

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Angélica Olivino da Silva

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA
ALVO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DE
Leishmania (Viannia) spp.

RECIFE

2017

Angélica Olivino da Silva

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA ALVO
DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DE *Leishmania (Viannia)*
spp.

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz, como requisito
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho.
Coorientador: Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

Recife

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S586a Silva, Angélica Olivino da.
Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp* / Angélica Olivino Silva. - Recife: [s.n.], 2017.
77 p. : ilus., tab.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.
Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho;
coorientador: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.
1. Leishmaniose Tegumentar Americana - diagnóstico. 2. DNA. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Sensibilidade e Especificidade. 5. DNA de helmintos - genética. 6. Estudos comparativos. 7. Técnicas de Diagnóstico Molecular. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. 2. Rodrigues, Eduardo Henrique Gomes. III. Título.

ANGÉLICA OLIVINO DA SILVA

AGRADECIMENTOS

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA
ALVO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DE
*Leishmania (Viannia) spp.***

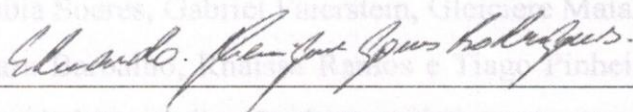
Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz, como requisito
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovada em: 16/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho (Orientador)

Departamento de Imunologia/ FIOCRUZ-PE

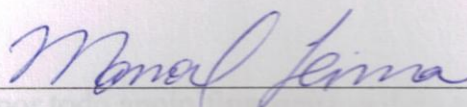


Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues (Coorientador)

Departamento de Farmácia/ FAINTVISA-PE

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro (Titular Interno)

Departamento de Imunologia/ FIOCRUZ-PE



Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima (Titular Externo)

Departamento de Imunologia/ FIOCRUZ-PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e meu mentor pela proteção, força e sempre guiar o meu caminho.

Aos meus pais por toda a educação, cuidado, amor, carinho e dedicação. Ao meu irmão André, por toda proteção, companheirismo e amizade. Às minhas avós Albertina e Maria pelo zelo e carinho. A todos os meus familiares por toda paciência, compreensão, apoio, amizade e amor.

Ao meu namorado Rafael Nascimento pelo apoio, compreensão e carinho.

Ao meu orientador Dr. Sinval Brandão pela sua orientação, apoio, paciência, envolvimento e principalmente pela oportunidade e confiança.

Aos meus coorientadores Eduardo Henrique e Roberto Werkhäuser por terem contribuído na minha formação acadêmica, pelos ensinamentos, incentivo, ajuda, sempre disponíveis e solícitos, dedicação e amizade.

À Dr. Maria Edileuza pelas amostras utilizadas neste estudo, pela força e incentivo.

À Dr. José Marinho Júnior, pela ajuda e ensinamentos.

Aos companheiros de laboratório, em especial aos meus amigos: Ana Valéria, Elis Dionísio, Ellyda Vanessa, Fábila Soares, Gabriel Faienstein, Gleiciere Maia, Igor Rocha, Lílian Caroliny, Maíra Lima, Mayara Barbalho, Rhaíssa Ramos e Tiago Pinheiro pelos conselhos, momentos felizes e por toda a ajuda na realização deste projeto.

Aos meus amigos de faculdade, Ada Selma, Adson Belém, Artur Alencar, Artur Alves, Jeann Fabiann, Mariana Almeida, Thays Cristina e Thuanny Maryna, por toda amizade e companheirismo ao longo desses anos.

À Ângela Rapela Medeiros, médica dermatologista do grupo, pela assistência aos pacientes.

A CAPES e a FACEPE por todo apoio financeiro cedido a este projeto.

Aos pacientes que com toda compreensão se dispuseram a participar deste projeto.

Por fim, a cada alma especial que passou pela minha vida. Obrigada.

SILVA, Angélica Olivino. **Avaliação de Protocolos de Extração e Purificação de DNA alvo da Reação em Cadeia da Polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.*** 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma parasitose, de grande importância para saúde pública e que acomete pele e mucosas, causada por espécies distintas de protozoários do gênero *Leishmania*. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com sua elevada sensibilidade, constitui uma ferramenta valiosa para estudos clínicos e epidemiológicos em leishmanioses. Em ensaios de PCR é crucial que o DNA alvo esteja bem purificado, a fim de que o resultado seja fidedigno. A comparação entre protocolos para extração e purificação de DNA assegura uma análise mais aprofundada da eficiência de cada um, e pode levar ao desenvolvimento de técnicas mais específicas e sensíveis que complementadas com abordagens não invasivas de coleta constituiriam um relevante avanço para o diagnóstico molecular e para a pesquisa da leishmaniose. Neste estudo comparativo, inicialmente utilizamos como substratos à extração e purificação de DNA o material genético de promastigotas resultantes de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis* e de swabs embebidos em diferentes diluições da referida cultura. Durante o estudo, avaliamos os protocolos testados (kit comercial, precipitação por cloreto de sódio, extração e purificação por fenol/clorofórmio e adsorção à sílica em suspensão) sob diferentes parâmetros. Entre eles podemos citar: rendimento da extração, grau de pureza do DNA extraído, reprodutibilidade, praticidade e relação custo/benefício do processo. Mesmo sendo um dos protocolos mais conhecidos, o protocolo de extração e purificação por fenol/clorofórmio só obteve vantagem no parâmetro de grau de pureza do DNA extraído. Nos outros parâmetros analisados o protocolo que mais se destacou foi o de adsorção à sílica em suspensão, obtendo resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), gerando também os melhores resultados visuais no que diz respeito aos produtos de PCR. Recomendamos, portanto, que o protocolo de adsorção à sílica em suspensão venha a ser utilizado para o diagnóstico e pesquisa da LTA, em conjunção com o método de coleta por swab, usado como um método alternativo e/ou complementar às diversas técnicas já estabelecidas de coleta de amostras dos pacientes com suspeita da doença.

Palavras-Chave: Leishmaniose Tegumentar Americana. DNA. Reação em Cadeia da Polimerase. Diagnóstico.

SILVA, Angélica Olivino. **Evaluation of Extraction and Purification Protocols of target DNA of Polymerase Chain Reaction in the *Leishmania (Viannia) spp.* detection.** 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (LTA) is a parasitic disease of great importance to public health. Affecting the skin and mucous membranes, it's caused by different species of *Leishmania* protozoa. The polymerase chain reaction (PCR), with its high sensitivity, it's a valuable tool for clinical and epidemiological studies on leishmaniasis. In PCR assays it's crucial that the target DNA is properly purified, so that the result is reliable. At the same time, the comparison between protocols for DNA extraction and purification ensures a more in-depth analysis of their efficiency and may lead to the development of more specific and sensitive techniques that complemented with non-invasive collection approaches would constitute a relevant advance for molecular diagnosis and research of leishmaniasis. In this comparative study, initially we used as substrates for DNA extraction and purification material from promastigotes resulting from culture of *Leishmania (V.) braziliensis* and swabs soaked in different dilutions of that culture. During the study, we evaluated the protocols tested (commercial kit, sodium chloride precipitation, extraction and purification by phenol/chloroform and adsorption to suspended silica) under different parameters. These include: performance of the extraction and purity of the extracted DNA, reproducibility, practicality and cost / benefit rate of the process. Even one of the most known protocols, the extraction and purification phenol/chloroform protocol only got advantage in the purity grade parameter. In the other analyzed parameters the most outstanding protocol was that of adsorption to suspended silica, obtaining statistically significant results ($p < 0.05$), which also generated the best visual results with respect to PCR products. We recommend, therefore, that the silica adsorption protocol be used for the diagnosis and research of the LTA, in conjunction with the *swab* collection method, used as an alternative and/or complementary method to the several established techniques of collection of samples of the patients with suspected disease.

Keywords: American cutaneous leishmaniasis. DNA. Polymerase Chain Reaction. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	14
Figura 2 -	Formas clínicas da Leishmaniose	15
Figura 3 -	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	16
Figura 4 -	Número de casos de LTA no continente Americano em 2014.	17
Figura 5 -	Distribuição por região dos casos de LTA notificados no Brasil em 2014.	18
Figura 6 -	Casos de LTA notificados em Pernambuco durante o período de 1990-2014.	18
Figura 7 -	Esquema dos testes laboratoriais.	20
Figura 8 -	Micrografia eletrônica do kDNA de <i>Leishmania</i> sp.	23
Figura 9 -	Fluxograma dos parâmetros analisados nos 4 protocolos de extração.	34
Figura 10 -	Peso molecular quantitativo	35
Figura 11a -	Análise estatística do rendimento de DNA proveniente de amostras de cultura.	40
Figura 11b -	Análise estatística do rendimento de DNA proveniente de <i>swab</i> embebido em cultura.	41
Figura 12 -	Eletroforeses em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados, originários de amostras de sangue com cultura e de sangue com <i>swab</i> embebido em cultura de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> , a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i> .	43
Figura 13 -	Géis dos protocolos de extração de DNA de amostras de cultura.	48
Figura 14 -	Géis dos protocolos de extração de DNA de <i>swab</i> embebido em cultura.	49
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando DNA total de parasita extraído de cultura de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> , a partir dos protocolos selecionados.	50
Figura 16 -	Gel do Protocolo Kit QIamp® DNA Mini Kit	51
Figura 17 -	Gel do Protocolo de Precipitação pelo NaCl	51
Figura 18 -	Gel do Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão	51
Figura 19 -	Gel do Protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio	51
Quadro 1 -	Avaliação do protocolo de adsorção à sílica em suspensão frente às amostras de pacientes com LTA.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a - Análise do rendimento de DNA proveniente de amostras de cultura.	39
Tabela 1b - Análise do rendimento de DNA proveniente de <i>swab</i> embebido em cultura.	40
Tabela 2 - Análise da concentração de DNA.	41
Tabela 3a - Análise do grau de pureza do DNA proveniente de cultura e Reprodutibilidade dos protocolos.	44
Tabela 3b - Análise do grau de pureza do DNA proveniente de <i>swab</i> embebido em cultura e Reprodutibilidade dos protocolos.	45
Tabela 4 - Avaliação da praticidade dos protocolos.	46
Tabela 5 - Avaliação do custo-benefício dos protocolos.	47
Tabela 6 - Avaliação do desempenho dos Protocolos.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	(Centers for Disease Control and Prevention) Centros para Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	<i>Deoxuribonucleotide triphosphates</i> (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados)
DO	Densidade ótica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etileno diamino tetracético)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCL	Ácido Clorídrico
HUOC	Hospital Oswaldo Cruz
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do Cinetoplasto)
kWh	Quilowatt. Hora
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaI	Iodeto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PD	Pesquisa direta
PE	Pernambuco
qPCR	<i>Quantitative real time PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real)
rpm	Rotações por minuto

SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SFB	Soro fetal bovino
SRL	Serviço de Referência em Leishmaniose
TAE	Tris-Acetato de EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UPE	Universidade de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Etiologia e Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.	14
2.1.1	Epidemiologia da LTA	16
2.2	Métodos de coleta para o diagnóstico da LTA	18
2.3	Diagnóstico	20
2.3.1	Testes Parasitológicos	20
2.3.2	Testes Imunológicos	21
2.3.3	Teste Molecular	22
2.4	Extração de DNA	23
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo Geral	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	METODOLOGIA	29
5.1	Desenho experimental e aspectos éticos	29
5.2	Seleção de pacientes	29
5.3	Coleta de amostras	29
5.3.1	Escarificação	29
5.3.2	Exsudatos cutâneos	30
5.3.3	Aspirado da borda da lesão	30
5.3.4	Biópsias cutâneas	30
5.3.5	Sangue periférico	30
5.3.6	Saliva	30
5.3.7	Swab oral	31
5.4	Cultura de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	31
5.5	Abordagem parasitológica	32
5.5.1	Pesquisa direta	32
5.6	Abordagens moleculares	32
5.6.1	Protocolo de extração e purificação de DNA comercial	32
5.6.2	Protocolos para extração e purificação de DNA <i>in house</i>	32

5.6.2.1	<i>Protocolo de precipitação pelo NaCl.....</i>	32
5.6.2.2	<i>Protocolo de extração e purificação por fenol-clorofórmio.....</i>	33
5.6.2.3	<i>Protocolo de adsorção à sílica em suspensão.....</i>	33
5.6.3	Desempenho dos protocolos de extração.....	34
5.6.3.1	<i>Rendimento e grau de pureza do DNA extraído.....</i>	34
5.6.3.2	<i>Reprodutibilidade.....</i>	35
5.6.3.3	<i>Praticidade.....</i>	36
5.6.3.4	<i>Custo/benefício.....</i>	36
5.6.3.5	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</i>	36
<u>5.6.3.5.1</u>	<u><i>Análises do produto de PCR.....</i></u>	<u>37</u>
5.6.4	Análise dos dados.....	37
6	RESULTADOS.....	38
6.1	Rendimento de DNA.....	38
6.2	Grau de pureza e Reprodutibilidade.....	43
6.3	Praticidade.....	46
6.4	Custo/benefício.....	47
6.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	48
6.6	Comparação dos protocolos por PCR	50
6.7	Avaliação do protocolo de melhor desempenho.....	53
7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	70
	ANEXO B- RELAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MARCAS UTILIZADAS NA CONFECÇÃO DOS REAGENTES.....	73
	ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	74
	ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	76

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (REY, 2001). O respectivo gênero compreende protozoários parasitos, com um ciclo de vida digenético, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (flebotomíneos), estes últimos sendo responsáveis pela transmissão desses agentes etiológicos de um mamífero a outro (GONTIJO, 2003).

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, com mais de 350 milhões de pessoas em situação de risco (ALVAR et al., 2012). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é a forma mais comum, que acomete pele e mucosas. No Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui problema de Saúde Pública, segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (2014).

O diagnóstico da LTA é formado pelos aspectos clínico-epidemiológicos e achados laboratoriais, podendo ser difícil, dada a similaridade com outras doenças que podem acometer a pele e também a mucosa. O diagnóstico de certeza pelos testes parasitológicos somente é dado quando se identifica o parasito nos tecidos, casos contrários às alterações histopatológicas são no máximo sugestivas do diagnóstico o que é explicado pela escassez de parasitos nas biópsias, comum principalmente em amostras de mucosa.

Nos casos duvidosos é importante a realização de exames específicos para o isolamento e, se possível, caracterização do parasito. Para tal temos as técnicas moleculares, como: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que possui altas sensibilidade e especificidade, através da análise molecular de minicírculos do kDNA (COSTA, 2009; RODRIGUES, 2002, 2013).

Em vista dos métodos de coleta serem considerados invasivos, alguns estudos vêm propondo a utilização de uma técnica não invasiva como o método de coleta com *swab* bacteriológico para o diagnóstico molecular da LTA através de PCR (CORVALAN et al., 2011; MIMORI et al., 2002). Para a realização da técnica de PCR torna-se necessária a obtenção de DNA purificado, o que se consegue rotineiramente utilizando kits comerciais ou artesanais desenvolvidos em laboratório (*in house*) (SILVA et al., 2012).

Tendo em vista a complexidade diagnóstica da LTA justifica-se o enfoque dado à avaliação de diferentes protocolos de extração e purificação de DNA, a fim de eleger a técnica mais apropriada para o diagnóstico molecular da doença, refletindo em um diagnóstico mais rápido e preciso.

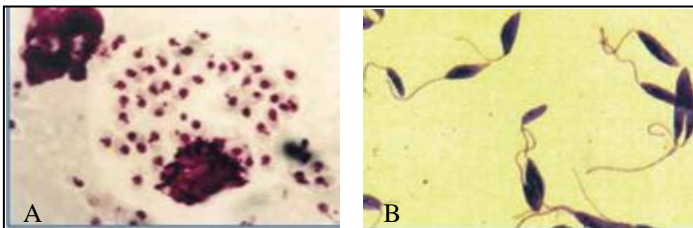
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Etiologia e Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

Os protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida) (MARZOCHI, 1992; ROSS, 1903). São os causadores das leishmanioses, doenças tropicais, consideradas como negligenciadas e de grande importância para a saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

As diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que infectam o hospedeiro vertebrado apresentam-se sob duas formas principais: amastigota ou aflagelada, que é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, e promastigota ou flagelada, sendo esta última a forma infectante, que é encontrada no tubo digestório do inseto vetor e, quando cultivadas, em alguns meios de cultura artificiais (Figura 1) (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; REY, 2001).

Figura 1 - Formas evolutivas de *Leishmania* spp.



Fonte: Brasil (2010).

Legenda: A) forma amastigota; B) forma promastigota;

De transmissão indireta, a doença pode se apresentar sob diferentes formas clínicas, devido a fatores inerentes às espécies parasitárias e à natureza do processo imunopatológico desenvolvido pelos seres humanos em resposta à infecção. As formas clínicas podem apresentar desde simples lesões cutâneas que tendem para autocura até graves lesões mucocutâneas mutilantes ou infecções viscerais (Figura 2) (RODRIGUES, 2002).

Figura 2- Formas clínicas da Leishmaniose

Fonte: Brasil (2007).

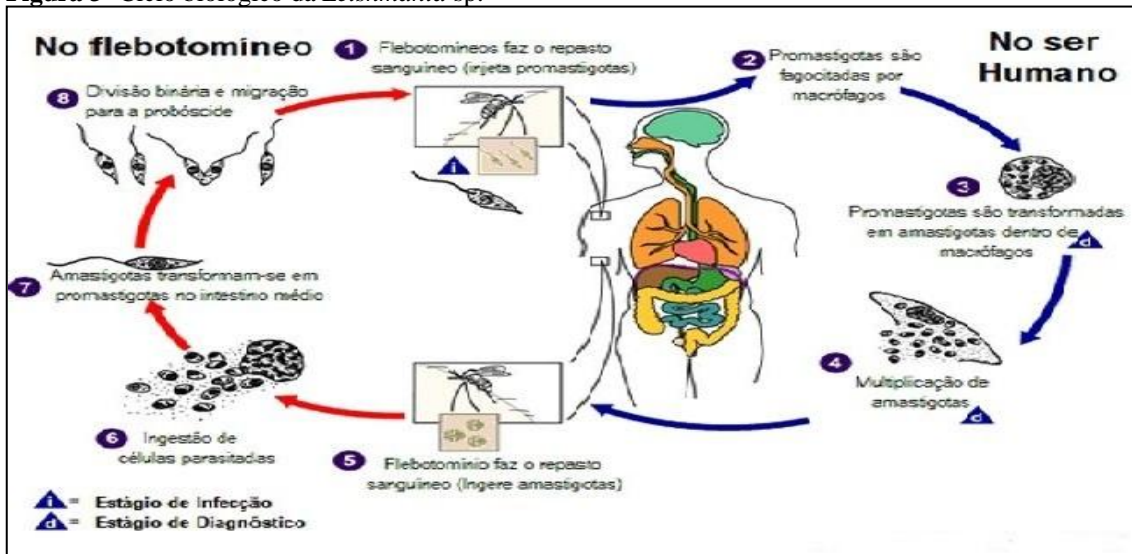
Legenda: A) forma cutânea localizada; B) forma mucocutânea; C) infecção visceral.

O ciclo biológico do parasito inicia-se pela picada de insetos fêmeas, da subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos que, durante o repasto sanguíneo, libera as formas promastigotas as quais acabam por ser fagocitadas pelos macrófagos.

No interior dessas células do sistema imune, as formas promastigotas sofrem alterações morfológicas, culminando em formas amastigotas que se multiplicam rompem o macrófago e são liberadas para serem ingeridas pelo inseto vetor.

No trato digestivo do inseto as formas amastigotas sofrerem novas alterações e dão origem a promastigotas, sendo estas últimas, inoculadas por ocasião de um novo repasto sanguíneo (Figura 3) (GOMES; GALATI, 1989; KILLICK-KENDRICK, 1990; MARZOCHI, 1992; RASO; GENARO, 1994; WRIGHT, 1903).

Figura 3- Ciclo biológico da *Leishmania* sp.



Fonte: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (2015).

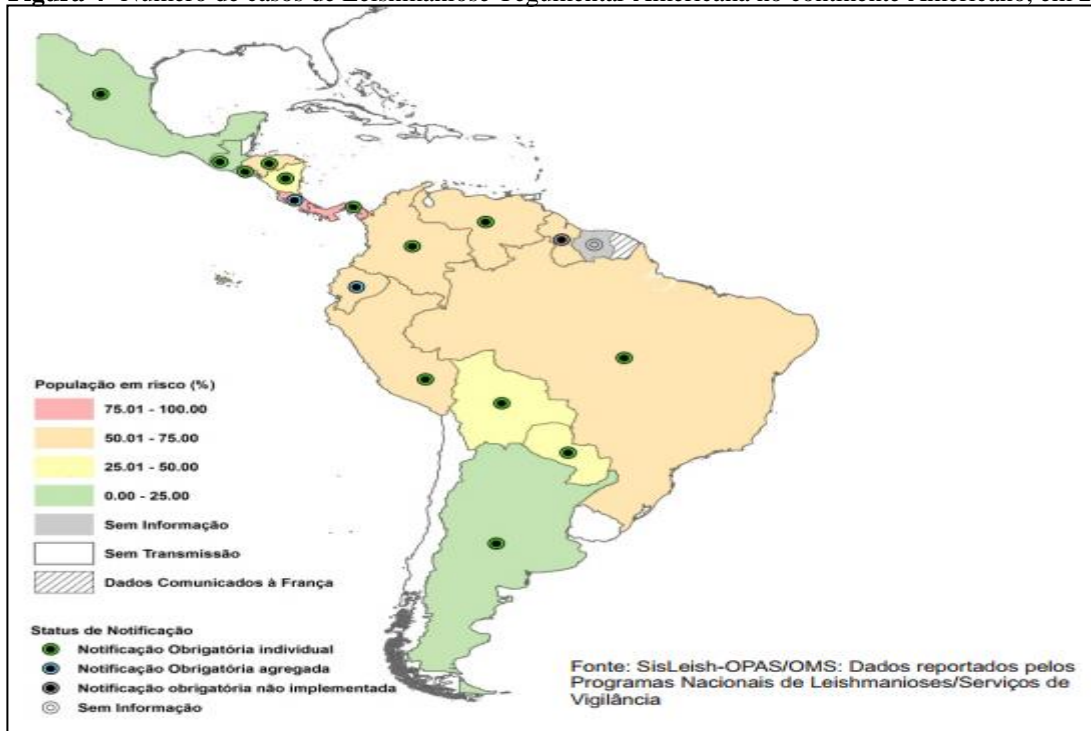
Legenda: Durante o repasto sanguíneo as formas amastigotas são ingeridas, sofrendo alterações morfológicas no trato digestivo do inseto vetor culminando em formas promastigotas infectantes, estas formas promastigotas infectantes serão inoculadas em um hospedeiro vertebrado em um próximo repasto, perpetuando a doença

Atualmente são conhecidas cerca de trinta espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, agrupadas e classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987).

Nas Américas a forma clínica mais comum é a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), parasitose de grande importância à saúde pública que acomete pele e mucosas. Dentre as espécies mais frequentes encontradas no Brasil, que causam a LTA, destacam-se a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a *Leishmania (Viannia) guyanensis* (BRASIL, 2007). Destas a *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil, sendo amplamente distribuída no território brasileiro e considerada uma das espécies mais importantes para saúde pública (BRASIL, 2007; BRITO et al., 2009).

2.1.1 Epidemiologia da LTA

A Leishmaniose Tegumentar Americana ou LTA, como é conhecida nas Américas, está presente em 18 países deste continente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) foram registrados, no ano de 2014, 51.098 casos da doença, distribuídos em 16 países da região, contudo Venezuela e Guyana Francesa não reportaram os dados, possivelmente pela deficiência no registro de notificação de casos. Do total, 75% (38.235) estão concentrados no Brasil e nos países da sub-região Andina (OMS, 2016) (Figura 4).

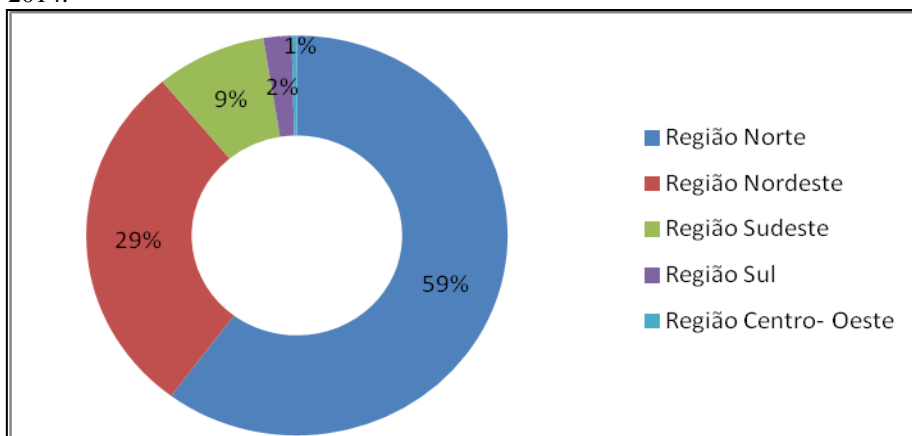
Figura 4- Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no continente Americano, em 2014.

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2016).

Registrando cerca de 20 mil novos casos por ano no Brasil, a LTA se afirma como um problema de grande magnitude à saúde pública, ressaltando que neste mesmo país, só no ano de 2014, foram notificados cerca de 20.296 casos (BRASIL, 2016). A região Nordeste contribuiu com 29% dos casos registrados em 2014, sendo a segunda região com maior número de casos (BRASIL, 2016) (Figura 5).

Sua incidência é verificada tanto nas áreas com predominância de mata e diversos tipos de plantações, propícias à colonização por flebotomíneos, como em áreas com resquícios de floresta de Mata Atlântica, nas quais se verifica vegetação abundante, além de regiões desmatadas, demonstrando adaptação de vetores e reservatórios a ambientes modificados, consequentemente favorecendo a transmissão extra, peri e intradomiciliar (MARINHO JÚNIOR, 2010; MARZOCHI, 1992).

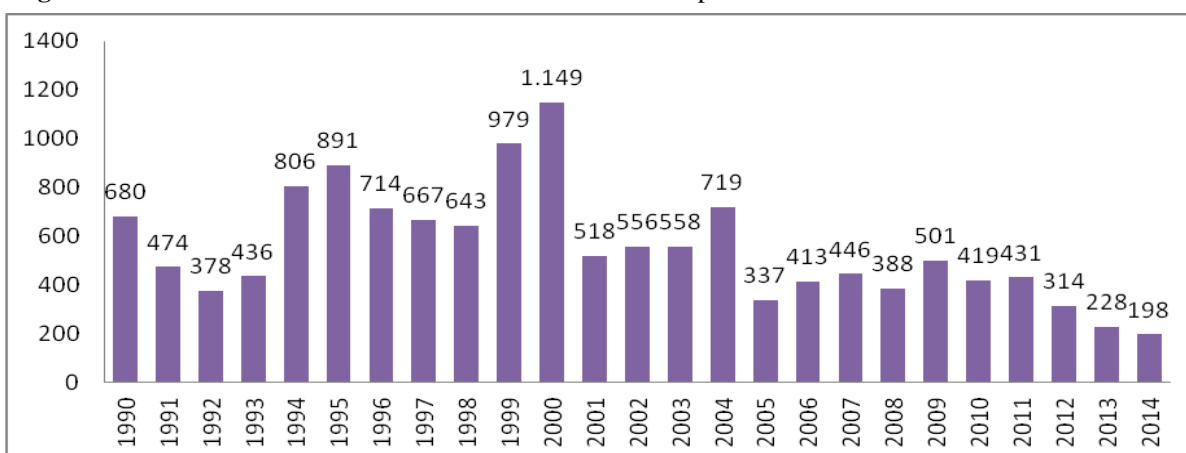
Figura 5- Distribuição por região dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados no Brasil, em 2014.



Fonte: Brasil (2016).

Destacamos Pernambuco, com maior número de casos ao longo dos anos, dentre os estados do Nordeste, onde a LTA é apontada como uma das maiores endemias para essa região (Figura 6). A doença incide em todas as regiões do estado de Pernambuco, destacando-se a região da Zona da Mata que responde por 60% do total dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

Figura 6- Casos de LTA notificados em Pernambuco durante o período de 1990-2014.



Fonte: Brasil (2016).

2.2 Métodos de coleta para o diagnóstico da LTA

Os métodos principais de coleta preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LTA são: a escarificação, a punção aspirativa, a captura de biópsia cutânea através de *punch* e o sangue (BRASIL, 2007; COSTA et al., 2009).

A escarificação é a raspagem da borda interna da úlcera ou da superfície da lesão fechada, utilizando lâmina de bisturi estéril. A punção aspirativa é realizada após injeção de solução salina estéril na borda da lesão, em seguida, utilizando-se de uma seringa aspira-se o conteúdo injetado. Na captura de biópsia cutânea através de *punch*, um pequeno fragmento de tecido é extraído da borda da lesão, mas também essa captura pode ser realizada com o uso de lâmina de bisturi (PASSOS, 2012).

Para os exames imunológicos é utilizado o sangue, que também pode ser destinado aos testes moleculares (BRASIL, 2007). O principal método de coleta utilizado para análise diagnóstica molecular é o de biópsia cutânea através de *punch* da borda da lesão do paciente infectado (BRASIL, 2007).

Contudo, alguns cuidados durante a coleta de biópsia cutânea são cruciais, tendo em vista ser um procedimento microcirúrgico e invasivo, onde pode haver o risco de desenvolvimento de infecção secundária com organismos bacterianos. Em alguns casos a coleta tecidual da lesão não pode ser realizada, como por exemplo, quando a lesão apresentar uma evolução prolongada, pigmentos pós-inflamatórios, e quando acontece em locais como a face ou áreas sensíveis do corpo (ALVES et al., 2011).

Para o diagnóstico da LTA e LV canina, alguns estudos vêm propondo a utilização da técnica não invasiva que utiliza o método de coleta com *swab* bacteriológico (FIGUEROA et al, 2009; FERREIRA, 2012; LOMBARDOA et al, 2012). Em se tratando de LTA, a viabilidade da técnica foi confirmada pela presença do parasito nos fluidos de lesão cutânea, demonstrando que o método de coleta utilizando *swab* é um instrumento útil para o diagnóstico da LTA através de PCR, em áreas endêmicas e preferencial por ser esse um método prático e seguro (ARAÚJO, 2013; ALEXANDRE, 2013; BRITO et al, 2012; CORVALAN et al., 2011; MIMORI et al. 2002; VIANA, 2013).

A técnica de PCR foi incorporada ao diagnóstico de várias doenças devido a sua alta capacidade de detecção de moléculas de DNA, sendo uma técnica eficiente para a avaliação molecular de *Leishmania* spp. (SCHÖNIAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2013). Contudo suas derivações [nested-PCR, PCR em tempo real (qPCR), reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR)] também vem obtendo resultados promissores (MARINHO JÚNIOR, 2010).

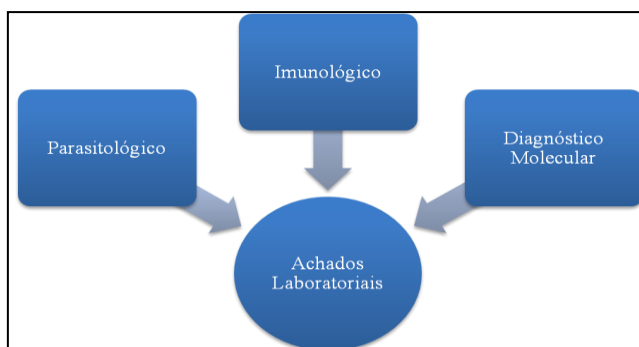
2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da LTA é feito a partir de um conjunto de critérios que envolvem os aspectos clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais (BRASIL, 2007). Os aspectos clínicos são realizados pelo profissional médico, que caracteriza as lesões encontradas na pele do paciente, sendo isto difícil, dada a similaridade com outras doenças dérmicas que podem acometer a pele e também a mucosa (ANDRADE et al., 2005).

Os dados epidemiológicos são confrontados com o histórico do paciente e buscam a existência de casos de LTA na região, onde o indivíduo pode ter adquirido a doença, através da sua eventual procedência de área endêmica (viagem de trabalho ou lazer e residência anterior), onde poderia entrar em contato com o inseto transmissor (BRASIL, 2007).

Os testes laboratoriais são essenciais para confirmar o diagnóstico de LTA (Figura 7), sendo estes, o parasitológico (pesquisa direta, histopatologia, cultivo de *Leishmania in vitro* e *in vivo*), o imunológico [intradermorreação de Montenegro (IDRM), reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), Teste Imunoenzimático (ELISA)] e o molecular [técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes] (PASSOS, 2012). Todos utilizados na rotina laboratorial, em hospitais e centros de pesquisas.

Figura 7- Esquema dos testes laboratoriais.



Fonte: A autora

2.3.1 Testes Parasitológicos

O teste parasitológico, de pesquisa direta, pode ser realizado mediante métodos de escarificação, punção aspirativa e biópsia de pele com impressão por sobreposição, em que após coloração pelo Giemsa verifica-se a forma amastigota na lâmina (NEVES, 2005).

A pesquisa direta é o exame mais simples e de custo mais baixo (CUBA CUBA et al., 1986), porém a sensibilidade do teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão (SILVEIRA et al., 2004). Os achados histopatológicos podem ser indicativos, mas raramente são específicos o suficiente como métodos confirmatórios da doença (GONTIJO; CARVALHO, 2003; LOUREIRO et al., 1998).

A biópsia, quando conservada em formol a 10%, possibilita tanto a pesquisa de antígenos de *Leishmania*, por meio de técnicas de imunohistoquímica, como a pesquisa de amastigotas coradas com hematoxilina-eosina (GOMES et al., 2014).

A cultura do parasito é realizada para o isolamento do mesmo, sendo o meio mais empregado o ágar-sangue de Novy e Neal modificado por Nicolle – NNN. Este meio bifásico é composto por uma fase ágar-sangue (base) e a outra por um meio líquido. Agar-sangue é altamente nutritivo e permite o crescimento de organismos bastante exigentes metabolicamente.

Esse procedimento, contudo, exige pessoal treinado e equipamentos dispendiosos, porém muitas vezes não há disponibilidade de tais facilidades nos serviços de saúde pública, o que torna o cultivo inadequado para inquéritos epidemiológicos em larga escala (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O cultivo *in vitro* é um método que apresenta limitações do ponto de vista temporal, além do alto risco de contaminação por fungos e/ou bactérias. Por outro lado, o isolamento de *Leishmania in vivo* é um método com baixa sensibilidade, pois apresenta crescimento lento do protozoário para iniciar a infecção no animal (DE BRUJIN et al., 1993).

2.3.2 Testes Imunológicos

Os exames imunológicos têm como base a reação de ligação antígeno-anticorpo e a resposta imune inata do hospedeiro infectado, ou seja, depende da patogenicidade dos parasitos e do sistema imunológico do paciente (BRITO et al., 2000).

O teste intradérmico de Montenegro utiliza um antígeno de *Leishmania*, sendo amplamente empregado em estudos epidemiológicos para a identificação de indivíduos expostos e sem a doença, contudo pode obter positividade em indivíduos curados de infecção causada pela *Leishmania* (JOSÉ et al., 2001). A reação intradérmica é caracterizada por uma forte resposta celular mediada por células T e normalmente é positiva em lesões cutâneas ou mucocutâneas, o teste é regularmente negativo em casos de leishmaniose difusa anérgica (LAINSON et al., 1994).

É importante ressaltar a dificuldade de interpretação dos resultados da IDRM, pois esta não diferencia a doença atual da progressa (JOSÉ et al., 2001). Nos pacientes com lesões recentes (um a seis meses de evolução) é frequente a negatividade sorológica e são relatadas reações cruzadas com outros organismos da família Trypanosomatidae (BRASIL, 2007). Embora com limitações do ponto de vista técnico, a IDRM é um bom sinalizador em áreas supostamente endêmicas a serem estudadas para a LTA.

O diagnóstico sorológico também pode ser realizado por imunofluorescência indireta e pelo teste imunoenzimático, que expressam os níveis de anticorpos circulantes (SKRABA et al. 2014). As reações IFI e ELISA são úteis principalmente nos casos com lesões extensas e múltiplas ou de lesões mucosas (ELMAHALLAWY et al. 2014). Em pacientes com a forma cutânea observam-se anticorpos da classe IgM em casos com evolução inferior a 4 meses. Títulos elevados de IgG são encontrados em pacientes com mais de uma lesão.

A IFI apresenta reação cruzada com *Leishmania infantum* e com *Trypanosoma cruzi*, entre outros (SKRABA et al. 2014). Outras técnicas como a citometria de fluxo estão sendo estudadas para serem auxiliares neste tipo diagnóstico visando diferenciar recidiva da forma ativa (OLIVEIRA, 2011; GOMES et al., 2014). Após o tratamento e cura clínica em ambas as formas de doença, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses (BRASIL, 2007).

2.3.3. Teste Molecular

Técnicas úteis para o diagnóstico e estudos epidemiológicos vêm sendo desenvolvidas desde os últimos 24 anos, e obtiveram um progresso significativo (BAÑULS et al., 1999; DEGRAVE et al., 1994; MORGAN; THOMPSON, 1998; RODRIGUES et al., 2013). A técnica de Reação em cadeia da polimerase, com sua grande sensibilidade e especificidade, oferece alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos em leishmanioses (DE BRUIJN; BARKER, 1992; DE BRUIJN et al., 1993; LIMA-JÚNIOR et al., 2013; RODRIGUES et al., 2002; WILSON, 1995).

A técnica de PCR é um procedimento que permite a amplificação de segmentos de DNA em até 1.000.000 de vezes, o que aumenta a sensibilidade da técnica (RODRIGUES, 2000, 2006). São observados dois alvos moleculares (nuclear e mitocondrial) utilizados na rotina diagnóstica para caracterização de *Leishmania* spp. (BRUIJN; BARKER, 1992; RODRIGUES et al., 2002; SCHÖNIAN, 2003).

Os tripanossomatídeos apresentam um DNA mitocondrial diferenciado, conhecido como DNA do cinetoplasto (kDNA), situado na base do flagelo, compreende uma rede ou

cadeia de DNA com milhares de círculos entrelaçados de dois tipos: os minicírculos e os maxicírculos (Figura 8).

Figura 8- Micrografia eletrônica do kDNA de *Leishmania* sp.



Fonte: Rodrigues (2006).

Legenda: Os maxicírculos indicados por seta estão conectados à duas redes formadas por minicírculos. A barra horizontal representa 1mm.

Existem milhares de pequenos círculos (10.000 cópias/célula) e poucas dúzias de maxicírculos (30-50 cópias). Uma comparação das sequências dos minicírculos de diferentes espécies de *Leishmania* revelou que existe uma região de aproximadamente 100-200 pb que é conservada, enquanto que as regiões restantes (650-550 pb) variam entre espécies (FERNANDES et al, 1999, RAY, 1987). Essas propriedades fazem do kDNA um alvo excelente para o diagnóstico de subgêneros e espécies de *Leishmania* (RODRIGUES et al., 2002, 2013).

Portanto, através da PCR, a amplificação de moléculas de minicírculos, permite a detecção da infecção por *Leishmania* spp. com alta sensibilidade e especificidade (RODRIGUES et al., 2002, 2013; MOUTTAKI et al. 2014).

2.4 Extração de DNA

Para a realização da PCR, torna-se fundamental que o DNA esteja muito bem purificado, livre de organelas celulares que possam comprometer o resultado final, tanto para análise diagnóstica quanto para genotipagem. Miescher em 1869, no intuito de caracterizar

proteínas, veio a identificar uma substância até então desconhecida, denominando-a de nucleína. Segundo Mayr (2003), a nucleína era uma nucleoproteína, uma mistura de proteína com DNA, e para provar que esta nucleoproteína de fato era diferente das proteínas, foi necessário elaborar novos métodos para purificá-la.

Este feito realizado por Altmann, que nominou a porção da substância nuclear de proteína ácido nucleico, contribuiu, para a comunidade científica da época, compreender o DNA como elemento responsável pela hereditariedade. Também foi necessário o desenvolvimento de novos métodos como ultracentrifugação, e ultrafiltração, para se obter as reais dimensões da molécula de DNA (MAYR, 2003).

A extração de DNA pode ser realizada por métodos que variam tanto quanto aos seus princípios norteadores, como no rendimento, tempo de execução, relação custo / benefício e na qualidade dos ácidos nucleicos obtidos. Este processo possui basicamente duas etapas: a lise e a purificação do DNA (WATSON, 2005).

A lise consiste no rompimento das membranas celulares e liberação do seu conteúdo, e a purificação que abrange a separação do DNA das organelas e dos compostos utilizados no processo (detergentes, proteases, fenóis, quelantes, sais, etc.) que podem danificar o DNA e/ou inibir a ação de enzimas como a *Taq Polimerase* nas reações de PCR (ROMANO, 1999).

Um dos problemas enfrentados pelos métodos de extração está relacionado com a etapa de lise, pois o DNA encontra-se protegido por muitas estruturas biológicas (proteínas, lipídeos de membrana), levando às dificuldades na liberação de grandes quantidades deste material. Neste caso, a quebra deve ser feita vigorosamente e utilizando agentes químicos (OLIVEIRA et al., 2007).

Entre os agentes químicos podemos citar os detergentes como o SDS, e agentes caotrópicos como o NaI entre outros. Uma etapa importante é impedir que as DNAses, atuem, o que pode ser alcançado empregando tampões de extração que deixam o pH em torno do pH 8.0, pois o pH ideal para ação dessas enzimas é cerca de 7.0 (BOYLE; LEW, 1995; DEGRAVE et al., 1994).

Outra opção tem sido adicionar, na solução tampão, quelantes de cátions divalentes como o EDTA. O EDTA age quelando cátions como Mg^{+2} e Ca^{+2} , que são co-fatores das DNAses (SAMBROOK et al., 1989).

A etapa seguinte, após a lise celular, é a separação do DNA dos componentes celulares liberados (purificação), que na maior parte dos casos são as proteínas. Essa separação pode ser realizada por vários procedimentos; entre o mais difundidos está à utilização de fenol/clorofórmio e da enzima Proteinase K (RAMOS et al., 2015).

O fenol desnatura as proteínas tornando-as insolúveis na camada aquosa, onde ficam os ácidos nucleicos extraídos. No entanto, recomenda-se a adição de agentes antioxidantes como o β -mercaptoetanol entre outros, ao tampão de extração, para evitar o efeito oxidativo dos resíduos dos polifenóis, que possam vir a ficar na mesma camada de DNA (AUSUBEL et al., 2009; MORGAN; THOMPSON, 1998).

A proteinase K, assim como o EDTA, inativa DNases. No entanto, sua ação consiste na digestão completa das proteínas, impedindo a ação biológica destas. Além das proteínas, os DNAs devem ser separados dos polissacarídeos e de compostos secundários que estejam presentes na amostra, pois eles podem inibir a atividade da *Taq* polimerase.

A etapa final do processo de extração consiste na precipitação do DNA liberado. A precipitação é efetuada adicionando-se álcool etílico e/ou isopropanol ao sobrenadante final rico em DNA. Esses alcoóis agem desidratando o DNA, e na presença de sais como NaCl (carreador de ácidos nucleicos) a precipitação é potencializada. Aliada a esta etapa, está a centrifugação, a fim de acelerar o processo de precipitação (ABRÃO et al, 2005; BAÑULS et. al., 1999).

Seguindo essas etapas básicas e outras complementares, que promovam a extração do DNA de uma amostra biológica, vários protocolos *in house* estão disponíveis na literatura científica. Fica claro, porém, que, o emprego de um determinado protocolo não segue um critério de escolha claramente definido, nem que parâmetros tenham sido avaliados previamente de modo a justificar técnica e cientificamente a sua escolha na prática laboratorial (ZORZETTO et al., 2015).

De um modo geral isso se repete na elaboração de novos protocolos ou na modificação dos já existentes. No entanto, esse perfil é parcialmente distinto no que se refere aos *kits* comercializados, onde na maioria das vezes o fabricante fornece indicações da amostra biológica para o qual ele é recomendado (PEREIRA; MONTEIRO, 2015)

Na rotina laboratorial dos dias de hoje, kits comerciais para extração do DNA são amplamente empregados, principalmente por sua maior praticidade e rapidez. Porém, nem sempre apresentam completa eficiência e precisão, além de implicarem em maiores custos.

Por isso as metodologias de extração e purificação tradicionais (*in house*) ainda são bastante utilizadas e consistem na preparação dos reagentes, que em parte diferem dos usados nos kits comerciais, e na realização de várias etapas que envolvem a separação do DNA da célula a partir da lise celular e terminam com a purificação do ácido nucleico.

A comparação de protocolos com características diferentes propõe uma otimização desses processos de extração e purificação, ou seja, busca um protocolo de extração que possa

ser usado sem prejuízos à amplificação por PCR, e que seja ao mesmo tempo rápido e eficiente. A obtenção de uma molécula de DNA íntegra e purificada é requisito primordial, sendo assim a utilização de um kit prático de extração e purificação, seja comercial ou desenvolvido no laboratório (*in house*), apresenta-se como elemento providencial aos vários propósitos (SILVA et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

O caráter crônico e a complexidade diagnóstica da LTA justifica o enfoque dado à análise de diferentes protocolos de extração e purificação de DNA, a fim de escolher a técnica mais apropriada para o diagnóstico molecular da doença.

Ao se comparar diversos protocolos comerciais e *in house* de extração e purificação de DNA, principalmente quando consideramos que as moléculas assim obtidas serão utilizadas em processos *downstream* de propósitos analíticos e/ou preparativos, encontram-se diferenças (muitas vezes relevantes), em termos de rendimento, reprodutibilidade, praticidade, pureza do produto final e custos.

Um desses processamentos técnicos subsequentes envolve a aplicação desses produtos purificados à técnica de PCR, atualmente bastante utilizada na rotina laboratorial de diagnóstico molecular da LTA. Contudo, a efetividade final da amplificação de DNA por técnicas convencionais de PCR (utilizadas rotineiramente no diagnóstico da LTA) depende da eficiência dos protocolos empregados nas etapas precedentes de extração e purificação da biomolécula alvo.

Além disso, também no caso do diagnóstico molecular da LTA será de grande importância que sejam comparados os desempenhos desses mesmos protocolos, considerando-se a natureza dos processos *upstream* utilizados na coleta (biópsia, sangue, aspirado de lesão, *swab*) das amostras biológicas. Assim, estudos comparativos acerca desses diferentes protocolos podem ser decisivos para se escolher a melhor técnica de extração e purificação de DNA frente aos processos *upstream* e *downstream* a serem empregados no caso do diagnóstico molecular de doenças e, em particular da LTA.

Um estudo recente (VIANA, 2013) do grupo de pesquisa em LTA do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) demonstrou a possibilidade de implantação de um protocolo de extração, desenvolvido, *in house* de adsorção à sílica em suspensão para detecção de *Leishmania (Viannia)* spp. por PCR, contudo mais estudos se fazem necessários para que este método possa ser implementado na rotina laboratorial para o diagnóstico molecular da LTA, e que reflita em uma análise mais rápida e precisa, diminuindo assim a evolução desta enfermidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes protocolos de extração e purificação de DNA alvo da Reação em Cadeia da Polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.*

4.2 Objetivos específicos

- a) Comparar a eficiência de diferentes protocolos de extração/purificação de DNA, frente a várias diluições de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*.
- b) Analisar a eficiência de diferentes protocolos de extração/purificação de DNA, frente a amostras de *swab* embebidas em várias diluições de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*.
- c) Comparar por PCR os resultados dos protocolos estudados, frente às amostras de sangue de pacientes com LTA.
- d) Avaliar o protocolo de melhor desempenho com cultura e sangue, frente a diferentes amostras de pacientes com LTA.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho experimental e aspectos éticos

Este trabalho é um estudo observacional descritivo, que busca avaliar o desempenho de diferentes protocolos de extração e purificação de DNA genômico para a pesquisa e o diagnóstico molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Foram analisadas, através de PCR, amostras de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis* e amostras biológicas de pacientes.

Todos os pacientes foram selecionados no Setor de Dermatologia do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC/UPE) onde ocorreram as coletas de amostras clínicas, sangue de um voluntário saudável foi coletado no CPqAM e cada indivíduo participante foi informado sobre a natureza do estudo, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O projeto segue os preceitos éticos que norteiam as pesquisas com seres humanos, estando aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM de CAAE: 43876215.6.0000.5190 (ANEXO A).

5.2 Seleção de pacientes

Foram selecionados 30 indivíduos provenientes de áreas endêmicas de LTA do estado de Pernambuco (Zona da Mata e a região Metropolitana do Recife), que apresentaram lesões cutâneas sugestivas de leishmaniose tegumentar nas formas ativa e recidiva cútis e com diagnóstico (clínico e/ou parasitológico) positivo para a LTA.

5.3 Coleta de amostras

5.3.1 Escarificação

As lesões cutâneas foram tratadas assepticamente e realizada a raspagem da borda da lesão utilizando lâmina de bisturi estéril, sendo o material coletado depositado em lâmina de microscopia.

5.3.2 Exsudatos cutâneos

Os exsudatos foram coletados com *swab* obtidos sob condições estéreis em toda a área da lesão ativa, inclusive no centro da borda caracteristicamente bem inflamada. A coleta de parasitos em lesões ressecadas foi realizada com o *swab* embebido em soro fisiológico. Os *swabs* foram estocados individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e transportados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM, onde foram armazenados a -20° C, até a utilização.

5.3.3 Aspirado da borda da lesão

A aspiração do material foi realizada, utilizando-se de uma seringa de 5 mL e agulha 25x8, após inoculação de 3 mL de solução salina estéril na borda da lesão.

5.3.4 Biópsias cutâneas

A coleta foi realizada com o auxílio do instrumento *punch* de 4-5 mm de diâmetro, após assepsia com álcool iodado e aplicação de anestesia local (lidocaína a 2% sem vaso constritor). Após este procedimento foi realizada uma incisão e retirado um pequeno fragmento que foi acondicionado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e transportado para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/FIOCFRUIZ, estocados a -80°C. Todo procedimento foi realizado pelo dermatologista do HUOC/UPE.

5.3.5 Sangue periférico

Trata-se assepticamente o local da coleta, posteriormente, realiza-se a punção de 4 ml de sangue total em tubo contendo k3EDTA, sem separação, para cada paciente, e o material biológico foi armazenado em freezer à - 20°C.

5.3.6 Saliva

A saliva do paciente foi depositada pelo próprio, sobre supervisão do coletador responsável, em tubo de coleta estéril, após chegada ao laboratório, à amostra foi transferida para microtubo estéril de 1,5ml.

5.3.7 Swab oral

Foi utilizado *swab* de algodão estéril, introduzido no vestibulo bucal, girado em 360 graus por 5 vezes, com leve pressão contra as bochechas.

5.4 Cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*

Culturas de parasitos a partir da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903) foram fornecidas pelo Serviço de Referência em Leishmaniose do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- Fiocruz, Pernambuco.

As cepas foram descongeladas e mantidas em meio NNN/Schneider suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 15% e antibiótico (ampicilina 100-200µg/ml), a 25°C ± 1°C. Os tubos foram mantidos, em repouso, em estufa incubadora, durante um período de aproximadamente sete dias, quando as culturas eram examinadas e repicadas para tubos contendo meio novo. Os parasitos foram expandidos para serem utilizados nas diferentes técnicas moleculares.

Quando os parasitos se encontravam na fase exponencial ou estacionária de crescimento, a massa celular foi preparada transferindo-se o conteúdo das garrafas de cultura para tubos FALCON de 15 ml. O meio Schneider contendo cerca de 10⁸ parasitos foi centrifugado, a 1500g, durante 10 minutos a 4°C, desprezando o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em solução tampão fosfato salino (PBS) estéril pH 7,2. Os parasitos foram lavados por 3 vezes com PBS 1x, a 1500g, 4°C por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1,5 ml de PBS foi transferido para tubos de microcentrífuga e lavado como anteriormente. Parte do sobrenadante foi desprezada e o restante foi deixado em quantidade suficiente para cobrir o sedimento. Os tubos foram estocados a -20°C até o uso.

Antes da lavagem foi realizada a contagem do número de promastigotas para cada amostra. Dez microlitros das culturas foram retirados com pipeta automática e transferidos para a câmara de Neubauer, onde foi feita a contagem dos parasitos por quadrante. O número final de parasitos por mililitro de cultura foi calculado de acordo com a fórmula: n° de parasitos/ml = média aritmética de quatro contagens x 10⁴ (fator de correção da câmara de Neubauer e transformação para ml) x diluição utilizada (quando houver). Os valores utilizados para as técnicas moleculares foram da ordem de no mínimo 10⁸ parasitos.

O método de diluição seriada (1/10) da quantidade de DNA inicial de 30 µg foi estipulado seguindo a orientação do kit comercial para cultura de *Leishmania (V.)*

braziliensis, a fim de identificar a menor concentração detectável através da PCR utilizando os diferentes protocolos de extração de DNA. Também são analisados os resultados de extração por *swab* embebidos nas diferentes concentrações de cultura de *Leishmania* (V.) *braziliensis*, todos os experimentos foram realizados com os mesmos volumes de amostra inicial (200µl).

5.5 Abordagem parasitológica

5.5.1 Pesquisa direta

O material para a Pesquisa Direta (PD) foi obtido por meio de escarificação da borda da lesão utilizando lâmina de bisturi estéril. Em seguida, os esfregaços confeccionados em lâmina de microscopia foram fixados com álcool metílico e corados pelo *Giemsa*. A PD de formas amastigotas de *Leishmania* spp. foi realizada através de microscopia óptica em aumento de 100x.

5.6 Abordagens moleculares

5.6.1 Protocolo de extração e purificação de DNA comercial

O DNA genômico proveniente das amostras de cultura e *swab* embebido em cultura foram extraídos e purificados através do kit QIamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA), seguindo as instruções do fornecedor.

5.6.2 Protocolos para extração e purificação de DNA *in house*

5.6.2.1 Protocolo de precipitação pelo NaCl

Aos tubos contendo cultura e posteriormente *swab* embebido em cultura foram adicionados 200 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; SDS 0,6 %) e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e incubados por 2 horas a 42 °C. Após a incubação, adiciona-se 42 µL de solução saturada de NaCl (6 M), agitando-se o tubo com vigor. Centrifuga-se por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante é transferido para um novo tubo, ao qual adiciona-se etanol absoluto (2 vezes o volume do sobrenadante) a esse tubo.

Os tubos foram agitados e centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g. O etanol absoluto é descartado e adiciona-se 1 mL de etanol 70 %, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o sedimento. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. Repete-se a lavagem com etanol a 70 % e, após desprezar o sobrenadante, os tubos permanecem abertos por 30 minutos para evaporação do etanol residual. O DNA é reidratado em 60 µL de TE 10:0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM) pH 8,0 (ABRÃO et al, 2005).

5.6.2.2 Protocolo de extração e purificação por fenol-clorofórmio

Foram adicionadas às amostras (cultura/*swab*) igual volume de mistura a amostra de fenol tamponado/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v), sendo esta solução homogeneizada de forma vigorosa por 10 segundos. Centrifuga-se durante 15 segundos na velocidade máxima e cuidadosamente é removida a fase aquosa (superior) e transferida para um novo tubo. Adiciona-se acetato de sódio 3M pH 5,2 numa quantidade correspondente a 1/10 do volume da fase aquosa. Na sequência, o tubo é agitado vigorosamente e acrescentado etanol absoluto gelado (2,5 x o volume).

Essa mistura é rapidamente agitada em vortex e incubada a -70 °C por 15 minutos. Centrifuga-se novamente por 5 minutos a 15.800 x g e descartado o sobrenadante. O precipitado é reconstituído em 1 mL de etanol, seguindo uma nova centrifugação de 15.800 x g por 5 minutos. Após esse processo, o *pellet* é colocado em concentrador à vácuo. Ao final, o sedimento é reidratado em 50 µL de tampão TE (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM) pH 8,0 (AUSUBEL et al., 2009).

5.6.2.3 Protocolo de adsorção à sílica em suspensão

Em cada 30 µL da amostra contendo até 5µg de DNA são acrescentados 75 µL de NaI 6M. Adiciona-se-à solução 5µL de suspensão de sílica. O tubo então é agitado em *vortex* durante um minuto e deixado em repouso no gelo por 4 minutos. Posteriormente, centrifuga-se a 15.800 x g por 30 segundos e na sequência o sobrenadante é removido. Adiciona-se 700 µL da solução de lavagem gelada (etanol 50%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 7,5), sendo repetida três vezes.

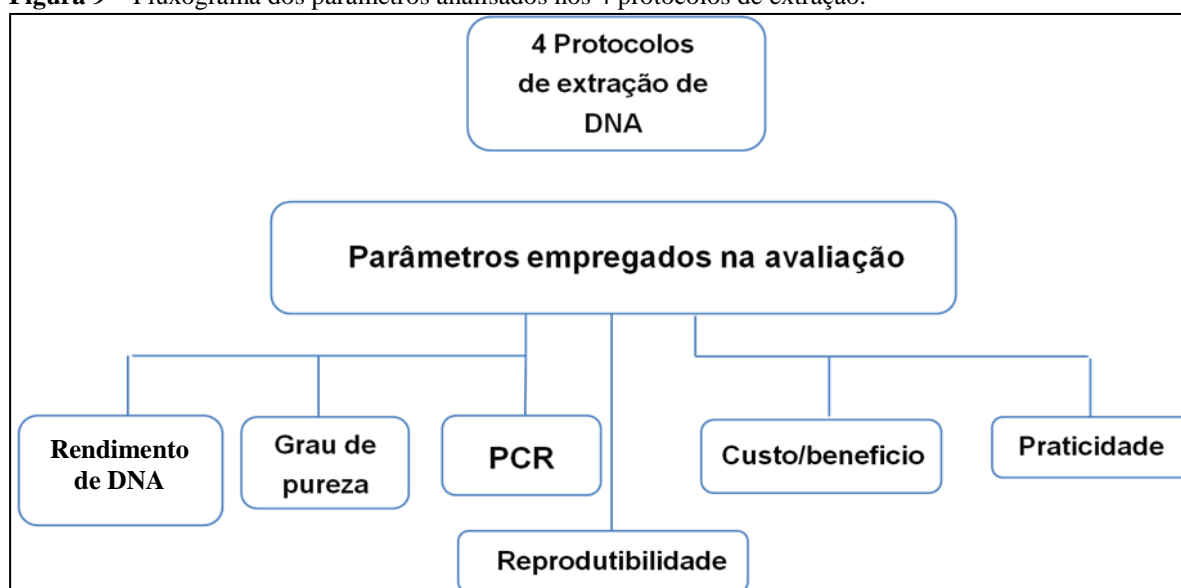
O sedimento é ressuspenso em 10 µL de água tipo I autoclavada. A solução envolvendo o DNA é incubada durante 5 minutos a 45 °C e após centrifugado a 15.800 x g

por 30 segundos. Após esta etapa, o sobrenadante contendo DNA é transferido para outro tubo e guardado a -20 °C (BOYLE;LEW, 1995).

5.6.3 Desempenho dos protocolos de extração

Os protocolos de extração e purificação foram avaliados através dos seguintes parâmetros: rendimento e grau de pureza do DNA extraído, reprodutibilidade, praticidade, custo/benefício e visualmente pela PCR (Figura 9).

Figura 9 – Fluxograma dos parâmetros analisados nos 4 protocolos de extração.



Fonte: A autora.

5.6.3.1 Rendimento e grau de pureza do DNA extraído

As amostras de DNA devidamente purificadas foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific®, modelo 2000c) e checadas quanto ao grau de pureza e concentração, este último utilizado para calcular o rendimento de DNA extraído.

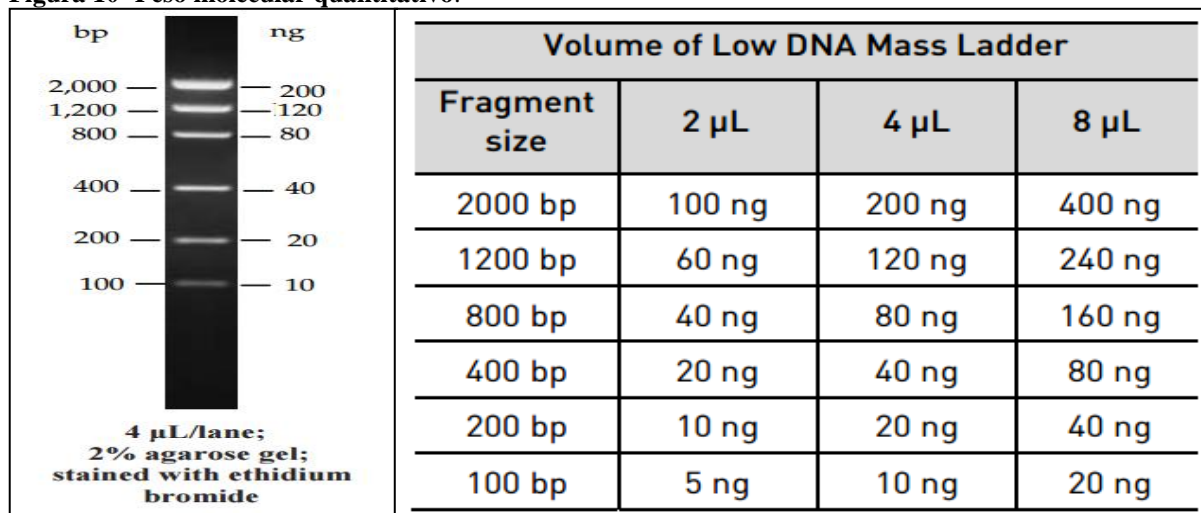
A estimativa da concentração de DNA das amostras extraídas foi efetuada a uma absorbância de 260 nm. Essa quantificação foi rigorosamente efetuada antes de realizarmos a PCR, sendo o equipamento calibrado automaticamente seguindo as orientações do fornecedor.

Existem outros métodos de quantificação, como métodos que empregam a característica da fluorescência em ultravioleta induzida pela intercalação de brometo de etídeo na dupla fita de DNA. A fluorescência é proporcional à concentração de DNA, e pode-se

determinar a quantidade de DNA numa mostra por padrões conhecidos em gel de agarose (BONACCORSO, 2005).

Para a dosagem por fluorescência em gel utilizamos 2 μ L do peso molecular Low DNA Mass Ladder- Invitrogen de dosagem conhecida de DNA (Figura 10).

Figura 10- Peso molecular quantitativo.



Fonte: Invitrogen (2016).

Optamos por utilizar esse método complementar a espectrofotometria, pois mesmo esta sendo um método simples, rápido e com certa precisão. Já é sabido que o alto nível de contaminação por proteínas, polissacarídeos, fenóis, álcool, ou outros ácidos nucleicos (não pertencentes ao DNA), na quantificação por espectrofotometria não permite uma determinação acurada da concentração de DNA e para o modelo do equipamento em questão, o limite de detecção é de 2ng de DNA total.

Para o grau de pureza, a relação de absorbância A260/A280 foi determinada para verificar a contaminação por proteínas. Amostras puras de DNA apresentam valores de DO260/DO280 de 1,8 a 2.0. Se existe contaminação, razões menores indicam que são por proteínas e maiores indicam que são por fenóis.

5.6.3.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade reflete a propriedade de um teste de gerar resultados consistentes quando repetidos nas mesmas amostras ou em amostras diferentes, desde que estas amostras sejam similares em termos de produto a ser identificado. Neste estudo, o coeficiente de variação foi utilizado para avaliar a reprodutibilidade dos resultados de grau de pureza

(relação 260/280), para cada protocolo aplicado em amostras nas mesmas diluições, em 5 repetições de dias alternados.

5.6.3.3 Praticidade

Neste parâmetro construímos uma tabela e ponderamos os seguintes itens:

- a) Número de etapas;
- b) Tempo despendido na execução de todo o processo de extração;
- c) Tempo gasto na preparação dos reagentes;
- d) Número e tipo de equipamentos necessários.

5.6.3.4 Custo/benefício

Neste parâmetro construímos uma segunda tabela e ponderamos os seguintes itens:

- a) Custo dos insumos por reação: preço dos reagentes, ponteiros e tubos;
- b) Custo com profissional: com relação ao cálculo dos gastos com recursos humanos, será considerado o salário pago (no mercado nacional) a um profissional de nível superior pelo tempo despendido na execução de todo o processo de extração/purificação e obtenção dos reagentes;
- c) Além do custo total em kW/h do consumo energético dos equipamentos utilizados em cada protocolo
- d) Relação custo/benefício: foi a soma dos itens anteriores dividida pelo rendimento de DNA purificado ao final de cada procedimento.

Na avaliação do custo/benefício de cada protocolo, os valores foram contabilizados em dólares americanos, cujo câmbio foi o estimado no ano de realização do experimento.

5.6.3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para gerar parâmetros visuais em géis de agarose de forma a se estabelecer a eficiência de cada protocolo de extração/purificação avaliado. Uma vez purificado, o DNA genômico é submetido à amplificação por PCR, utilizando um termociclador automático (Eppendorf[®], modelo Master Cyclergradient), que permite a amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) de parasitos (no presente caso, pertencentes ao subgênero *Viannia*).

O mix de PCR consiste em 23 μ L de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; MgCl₂ 1,5 mM, gelatina 0,01 %; 0,2 mM de cada dNTP; 100 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e água tipo I autoclavada. A essa mistura serão adicionados 2 μ L da amostra de DNA extraído. A PCR é realizada em 35 ciclos (94 °C, 1 min; 65 °C, 1 min; 72 °C, 1 min), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são: LEIB1(5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e LEIB2(5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), tendo como alvo todo minicírculo do kDNA de *Leishmania (Viannia)* spp., equivalente a aproximadamente 750 pares de base (RODRIGUES et al., 2013). O iniciador LEIB1 é específico para cinetoplastídeos (hibridiza na possível origem de replicação), enquanto que o iniciador LEIB2 é específico para o subgênero *Viannia*.

5.6.3.5.1 Análises do produto de PCR

Após amplificação, 10 μ L do produto de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM) corados por solução de brometo de etídio a 10 μ g/mL. As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e digitalizadas através de um sistema de documentação Kodak[®], modelo Gel Logic 100 Imagem System.

5.6.4 Análises de dados

Os dados foram armazenados e processados preliminarmente em Excel. O desempenho dos protocolos testados foi avaliado em termos de média, mediana e proporções referentes a cada um dos parâmetros analisados (p.ex., rendimento médio de DNA extraído, grau de pureza médio etc.). Para as médias e proporções estimaram-se intervalos de confiança de 95% para avaliar a precisão das estimativas.

A Reprodutibilidade foi avaliada por meio do coeficiente de variação, valores desejáveis serão aqueles < 0.2, acima de 0.3 indicam má reprodutibilidade e valores entre 0.2 e 0.3 foram considerados limítrofes.

Posteriormente foi utilizado o programa Bio Estat 5.4 para as análises estatísticas, comparando os resultados entre os protocolos pelo teste t de student e considerado como significativo p< 0,05.

6 RESULTADOS

Os parâmetros avaliados foram estabelecidos de acordo com as características de maior importância na escolha de um método de extração, de modo que os resultados obtidos sejam satisfatórios, confiáveis e reprodutíveis.

Esses parâmetros são: o rendimento de DNA extraído, grau de pureza do DNA obtido e amplificação da região do minicírculo de kDNA de *Leishmania (Viannia) spp.* pela PCR, reprodutibilidade, praticidade e custo-benefício foram avaliados, dentro de cada protocolo testado, com o intuito de identificar o método de extração mais eficiente na busca do DNA.

6.1 Rendimentos de DNA

Para uma melhor avaliação do rendimento de DNA extraído de cada protocolo pela quantificação da concentração, através de espectrofotômetro, foi estipulada a quantidade de DNA obtido ao fim de cada protocolo.

A Tabela 1a apresenta a média e a mediana da quantidade aproximada de DNA resultante das amostras extraídas por cada protocolo, além da porcentagem do rendimento de cada amostra, de acordo com as diluições de 30ug, 10ug, 1ug, 100ng e 10ng de DNA de promastigotas.

A vantagem da mediana em relação à média é que enquanto os valores de média podem variar muito entre os protocolos, dependendo do tipo de distribuição dos dados a mediana não é influenciada pelos valores extremos dessa distribuição, já que considera o valor central.

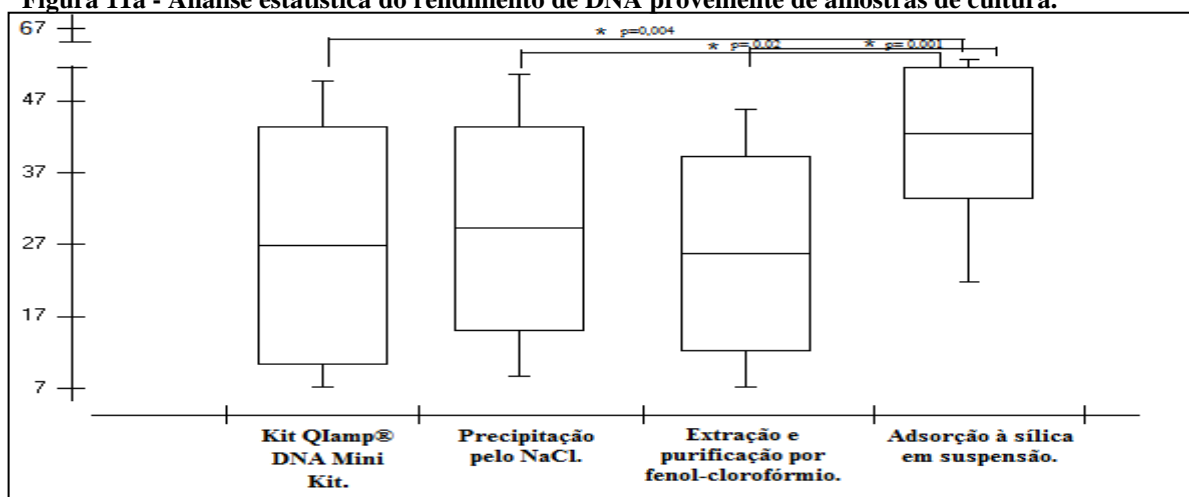
Tabela 1a - Análise do rendimento de DNA proveniente de amostras de cultura.

Quantidade de DNA	Análise	Protocolos			
		Kit QIamp® DNA Mini Kit. Quantidade final de DNA purificado (percentual)	Precipitação pelo NaCl. Quantidade final de DNA purificado (percentual)	Extração e purificação por fenol-clorofórmio. Quantidade final de DNA purificado (percentual)	Adsorção à sílica em suspensão. Quantidade final de DNA purificado (percentual)
30 ug*	Mediana	2,35ug (7,8%)	18ug (60%)	10ug (33%)	15,4ug (51,3%)
	Média	3ug (10%)	15,9ug (53%)	13,2ug (44%)	14,5ug (48,3%)
10 ug*	Mediana	0,74ug (7,4%)	1,8ug (18%)	3,3ug (33%)	6,2ug (62%)
	Média	1,01ug (10,1%)	2,96ug (29,6%)	4,64ug (46,4%)	4,46ug (44,6%)
1 ug*	Mediana	0,5ug (50%)	0,3ug (30%)	0,35ug (35%)	0,59ug (59%)
	Média	0,4ug (40%)	0,3ug (30%)	0,19ug (19%)	0,31ug (31%)
100 ng*	Mediana	43ng (43%)	52ng (52%)	20ng (20%)	53ng (53%)
	Média	32,8ng (32,8%)	51,6ng (51,6%)	16,3ng (16,3%)	54,8ng (54,8%)
10 ng*	Mediana	3,7ng (37%)	2,8ng (28%)	5,5ng (55%)	6,04ng (60,4%)
	Média	3,4ng (34%)	3,3ng (33%)	4,84ng (48,4%)	5,32ng (53,2%)

Fonte: A autora.

Nota: Média, mediana e porcentagem, obtidas a partir da estimativa, em espectrofotômetro, da concentração de DNA. *Quantidade inicial de DNA de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*.

O protocolo de Adsorção à sílica obteve, numa visão geral, as maiores médias e medianas, refletindo num melhor rendimento de DNA, sendo seus dados estatisticamente significativos quando comparados com os outros protocolos (Figura 11a).

Figura 11a - Análise estatística do rendimento de DNA proveniente de amostras de cultura.

Fonte: A autora.

Nota: * $p < 0,05$ na comparação do rendimento de DNA entre os protocolos, utilizando o teste t de Student.

Resultado semelhante à análise anterior ocorreu quando analisamos a tabela de rendimento de DNA após a extração de *swab* embebido em cultura (Tabela 1b).

Tabela 1b - Análise do rendimento de DNA proveniente de *swab* embebido em cultura.

Quantidade de DNA	Análise	Protocolos			
		Kit QIamp® DNA Mini Kit. Quantidade final de DNA purificado (percentual)	Precipitação pelo NaCl. Quantidade final de DNA purificado (percentual)	Extração e purificação por fenol-clorofórmio. Quantidade final de DNA purificado (percentual)	Adsorção à sílica em suspensão. Quantidade final de DNA purificado (percentual)
30 ug*	Mediana	12,5ug (41,6%)	14ug (46,6%)	3,5ug (11,7%)	9,35ug (31,2%)
	Média	12ug (40%)	12ug (40%)	3,9ug (13%)	7,75ug (25,8%)
10 ug*	Mediana	1ug (10%)	1,5ug (15%)	2ug (20%)	2,91ug (29,1%)
	Média	1,6ug (16%)	1,8ug (18%)	1,06ug (10,6%)	2,5ug (25%)
1 ug*	Mediana	0,03ug (3%)	0,05ug (5%)	0,03ug (3%)	0,09ug (9%)
	Média	0,021ug(2,1%)	0,06ug (6%)	0,026ug (2,6%)	0,08ug (8%)
100 ng*	Mediana	15ng (15%)	26ng (26%)	9,4ng (9,4%)	36,8ng (36,8%)
	Média	16ng (16%)	13ng (13%)	21,4ng (21,4%)	51,2ng (51,2%)
10 ng*	Mediana	2,9ng (29%)	5,1ng (51%)	3ng (30%)	7,5ng (75%)
	Média	3,8ng (38%)	6ng (60%)	2,5ng (25%)	6,1ng (61%)

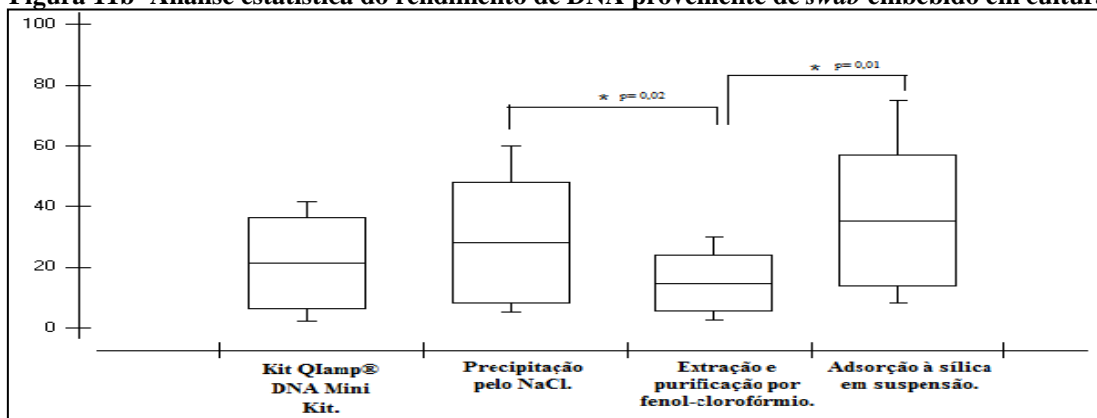
Fonte: A autora.

Nota: Média, mediana e porcentagem, obtidas a partir da estimativa, em espectrofotômetro, da concentração de DNA. *Quantidade inicial de DNA de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Contudo na análise estatística observamos que tanto o protocolo de precipitação pelo NaCl, quanto o de adsorção à sílica em suspensão tem rendimentos estatisticamente maiores

que o protocolo de extração e purificação por fenol-clorofórmio, mas seus resultados não são estatisticamente significativos entre si e quando comparados com o kit comercial (Figura 11b).

Figura 11b- Análise estatística do rendimento de DNA proveniente de swab embebido em cultura.



Fonte: A autora.

Nota: * $p < 0,05$ na comparação do rendimento de DNA entre os protocolos utilizando o teste t de Student.

A fim de mimetizar o diagnóstico molecular da LTA, foi adicionado aos tubos contendo cultura e swab embebido em cultura 100ul de sangue de voluntário saudável, após a extração as amostras foram quantificadas uma única vez para aferição da concentração (Tabela 2).

Tabela 2- Análise da concentração de DNA.

Quantidade de DNA	Análise	Protocolos			
		Kit QIamp® DNA Mini Kit. Concentração	Precipitação pelo NaCl. Concentração	Extração e purificação por fenol-clorofórmio. Concentração	Adsorção à sílica em suspensão. Concentração
30 ug*	Sg+Cultura**	35,6ng/ul	43,7ng/ul	44,3ng/ul	136,9ng/ul
	Sg+ Sw + Cultura ***	16,1ng/ul	18,8ng/ul	-	9,4ng/ul
10 ug*	Sg+Cultura	8,6ng/ul	23ng/ul	12,7ng/ul	64ng/ul
	Sg+ Sw + Cultura	26ng/ul	9ng/ul	-	11,4ng/ul
1 ug*	Sg+Cultura	10,6ng/ul	28,4ng/ul	107ng/ul	26,3ng/ul
	Sg+ Sw + Cultura	4,9ng/ul	2,1ng/ul	8,1ng/ul	9,6ng/ul
100 ng*	Sg+Cultura	6,8ng/ul	11,7ng/ul	23,3ng/ul	19,8ng/ul
	Sg+ Sw + Cultura	7,3ng/ul	7,8ng/ul	7,9ng/ul	14,9ng/ul
10 ng*	Sg+Cultura	3,9ng/ul	4,7ng/ul	8,5ng/ul	17,9ng/ul
	Sg+ Sw + Cultura	4,7ng/ul	1,6ng/ul	2,2ng/ul	7,9ng/ul

Fonte: A autora.

Nota: Concentrações de DNA, obtidas a partir da estimativa, em espectrofotômetro. *Quantidade inicial de DNA de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*; **Sg+Cultura: sangue mais cultura; *** Sg+ Sw + Cultura: sangue mais swab embebido em cultura.

Novamente, o protocolo de Adsorção à sílica obteve, numa visão geral, as maiores concentrações, estando em maior concentração em 3 das cinco amostras analisadas, tanto para sangue mais cultura, quanto para sangue mais *swab* embebido em cultura, refletindo assim num melhor rendimento de DNA ao fim de sua extração. Contudo não houve diferença estatisticamente significativa comparando os resultados de concentração dos protocolos.

Em duas amostras (30ug e 10ug) não foi possível a detecção por espectrofotometria quando extraído pelo método de extração e purificação por fenol-cloroformio, este resultado pode está relacionado ao limite de detecção do equipamento, por este motivo e para se ter uma maior confiabilidade nas concentrações de DNA, optamos por utilizar complementarmente à espectrofotometria à dosagem por fluorescência em gel.

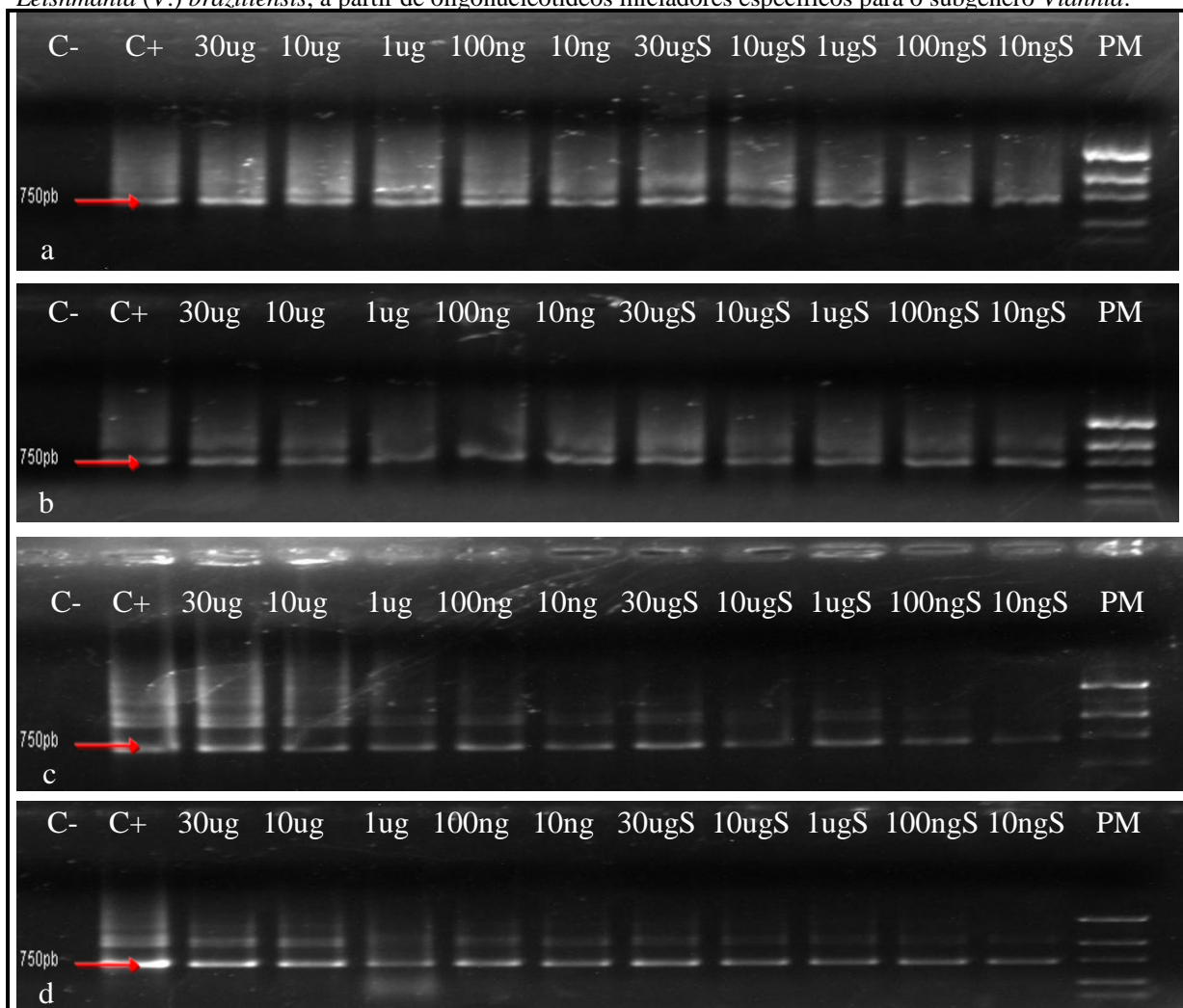
Nas relações de eletroforese foram utilizados 2ul de peso molecular quantitativo. Analisando o gel das amostras extraídas com o kit comercial percebemos que as amostras tanto provenientes da extração de sangue com cultura e de sangue com *swab* embebido em cultura apresentaram uma quantidade de DNA variando de 60 a 40ng, contudo observa-se um intenso rastro de DNA (Figuras 12a).

Observando o gel das amostras extraídas com o protocolo de precipitação pelo NaCl, percebemos que as amostras tanto provenientes da extração de sangue com cultura e de sangue com *swab* embebido em cultura apresentaram uma quantidade de DNA variando de 40 a 20ng, contudo novamente observa-se um intenso rastro de DNA (Figuras 12b).

Avaliando o gel das amostras extraídas com o protocolo de extração e purificação por fenol-clorofórmio, percebemos que as amostras tanto provenientes da extração de sangue com cultura e de sangue com *swab* embebido em cultura apresentaram boa quantidade de DNA variando de 100 a 20ng e sem muita visualização de rastros de DNA (Figuras 12c).

Analisando o gel das amostras extraídas com o protocolo de adsorção a sílica em suspensão, percebemos que as amostras tanto provenientes da extração de sangue com cultura e de sangue com *swab* embebido em cultura apresentaram a melhor quantidade de DNA variando de mais que 100 a 60ng, com as bandas mais nítidas e sem visualização de rastros de DNA (Figuras 12d).

Figura 12- Eletroforeses em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados, originários de amostras de sangue com cultura e de sangue com *swab* embebido em cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*, a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.



Fonte: A autora.

Legenda: (a) Gel do Protocolo Kit QIamp® DNA Mini Kit; (b) Gel do Protocolo de Precipitação pelo NaCl; (c) Gel do Protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio; (d) Gel do Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão; Controle negativo (C-); Controle positivo (C+); amostras de sangue com cultura com quantidade de DNA inicial de: 30ug, 10ug, 1ug, 100ng, 10ng; amostras de sangue com *swab* embebido em cultura: 30ugS, 10ugS, 1ugS, 100ngS, 10ngS. O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: marcador de peso molecular: Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

6.2 Grau de pureza e Reprodutibilidade

O grau de pureza das amostras foi estimado por uma medida espectrofotométrica, que consistiu no valor fornecido, pelo equipamento, através do cálculo da relação entre os valores obtidos para DNA (260 nm) e proteína (280 nm). Neste caso, amostras cujos valores encontram-se entre 1,8 e 2,0 são consideradas puras (CHIARI et al., 2009).

A média, a mediana, o intervalo de confiança de 95% (IC95%) e o coeficiente de variação (CV) estão descritos na Tabela 3a. Além dos valores citados anteriormente, para este

parâmetro foi calculada a porcentagem de valores entre 1,8 e 2,0.

A Reprodutibilidade foi avaliada por meio do coeficiente de variação, valores desejáveis serão aqueles < 0,2, acima de 0,3 indicam má reprodutibilidade e valores entre 0,2 e 0,3 são considerados limítrofes.

Tabela 3a - Análise do grau de pureza do DNA proveniente de cultura e Reprodutibilidade dos protocolos.

Quantidade de DNA	Análise (260/280)	Kit QIamp® DNA Mini Kit	Protocolos		
			Precipitação pelo NaCl	Extração e purificação por fenol-clorofórmio	Adsorção à sílica em suspensão
30 ug*	%de leituras entre 1,8-2,0	20%	60%	60%	20%
	Mediana	1,77	1,81	1,86	2,03
	Média	1,85	1,8	1,9	2,5
	IC95%**	1,65-2,05	1,2-2,0	1,86-1,94	2,0-3,0
	CV***	0,24	0,06	0,04	0,15
10 ug*	%de leituras entre 1,8-2,0	20%	20%	60%	40%
	Mediana	1,62	1,75	1,82	2,01
	Média	1,83	1,64	2,11	2,7
	IC95%	1,63-2,03	1,34-1,94	1,81-1,21	2,1-3,3
	CV	0,2	0,4	0,2	0,2
1 ug*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	0%	20%	20%
	Mediana	1,2	1,52	1,57	2,3
	Média	1,86	1,46	1,37	2,6
	IC95%	1,26-2,46	1,26-1,66	1,17-1,57	2,2-3,0
	CV	0,69	0,28	0,4	0,3
100 ng*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	0%	0%	0%
	Mediana	1,16	1,18	1,55	1,73
	Média	1,38	1,19	2,4	2,17
	IC95%	1,18-1,58	1,11-1,27	1,4-3,4	1,87-2,47
	CV	0,31	0,14	0,7	0,11
10 ng*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	20%	20%	0%
	Mediana	1,32	1,22	1,57	1,69
	Média	1,3	1,32	1,82	1,64
	IC95%	1,23-1,37	1,2-1,44	1,52-2,12	1,54-1,74
	CV	0,11	0,18	0,4	0,1

Fonte: A autora.

Nota: *Quantidade inicial de DNA de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. **Intervalo de confiança de 95% (IC95%) - faixa de variação dos valores esperados num experimento com um determinado protocolo e diluição. ***Coeficiente de variação (CV) - mede o grau de reprodutibilidade. Valores desejáveis seriam aqueles <0.2; acima de 0.3 indicam má reprodutibilidade.

Verificamos que o protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio apresenta as maiores porcentagens de valores entre 1,8 e 2,0, indicando ser o protocolo que gera um maior número de amostras livres de proteínas.

O protocolo de Adsorção à sílica em suspensão também demonstrou bons resultados,

sendo o segundo melhor para esse parâmetro. Resultados semelhantes ocorreram quando analisamos a tabela de grau de pureza do DNA após a extração de *swab* embebida em cultura (Tabela 3b).

Tabela 3b - Análise do grau de pureza do DNA proveniente de *swab* embebido em cultura e Reprodutibilidade dos protocolos.

Quantidade de DNA	Análise (260/280)	Protocolos			
		Kit QIamp® DNA Mini Kit	Precipitação pelo NaCl	Extração e purificação por fenol-clorofórmio	Adsorção à sílica em suspensão
30 ug*	%de leituras entre 1,8-2,0	20%	40%	40%	20%
	Mediana	1,82	1,97	1,96	1,81
	Média	1,84	1,91	2	1,21
	IC95%**	1,68-2,0	1,84-1,98	1,7-2,3	0,65-1,75
	CV***	0,12	0,05	0,2	0,13
10 ug*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	0%	40%	20%
	Mediana	1,51	1,79	1,91	1,99
	Média	1,57	1,43	1,77	2,7
	IC95%	1,49-1,65	0,9-1,93	1,58-1,96	2,3-3,1
	CV	0,7	0,5	0,15	0,15
1 ug*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	20%	20%	20%
	Mediana	1,22	1,82	1,94	2,55
	Média	1,31	2,16	1,85	2,6
	IC95%	1,22-1,4	1,76-1,56	1,68-2,02	2,2-3,0
	CV	0,2	0,2	0,13	0,2
100 ng*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	0%	0%	0%
	Mediana	1,39	0,87	1,47	3,45
	Média	1,34	0,86	1,35	3,2
	IC95%	1,28-1,4	0,56-1,1	1,16-1,54	2,4-3,0
	CV	0,6	0,5	0,2	0,3
10 ng*	%de leituras entre 1,8-2,0	0%	0%	0%	0%
	Mediana	1,25	1,1	1,49	1,53
	Média	1,39	1,15	1,13	1,48
	IC95%	1,14-1,54	1,07-1,23	0,73-1,53	1,4-1,56
	CV	0,5	0,1	0,5	0,11

Fonte: A autora.

Nota: *Quantidade inicial de DNA de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. **Intervalo de confiança de 95% (IC95%) - faixa de variação dos valores esperados num experimento com um determinado protocolo e diluição. ***Coeficiente de variação (CV) - mede o grau de reprodutibilidade. Valores desejáveis seriam aqueles <0.2; acima de 0.3 indicam má reprodutibilidade.

Em relação à Reprodutibilidade, os protocolos obtiveram os melhores resultados quando a amostra provinha de *swab* embebido em cultura de promastigotas de *Leishmania (V.)*

braziliensis, do que quando a extração era realizada diretamente da cultura, novamente o protocolo de Adsorção à sílica se destacou neste parâmetro nos dois casos.

6.3 Praticidade

A praticidade de cada método foi avaliada por meio dos seguintes itens: número de etapas, tempo gasto na preparação dos reagentes, tempo despendido na execução de todo o processo de extração e número de equipamentos necessários (Tabela 4).

Para conhecimento do material adicional necessário para a realização do processo de extração, os equipamentos exigidos por cada protocolo também foram listados.

Tabela 4 - Avaliação da praticidade dos protocolos.

	Protocolos			
	Kit QIamp® DNA Mini Kit	Precipitação pelo NaCl	Extração e purificação por fenol-clorofórmio	Adsorção à sílica em suspensão
Nº de etapas para execução do protocolo	15	12	15	11
Tempo despendido na preparação dos reagentes	04 minutos	32 minutos 47 segundos	10 horas 02 minutos 27 segundos	2 horas 31 minutos 33 segundos
Tempo de execução do processo de extração	3 horas 54 minutos 14 segundos	3 horas 20 minutos 13 segundos	2 horas 56 minutos 45 segundos	1 hora 35 minutos 24 segundos
Nº de equipamentos necessários	3	3	6	4
Equipamentos utilizados	Banho-maria Centrifuga Vortex	Agitador magnético Banho-maria Centrifuga	Capela de exaustão Agitador magnético Freezer Centrifuga; Vortex Concentrador a vácuo	Agitador magnético Banho-maria Centrifuga Vortex

Fonte: A autora.

Nota: Descrição do número de etapas, tempo gasto na preparação dos reagentes, tempo despendido na execução de todo o processo de extração, número de equipamentos necessários e equipamentos exigidos por cada protocolo.

Em relação à praticidade, mais uma vez, o protocolo de Adsorção à sílica em suspensão se destaca, por ter o menor número de etapas, consequentemente também tem o menor tempo de execução do processo de extração. Contudo em uma visão geral, tanto o protocolo de Adsorção à sílica, quanto o de Precipitação pelo NaCl, pontuaram como equivalentes no parâmetro de praticidade.

O protocolo com maior tempo de execução foi o kit comercial, porém se somarmos o tempo despendido na preparação dos reagentes com o tempo de execução, observamos que o protocolo com o maior tempo é o de Extração e purificação por fenol-clorofórmio.

6.4 Custo/benefício

A soma dos custos por reação de extração (gastos com reagentes, ponteiras e tubos) e o custo total de trabalho humano (valor pago a um profissional de nível superior com especialização pelo total de tempo gasto em cada protocolo), além do custo total em kW/h do consumo energético dos equipamentos utilizados em cada protocolo e da relação custo/benefício, sendo este último o resultado do rendimento de DNA extraído ao fim de cada protocolo, está descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação do custo-benefício dos protocolos. Descrição dos valores de custo por reação de extração, custo total de trabalho, custo total de energia, gastos em cada protocolo. Todos os valores foram convertidos em dólar.

	Kit QIamp® DNA Mini Kit	Protocolos Precipitação pelo NaCl	Extração e purificação por fenol-clorofórmio	Adsorção à sílica em suspensão
Custo por reação de extração* (reagentes, ponteiras e tubos)	\$3,43	\$0,23	\$0,28	\$0,25
Custo total de trabalho** (profissional de nível superior com especialização)	\$28,03	\$28,03	\$91,19	\$28,03
Custo total de energia*** (kW/h)	\$0,04	\$0,04	\$0,12	\$0,009
Custo (soma dos itens anteriores)	\$31,50	\$28,30	\$91,59	\$28,28
Custo/Benefício	2,21	0,43	1,01	0,40

Fonte: A autora.

Nota: *Custo calculado para uma única amostra. ** Custo de hora de trabalho calculado a partir de salário + encargos sociais pago pela União a um tecnologista de nível 1 com especialização da Fundação Oswaldo Cruz: R\$ 28,41 = US\$ 7,01 (Cotação em 07/01/2016: US\$ 1,00 = R\$ 4,052) (Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2016). *** Custo total em kW/h do consumo energético dos equipamentos utilizados em cada protocolo (Cotação em 07/01/2016: US\$ 1,00 = R\$ 4,052).

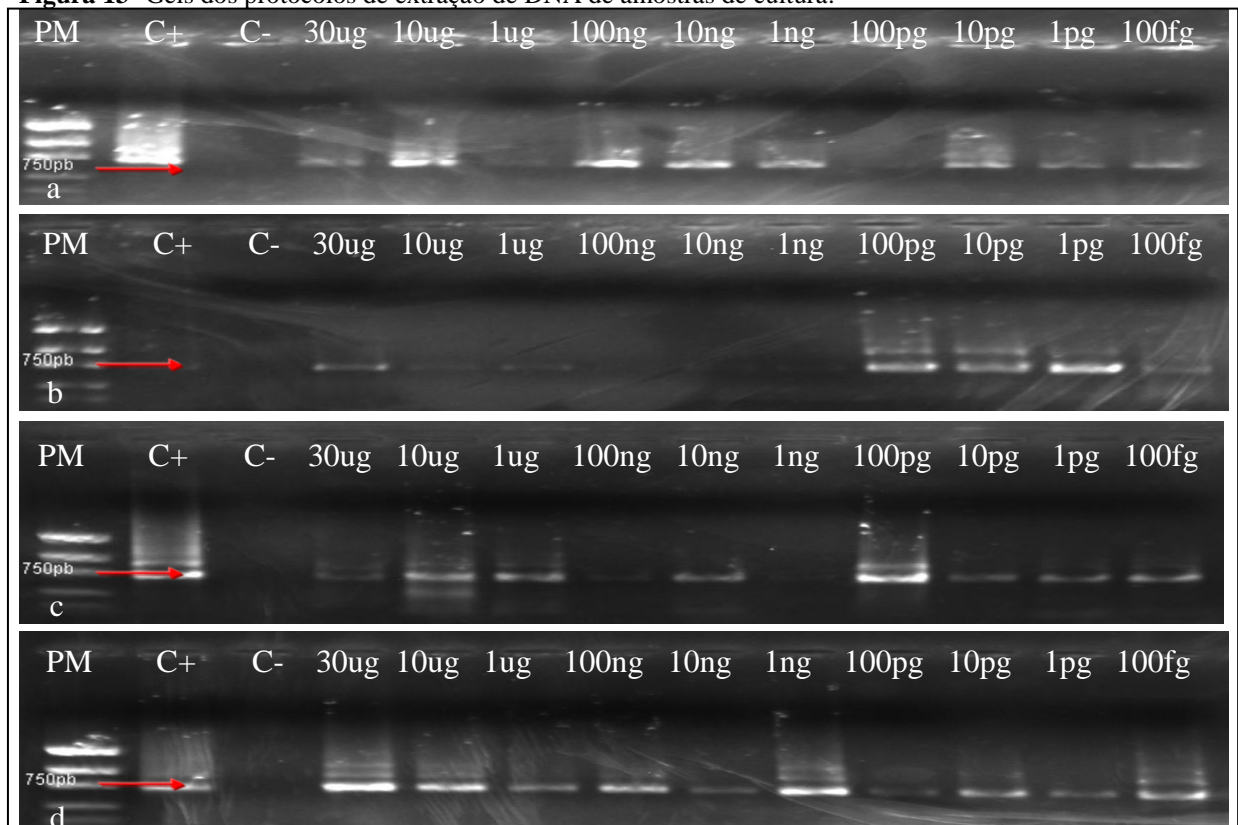
O protocolo de Precipitação pelo NaCl apresentou o custo mais baixo em relação aos insumos. Já o maior custo por reação é relatado para o protocolo comercial, enquanto o protocolo que utilizou fenol-clorofórmio demandou o maior gasto com mão de obra. Contudo o protocolo de Adsorção à sílica em suspensão foi o que obteve o menor custo total de energia e a melhor relação custo/benefício.

6.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Como resultado desta avaliação, as amostras extraídas e amplificadas foram aplicadas em géis de agarose, para verificação da presença/ausência de bandas.

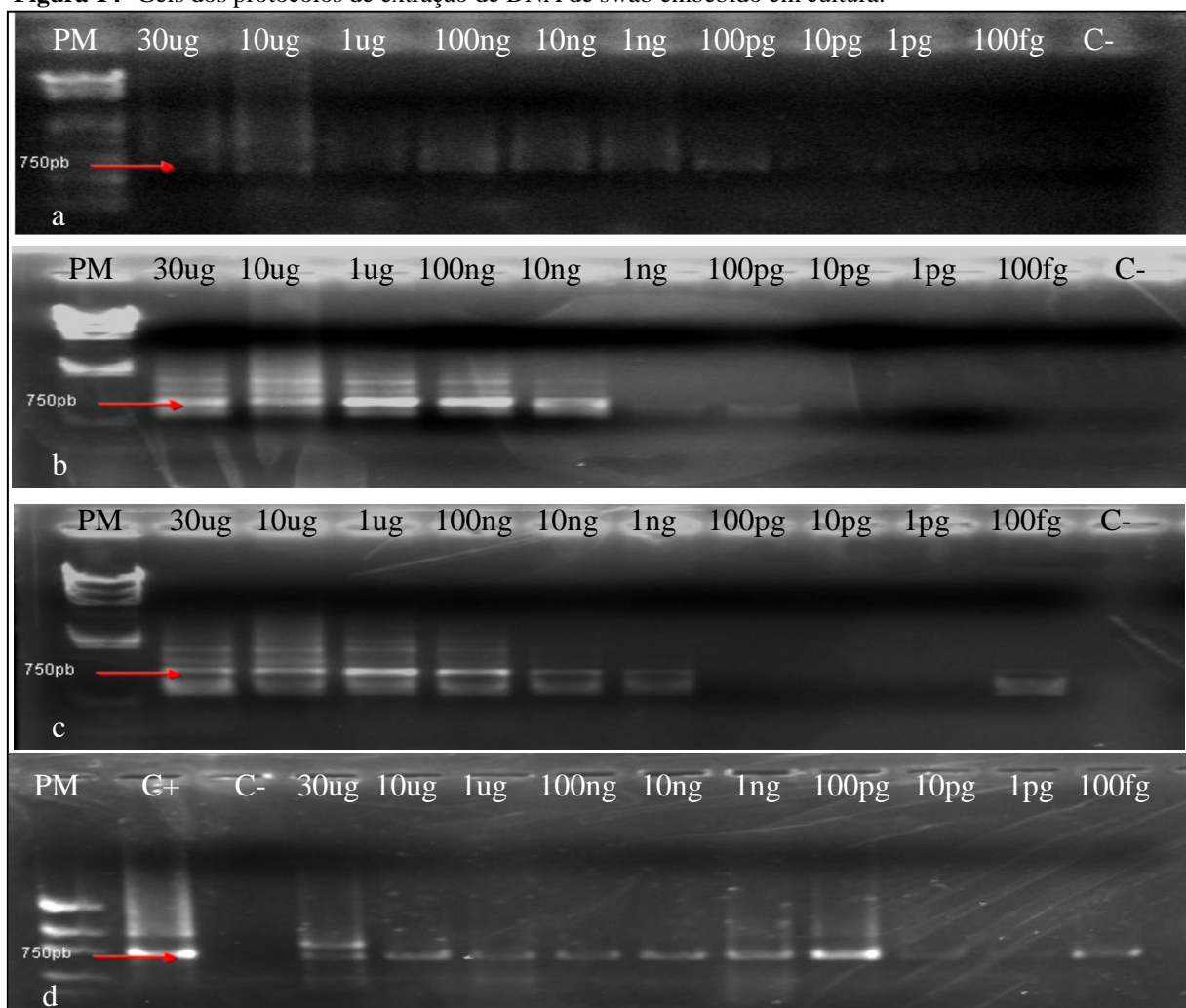
As fotografias dos géis contendo os perfis eletroforéticos dos protocolos podem ser visualizadas nas Figuras 13, para extração diretamente de cultura e nas Figuras de 14, para as amostras de *swab* previamente embebidos nas culturas.

Figura 13- Géis dos protocolos de extração de DNA de amostras de cultura.



Fonte: A autora.

Legenda: (a) Gel do Protocolo Kit QIamp® DNA Mini Kit; (b) Gel do Protocolo de Precipitação pelo NaCl; (c) Gel do Protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio; (d) Gel do Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão; Controle positivo (C+); Controle negativo (C-), amostras de cultura com quantidade de DNA inicial de: 30ug, 10ug, 1ug, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg. O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

Figura 14- Géis dos protocolos de extração de DNA de swab embebido em cultura.

Fonte: A autora.

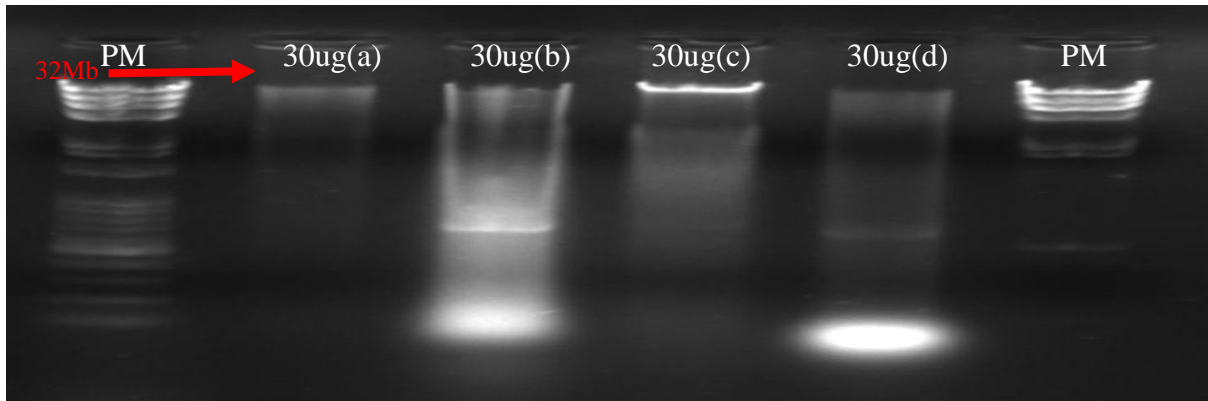
Legenda: (a) Gel do Protocolo Kit QIamp® DNA Mini Kit; (b) Gel do Protocolo de Precipitação pelo NaCl; (c) Gel do Protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio; (d) Gel do Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão; Controle positivo (C+); Controle negativo (C-), amostras de *swab* embebidos em cultura com quantidade de DNA inicial de: 30ug, 10ug, 1ug, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg. O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

De todos os protocolos testados o Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão obteve as bandas mais nítidas e homogêneas com o mínimo de rastro e bandas inespecíficas. Estes resultados corroboram com o trabalho de Viana (2013), que ao analisar os mesmos protocolos, utilizando apenas amostras de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*, observou as mesmas características apresentadas neste estudo.

Além da concentração e pureza, a integridade do DNA extraído também interfere na PCR, um DNA íntegro proporciona um melhor anelamento dos primers e conseqüentemente uma melhor amplificação. Através de uma corrida eletroforética do DNA após a extração,

podemos observar a integridade do genoma inteiro do parasito, o que equivale a aproximadamente 32Mb (Figura 15).

Figura 15- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando DNA total de parasita extraído de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*, a partir dos protocolos selecionados.



Fonte: A autora.

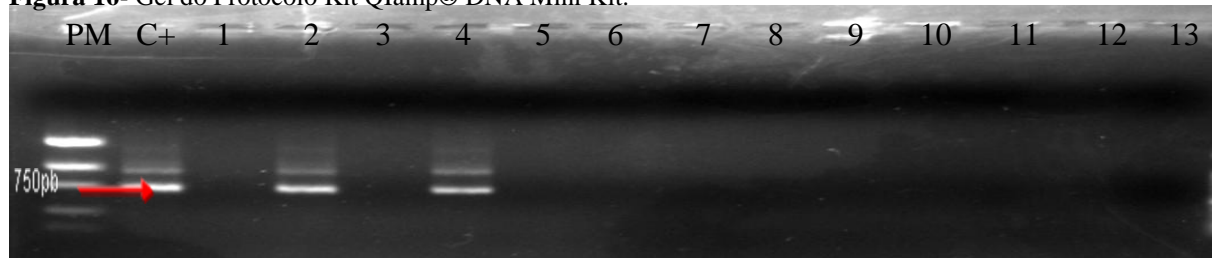
Legenda: Amostras de DNA de cultura, após extração, com quantidade inicial de: 30ug(a) referente ao Protocolo Kit QIamp® DNA Mini Kit; 30ug(b) referente ao Protocolo de Precipitação pelo NaCl; 30ug (c) referente ao Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão e 30ug(d) referente ao Protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio. O tamanho aproximado do genoma de 32Mb encontra-se indicado por seta. PM: marcador de peso molecular + Low DNA Mass Ladder e 100bp DNA Ladder (DNA Express) (30.000, 12000, 8000, 4000, 2000 e 100 bp).

É possível observar, no gel acima, que o Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão obteve a banda mais nítida de DNA genômico do parasita. Os protocolos de NaCl e fenol/clorofórmio apresentaram um intenso a moderado rastro de DNA, respectivamente. Já o DNA proveniente do kit comercial aparece visualmente em baixa quantidade.

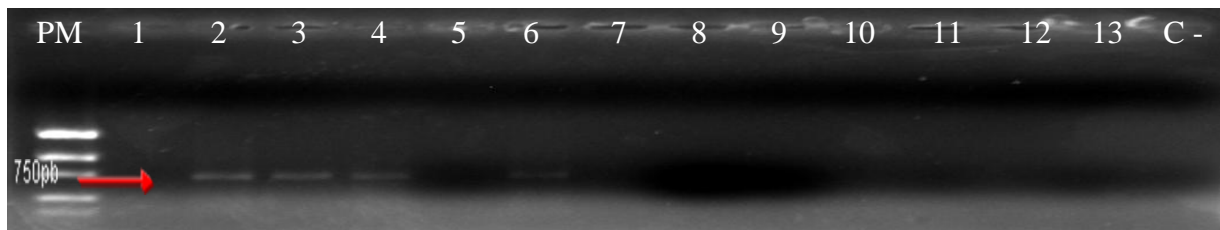
6.6 Comparação dos protocolos por PCR, frente às amostras de sangue de pacientes com LTA.

Ao compararmos amostras de sangue de 13 pacientes com diagnóstico clínico e parasitológico positivos para LTA, 2/13 (15%) foram positivos com o kit comercial (Figura 16), 4/13 (31%) positivaram com o protocolo de precipitação por NaCl (Figura 17), 10/13 (77%) foram positivos utilizando o protocolo de adsorção à sílica em suspensão (Figura 18) e 7/13 (54%) positivaram com o protocolo de extração por fenol/clorofórmio (Figura 19).

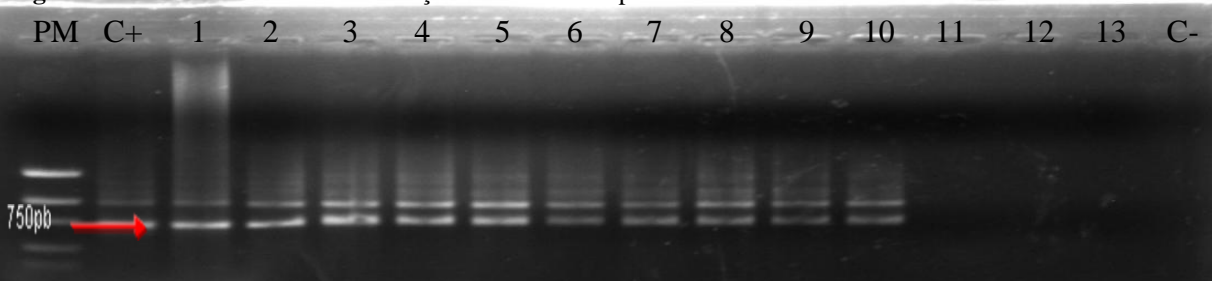
A reação de PCR das amostras extraídas pelo kit comercial e pelo protocolo de precipitação pelo NaCl foi realizada em conjunto, portanto, na corrida eletroforética, um evidencia o controle positivo o outro evidencia controle negativo.

Figura 16- Gel do Protocolo Kit QIamp® DNA Mini Kit.

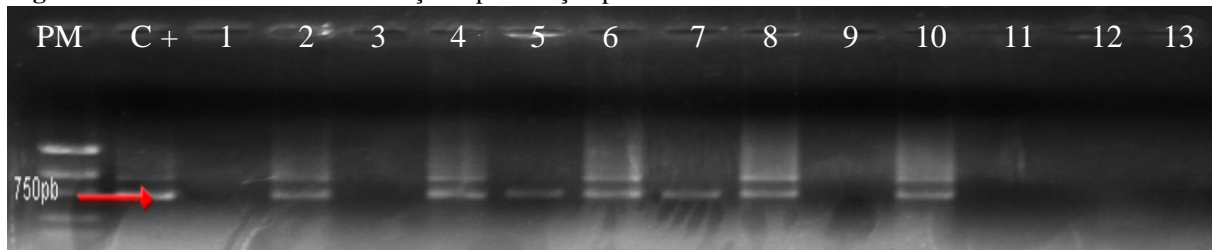
Legenda: Controle positivo (C+), amostras de sangue de pacientes com LTA (1-13). O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: marcador de peso molecular: Low DNA Mass Ladder (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

Figura 17- Gel do Protocolo de Precipitação pelo NaCl.

Legenda: Controle negativo (C-), amostras de sangue de pacientes com LTA (1-13). O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: marcador de peso molecular: Low DNA Mass Ladder (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

Figura 18- Gel do Protocolo de Adsorção à sílica em suspensão.

Legenda: Controle positivo (C+), controle negativo (C-), amostras de sangue de pacientes com LTA (1-13). O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: marcador de peso molecular: Low DNA Mass Ladder (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

Figura 19- Gel do Protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio.

Legenda: Controle negativo (C+), amostras de sangue de pacientes com LTA (1-13). O produto de amplificação de 750pb encontra-se indicado por seta. PM: marcador de peso molecular: Low DNA Mass Ladder (2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 bp).

A reação de PCR, das amostras extraídas pelo Protocolo de adsorção à sílica em suspensão e o protocolo de extração por fenol/clorofórmio, foram realizadas em conjunto, por tanto na corrida eletroforética, o controle negativo encontra-se evidenciado apenas no gel com as amostras extraídas pelo Protocolo de adsorção à sílica em suspensão.

Utilizando um sistema de pontuação de 1 a 5, onde: 1= péssimo; 2= ruim; 3= regular; 4= bom, 5= ótimo, construímos uma tabela (Tabela 6) para, através do somatório dos pontos, selecionar o protocolo de melhor desempenho com cultura e sangue, a ser testado frente às diferentes amostras de pacientes com LTA.

Tabela 6- Avaliação do desempenho dos Protocolos.

Análise	Protocolo			
	Kit QIamp® DNA Mini Kit	Precipitação pelo NaCl	Extração e purificação por fenol-clorofórmio	Adsorção à sílica em suspensão
Rendimento	1	2	2	4
Grau de Pureza	2	2	4	3
Reprodutibilidade	1	2	1	4
Praticidade	2	4	1	4
Custo/benefício	2	3	1	5
PCR	2	2	3	4
Total	10	15	12	24

Fonte: A autora.

Legenda: Sistema de pontuação de 1 a 5, onde 1= péssimo; 2= ruim; 3= regular; 4= bom, 5= ótimo.

Analisado a tabela de pontuação, como já esperado, observamos que o Protocolo de adsorção à sílica em suspensão obteve a pontuação mais alta, portanto, este protocolo foi selecionado para ser testado com outras amostras biológicas de pacientes com LTA. Afim de comprovar sua eficiência em outros tipos de amostras.

6.7 Avaliação do protocolo de melhor desempenho com cultura e sangue, frente às amostras de pacientes com LTA.

Foram selecionados 30 pacientes com diagnóstico clínico e/ou parasitológicos positivos para a LTA. Utilizando o Protocolo de adsorção à sílica em suspensão, foram extraídos o DNA de amostras de sangue, saliva, aspirado de lesão, *swab* oral, *swab* lesão e biópsia, de cada paciente segundo tenham se disponibilizado a coleta e/ou as condições eram favoráveis (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliação do protocolo de adsorção à sílica em suspensão frente às amostras de pacientes com LTA.

Paciente	Pesquisa Direta	Biópsia	Swab lesão	Swab Oral	Saliva	Aspirado	Sangue
1	+	+	NR	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	-	+
6	NR	NR	+	+	NR	NR	+
7	NR	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	-	+
9	-	+	+	+	+	-	+
10	NR	+	+	+	+	-	+
11	NR	NR	+	+	NR	NR	-
12	+	NR	+	+	+	+	-
13	-	NR	+	-	-	+	+
14	-	NR	+	+	+	+	+
15	-	NR	NR	+	+	+	+
16	+	NR	-	+	+	+	+
17	-	NR	+	+	+	+	-
18	NR	NR	-	+	-	+	-
19	+	NR	+	+	+	+	-
20	+	NR	-	-	-	+	-
21	NR	NR	NR	+	+	+	NR
22	NR	NR	+	+	+	NR	+
23	NR	+	+	+	+	NR	+
24	+	+	+	+	+	+	+
25	NR	NR	NR	+	+	NR	-
26	+	+	+	+	+	NR	+
27	NR	NR	+	+	+	NR	-
28	NR	NR	NR	-	+	NR	-
29	NR	NR	+	+	+	NR	+
30	NR	NR	+	-	-	NR	-

Fonte: A autora.

Legenda: NR: não realizado, (+): positivo, (-): negativo.

Todos os pacientes foram positivos em pelo menos uma amostra. Sendo a biópsia a amostra com maior percentual de positividade 12/12 (100%), seguido do *swab* lesão 22/25 (88%), *swab* oral e saliva com o mesmo percentual 26/30 (86%) e 24/28 (86%) respectivamente, aspirado com 15/20 (75%) e sangue com 19/29 (65%) obteve o menor percentual.

7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas técnicas úteis para o diagnóstico e estudos epidemiológicos vêm sendo desenvolvidos e obtendo um progresso significativo (DEGRAVE et al., 1994; RODRIGUES et al., 2013). Dentre elas a técnica de Reação em cadeia da polimerase, procedimento que permite a amplificação de segmentos de DNA em milhares de vezes, o que aumenta a sensibilidade da técnica, oferece alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos em distintas parasitoses como as leishmanioses (DE BRUIJN; BARKER, 1992; DE BRUIJN et al., 1993)

Para a técnica de PCR, como para outras técnicas moleculares, é fundamental que o DNA esteja muito bem purificado, íntegro e em concentração compatível com a sensibilidade da técnica (RODGERS et al., 1990; RODRIGUES et al., 2002; PALMA et al., 2016; WILSON, 1995). Portanto escolher o melhor método de extração e purificação de DNA pode determinar o sucesso da reação.

Neste trabalho, procurou-se avaliar por comparação protocolos que utilizam diferentes critérios físico-químicos de extração como: precipitação com auxílio de sais (Precipitação pelo NaCl), separação em fases (extração e purificação por fenol-cloroformio), hidrofobicidade (adsorção à sílica em suspensão). Nesses estudos, também foi utilizado um kit comercial amplamente utilizado nas rotinas laboratoriais (QiAamp® DNA mini kit, da Qiagen) por laboratórios de todo o mundo.

Foram estipulados parâmetros de avaliação que englobassem as principais características de um bom método de extração: rendimento de DNA, grau de pureza, reprodutibilidade, praticidade e custo/benefício. Adicionalmente foi avaliado também como um parâmetro essencial o desempenho da PCR aplicada ao DNAs alvos obtidos dos processos de extração e purificação testados (NEVES, 2010).

Em relação ao rendimento de DNA extraído, o protocolo de adsorção à sílica obteve, em geral, as maiores médias e medianas, refletindo num melhor rendimento de DNA. Este resultado corrobora com os trabalhos de Ferreira (2011) e Caldart et. al. (2011).

Os referidos autores, ao comparem um protocolo de sílica, semelhante ao abordado neste trabalho, com um kit comercial verificaram que o procedimento *in house* obteve o DNA de boa qualidade e quantidade.

Mesmo após a adição de sangue às amostras de cultura e de *swab* embebido em cultura o protocolo de adsorção à sílica em suspensão continuou obtendo as melhores

concentrações de DNA considerando cinco diluições iniciais de DNA (30ug, 10ug, 1ug, 100ng e 10ng).

Dosagens semelhantes foram observadas tanto pelo método de espectrofotometria como pelo método de quantificação da fluorescência em gel.

Ainda segundo os autores, esses resultados (rendimento) se justificam pelo princípio da técnica, que baseia-se nas ligações que ocorrem entre a superfície das partículas de sílica e do DNA na presença de sais sob determinado pH. Esse processo aliado à adição de um sal caotrópico (NaI) possibilita uma melhor ligação ao DNA, aumentando assim seu rendimento final.

Ao compararmos o grau de pureza do DNA extraído, verificamos que o protocolo de Extração e purificação por fenol-clorofórmio apresentou um maior número de amostras livres de proteínas. Resultado semelhante dos trabalhos de Parpinelli; Ribeiro (2009) e Barrero et. al. (2008).

Já o protocolo de Adsorção à sílica em suspensão foi o segundo melhor para esse parâmetro, corroborando com resultados obtidos no trabalho de Caldart et. al. (2011).

Em relação a reprodutibilidade dos protocolos, mais uma vez o protocolo de adsorção à sílica em suspensão obteve os melhores resultados, através do coeficiente de variação o protocolo em questão obteve os resultados mais reprodutíveis.

Neste mesmo parâmetro, observamos que tanto o protocolo comercial como o de extração e purificação por fenol-cloroformio obtiveram os piores desempenhos em termo de reprodutibilidade, este resultado pode estar relacionado ao número maior de etapas que os mesmos possuem, quanto maior o número de etapas, mais chance de contaminação e pior a reprodutibilidade.

Analisando a praticidade, percebemos que o protocolo de adsorção à sílica em suspensão se destaca, mais uma vez, por ter o menor número de etapas, com um menor tempo de execução do processo de extração, resultado semelhante ao trabalho de Viana (2013).

Contudo o protocolo de precipitação pelo NaCl obteve resultados equivalentes em termos de praticidade aqueles encontrados através do protocolo de adsorção a sílica em suspensão.

Também em relação à praticidade, vale ressaltar que para a realização do protocolo de extração e purificação por fenol-cloroformio se faz necessário a utilização da Capela de exaustão para o processo de tamponação do Fenol, etapa dispendiosa que além de demorar cerca de 10 horas para ser realizada exige um profissional extremamente atento e cuidadoso, pois o fenol é um agente tóxico que se inalado provoca irritação nas vias aéreas.

Assim, embora neste estudo o protocolo com maior tempo de execução tenha sido o kit comercial, se somarmos o tempo despendido na preparação dos reagentes com o tempo de execução, observamos que o protocolo que consumiu mais tempo foi o de extração e purificação por fenol-clorofórmio, este último em trabalhos como o de Vieira et. al. (2010) demorou de 2 a 3 dias para ser realizado.

Em trabalhos como de Abrão et. al. (2005), Caldart et. al. (2011) e Weber et al. (2010), que comparam protocolos comerciais e *in house*, é citado que o baixo custo destes últimos, em relação aos kits comerciais, é um ponto relevante a ser levado em consideração na escolha de um protocolo de extração.

Contudo não somente o custo foi levado em conta nos trabalhos já citados, mas se os protocolos citados apresentavam um resultado satisfatório ao se analisar posteriormente o DNA purificado em termos de quantidade e qualidade do material obtido. Assim sendo, este trabalho buscou analisar a relação custo/benefício dos diversos protocolos.

O protocolo que obteve a melhor relação custo/benefício foi mais uma vez o de adsorção à sílica em suspensão, pois apesar de apresentar um baixo custo em relação aos reagentes, ao valor e à quantidade das horas homens trabalhadas e ao custo energético, também foi capaz de produzir um bom rendimento de DNA purificado. Por outro lado, o protocolo que utilizou fenol-clorofórmio apresentou o maior gasto com mão de obra, devido ao tempo que é despendido na fabricação dos reagentes, da necessidade de passar pelo processo de tamponamento do Fenol.

Já em relação ao custo com os reagentes o protocolo comercial é o mais caro, além de ter a pior relação custo/benefício por ter o pior rendimento de DNA após a extração. O protocolo de precipitação pelo NaCl possui o menor custo em relação aos insumos, o que lhe fornece a segunda melhor relação custo/benefício.

Comparando os resultados obtidos na PCR para amostras de cultura e de *swab* embebido em cultura e diluindo estes até a quantidade de 100fg de DNA alvo, observamos que mais uma vez o protocolo de adsorção a sílica em suspensão obteve os melhores resultados visualizados em géis de agarose como bandas mais nítidas, sem rastro de DNA. Também apresentaram os resultados mais homogêneos.

Estes resultados podem estar relacionados à capacidade do método de extração supracitado de fornecer um DNA integro (BAREA et. al., 2004; PALMA et al., 2016) o que foi observado na reação de eletroforese do DNA após extração.

Em relação ao parâmetro integridade, após a extração com fenol/clorofôrmio, o artigo de Silva et al. (2012), ao comparar biopsias caninas para o diagnóstico da LTA, observa um

rastro de DNA maior nas amostras extraídas com fenol/clorofômio do que com o protocolo de acetato de potássio.

Ao compararmos amostras de pacientes com resultados positivos para LTA, podemos observar que novamente o protocolo de adsorção à sílica em suspensão obteve a maior porcentagem de positividade (77%) assim sendo, podemos inferir que a técnica de adsorção à sílica em suspensão, é o método de melhor desempenho também para extração de DNA a partir de sangue de pacientes com suspeita de LTA.

Com o auxílio de uma tabela de pontuação, para organizar e pontuar adequadamente cada protocolo segundo seu desempenho nos parâmetros testados foi possível determinar que o método de adsorção a sílica em suspensão obteve a maior pontuação (24 pontos).

As amostras biológicas de pacientes com suspeita de LTA são amostras de conveniência, ou seja, nem sempre é possível obter todas as amostras biológicas do mesmo paciente (amostras pareadas), por impossibilidades referentes a saúde do paciente ou o mesmo se negar a certos tipos de coletas.

Para o diagnóstico molecular da LTA, o Ministério da Saúde preconiza a biópsia e o aspirado de lesão, já o sangue é reputado como não sendo uma fonte ideal de amostras no caso da leishmaniose tegumentar americana por possuir uma baixa positividade e isso pôde ser observado neste estudo.

Neste trabalho amostras de *swab* lesão e *swab* oral possuem uma alta percentagem de positividade, o que corrobora os trabalhos de Alexandre (2013), Araújo (2013), Brito (2012), Mimori et al. (2002) e Silva (2015).

Já para o diagnóstico molecular da LTA, utilizando amostras de saliva, Gomes (2014) observou uma positividade mais baixa em seu estudo, utilizando um kit comercial para extração do DNA, do que ocorreu no presente trabalho quando utilizamos o método *in house* de extração por adsorção a sílica em suspensão.

Nessa pesquisa, o protocolo de adsorção à sílica em suspensão demonstrou que essa metodologia foi eficaz, simples, rápida, de baixo custo e com boa amplificação do DNA. A técnica ainda obtém outra vantagem sobre os outros protocolos por ser muito fácil de implementar, pois utiliza equipamentos padrões de laboratório e poucos produtos químicos. Além de possuir eficiente remoção de inibidores da PCR.

8 CONCLUSÃO

O protocolo *in house* de “adsorção à sílica em suspensão” é o indicado como método de escolha, para extração e purificação de DNA total de *Leishmania (V.) braziliensis*, a partir de cultura e de amostras de pacientes com suspeita de LTA, visando o diagnóstico molecular da doença através do emprego de PCR;

O método de coleta por *swab* pode ser utilizado sem prejuízo de eficiência e até com vantagem, frente aos quatro métodos de extração e purificação testados.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M.G. et al. Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 49, n.6, p. 978-982, 2005.
- ALEXANDER, J. et al. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, London v. 112, n 18, p. 2993-3002, 1999.
- ALEXANDRE, J. L. A. **Padronização e avaliação do método de coleta utilizando swab em saliva para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana**. 2013. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2013.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ALVES, R. et al. Biópsia cutânea: onde, quando e como? **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, Madrid, v.39, n. 2, p.3-12, 2011.
- ANDRADE, B. B et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas, **Gazeta Médica da Bahia**; Salvador, v. 75, n. 1; p. 75-82, 2005.
- ANDRADE, M.S. et al. New outbreak of American tegumentary leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.42, n. 5, p.594-596, 2009.
- ARAÚJO, A. I. F. **Avaliação do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco, Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- BAÑULS, A.L et al. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 29, n. 7, p. 1137-1147, 1999.
- BAREA, J. A. et al. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 274-281. 2004.
- BARRERO, N. M. L. et. al. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008.
- BARKER, D.C; BUTCHER, J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.77, n. 3, p.285-97, 1983.

BASANO, S. A; CAMARGO, L. M. A.: Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p.252-258, 2004.

BONACCORSO, N. S. **Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Direito. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BORST, P.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Kinetoplast DNA - Review. **Plasmid**, New York, v. 2, n. 2, p. 20-40, 1979.

BOYLE, J.S.; LEW, A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 8-10, 1995.

BRANDÃO-FILHO, S. P. **Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana associada à *Leishmania (Vianna) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2001.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.93, n. 5, p.488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

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

BRASIL. Departamento de informática do SUS. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: junho 2016.

BRITO, M. E. F. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 10, p. 2445-2448, out, 2008.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, DC, v 7, n. 2, p. 318–321, Mar 2000.

BRITO, M. E. F. et al. Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis. **Case Reports in Dermatological Medicine**, New York, v. 4, n.1, p. 1-4, 2012.

BRITO, M. E. F., et al. Species diversity of *Leishmania (Vianna)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **TM & IH. Tropical medicine and international health**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2009.

BROWN, T. A. **Genética um enfoque molecular**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CALDART, E.T. et al. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. . **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n.1, p. 94-95. 2011.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos da América). **Parasites - Leishmaniasis, Biology, Life Cycle**. Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 12 Jan 2016.

CHIARI, L. et al. Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. **Circular Técnica**, Campo Grande, v. 36, 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/853311/1/CT36.pdf>>. Acesso em: 12 nov 2016.

COSTA, J.M.L. et al. Modalidades, Diagnóstico e Terapêutica da LT no Brasil, **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.79, n. 3, p.70-83, 2009.

CUBA CUBA, C. A. et al. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Epidemiological Bulletin Pan American Health Organization**, Washington, DC, v. 15, n. 3, p. 249-259, 1981.

DE BRUIJN, M. H. L. et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v. 44, n. 2, p. 201-207, 1993.

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DEAN, C. M; RICHARDS, C. L; MALOUIN, F. Task-related circuit training improves performance of locomotor tasks in chronic stroke: A randomized controlled pilot study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 81, n. 4, p. 409-417, 2000.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sássari, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014.

ERESH, S et al. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p.423-433, 1994.

FERNANDES, O., et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 1, p.563-8, 1999.

FERREIRA S. A. **Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR.** 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

FIGUEROA, R. A. et al. Detection of *Leishmania* in Unaffected Mucosal Tissues of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)* Species. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 200, n.1, p. 638–46, 2009.

FURUSAWA, G. P.; BORGES M. F. Colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na Vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v.43, n.1, p. 7-25, 2014.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.5, n. 2, p.109-116, 2007.

GARCIA, F. C. B 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 leishmania em amostras cutâneo-mucosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasília, v. 80, n. 3, p. 339-344, 2005.

GOMES, A. C.; GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 136-142, 1989.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasília, v. 89, n. 5, p. 701-711, 2014.

GOMES, C. M. **Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, swab nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO M.L. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 1, p.71-80, 2003.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A. Infrequency of gross skin lesions among Panamanian forest mammals with cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, Cambridge, Reino Unido v. 71, n. 1, p. 87-92, 1975.

INVITROGEN. **Low DNA Mass Ladder.** Manual digital. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Low_DNA_Mass_Ladder_man.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2016.

JOSÉ, F.F. et. al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília- DF, v. 34, n. 6, p. 537-542, 2001.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

LAINSON R.; SHAW J. J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to **Amazonian Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 94-106, 1992.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazonica de Saúde**. Manaus, v. 1, n. 2, p.13-32, 2010.

LAINSON, R.; et. al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the disease in Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER L.; BALOWS A.; SUSSMAN M. (ed) **Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. ed. 9, London: Topley & Wilson, 1998, v. 5, p. 241-266.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: KENDRICK P.; KENDRICK K. (Ed) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987, p. 111-119.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. *Leishmania* and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**. Washington, DC, v. 7. n. 4. p. 1-19, 1973.

LEVINE, N.D. et al. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, New York, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LIMA, A. C. V. M. R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil**. 2010. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LIMA-JÚNIOR, M. S. C. et al. Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 3, n. 1, p. 10-15, 2013.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, n. 5, p. 10–17, 2012.

LOUREIRO, C. C. P. et al. Leishmaniose: métodos diagnósticos. **Folha médica**, Rio de Janeiro, v.117, n. 2, p.131-134, 1998.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da Leishmaniose Tegumentar Americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

MARLOW, M. A. et al. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2013.

MARZOCHI M. C. A. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). **Jornal Brasileiro de Medicina**; Rio de Janeiro, v. 63, n. 5/6, p. 81-105, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 359-375, 1994.

MAYR, E. **The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution and Inheritance**. London: The Belknap Press of Harvard University Press. 2003.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Quarterly journal of medicine**, Dublin, v. 01, n. 1, p. 1-8, June 2013.

MEILI, M. Signer's Gift – Rudolf Signer and DNA. **Chimia**, Zurique, v. 57, n.11, p. 735-740, 2003.

MIMORI, T. et. al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, Basel, v. 81, n. 3, p.197 -202, 2002.

MOORE, D. D.; DOWHAN, D. Preparation and Analysis of DNA. In: AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. Nova Jersey, ed. John Wiley & Sons, 2009, v.1, cap. 2, p. 201-203.

MORAIS, R. C. S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de Leishmania**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

MORGAN, U. M., THOMPSON, R.C.A. Molecular detection of parasitic protozoa. **Parasitology**, Cambridge, v.117, n. 1, p.73-85, 1998.

MOUTTAKI, T. et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, n. 1, p. 1 - 9, 2014.

NEVES V. C. **Avaliação de Protocolos de Extração de DNA Empregados na Detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 por PCR em Triatomídeos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós- Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2010.

NEVES, D.P. Leishmaniose Tegumentar America in **Parasitologia Humana**. ed. 11, São Paulo: Atheneu, 2005, p. 54-57.

OLIVEIRA, A. P. **Aplicação da citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana**. 2011. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

OLLIARO, P. et al. Methodology of Clinical Trials Aimed at Assessing Interventions for Cutaneous Leishmaniasis, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, USA v. 7, n. 1, p. 1-19, March 2013.

PALMA, J. et al., Comparative analysis of protocols for DNA extraction from soybean caterpillars. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, p. 1-9. 2016.

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

PASSOS, G. P. et al. Métodos para Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana – Revisão, **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.15; p. 12-33, 2012.

PEREIRA, T. L; MONTEIRO, F. C. Avaliação de protocolo de extração de dna para micobactérias diretamente de amostras granulomatosas de bovinos suspeitas de tuberculose procedentes de frigorífico na Bahia. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 71-79, July 2015.

PESSÔA, S. M. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PHILLIPS, S. M. **A Comparative Study Of DNA Extraction Methodologies: Variation In DNA Yield And Effects On Downstream PCR Analysis**. 2009. Tese (Master of Science) - Boston University School of Medicine, Massachusetts, 2009.

PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v.37, n. 6, p. 1819-1823, 1999.

RABELLO, E. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. I. Histórico e sinonímia. **Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia**, Brasília, v.1, n.1, p.3-31, 1925.

RAMOS, J. E. P. et al. Extração de DNA de amostras de carcinomas anais incluídas em parafina. **Eletronic Journal of Pharmacy**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 38-39, 2015.

RASO, P.; GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BRASILEIRO FILHO, G. et al. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, New York, v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987.

REIS, L. C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 439-443, set-out, 2008.

REITHINGER, R.; DUJARDIN J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC , v. 45, n. 1, p. 21–25, Jan. 2007.

REMME, J.H. et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends Parasitol**, Oxford, v.18, n. 10, p.421-6, 2002.

REY, L., **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RODGERS, M. R. et al. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v.71, n. 3, p.267-275, 1990.

RODRIGUES E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUES, E. H. G. **Análise de seqüências de minicírculos do kDNA obtidos de amostras clínicas (lesões ativas e cicatrizadas) de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco, Brasil**. 2006. Tese (Doutorado Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

RODRIGUES, E. H. G. et al. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 228-228, 2013.

RODRIGUES, E. H. G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pernambuco**. 2000. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.

ROGERS, W.O.; WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proceedings National Academy Science**, Boston, v. 84, n. 2, p. 565-569, 1987.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (ed). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CENARGEN, 1999, p.163-177.

ROSS R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **British Medical Journal**; Liverpool, v.11, n. 1, p. 1401, 1903.

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

SANTOS, R. V; COIMBRA, J. R. C. E. A. **Saúde e Povos Indígenas**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1994.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology Infect Disease**, New York, v. 47, n. 2, p. 349-58, 2003.

SILVA, A. O. **Utilização do Swab no Serviço de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2015. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA P. M. A. et al. Comparação De Protocolos De Extração Do DNA De Tecido Animal Para Diagnóstico De Leishmaniose Tegumentar Americana Canina. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n.15; p.1774. 2012.

SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.1, p. 239-51, 2004.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review in Microbiology**, USA, v. 41, n.1, p.363-82, 1987.

SKRABA, C. M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 78, n. 2, p. 411–417, 2014.

STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Molecular and Biochemical Parasitology**; Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 93-104, 1983.

UEZATO, H. et al. Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, ethanol-fixed, frozen human skin specimens by polymerase Chain reaction and Southern blotting. **Journal of dermatological treatment**, Basingstoke, v.25, n. 3, p.623-631, 1998.

VALE, E.C.S; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Brasília, v. 80, n. 4, p.421-8. 2005.

VIANA, J. B. M. **Otimização do método de coleta em swab para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco, Brasil**. 2013. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

VIEIRA, J. N. et. al. Comparação de três técnicas de extração de DNA para sexagem molecular em aves. **Veterinária e Zootecnia**. Botucatu, v. 17, n. 3, p. 394-398. 2010.

WATSON, J. D. et al. **Molecular Biology of the Gene**, 5 ed. San Francisco: Pearson, 2004.

WATSON, J. D.; BERRY, A. **DNA: O Segredo da Vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

WEBER, G. R. et. al. Uso de solução salina (NaCl) na extração de DNA a partir de bulbo capilar. **Evidência**, Joaçaba v. 10 n. 1-2, p. 115-120, 2010.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of Clinical Microbiology**; Washington, v. 40, n. 2, p. 601–606, 2002.

WEISS, J. B. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 8, n.1, p. 113-130, 1995.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.89, n. 1, p.95-100, 1995.

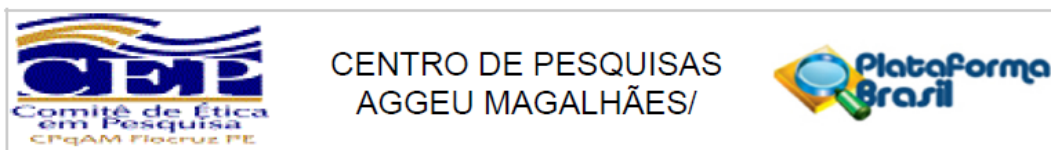
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series 949**, Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**, Geneva, Nº 2, Junho de 2016.

WRIGHT, J.H. Protozoa in a case of tropical ulcer (“Delhi Sore”). **Journal of Medical Research**, Boston, v. 10, n. 1, p. 472-482, 1903.

ZORZETTO, R. et. al. Técnica de PCR simplex associada a método de extração de DNA de baixo custo para identificação molecular de isolados clínicos de *Shigella* spp. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 11-17, 2015.

ANEXO A –PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA empregados na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.* por PCR.

Pesquisador: Angélica Olivino da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43876215.6.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.140.782

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo comparativo acerca de diferentes protocolos para extração e purificação de DNA para a realização da PCR, que assegure uma análise mais aprofundada, culminando para o desenvolvimento de um protocolo específico e sensível. Neste estudo comparativo será utilizado como substratos à purificação de DNA o cultivo de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e swab embebido em diferentes diluições, como parâmetros necessários à análise desses protocolos de extração e purificação de DNA. De acordo com os resultados apresentados será selecionado o protocolo mais adequado, e que possa ser incorporado à pesquisa em leishmaniose tegumentar americana junto aos pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco.

Objetivo da Pesquisa:

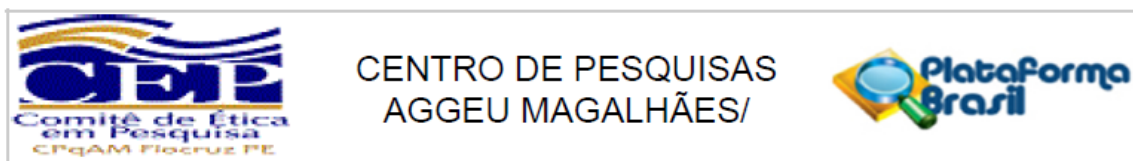
Objetivo primário:

Avaliar diferentes protocolos de extração e purificação de DNA empregados na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.* por PCR.

Objetivo Secundário:

a) Analisar protocolos de extração, a partir das diferentes diluições de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.140.782

- b) Avaliar protocolos de extração, a partir das amostras de swab em diferentes diluições de cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*.
 c) Avaliar o protocolo mais adequado frente as amostras de pacientes com LTA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os Riscos e Benefícios estão de acordo com RESOLUÇÃO CNS Nº 466/12

Riscos:

Apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os pacientes, há possibilidade de sentir algum desconforto ou ardência após a utilização da seringa e raspagem da pele, ou mesmo no procedimento de biópsia, após a anestesia, este último realizado por profissional médico.

Benefícios:

Benefícios:

Este estudo contribuirá para uma melhor detecção da doença através de uma observação minuciosa acerca da comparação analítica de diferentes protocolos, corrobora para eleger a mais indicada técnica de extração e purificação de DNA, em particular, para a LTA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com relevância científica, bem estruturada e com clareza metodológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos e documentações exigidas apresentadas.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

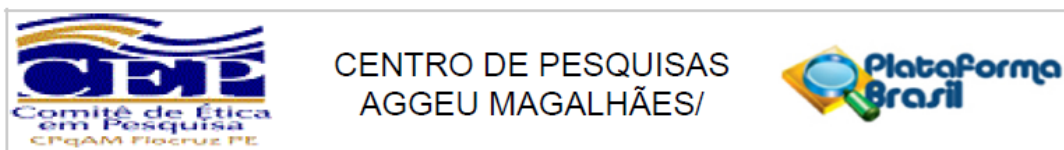
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.140.782

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

RECIFE, 07 de Julho de 2015

Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

ANEXO B – RELAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MARCAS UTILIZADAS NA
FABRICAÇÃO DOS REAGENTES

Produto	Fabricante	Código do Fabricante	Lote
Álcool Absoluto (P.A)	Alphatec®	-	21789
Álcool Isoamílico (P.A)	Vetec®	358	-
Clorofórmio (P.A)	Isofar®	213	-
EDTA (P.A)	Dinâmica®	-	10016
Fenol (P.A)	Sigma-Aldrich®	P1037	-
HCL (P.A)	Proquímios®	-	11/0314
NaCl (P.A)	Vetec®	106	-
NaI (P.A)	Vetec®	644	-
Proteinase K (P.A)	Affymetrix- USB®	76230Y	-
SDS (Molecular Biology Grade)	Promega©	H5114	-
Sílica (P.A)	Sigma-Aldrich®	S5631	-
Tris (P.A)	Invitrogen™	15504-020	-

ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Grupo de Paciente Menor de 18 anos

Convidamos o (a) menor, após autorização dos responsáveis legais, para participar do projeto de pesquisa “Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA empregados na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.* por PCR” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é contribuir para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana.

O (A) menor fará parte do grupo de pacientes, realizaremos a coleta de pele através da raspagem superficial da borda do ferimento, aspirado da borda, utilizando uma seringa, e/ou biópsia da borda do ferimento, coletado após anestesia por profissional médico e coleta de exsudatos cutâneos (líquido expelido do ferimento), através *swab* (cotonete) em toda a área da lesão, de modo superficial e sem dor. Todo procedimento será realizado com material estéril (sem contaminantes) descartável e por profissionais de saúde com capacidade para executá-lo. Quanto aos riscos, apesar de todo cuidado tomado no sentido de protegê-lo, o menor poderá sentir algum desconforto ou ardência. A identidade dele (a) não será revelada em nenhum momento da pesquisa.

Antes de sua participação no projeto citado, o (a) menor, tem total liberdade de pedir esclarecimentos adicionais que julguem necessários. Tais informações serão prestadas por quaisquer dos responsáveis pelo estudo. O (A) menor tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem prejuízo de qualquer tipo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a identidade do voluntário); e para que possamos estocar as suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou de outras informações o (a) senhor (a) poderá, a qualquer momento, entrar em contato com a equipe responsável (Edileuza Brito e Angélica Olivino - CPqAM e Ângela Rapela - HUOC-UPE), através dos telefones abaixo. Caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa isso poderá ser feito através do contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (telefone (81) 2101-2639) o qual tomará as medidas cabíveis.

Nome do menor

Assinatura do paciente e endereço

data

Assinatura de testemunha

data

Assinatura do médico responsável – HUOC-UPE

data

Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC-UPE), Rua Arnaldo Marques, s/n - Santo Amaro, Recife-PE. Fone: (81) 3413-1300.
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ. Tel.: (81) 2101 2641 ou 2101 2566.

ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Grupo Paciente**

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA empregados na detecção de *Leishmania (Viannia)* spp. por PCR” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é contribuir para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana.

O (A) Sr. (a) fará parte do grupo de pacientes, que será submetido à coleta de pele através da raspagem superficial da borda do ferimento, aspirado da borda, utilizando uma seringa, e/ou biópsia da borda do ferimento, coletado após anestesia por profissional médico e coleta de exsudatos cutâneos (líquido expelido do ferimento), através *swab* (cotonete) em toda a área da lesão, de modo superficial e sem dor. Todo procedimento será realizado com material estéril (sem contaminantes) descartável e por profissionais de saúde com capacidade para executá-lo. Quanto aos riscos, apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os voluntários, o (a) senhor (a) poderá sentir algum desconforto ou ardência. Sua identidade não será revelada em nenhum momento da pesquisa.

Antes de sua participação no referido projeto, o senhor tem total liberdade de pedir esclarecimentos adicionais que julguem necessários. Tais informações serão prestadas por quaisquer dos responsáveis pelo estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem prejuízo de qualquer tipo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a sua identidade); e para que possamos estocar a suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, ao (a) senhor (a) será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou de informações adicionais o (a) senhor (a) poderá, a qualquer momento, entrar em contato com a equipe responsável (Edileuza Brito e Angélica Olivino – CPqAM-Fiocruz e Ângela Rapela - HUOC-UPE), através dos telefones abaixo. Caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa isso poderá ser feito através do contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (telefone (81) 2101-2639) o qual tomará as medidas cabíveis.

Assinatura do paciente e endereço

data

Assinatura de testemunha

data

Assinatura do médico responsável – HUOC-UPE

data

Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC-UPE), Rua Arnaldo Marques, s/n - Santo Amaro, Recife-PE. Fone: (81) 3413-1300.
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ. Tel.: (81) 2101 2641 ou 2101 2566.