão Tris-EDTA-Acetato (TAE) 1X pH 8 à 80v e 200mA (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M). Os géis foram corados com brometo de etídeo, os produtos visualizados sobre o transluminador de luz UV e analisado pelo sistema de fotodocumentação *alfadigidoc*. Para confirmação dos resultados a eletroforese foi novamente realizada.

#### 4.8 APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CEP/UFMS, sob o nº 1152 em 30 de abril de 2008 (Anexo A).

#### 4.9 FINANCIAMENTO

Este projeto teve recursos financeiros da Fundação para o Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia (FUNDECT), edital Chamada MS/CNPq/FUNDECT 04/07 – SAÚDE.

## 5 RESULTADOS

Na primeira etapa do estudo, a PCR foi realizada em DNA obtido de substrato salivar proveniente de seis pacientes com suspeita de LV e um com suspeita de recidiva da LTA na forma cutânea (nº1). Nessa reação ocorreu somente amplificação de DNA quando usado os iniciadores para as espécies *L.(V.) braziliensis* na amostra obtida em substrato de secreção salivar referente ao paciente (nº1). Portanto, os pacientes com LV foram excluídos do estudo, pois sentiu-se que havia necessidade de adequação da técnica para utilização nesse tipo de amostra para os pacientes com essa patologia.

Estabelecidas todas as condições da PCR e após a padronização da técnica, ao serem utilizados os *primers* para a espécie *L.(L.) chagasi*, RV1 – CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG e RV2 – CCACCTGGCCTATTTTACACCA e os *primers* específicos para a espécie *L.(L.) amazonensis*, a1 – TGCG AGGATAAAGGGAAAGAA e a2 – GTGCCCTGACTTGCATGTCTA, não ocorreu amplificação de DNA leishmaniótico em nenhuma amostra dos pacientes do estudo.

Ao se utilizar os *primers* para a identificação de *L.(V.) braziliensis*, b1 – GTG GGCATCTGCTGATGAC e b2 – CAAAAGCGAGGGACTGCGGA, a avaliação do limiar de detecção revelou a geração de um fragmento de aproximadamente 103pb, tamanho estimado para essa espécie, determinando um resultado positivo. Esse resultado foi encontrado nas amostras salivares dos pacientes nº1 (figura 16), 2 e 3 (figura 17). Também resultaram positivos os esfregaços das lesões da mucosa oral do paciente nº3 (figura 17) e nasal do paciente nº4 (figura 18).

A amplificação de DNA e o substrato utilizado para cada paciente estão demonstradas no quadro 8.

Quadro 8 – Relação da amplificação de DNA e substrato utilizado

Espécie	<i>L. (V.) braziliensis</i>	
<i>Primer</i>	b1 –GTGGCGTATCTGCTGATGAC	b2 – CAAAAGCGAGGGACTGCGGA
DNA controle	MHOM/BR/75/M2903	
Nº1 – LC	Positivo saliva	
P Nº2 – LCM	Positivo saliva	
C Nº3 – LCM	Positivo saliva e lesão do palato	
R Nº4 – LM	Positivo lesão nasal	

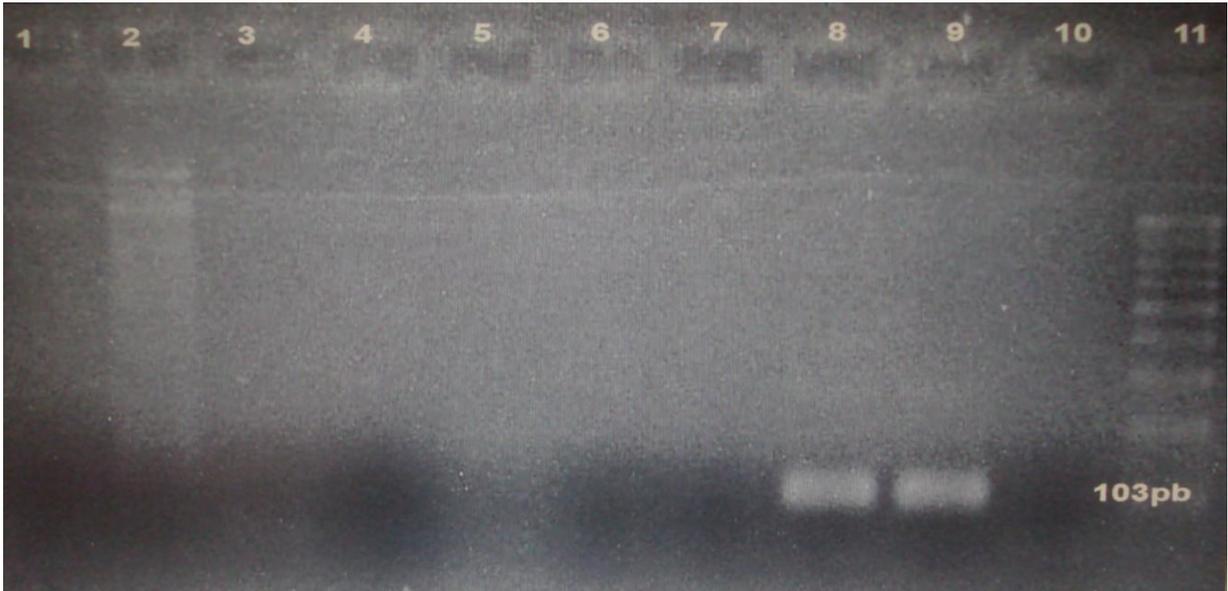


Figura 16 – Produtos provenientes de amostra de secreção salivar de pacientes com LC e LV, demonstrando amplificação por PCR de *L.(V.) braziliensis* na amostra de um paciente com LTA. Canaletas 1, 3, 4, 5, 6 e 7 pertencentes às amostras dos pacientes com LV; canaleta 8 - amostra do paciente com LTA (n°1); canaleta 2 - controle saudável; canaleta 9 - controle positivo; canaleta 10 - controle negativo; canaleta 11 - marcador que determina o padrão de tamanho molecular

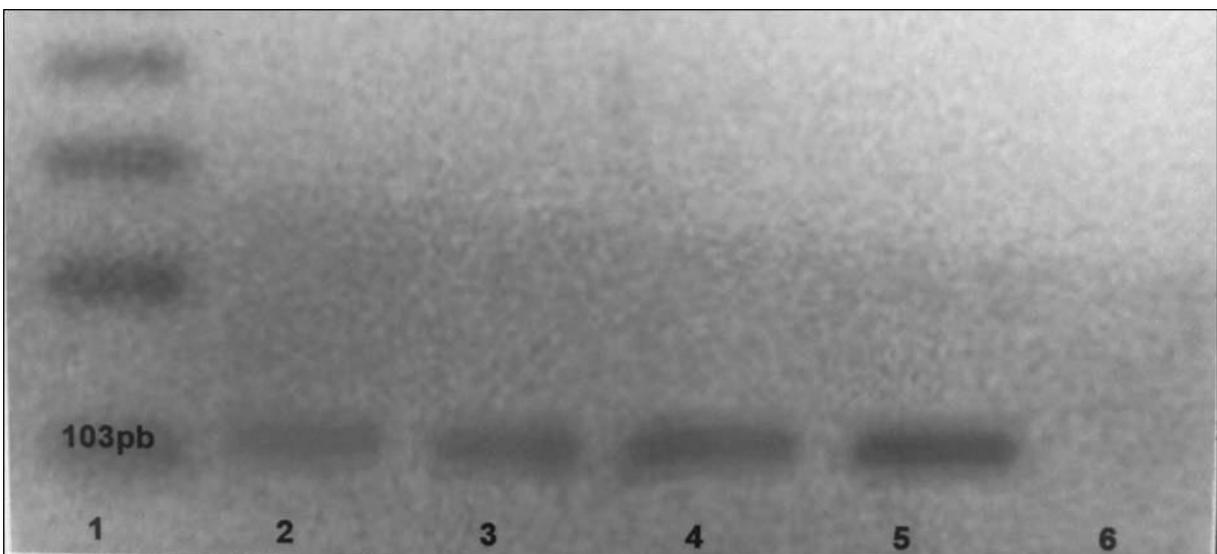


Figura 17 – Eletroforese identificando os produtos da amplificação da PCR em amostras da saliva dos pacientes n°2 e 3 com LCM usando os iniciadores b1 e b2, cepa referência *L. (V.) braziliensis*. Canaleta 1 - marcador que determina o padrão de tamanho molecular; canaleta 2- saliva do paciente n°2; canaleta 3 - saliva do paciente n°3; canaleta 4 - esfregaço da lesão do palato coletada com cotonete do paciente n°3; canaleta 5 - controle positivo; canaleta 6 - controle negativo

No paciente n°4, cujo diagnóstico inicial foi sugestivo de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado de úvula e palato mole, estágio IV (T3N2M0) através de biópsia, não foi constatada nenhuma amplificação na amostra proveniente da secreção salivar, provavelmente porque o mesmo apresentava

xerostomia e a quantidade coletada de saliva foi insuficiente ou inexistente (figura 18). No entanto, ocorreu a geração de fragmentos de DNA do parasita *L.(V.) braziliensis* diretamente da amostra, obtida com cotonete de algodão, do substrato das lesões nasais desse paciente (figura 18).

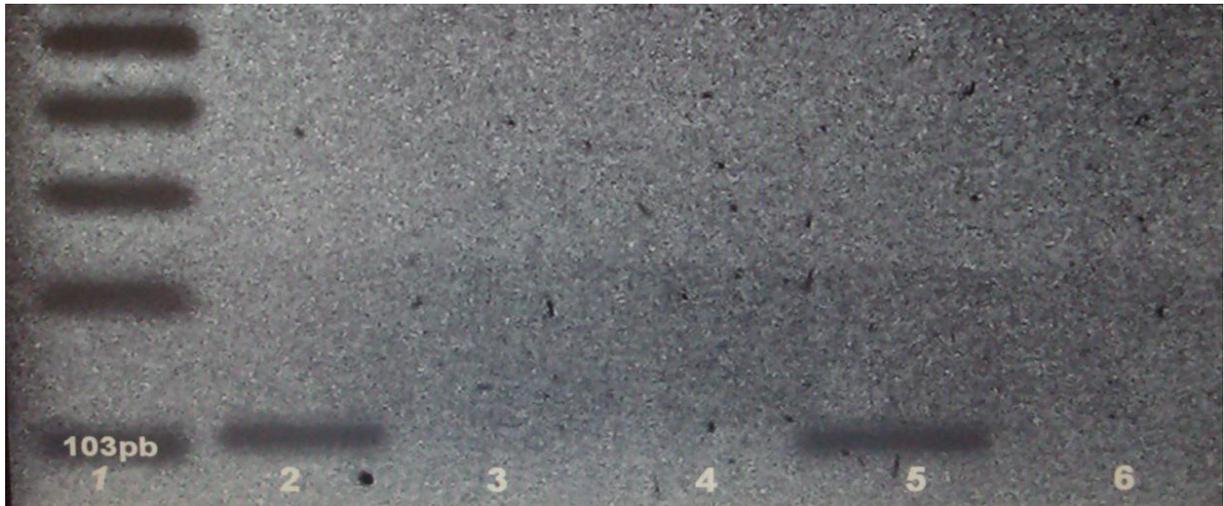


Figura 18 – Eletroforese identificando os produtos da amplificação da PCR em substratos provenientes do paciente n°4 com LM, usando os iniciadores b1 e b2, cepa referência *L. braziliensis*. Canaleta 1 - marcador que determina o padrão de tamanho molecular; canaleta 2 – esfregaço da lesão da mucosa nasal coletada com cotonete; canaleta 3 – amostra da lesão da mucosa do palato coletada com cotonete; canaleta 4 – substrato da secreção salivar coletada com cotonete; canaleta 5 – controle positivo; canaleta 6 – controle negativo

Todavia, a PCR não detectou presença de DNA do parasita nas amostras obtidas com espátula de madeira das lesões do palato dos pacientes n°3 e n°4, e nas provenientes da lesão da mucosa do palato através de cotonete do quarto paciente (n°4) (figura 17).



Figura 19– Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando amplificação de DNA *L. (V.) braziliensis* na canaleta 3 - secreção salivar do paciente n°2; canaleta 4 – secreção salivar do paciente n°3; canaleta 5 - lesão do palato colhida com cotonete sem gel do paciente n°3; canaleta 10 – substrato de lesão nasal coletado com cotonete, conservada c/ gel do paciente n°4

O quadro nº9 resume os resultados de PCR nos pacientes do estudo, em todas as amostras coletadas.

Quadro 9 – Relação resultados da PCR nas amostras dos pacientes com LTA do estudo

Amostra Paciente	Saliva	Lesão palato		Lesão nasal
		Cotonete	Espátula madeira	
Nº1	Positivo	NR	NR	NR
Nº2	Positivo	NR	NR	NR
Nº3	Positivo	Positivo	Negativo	NR
Nº4	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

NR:não realizado

## 6 DISCUSSÃO

Diversos autores utilizaram a PCR para diagnóstico da LTA tanto na expressão cutânea quanto na mucosa (2,7,11,38,44,47,48,49,50,51,52) através de biópsias (7,8,30,38,45,47,48,49,50,51), exsudatos e raspados obtidos com cotonetes (32). No entanto, não encontramos relatos do uso da saliva como substrato diagnóstico na LTA.

Em se tratando da LTA, a sensibilidade e a especificidade da PCR independem do número, estágio e localização do parasita (44), o que poderia fazer supor que a amplificação do DNA de *Leishmania* fosse possível também na saliva, o que motivou a realização do presente estudo.

Metodologias diagnósticas sensíveis como a PCR podem usar a saliva como um método não invasivo para detectar enfermidades sistêmicas (41,53) e orais (53) como também alguns tipos de câncer, entre eles o de mama (56) e células escamosas do carcinoma oral (57). O fluido salivar pode ainda fornecer fonte de DNA para identificar o vírus do sarampo (64), da AIDS (60) assim como o da hepatite C (59) além de anticorpos para hepatite A,B e C como também o da AIDS (59), infecção por *Plasmodium falciparum* (58); microorganismos como herpes simplex tipo I (65), *S. mutans* e *S. sobrinus* (61,62), periodontopatógenos (41,63) e qualquer organismo que contenha DNA. A possibilidade de amplificação do DNA de *Leishmania* nesse tipo de substrato foi demonstrada pela primeira vez, através da positividade da reação nos pacientes 1, 2 e 3.

A aplicabilidade da PCR em secreção salivar quando analisada do ponto de vista custo X benefício, em termos diagnósticos, tem um grande valor.

O custo quanto à obtenção do substrato pode ser considerado baixo. No caso do paciente nº1, a coleta utilizou apenas uma seringa e, no nº2 e 3, foram empregados somente microtubos tipo *Eppendorf* nos quais a saliva era dispensada diretamente, não havendo necessidade de transferência de recipiente para transporte. Quando comparados com amostras de sangue e urina, os valores para transporte e conservação dos substratos salivares também são menores (56).

A técnica de captação é muito simples, como demonstrado pela coleta realizada nos pacientes do estudo, em que essa secreção foi dispensada diretamente no tubo ou através de aspiração com seringa e também pelo uso de cotonete. A simplicidade da técnica de captação da saliva diminui a possibilidade de

ocorrência de falhas técnicas por não necessitar intervenção direta de técnicos nessa fase.

O não envolvimento de material biológico crítico propicia um menor risco de contaminação, tanto para os clínicos e técnicos de laboratório quando no manuseio das amostras, como para a própria amostra. Entre outras vantagens da utilização do fluido oral como substrato, está o acesso fácil à boca (55) com procedimento não invasivo (53,54,63,64). A coleta da saliva pode ser considerada inócua e indolor, diferentemente da biópsia, que necessita anestésiar o local que irá fornecer o material (2,27).

A LCM é uma doença progressiva, é condição de grande desafio diagnóstico (11,30,34,45), de prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura (11) e difícil tratamento (20,28,30,34). Normalmente se expressa decorrido algum tempo após a inoculação do parasita na pele (11) e podem levar a lesões destrutivas do trato respiratório superior (30,34). Na apresentação mucosa as manifestações podem ser graves e mutilantes (26,34), causando desconforto físico e estético além de apresentar alto índice de morbidade e significativa mortalidade por complicações advindas (20,34). Portanto, na expressão mucosa da leishmaniose, a saliva como meio diagnóstico pode ter grande relevância, capaz de vir a ser uma alternativa ou até mesmo solução para a dificuldade em se obter substrato das lesões mucosas para a realização de biópsia, método considerado invasivo e doloroso (32). O fluido oral como substrato da PCR pode ser extremamente útil na identificação parasitária e, assim, auxiliar a investigação diagnóstica de LCM através de técnica não invasiva.

Os métodos parasitológicos clássicos apresentam baixo desempenho para o diagnóstico da doença, e a confirmação parasitária nem sempre é possível (15,16,30,38) em razão do restrito número dos microorganismos presentes na lesão (38), especialmente na forma mucosa (40,45). A PCR, técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detectar uma única molécula de DNA num substrato ou um fragmento contanto que no mesmo o alvo esteja presente, pode contribuir na detecção genômica e ser aliada aos métodos convencionais, visto que o parasita, se presente, será identificado na amostra através da amplificação de seu DNA. Inclusive, a PCR é útil mesmo se aplicada em situações de reduzida presença de DNA (24,38).

No presente estudo, a utilidade da PCR foi bem demonstrada, pois todos os indivíduos do estudo apresentaram dificuldade diagnóstica através dos métodos

clássicos e tiveram amplificação de DNA de leishmânia através dessa metodologia molecular.

No paciente n°4, a PCR seria de grande importância desde que foi estabelecido o diagnóstico de carcinoma espinocelular de palato. Provavelmente, a patologia tratava-se desde o início de LTA, já que o tratamento radioterápico realizado quando do envolvimento mucoso não apresentou regressão das lesões. Pelo contrário, estas foram só aumentando, e somente tiveram resolução após o tratamento específico com anfotericina B. Se o diagnóstico de leishmaniose tivesse sido confirmado desde o início, poderia ter sido evitado um tratamento tão agressivo e radical como a radioterapia, com consequência comprovada através de seus efeitos deletérios e residuais principalmente na região de cabeça e pescoço (66).

A metodologia molecular tem valor principalmente nos casos inconclusivos, de dúvida ou então naqueles que a terapia indicada seja agressiva e possa apresentar complicados efeitos residuais. Esses fatos foram de suma importância no estudo, pois o paciente n°1 apresentou diagnóstico inconclusivo no segundo episódio, o n°2 era refratário ao antimonial, o n°3 apresentou sorologia com títulos baixos de anticorpos e os resultados da biópsia do paciente n°4 não detectaram parasitas e foram apenas sugestivos de LM.

A identificação precisa e a classificação das espécies de *Leishmania* é importante na vigilância em saúde pública, pois diferentes espécies são responsáveis por distintas expressões clínicas da LTA (7). Nos indivíduos participantes do estudo, a PCR identificou a *L.(V.) braziliensis* como agente etiológico da doença em todos os casos. De fato, essa é a espécie predominante causadora da LTA no Brasil, possuindo a mais extensa distribuição geográfica no País (1,4,21,33). Outros pesquisadores identificaram essa espécie como responsável pela maioria dos casos de LTA na região Centro-Oeste (22).

O parasita *L.(V.) braziliensis* é responsável pela forma mais destrutiva da LT no Novo Mundo (25), apresenta características de alta agressividade aos tecidos cutâneos e mucosos, escassez (17,28) e difícil isolamento nos tecidos assim como resistência à terapia antimonial (9) além de freqüentes recidivas (28) o que sintetiza a utilidade da PCR na identificação parasitária, como no caso do paciente n°2, refratário ao tratamento antimonial, com freqüentes reativações dessa expressão clínica.

Entre as dificuldades encontradas para a realização deste trabalho, como em qualquer um que necessite interdisciplinaridade, pode ser relatada a necessidade da presença constante no ambulatório à espera dos pacientes, o que é difícil, pois nem sempre é possível estar presente no momento da consulta antes de se iniciar a terapia medicamentosa. O seguimento pós-terapia dos pacientes também foi complicado. No caso do indivíduo com LC (n°1), esse nunca mais retornou ao NHU/UFMS para monitoramento da evolução e possível nova avaliação tanto médica quanto na saliva, tampouco respondeu às solicitações para comparecimento. Já nos com LCM (n°2 e 3) e no com LM (n°4), foi possível o acompanhamento enquanto eles retornavam para avaliação clínica em razão de que tanto o envolvimento mucoso e o tratamento, são mais complicados que na expressão cutânea, logo não há interrupção ambulatorial.

Na LTA recomenda-se supervisão mensal por três meses consecutivos após o esquema terapêutico para a forma cutânea visando verificação da evolução da doença, seguimento e reavaliação e, para a mucosa seis meses (2,11,27). Após a cura clínica da LC, ou seja, reepitelização das lesões ulceradas e não ulceradas, regressão da infiltração e eritema num prazo de até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (2,11,27). Na LM, o critério de cura é determinado pela regressão de todos os sinais clinicamente e comprovado pela rinoscopia anterior para a avaliação de cura até seis meses pós-terapia medicamentosa (2,11,27). Em ambas expressões, o paciente deverá ser acompanhado de dois em dois meses até completar 12 meses após o tratamento (2,27). Os pacientes n°2 e 3 não foram avaliados regularmente no NHU/UFMS em razão de residência distante mas tiveram seu acompanhamento na unidade de saúde de suas cidades de origem. O de n°4 foi avaliado de acordo com o protocolo como também foi encaminhado para reabilitação oral (prótese dentária) visando uma melhora na sua qualidade de vida. Para avaliação da prótese, necessitou acompanhamento regular, oportunizando o seguimento da evolução clínica da doença após o esquema terapêutico, permitindo observar a cura clínica, pois houve regressão total tanto das lesões orais quanto nasais, fato confirmado pela avaliação do otorrinolaringologista.

O restrito número de pacientes participantes do estudo se deve ao fato da dificuldade de se encontrar sujeitos com o critério essencial para inclusão no estudo: indivíduos com sinais e sintomas que permitissem a suspeita ou diagnóstico da LTA, sem estar em terapia medicamentosa.

O presente estudo foi pioneiro, pois revelou pela primeira vez ser possível a amplificação do DNA de *Leishmania* através de PCR na secreção salivar de pacientes com LTA. Possibilitou também a identificação da *L.(V.) braziliensis* como espécie envolvida na etiologia da doença.

Mesmo que precoce esta pesquisa pode representar um horizonte na colaboração da investigação diagnóstica da LTA, utilizando-se uma amostra que permite uma coleta não invasiva.

Novos estudos são necessários para avaliar a utilidade do uso da saliva pela PCR para o diagnóstico da LTA, através do estudo da sensibilidade e especificidade do método, com um maior número de participantes, para a confirmação e otimização destes resultados.

## 7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos:

- Pela primeira vez foi possível identificar DNA de *Leishmania* em saliva de pacientes com LTA, conferindo pioneirismo ao estudo.
  
- A *L.(V.) braziliensis* foi a única espécie identificada nos pacientes do estudo.
  
- A secreção salivar apresentou várias vantagens que indicam a possibilidade de seu uso como substrato na PCR para investigação diagnóstica da LTA.
  
- Novos estudos são necessários para consolidar a utilidade da saliva como amostra adequada para o diagnóstico da LTA através da PCR, colaborando na complementaridade de métodos diagnósticos da LTA.

## REFERÊNCIAS

- 1- Reis LC, Brito MEF, Almeida EL, *et al.* Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(5):439-43.
- 2- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 182p.
- 3- Silva LJ, Camargo-Neves VLF. As Leishmanioses, uma visão para o clínico. *Prática Hospitalar.* 2004;36:42-54.
- 4- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Normas e Manuais Técnicos. 6 ed. Série A. Brasília, 2005. p.444-66.
- 5- Passos VMA, Barreto SM, Romanha AJ, *et al.* Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(1):5-12.
- 6- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Inf Dis.* 2007;7(9):581-96.
- 7- Mimori T, Sasaki J, Nakata, M, *et al.* Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene.* 1998;210:179–86.
- 8- Garcia FCB; Santos SSR, Chociay MF, *et al.* Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmânia cutâneo-mucosa. *An Bras Dermatol.* 2005;80(3):339-44.

- 9 - Cifuentes MCB, Ospina PD, Arias LFC. La *Leishmania spp* como estratégia de diagnóstico y tratamiento de la Leishmaniasis, um artículo de revision. Inv Andina. 2007;9(15):64-76.
- 10- Rodriguez N, Cardona M, Zerpa O, *et al.* Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania spp* en áreas endémicas de Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 2001;41(1):21-6.
- 11- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Inst Med Trop. 2003;36(1):71-80.
- 12- Forkner CE, Zia LS. Viable *Leishmania Donovanii* in nasal and oral secretions of patients with Kala-azar and the bearing of this finding on the transmission of the disease. Exp Med. 1934;59(4):491-99.
- 13- Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval MEC, *et al.* Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010;105(3):310-13.
- 14- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. Gen Mol Res. 2004;2:251-257.
- 15- Loureiro CCP, Dadalti P, Gutierrez MCG, Ramos-e-Silva M. Leishmaniose: métodos diagnósticos. Folha Médica. 1998;117(2):131-4.
- 16- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F *et al.* Comparisson of PCR Assays for Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Clin Microbiol. 2006;44(4):1435-39.
- 17- Sampaio RNR, Andrade GB, Pereira AC, *et al.* Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. An Bras Dermatol. 2002;77(5):557-61.

- 18- Sánchez J, Orozco L, Buendia J, Muñoz G. Validez del diagnóstico presuntivo de leishmaniasis cutánea realizado por mediadores comunitarios en Colombia. *Pan Am J Public Health*. 2007;21(6):335-44.
- 19- Ampuero J, Macedo V, Marsden P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):22-6.
- 20- Amato VS, Tuon FF, Bracha HA, *et al*. Mucosal leishmaniasis – Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*. 2008;105:1-9.
- 21- Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):328-37.
- 22- Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollilo E. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):43-6.
- 23- Kignel S, Donato AC, Moreira CA, *et al*. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev APCD*. 1997;51(6):543-7.
- 24- Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania SP* na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(6):540-3.
- 25- Medeiros ACR, Roselino AMF. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. *An Brasil Dermatol*. 1999;74(4):329-36.
- 26- Reis LC, Brito MEF, Souza, MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Patol Trop*. 2006;35(2):103-15.

- 27- Ministério da Saúde (Brasil), Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2000. 62p.
- 28- Sampaio RNR, Marsden PD. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B lipossomal. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(2):125-8.
- 29- Camargo LB, Langoni H. Impact of Leishmaniasis on public health. J Venom Anim Toxins incl Trop. 2006;12(4):527-48.
- 30- Bracho CO, Quintana LP, Arenas SM, *et al.* Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(5):549-54.
- 31- Razera F, Blanco LFO, Bonamigo RR. Relato de Caso - Leishmaniose tegumentar americana: primeiros casos autóctones notificados no Rio Grande do Sul desde 2001 e revisão da literatura. Rev AMIRGS. 2005;49(3):137-216.
- 32- Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña MH, *et al.* Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. Acta Trop. 2002;81:197–202.
- 33- Schubac A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AS, *et al.* Leishmanal antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patient. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(7):987-96.
- 34- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“Espúndia”, Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80:859-76.
- 35- Costa JML. Cura espontânea da Leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. Rev Soc Bras Med Trop. 1992;23(4):205-8.

- 36- Ministério da Saúde (Brasil), Fundação Nacional de Saúde, Dermatologia Sanitária - Brasília. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Centro Nacional de Epidemiologia. Brasília, 1992. 46p.
- 37- Ferreira MP, Roselino AMF, Nascimento MMP, *et al.* Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Rev Inst Med Trop. 2006;48(4):215-17.
- 38- Sing S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006;123:311-30.
- 39- Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(2):137-41.
- 40- Roselino AM. Biologia molecular aplicada às dermatoses. An Bras Dermatol. 2008;83(3):187-203.
- 41- Cury PR, Furuse C, Araújo NS. Técnica e aplicação da reação em cadeia da polimerase na Área Odontológica. Rev Odontol Araçatuba. 2005;26(2):34-9.
- 42- Bruce A, Johnson A, Lewis J *et al.* Biologia Molecular da Célula. Tradução Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.*, - 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- 43- Nogueira JMR, Silva LFF, Hofer E, Araújo AJG. Paleoparasitologia: revisão bibliográfica e novas perspectivas para os estudos microbiológicos. Rev Pat Trop. 2006;35(2):87-102.
- 44- Michalsky EM, Forte-Dias CL, Pimenta, *et al.* Assessment of PCR in the detection of *Leishmânia spp* in experimentally infected individual phlebotominae sandflies (diptera – Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop 2002;44(5):255-9.

- 45- Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, *et al.* Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1819-23.
- 46- Rodrigues EHG, Brito MEF, Mendonça MG, *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in Northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):572-6.
- 47- Venazzi EAS, Roberto ACS, Barbosa-Tessmann IP, *et al.* Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(4):427-30.
- 48- Romero GA, Guerra MVF, Paes MG, *et al.* Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop.* 2001;79:225-9.
- 49- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, *et al.* Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Species. Discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol.* 1994;32(9):246-52.
- 50- Romero GAS, Noronha EF, Pirmez C, *et al.* Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Trop.* 2009;109(1):74-7.
- 51- Rodriguez N, Lima H, Cruz M, *et al.* Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;9(1):105-9.
- 52- Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Salaiza NS, *et al.* PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2009;104(3):691-99.
- 53- Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(3):313-21.

- 54- Tabak LA. A Revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *Diag J Dental Edu.* 2001 dec; 65(12):1335-39.
- 55- Moura SAB de, Gerbi M, Medeiros AMC, *et al.* Identificação de *Helicobacter pylori* na saliva e biofilme dental. *Int J Dent.* 2004 dez;3(2):349-52.
- 56- Lawrence HP. Salivary Markers of Systemic Disease: No invasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc.* 2002;68(3):170-4.
- 57- Hu S, Arellano M, Boonthung P, *et al.* Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6246-52.
- 58- Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, *et al.* PCR detection of Plasmodium in human urine and saliva samples. *Malaria J.* november 2006 (acesso em 15 de dezembro de 2009); (aproximadamente 7p.). Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/5/1/103>
- 59- Lins L, Gomes L, Pimentel R. Detecção do vírus da hepatite C na saliva e suas implicações na prática odontológica. *Rev. ABO Nac.* 2007;15(6): 357-61.
- 60- Ando S, Kakizawa J, Yamamoto Y, *et al.* Detection of HIV RNA and DNA in saliva by RT-PCR and PCR under different conditions. *Int Conf AIDS.* 1994 Aug; 7(12);10: 232.
- 61- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, *et al.* Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:258-262.
- 62- Amoroso P, Franco e Franco TC, Marin JM, Ávila FA. Avaliação comparativa da PCR e fenotipagem na detecção de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* e estudo de transmissão. *Cien Odontol Bras.* 2004;7(2):30-40.

- 63- Shimada MH, Angelis L de, Ciesielsky FIN, *et al.* Emprego de saliva na determinação do risco às doenças periodontais: aspectos microbiológicos e clínicos. Rev Odonto UNESP. 2008;37(2):183-189.
- 64- Oliveira SA, Siqueira MM, Camacho LAB, *et al.* Use of RT-PCR on oral fluid samples to assist the identification of measles cases during an outbreak. Epidemiol Infect. 2003;130:101-6.
- 65- Lazarini PR, Vianna MF, Alcântara MPA, *et al.* Pesquisa do vírus herpes simples na saliva de pacientes com paralisia facial periférica de Bell. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2006;72(1): 7-11.
- 66- Corvalan FH, Marcucci G, Guimarães JJ. Cárie radioinduzida – Revista da literatura e instituição de um protocolo preventivo. Rev ABO Nac. 2003;11(2):112-7.

## APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA

IDENTIFICAÇÃO – HISTÓRIA SOCIAL		ORDEM _____/____
Nº Pront _____	HU _____	Suspeita LV _____
Nome _____		LT - C CM M _____
DN ____/____/____		Idade ____ anos Data ____/____/____
Naturalidade _____		Gen M F Raça B N A I Nív Esc _____
Procedência _____		Profissão _____
Animais SN _____		Hábitos _____
Residências anteriores _____		Área U R PU _____
Aspectos habitat _____		
Obs. _____		

HISTÓRICO MÉDICO																									
Doenças presentes _____																									
Lesão ____ Data ____/____/____ Local 1-PELE 2-MUCOSA obs _____																									
1-FACE ____ NARIZ 2-ASA 3-SEP 4-PALATO– MOLE DURO 5-LÁBIOS ____ 6-ORELHA ____																									
7-PESCOÇO ____ 8-GARGANTA ____ 9-TÓRAX ____ 10-MÃO ____ 11-MSS ____																									
12-MMII ____ 13-PÉ ____ 14- OUTRO ____																									
ASPECTO1-GRANULOMATOSO ____ 2-PURULENTO ____ 3-PÁPULA ____																									
4-ÚLCERA ____ 5-CROSTOSA ____ 6-ERITEMATOSA ____ 7-PRURIGINOSA ____																									
8-CICATRICAL ____ 9-OUTRO ____																									
Evolução _____																									
Tratamento _____																									
Obs _____																									
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>X</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td> </tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

SINAIS E SINTOMAS	
1-CEFALÉIA _____ F O 2-FEBRE _____ 3-SENSAÇÃO GRIPE _____	
4-PESO NA FACE _____ 5-TOSSE _____ 6-EXPECTORAÇÃO _____	
7-OTALGIA _____ 8-ZUMBIDO _____ 9-TONTURA _____ 10-ROUQUIDÃO _____	
11-DISPNEIA _____ 13-ARTRALGIA _____ 14OUTROS _____	
A-NARIZ– 1-OBSTRUÇÃO _____ 2-PRURIDO _____ 3-ODOR FÉTIDO _____	
4-EPISTAXE _____ 5-CORIZA _____ 6-DOR _____ 7-HIPEREMIA _____	
8-EDEMA _____ 9-AUMENTO VOL.NASAL _____ 10-OUTRO _____	
B-BOCA–PRURIDO PALATO 1-M _____ 2-D _____ DOR PALATO 3-M _____ 4-D _____	
5-SIALORRÉIA _____ 6-XEROSTOMIA _____ 7-SECREÇÃO _____ 8-HALITOSE _____	
C-GARGANTA-1-PRURIDO _____ 2-DOR _____ 3-HIPEREMIA _____	
4-SECREÇÃO _____ 5-DISFAGIA _____ 6-ODINOFAGIA _____	
D-FACE-1-PRURIDO _____ 2-DOR _____ 3-HIPEREMIA _____ 4-EDEMA _____	
E-PESCOÇO-1-PRURIDO _____ 2-DOR _____ 3-HIPEREMIA _____ 4-EDEMA _____	
F-TORAX-1-PRURIDO _____ 2-DOR _____ 3-HIPEREMIA _____ 4-EDEMA _____	
G-MEMBROS-1-PRURIDO _____ 2-DOR _____ 3-HIPEREMIA _____ 4-EDEMA _____	

## SINAIS QUE ANTECEDERAM DIAGNÓSTICO

DATA	DESCRIÇÃO	TEMPO	OBS

## PROCEDIMENTOS


## AVALIAÇÃO CLÍNICA

BOCA \_\_\_\_\_ DENTES– Bom Ruim N° \_\_\_\_\_ SALIVA – Normal Espessa Reduzida  
 GENGIVA–Normal Sangrante TÁRTARO–Presente Ausente HIGIENE ORAL – Boa Ruim  
 Obs \_\_\_\_\_

## LESÕES

PELE \_\_\_\_\_ A-FACE B-ORELHA C-MMSS D-MMII E-PÉ \_\_\_\_\_ F-MÃO \_\_\_\_\_  
 G-TORAX H-PESCOÇO I-OUTRO \_\_\_\_\_ J-NARIZ \_\_\_\_\_ K-SEPTO NASAL \_\_\_\_\_  
 OROFARINGE \_\_\_\_\_ L-LÁBIOS \_\_\_\_\_ M-PALATO DU N-PALATO MOLE- O-GARGANTA

## ASPECTO

1-NORMAL 2-ÚLCERA 3-PÁPULA 4-HIPEREM 5-L.CROSTOSA 6-L.GRANULOMATOSA  
 7-CICATRICAL 8-MORIFORME 9-EDEMA NASAL 10-DESABAMENTO ASA NARIZ  
 SEPTO 11- PERFURAÇÃO 12- DESTRUIÇÃO PARCIAL 13-DESTRUIÇÃO TOTAL  
 PALATO 14-PERFURAÇÃO 15-LESÃOVERRUCOSA 16-OUTRO \_\_\_\_\_

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

## LESÕES

DATA	LOCAL	ASPECTO	OBS

## EXAMES COMPLEMENTARES SOLICITADOS

IDRMN _____	Parecer _____
IFI _____	Parecer _____
Mielograma _____	Parecer _____
Biópsia _____	Local _____
Parecer _____	
Obs _____	

## AVALIAÇÃO PCR


## APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO (TICLE)

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa intitulado “PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em saliva humana para investigação de Tegumentar Americana” (LTA). Leia atentamente estas informações antes de decidir.

a) A principal justificativa para essa pesquisa está na razão do crescente número de casos confirmados de leishmaniose no estado do MS. Será utilizado o momento da sua consulta médica para coletarmos sua saliva (cuspe) e assim buscamos, testar um método de diagnóstico através da PCR, para identificar precocemente e investigar de modo não invasivo, a possível presença na saliva, do agente que causa a leishmaniose.

b) As leishmanioses são doenças infecciosas que acometem humanos e outros vertebrados, causadas por várias espécies de parasitas (microorganismos). A Tegumentar americana é uma doença que causa feridas na pele e muitas vezes na boca e garganta. A visceral afeta os órgãos internos como o baço, fígado e medula óssea, dá febre, emagrecimento, tosse seca, sua barriga pode ficar inchada (hepatoesplenomegalia) e você pode ter manifestações como dor de barriga e diarreia. Ambas doenças são transmitidas pela picada de um mosquito.

c) O diagnóstico de qualquer uma das formas da leishmaniose exige que se demonstre a presença do protozoário (parasita - agente que causa a doença). Deve ser clínico, epidemiológico e laboratorial. O diagnóstico clínico é baseado nos sintomas da doença. O laboratorial baseia-se na evidência do parasita através do exame parasitológico direto e indireto e em provas imunológicas. Para a pesquisa direta são utilizados os seguintes procedimentos: escarificação, punção aspirativa e biópsia (histopatológico). No caso da LTA os exames mais comumente utilizados é a coleta de material das lesões por biópsia que retira um pedacinho da ferida ou então raspado na lesão e depois leva para exames de laboratório, ou então pode ser por uma reação chamada intradermoreação de Montenegro. Na LV, além da reação de Montenegro, tem que fazer também um exame de aspirado da medula óssea para exame de laboratório. Quem decide quais exames serão é o médico e, caso ele ache necessário, poderá solicitar outros exames.

d) Nesse teste que estamos te convidando a participar será para testar um método molecular chamado Reação em Cadeia da Polimerase que já provou, no diagnóstico da leishmaniose, ter alta sensibilidade com rápida detecção do parasita, podendo ser utilizada na tipagem de leishmânias (agente que causa a doença) isoladas de material clínico, insetos vetores (que transmite a doença), reservatórios (animais) ou cultura (material coletado para exames), mediante o sistema completo de amplificação do DNA (igual ao teste de paternidade). A PCR é um método rápido, fácil e confiável para uma investigação de rotina. Baseado nessas informações e sabendo que o agente etiológico da leishmaniose pode ser encontrado em fluidos corporais aonde apenas testes laboratoriais muito sensíveis podem detectar sua presença, e por ser a saliva (cuspe) um produto do organismo humano, buscamos tentar encontrar o parasita nessa secreção amplificando ou multiplicando vestígios de seu DNA.

e) Os desconfortos e riscos possíveis para a coleta da saliva não existe, pois é um método simples e será coletada através de uma seringa. Os benefícios que posso

esperar em participar dessa pesquisa, caso tenha sinais e sintomas da doença, é que posso ter um diagnóstico complementar aos outros testes usados para comprovação da doença e já protocolados. O resultado da PCR não irá interferir na decisão médica, pois o diagnóstico definitivo da doença depende da associação de outros fatores conhecidos pela equipe médica. Como você está em acompanhamento clínico para a doença, quem decide o tratamento será o médico.

f) Em caso de fazer parte do grupo controle, ou seja, aquele que não tem suspeita da doença, caso o resultado seja positivo, lembrar que este é um estudo para testar a sensibilidade e especificidade do teste na saliva, devendo ser conferido com todos os dados usados rotineiramente no diagnóstico da leishmaniose como procedência do paciente, clínica da doença e testes laboratoriais. O diagnóstico por PCR não vai ser usado para diagnóstico de tratamento, mas sim aproveitado para discutir diagnóstico de rotina.

g) A forma de acompanhamento e assistência é a proposta pela avaliação médica e os dados de interesse da pesquisa coletados serão informados no transcorrer de minhas consultas e/ou tratamento, anotados em ficha específica previamente conhecida. Quanto às informações coletadas do prontuário médico, serão somente as de interesse da pesquisa e estas serão transcritas para essa ficha na qual você poderá acessar quando julgar necessário;

h) Será garantido esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia (modo de desenvolvimento), assim como poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado), sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

i) Não ocorrerá penalização alguma e a garantia da continuidade do tratamento médico será mantida caso venha ocorrer recusa em participar ou retirar o consentimento, em qualquer fase da pesquisa;

j) Fica consentida a divulgação em publicações científicas dos resultados obtidos durante este estudo e sendo a imagem (fotografia de possíveis lesões) parte necessária do estudo, fica também liberada, desde que as informações pessoais não sejam mencionadas, tendo como garantia o sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, assegurando-me absoluta privacidade, preservando a meu anonimato e minha identificação;

k) Por se tratar de pesquisa em doença pré-existente com protocolo médico definido, não há ressarcimento por conta de que será executada durante o acompanhamento médico.

l) Direito de garantia de tomar conhecimento, pessoalmente, do(s) resultado(s) parcial(is) e final(is) desta pesquisa.

m) A sua participação será importante independente ser do grupo principal ou controle. Se você for do grupo suspeito da doença, os procedimentos convencionais de diagnóstico e tratamento da doença não sofrerão interferência, pois se trata de doença já com protocolo estabelecido tanto para diagnóstico quanto para o tratamento. Se for do grupo controle, será importante saber se o teste em questão tem sensibilidade em reconhecer o agente causador da doença e diferenciar de outros microrganismos que fazem parte da cavidade bucal e não são causadores de doenças.

n) Fica garantido o direito de renúncia, sem qualquer prejuízo ao tratamento e a qualquer momento. Em caso de dúvidas quanto a sua participação, entre em contato com a pesquisadora Fátima Heritier Corvalan (9983 5499 ou 3304 9663) e/ou Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS (3345 7187).

## APÊNDICE C – DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

### QUALIFICAÇÃO DO DECLARANTE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Objeto da Pesquisa

Nome \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento:..... / ..... / ..... Sexo: M ( ) F ( )  
 Endereço \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_  
 Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ ESTADO \_\_\_\_\_  
 Cep \_\_\_\_\_ Telefones \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Declarante

Representante Legal de \_\_\_\_\_  
 Nome \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento:..... / ..... / ..... Sexo: M ( ) F ( )  
 Endereço \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_  
 Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ ESTADO \_\_\_\_\_  
 Cep \_\_\_\_\_ Telefones \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Declarante

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do RG N° \_\_\_\_\_, DECLARO para fins de participação na pesquisa, na condição de sujeito objeto da pesquisa ou representante legal do sujeito objeto da pesquisa, menor ou incapaz, \_\_\_\_\_ que fui devidamente esclarecido do Projeto de Pesquisa intitulado: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em saliva humana para investigação de Leishmaniose Visceral ou Tegumentar Americana, desenvolvido por Fátima Heritier Corvalan, aluna do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Doutorado, Consórcio entre a Universidade Nacional de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Campo Grande, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Ms. Fátima Heritier Corvalan  
Pesquisadora Responsável pelo Projeto

\_\_\_\_\_  
Sujeito da pesquisa e/ou  
responsável

## APÊNDICE D - DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR

### DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR

DECLARO, para fins de realização da pesquisa “PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em saliva humana para investigação de Leishmaniose Visceral ou Tegumentar Americana”, ter elaborado este Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido (TCILE), cumprindo todas as exigências contidas nas alíneas acima elencadas e que, obtive de forma apropriada e voluntária, o consentimento livre e esclarecido do declarante acima qualificado para a realização desta pesquisa.

Campo Grande, 30 de outubro de 2007

---

Fátima Heritier Corvalan  
Pesquisadora Responsável

## APÊNDICE E – SHORT COMUNICAÇÃO ACEITA PARA PUBLICAÇÃO

### **DNA identification of *Leishmania Viannia braziliensis* in human oral fluid samples (saliva) of a patient with American Cutaneous Leishmaniasis**

FH Corvalan<sup>1,\*</sup>, RNR Sampaio<sup>2</sup>, YM Brustoloni<sup>3</sup>, R Andreotti<sup>4</sup>, MSC Lima Júnior<sup>5</sup>.

(1) Department of Special and Community Dentistry. School of Odontology. Federal University of Mato Grosso do Sul. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; (2) Laboratory of Dermatology, Department of Clinical Medicine, School of Medicine, University of Brasilia, Brasília, Federal District, Brazil; (3) Department of Pediatrics. School of Medicine. Federal University of Mato Grosso do Sul. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; (4) Molecular Biology Laboratory. EMBRAPA Beef Cattle. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; (5) Doctoral Program of Infectious and Parasitic Diseases. Federal University of Mato Grosso do Sul.

**Abstract:** This study aims to report the amplification of the DNA of *Leishmania (V.) braziliensis*, using polymerase chain reaction, obtained from the saliva of a patient with American cutaneous leishmaniasis who did not present any lesion in the oral mucosa. Amplification produced fragments of 103 pb, an estimated size employing *Leishmania (V.) braziliensis* primers (b1 e b2). The present results revealed, for the first time, that the in vitro amplification of *Leishmania* DNA is possible from the salivary fluid of a patient with American cutaneous leishmaniasis. However, more studies are required with a larger number of participants to evaluate the usefulness of saliva as a non-invasive sample for PCR. The development of such non-invasive technique is necessary for the diagnosis of many diseases in the future, especially infectious and parasitic ones.

**Key words:** Cutaneous leishmaniasis; saliva; *Leishmania*; Polymerase Chain Reaction; noninvasive diagnosis.

**Conflicts of interest:** There is no conflict

**Correspondence to:** Fátima Heritier Corvalan. School of Odontology. Federal University of Mato Grosso do Sul. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Phone: 55- 67- 33457381, Cel phone: 67 99835499. email: [fhcorvalan@hotmail.com](mailto:fhcorvalan@hotmail.com)

Leishmaniasis is a disease that affects humans and is caused by different species of parasites that can be differentiated only by biochemical, immunological, molecular and pathological methods. Sensitivity, with its capacity of detecting microorganisms, and the speed with which the identification of the parasite can be made, are the main advantages of techniques based on DNA detection.

Advances in molecular biology have enabled the development of specific tools for diagnosing various infirmities (1), allowing the establishment of a more precise diagnosis and prognosis (2). Among the molecular methods group that have been developed with high sensitivity and specificity which can be

applied in the diagnosis taxonomy, the Polymerase Chain Reaction (PCR) is presented as an option in diagnosis of leishmaniasis (3,4,5). It has the potential of becoming an additional diagnostic tool, allowing the establishment of a correct diagnosis and a more precise prognosis.

It has been reported in the literature that it is possible to detect the causative agent of the visceral leishmaniasis (VL) in tissue samples, blood, urine, feces and swabs of human nasal and oral secretions (6). However, there are no records in the medical literature concerning the presence of etiologic agents of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the oral fluids, thus, in the present study objective was to use molecular methods like the PCR to detect *Leishmania* in these secretions. Knowing of the high sensitivity and specificity of the PCR, this molecular tool was used to verify the possibility of detecting DNA of *Leishmania* in the saliva of a patient with clinical diagnosis of ACL. Because of the difficult diagnosis of this disease (7,8), the detection of *Leishmania* DNA in saliva could be an option in the parasitological investigation.

This study presents the case of an individual of 35 years, coming from rural area, a farmer, who in August 2007 showed a skin lesion in the left calf and the temporal region. The Montenegro skin test was positive and clinical cure was obtained with the use of N-methylglucamine, 20mg/kg/day for 20 days. Nine months later the patient returned with skin lesions on the face, distributed next on the left angle of the mouth, on right and left pre-auricular region, on the chin and on the right lateral neck and no lesions in the oral mucosa (Figure 1).

Besides the patient with ACL, were also tested 6 patients with VL and a healthy, without leishmaniasis, whose saliva was collected and included in the reaction.

The oral fluid was collected during the medical examination of the patients, put in a 1.5 mL sterile *Eppendorf* microtube, and frozen at -20°C until the DNA extraction. The DNA extraction method used was phenol/chloroform and precipitated with ethanol (4,9).

**Polymerase chain reaction.** Primers described in literature were used in the PCR. The reaction was standardized by the Laboratory of Molecular Biology of, Federal University of Mato Grosso do Sul, according description by Lima Jr *et al* (2009). The DNAs used as controls were provided by the Leishmaniasis Laboratory of the Research Center René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brazil): *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), *L.(L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8) and *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), taking into account the expected product size and annealing temperatures of primers. For *L.(L.) chagasi* were used primers RV1 (CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) and RV2 (CACCTGGCCTATTTTACACCA), with the expected product of 145pb; for *L.(L.) amazonensis* the primers were a1 (TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA) and a2 (TGCCCTGACTTGCATGTCTA), with the expected product of 62pb; and for *L.(V.) braziliensis*, the primers used were b1 (GTGGGCGTATCTGCTGATGAC) and b2 (CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA), with the expected product of 103pb. These informations are shown in table 1.

**PCR conditions:** a) with a volume of 25µL RV1/RV2: Phoneutria 2X buffer (Belo Horizonte, MG), 0.2 mM dNTPs, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 pmol RV1/RV2 primers, 0.2µl Taq polymerase Phoneutria 4U, 0.5µl DNA 40ng/µl, 19.4 µl water and thermal cycler BIOER XP cycler model. The cycles were 95°C - 5min, 40 cycles of 94°C - 30 sec, 70 C-1 min, 72°C - 1 min and final extension at 72°C - 10 min. b) with a volume of 25µL a1/a2: Phoneutria buffer 2X, dNTPs 0.2 mM, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 pmol a1/a2 primers,

0.2µl Taq polymerase Phoeutria 4U, 0.5µl DNA 40ng/µl;, water 18.8 µl thermal cycler and cycler BIOER XP model. The cycles were 95°C - 5min, 35 cycles: 95°C - 30 sec, 55°C - 1 min 30 sec, 72°C - 1 min/30 sec and final extension at 72°C - 10 min. c) with a volume of 25µL b1/b2: Phoeutria 2X buffer, 0.2 mM dNTPs, MgCl<sub>2</sub> - 0.3 mM, 1 pmol a1/a2 primers, 0.2 µl Taq polymerase Phoeutria 4U, 0.5µl DNA 40mg/µl;, 17.3 µl water and thermal cycler model BIOER XP cycler. The cycles were 95°C - 5 min, 35 cycles: 95°C - 30 sec, 70°C - 1 min 30 sec, 72°C - 1 min/30 sec and final extension at 72°C - 10 min.

The electrophoresis was performed in agarose gel with 2% tris-acetate-EDTA (TAE) 1X pH 8.0 to 80v and 400mA (0.04 M Tris-acetate, EDTA 0.001 M42). The gels were stained with ethidium bromide (0.5 mg/mL) and visualized with ultraviolet light.

When all the conditions for PCR aiming to amplify the DNA of *Leishmania* species were established, and the RV1 and RV2 primers specific for the species of the *L.(L.) chagasi* and a1/a2 of the species of *L.(L.) amazonensis* were tested, the results were not satisfactory, since they not allow the amplification of DNA in the saliva of patients tested. However, when primers b1/b2, specific to the specie *L.(V.) braziliensis* were used, a PCR proved positive in the detection of DNA in the saliva from the patient with ACL (Figure 2). In ACL, this specie is dominant (11) and the PCR in skin and mucosal samples makes it possible to identify from 39,2% (3) to 93,8% (9) of the prevalence of this parasite. *Leishmania* DNA for this species was also detected in the salivary fluid of two more patients with mucocutaneous leishmaniasis, but these results are still being evaluated.

The PCR technology is very flexible, allowing a series of adaptations that permits its use in the analysis of a wide variety of substrates. In literature there are numerous studies and reports describing the use of salivary secretion as a potential biological fluid sample for laboratory tests. Its diagnosis value has been corroborated by studies using body fluids, whereby it is possible to analyze specific substrates important in clarifying diagnosis of diseases (12,13). Oral fluids can be used for detection and characterization of microorganisms by molecular tests on the grounds of providing a convenient source of microbial DNA (12,13,14). An important aspect to consider is that saliva collection is simple and noninvasive. It does not involve critical biological material due to the fact that it is dispensed directly from the mouth into the tube used for transportation. It is not complex, and decreases the possibility of contamination and technical failures since it does not depend on the intervention of technicians in this phase. Among the other advantages of using saliva as a substrate, is its easy access to the mouth (12) with a noninvasive procedure (13,15). When compared with samples of blood and urine, the transportation and preservation of salivary substrates is also simpler and cheaper (15). The present study can be considered pioneer, since it was the first to be able to detect the parasite *L.(V.) braziliensis* in the saliva sample from a patient with ACL utilizing the PCR. To validate this molecular method employing the saliva as a substrate in the diagnosis of this disease, the research continues with a larger number of cases.

Acknowledgments: We are indebted to the Foundation to Support the Development of Education, Science and Technology of the state of Mato Grosso do Sul - FUNDECT, funding this research.

Ethical approval: Approved by the Ethics in Research of Federal University of Mato Grosso do Sul under number 1152/08.

#### References

1. Cury PR, Furuse C, Araújo NS. Technique and Application of Reaction Polymerase Chain in the dental field. *J Dent Araçatuba*. 2005;26(2):34-9.
2. Sing S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006; 123:311-30.
3. Garcia FCB, Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Subsidiary methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis (ACL): comparison of results of DNA sequencing and PCR-RFLP to determine the species of mucocutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2005;80(3):339-44.
4. Mimori T, Sasaki J, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, Hashiguchi Y, Furuya M, Saya H. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene*. 1998; 210:179-86.
5. Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, Cruz AM, Costa SCG, Catanho M. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1819-2183.
6. - Forkner CE, Zia, LS. Viable *Leishmania donovani* in nasal and oral secretions of patients with Kalazar and the bearing of this finding on the transmission of the disease. *Exp Med*. 1934;59(4):491-8.
7. Romero GAS, Sampaio RNR, Macedo V, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an Endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94():505-8.
8. Sampaio RNR, Andrade GB, Silva EA, Cuba CAC, Pereira AC. Comparative study of techniques for demonstration of amastigotes and primary isolation of promastigotes in American cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2002;77(5):557-61.
9. Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña MH, Gomez EA, Saya H, Katakura K, Nonaka S, Shamsuzzaman SM, Hashiguchi Y. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop*. 2002;81:197-202.
10. Lima Júnior MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identification of species of *Leishmania* isolated from human cases in Mato Grosso do Sul through the polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(3):303-8.
11. Camargo LB, Langoni H. Impact of Leishmaniasis on Public Health. *J Venom Anim Toxins incl Trop*. 2006;12(4):527-48.
12. Moura SAB, Gerb, M, Medeiros AMC, Souto MF, Emiliano GBG, Sousa JMA. Identification of *Helicobacter pylori* in saliva and plaque. *Int J Dentistry*. 2004; 3(2):349-52.
13. Tabak, LA. A Revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnosis. *Diag J Dental Edu*. 2001;65(12):1335-9.
14. Wong DT. Salivary diagnosis powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *Am J Dent Assoc*. 2006;137(3):313-21.

15 Lawrence HP. Salivary Markers of Systemic Disease: No invasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health. J Can Dent Assoc. 2002;68(3):170-4.

Table 1 - Primer and DNA control for the species *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) amazonensis* and *L.(V) braziliensis* used in PCR for identification of Leishmania DNA in the saliva of patients with ACL and VL

Species	Primer		DNA Control	Expected product
<i>L.(L.) chagasi</i>	RV1	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	MHOM/BR/74/PP/75	145pb
	RV2	CACCTGGCCTATTTTACACCA		
<i>L.(L.) amazonensis</i>	a1	TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA	IPLA/BR/67/PH8	62pb
	a2	GTGCCCTGACTTGCATGTCTA		
<i>L.(V) braziliensis</i>	b1	GTGGGCGTATCTGCTGATGAC	MHOM/BR/75/M2903	103pb
	b2	CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA		



Figure 1 - A patient with papular lesions in the right, left pre-auricular region and in the right cervical region, scaly lesion on the left angle of the mouth and pustular on chin region

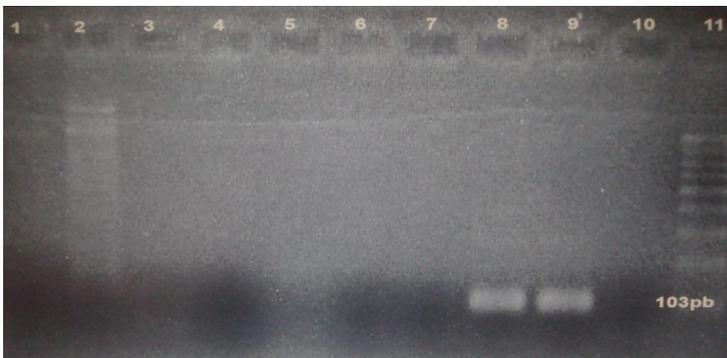
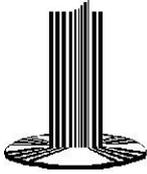


Figure 2 - PCR products from oral fluids sample showing amplification by PCR of *L. (V.) braziliensis* (channel 8) of a patient with American Cutaneous Leishmaniasis showing amplification of 103 pb. The channels 1, 3, 4, 5, 6 and 7 identify samples of the patients with visceral leishmaniasis; in channel 2, sample of a healthy control; in channel 9 a positive control; in channel 10 a negative control; channel 11 is the marker that determines the pattern of molecular size – 103 pb

**ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1152 da Pesquisadora Fátima Heritier Corvalan intitulado “PCR em saliva humana para investigação de Leishmaniose Visceral ou Tegumentar América”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 24 de abril de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Odair Pimentel Martins*  
*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

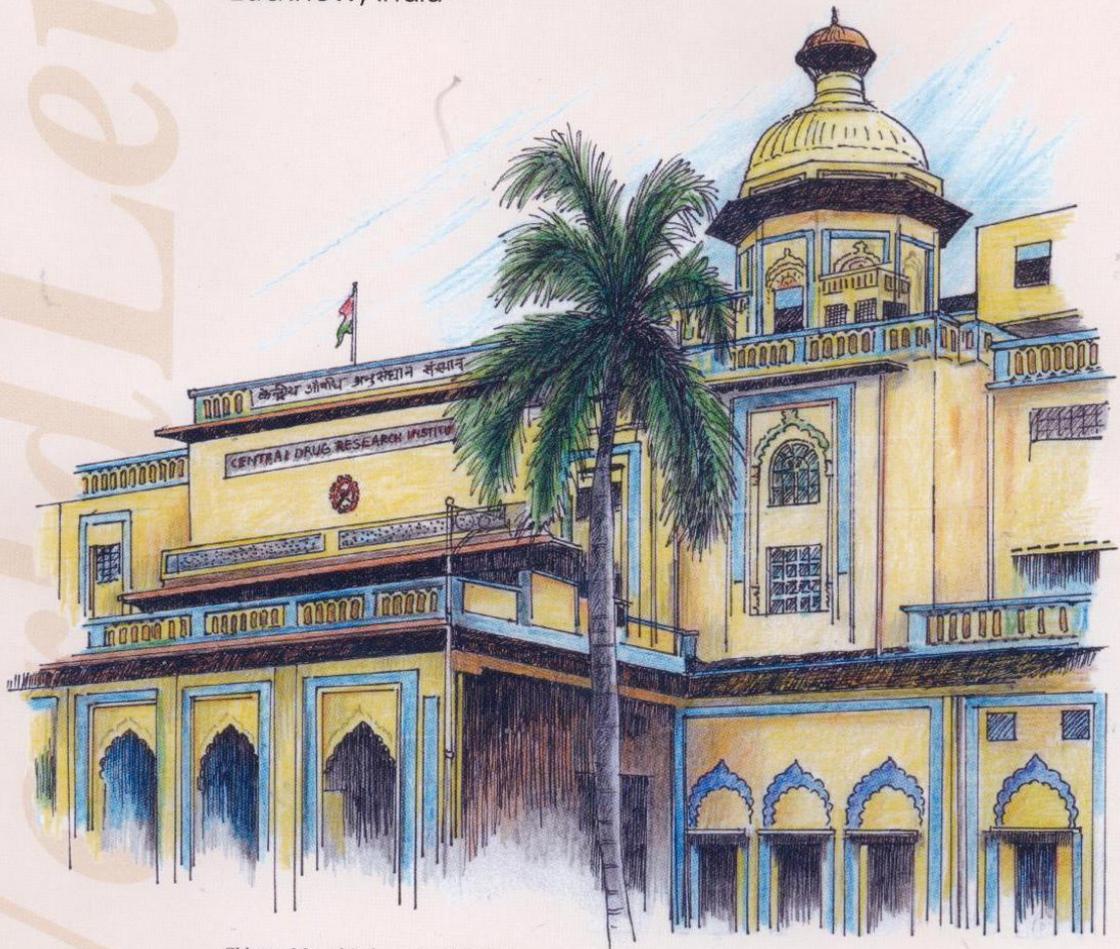
*Campo Grande, 30 de abril de 2008.*

**ANEXO B – APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO INTERNACIONAL**

4<sup>th</sup> World Congress on Leishmaniasis 2009

# *WorldLeish4*

3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> February 2009  
Lucknow, India



*Chhatar Manzil Palace, the C. D. R. I.*

Abstract Book

**Fourth World Congress on  
Leishmaniasis**

***WorldLeish4***

3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> February 2009

Lucknow, India

**Abstract Book**

#598

**PRESENCE OF DNA OF LEISHMANIA (VIANNA) LEISHMANIA BRAZILIENSIS IN SALIVA COLLECTED FROM A CASE OF LEISHMANIASIS - CASE REPORT**

*Prof Fátima Corvalan, Anamaria Mello Miranda Paniago, Yvone Brustoloni Maia, Renato Andreotti, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior, Raimunda Non*

Faculty of Dentistry, Federal University of Mato Grosso do Sul [fhcorvalan@hotmail.com](mailto:fhcorvalan@hotmail.com)

Purpose: To describe the amplification of DNA of *Leishmania (V.) braziliensis* through the polymerase chain reaction (PCR) in saliva of a patient with recurrence after treatment for leishmaniasis. The impact of parasitic diseases among humans is huge. The leishmaniasis have high prevalence in tropical regions. In recent years, advances in molecular biology has enabled the development of specific tools for diagnosis of diseases and PCR was the chosen methodology to detect the causative agent of the disease and identify the different species of *Leishmania* in salivary secretion of patients with suspected ACL, amplifying or multiplying traces of their DNA. Report: 35 year-old man diagnosed with cutaneous leishmaniasis in 2007, treated with N-methyl glucamine for 30 days and in 2008 presented two injuries in the region papular infiltrating right pre-auricular, atrophic scar on the face and right hand injury papular infiltrating the left. The collection of saliva was during the medical consultation. DNA extraction was performed using the protocol developed in the laboratory of Molecular Biology of EMBRAPA Beef Cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. We used pairs of specific primers to identify the species of *Leishmania* in the methodology of PCR. The products amplified by PCR were analyzed by agarose gel electrophoresis to 2% stained by etídeo bromide, viewed on the translumination of UV light and analyzed by the fotodocumentação alfadigidoc. Conclusion: The debris generated by amplification totaled 103 pairs of basic size estimated when the initiators used B1 and B2, primers for the kind *Leishmania (V.) braziliensis*, demonstrating satisfactory specificity. It is not like previous report. It is important to continue the study aimed noninvasive diagnostic measure. Acknowledgment: The Foundation for supporting the development of education, science and technology in the state of Mato Grosso do Sul - FUNDECT, funding this research.

**ANEXO C – ACEITE DA SHORT COMMUNICATION PARA PUBLICAÇÃO**

## JVATiTD PAPER

## STATUS UPDATED

Paper: DNA identification of *Leishmania Viannia braziliensis* in human oral fluid samples (saliva) of a patient with American Cutaneous Leishmaniasis (1357)

Author: Fatima Heritier Corvalan

Prezada Dra. Fátima, bom dia

A versão corrigida do seu trabalho foi analisada pelo Conselho editorial e está aceita para publicação no JVATiTD, no entanto, solicitamos que envie pelo Sistema de Submissão Online as figuras 1 e 2 em arquivos separados e em formato .jpeg.

Por favor envie o mais rápido possível para que possamos dar encaminhamento do trabalho na Revista.

Desde já agradecemos sua atenção.

Atenciosamente

Selma Pires

JVATiTD

<http://www.jvat.org.br/paper>

## ANEXO D – RESUMO DA SHORT COMMUNICATION PUBLICADO

### Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases

version ISSN 1678-9199

#### Abstract

[CORVALAN, FH](#) et al. **DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis.** *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* [online]. 2011, vol.17, n.1, pp. 98-102. ISSN 1678-9199. doi: 10.1590/S1678-91992011000100013.

This study aims to report the amplification of the DNA of *Leishmania (V.) braziliensis*, using polymerase chain reaction, obtained from the saliva of a patient with American cutaneous leishmaniasis who did not present any lesion in the oral mucosa. Amplification produced fragments of 103 bp, an estimated size employing *Leishmania (V.) braziliensis* primers (b1 e b2). The present results revealed, for the first time, that the *in vitro* amplification of *Leishmania* DNA using samples from the salivary fluid of a patient with American cutaneous leishmaniasis is possible. However, more studies are required with a larger number of participants to evaluate the usefulness of saliva as a non-invasive sample for PCR. The development of such non-invasive technique is necessary for the diagnosis of many diseases in the future, especially infectious and parasitic ones.

**Keywords :** cutaneous leishmaniasis; saliva, *Leishmania*; polymerase chain reaction; non-invasive diagnosis.