

## PESQUISA DE DNA DE *Leishmania* spp. EM MAMÍFEROS SILVESTRES NA MICRORREGIÃO DE PELOTAS, RS, BRASIL - DADOS PRELIMINARES

JULIA SOMAVILLA LIGNON<sup>1</sup>; MARIANA ACCORSI TELES<sup>2</sup>; DIEGO MOSCARELLI PINTO<sup>3</sup>; RAQUELI TERESINHA FRANÇA<sup>4</sup>; RODRIGO CASQUERO CUNHA<sup>5</sup>; FÁBIO RAPHAEL PASCOTI BRUHN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – julialignon@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – mariaccteles@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – dimoscarelli@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – raquelifranca@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha\_vet@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabio\_rpb@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, as quais são transmitidas pela picada de insetos flebotomíneos e possuem os canídeos como principais reservatórios. Compreendem parasitos multi-hospedeiros de caráter zoonótico que são mantidos por uma grande diversidade de espécies de mamíferos na natureza (OPAS, 2021). São doenças infecciosas, não contagiosas que possuem sintomatologia variada, e as manifestações clínicas em humanos e animais são subdivididas em leishmaniose cutânea, muco-cutânea e visceral. A enfermidade é uma zoonose grave, dada a sua incidência e alta letalidade, e que consiste em um problema de saúde pública preocupante, que acomete principalmente populações de países em desenvolvimento (ALVAR et al., 2012).

No Brasil, até o fim da década de 80, a leishmaniose estava restrita às zonas rurais, e a transmissão ocorria entre vetores e animais silvestres. No entanto, tem-se notado mudanças importantes no padrão de transmissão e na década de 90 observou-se um nítido processo de urbanização da enfermidade, além da sua expansão geográfica para os estados mais ao sul do país (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

Segundo o relatório do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Instituto Internacional de Pesquisa Pecuária (PNUMA, 2020), cerca de 60% das enfermidades que infectam humanos têm origem em um animal. Entre todas as novas e emergentes doenças infecciosas, cerca de 75% são transmitidas de uma espécie intermediária animal para humanos. Ainda, segundo o documento, em torno de 80% dos patógenos que contaminam animais possuem mais de um hospedeiro, incluindo humanos.

A fauna silvestre, portanto, pode representar uma grande fonte de informações em locais que ainda não foram estudados (THOMPSON, KUTZ e SMITH, 2009). A identificação de protozoários como *Leishmania* spp. nestes animais tem grande importância no monitoramento das doenças em uma determinada região e ajuda a estabelecer indicadores ambientais, permitindo a identificação das áreas de risco à infecção, pois estes atuam como marcadores epidemiológicos para a presença dos microrganismos (CANTEROS et al., 2004).

Portanto, com este trabalho, objetivou-se pesquisar, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença de DNA de *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres da microrregião de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

## 2. METODOLOGIA

### **Coleta de animais**

Carcaças de animais silvestres mortos por atropelamento foram coletadas nas rodovias das cidades pertencentes a microrregião de Pelotas, no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Optou-se, preferencialmente, por animais com vísceras preservadas e não expostas, com tempo estimado entre uma e sete horas. Os animais coletados foram embalados em sacos plásticos, etiquetados com espécie, sexo, data, cidade e local onde foram encontrados e transportados em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório do Grupo de Estudos em Enfermidades Parasitárias da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), aonde foram necropsiados. Também foram utilizadas carcaças de animais silvestres que vieram a óbito, durante o período do experimento, provenientes do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) e Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), além de amostras provenientes de animais silvestres necropsiados no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD), ambos da UFPEL. Fragmentos dos tecidos como baço, fígado, rim, coração, pulmão, linfonodos, medula óssea e sangue de todos os animais foram amostrados e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises moleculares.

### **Extração de DNA e detecção molecular**

As extrações de DNA foram realizadas com kits comerciais: *PetNAD™ Nucleic Acid Co-Prep Kit* para o sangue e *ID Gene™ Spin Universal Extraction Kit* para tecidos, segundo instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro de luz UV (NanoDrop®), para avaliar a sua qualidade mediante mensuração de sua pureza (260 nm/280 nm) e concentração em nanogramas por microlitros (ng/ $\mu\text{L}$ ), e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da PCR. Para identificar a presença de DNA de *Leishmania* spp., a PCR foi realizada usando os seguintes primers: LITSR (5' CTGGATCATTTCGGATG 3') e L5.8S (5' TGATACCACTTATCGCACTT 3') amplificando um fragmento de aproximadamente 340pb da região ITS1, segundo RANASINGHE et al. (2015) e conferido na ferramenta *BLAST*. Nas reações, foram utilizados 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA (50  $\mu\text{L}$ ) e o mix contendo 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5mM), 0,5  $\mu\text{L}$  cada iniciador (10mM), 2,5 $\mu\text{L}$  solução tampão (10X), 0,75  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ ), e 17  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, totalizando 25  $\mu\text{L}$ . As amplificações, em termociclador convencional, foram: desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos,  $53^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado o DNA da cepa de *Leishmania braziliensis* cedida gentilmente pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e visualizados em luz ultravioleta. Utilizou-se o padrão de peso molecular de 100pb.

### **Considerações éticas**

A coleta de animais silvestres atropelados foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informações sobre Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente sob matrícula nº 82632-3 e o projeto foi liberado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (processo nº 23110.046990/2022-02).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, amostras de 24 animais (1 *Hydrochoerus hydrochaeris*, 1 *Leopardus geoffroyi*, 10 *Didelphis albiventris*, 1 *Procyon cancrivorus*, 4 *Cerdocyon thous*, 1 *Conepatus chinga*, 1 *Lepus europaeus*, 2 *Mazama gouazoubira*, 1 *Euphractus sexcinctus*, 1 *Dasypus novemcinctus*, 1 *Cavia aperea*) foram analisadas. Destes, todos foram negativos para *Leishmania* na técnica de PCR.

Cerca de 70 espécies de mamíferos no mundo, incluindo humanos, podem ser considerados hospedeiros vertebrados de *Leishmania*. Animais infectados com este protozoário pertencem às ordens Carnivora, Cingulata, Chiroptera, Didelphimorphia, Lagomorpha, Pilosa, Primata e Rodentia. Os roedores, além de formarem a ordem mais diversificada, são o grupo mais explorado em relação às infecções por *Leishmania*, já que Nessa ordem foram registradas infecções pela maior diversidade de espécies do protozoário. Isso pode ser devido ao fato de várias razões, principalmente à sua grande abundância em ambientes antropizados e em nichos ecológicos onde flebotomíneos se reproduzem. Os carnívoros são geralmente designados como reservatórios de diferentes espécies de *Leishmania* e estudos demonstram que cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e tatu (*Dasypus novemcinctus*) são considerados potenciais reservatórios de alguns desses protozoários. Ainda, considerando que os gatos domésticos são potenciais reservatórios de *Leishmania*, compreender se felinos silvestres em vida livre participam dos ciclos de transmissão é importante para uma melhor compreensão desta zoonose no ambiente silvestre e mais estudos devem ser realizados (AZAMI-CONESA et al., 2021; OPAS, 2021).

A família Didelphidae também é considerada potencial reservatório e tem importância na manutenção do patógeno no ambiente (OPAS, 2021). MACEDO et al. (2019) encontraram uma prevalência de 34% (17/50) deste protozoário em *Didelphis albiventris* provenientes da mesma região do presente estudo. Este tripanossomatídeo também foi descrito neste mesmo hospedeiro em outros estados do país (QUINTAL et al., 2011; HUMBERG et al., 2012). Neste sentido, segundo FINNIE (1986), os animais pertencentes ao gênero *Didelphis* são extremamente adaptáveis aos mais diferentes ambientes, como florestas e em meio à civilização humana. Além disso, são nômades, sendo difícil definir seu território, pois percorrem longas distâncias e permanecem em uma área por períodos relativamente curtos, facilitando assim a disseminação de patógenos.

Apesar de todas essas informações, ainda não há relatos da presença do vetor responsável pela transmissão do patógeno na região estudada, portanto, acredita-se que o fato de não haver amostras positivas, até o momento, também se deve ao não contato do hospedeiro com o vetor infectado.

A magnitude do problema de saúde das leishmanioses e sua complexa epidemiologia aponta a necessidade da identificação de todos os elos da cadeia de transmissão, com a finalidade de implementar estratégias efetivas de controle. Assim, a compreensão de cada foco de transmissão é fundamental para apoiar estratégias eficazes e sustentáveis para a vigilância das leishmanioses.

### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que, até o presente momento, o protozoário pesquisado não foi encontrado entre os mamíferos silvestres estudados na microrregião de Pelotas, RS, Brasil.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, 2004.

AZAMI-CONESA, I.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A. A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*. **Microorganisms**, v.9, n.1101, p.1-44, 2021.

CANTEROS, C.E.; IACHINI, R.H.; RIVAS, M.C. et al. First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.37, n.1, p.46-56, 2004.

FINNIE, E.P. Monotremes and Marsupials (Anatomy). In: FOWLER, M.E. **Zoo and wild animal medicine** 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. Cap.36, p.558-560.

HUMBERG, R. M. P.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. D. S. P. E. et al. *Leishmania chagasi* in Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, n.3, p.470–472, 2012.

MACEDO, M.R.P.; SOARES, T.A.L.; SCHEER, S. et al. Autochthonous *Leishmania* spp. infection in *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in Pelotas and Capão do Leão cities, Southern Brazil. In: **XXV Congresso Latinoamericano de Parasitología – FLAP**, Panamá, 2019, p. 219.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. Washington, D.C. 2021. 582p.

PNUMA - PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE E INSTITUTO INTERNACIONAL DE PESQUISA PECUÁRIA. **Preventing the Next Pandemic: Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission**. Nairobi: Kenya, 2020.

QUINTAL, A.P.N.; RIBEIRO, E.S.; RODRIGUES, F.P. et al. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.112–119, 2011.

RANASINGHE, S.; WICKREMASINGHE, R.; HULANGAMUWA, S. et al. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania donovani*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n.8, p.1017-1023, 2015.

THOMPSON, R.C.A.; KUTZ, S.J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.6, p.678-693, 2009.