

**Título: Diagnóstico molecular de pacientes com lesões ativas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Kdna Pcr em amostras processadas em Glicol Metacrilato (GMA)**

**Autor(es)** Abraão Ferreira Lopes Dornellas; Tatiana Penna de Queiroz; Marcia Pereira Oliveira Duarte\*; Luiza Oliveira Ramos Pereira; Rosimar Baptista Lima

**E-mail para contato:** marciapo@gmail.com

**IES:** UNESA

**Palavra(s) Chave(s):** Leishmaniose; Diagnóstico; PCR

### **RESUMO**

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), existem aproximadamente dois milhões de casos novos das diferentes formas clínicas da doença por ano (WHO, 2010). A doença pode se manifestar em quatro diferentes formas clínicas, sendo a Leishmaniose cutânea localizada a forma mais frequente. O diagnóstico histopatológico de Leishmaniose só pode ser firmado com a observação de formas amastigotas do parasito, tendo-se muitos casos com laudo de compatibilidade com a doença, sem confirmação, dificultando as decisões terapêuticas. Isso acontece principalmente nos casos de infecção por *L. (Vianna) braziliensis*, pelo baixo parasitismo tissular. O processamento de amostras de lesão em resinas plástica, como GMA, vem trazendo inúmeras vantagens em relação à inclusão em parafina, permitindo uma melhor observação das alterações morfológicas e visualização das formas amastigotas no tecido. O diagnóstico molecular tem se mostrado mais sensível do que as técnicas convencionais, permitindo a amplificação de regiões do DNA do parasito, possibilitando maior precisão, além de outras funções, tais como quantificação da carga parasitária, determinação das espécies, etc. Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para realização de kDNA PCR de amostras de pacientes com leishmaniose, que encontravam-se incluídas em resina GMA. O estudo retrospectivo foi realizado no LIPMED/IOC/Fiocruz. Foram utilizadas 9 amostras de lesão de pacientes com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar processadas em GMA. 40 cortes de 3µm de cada caso foram digeridos em TEN 1x + 0.45% NP40 + 250 Ig/mL of proteinase K em banho maria a 55°C por 24 horas. 2 µL desta solução foram usados na reação de PCR utilizando-se iniciadores de região conservada de kDNA. A visualização das bandas de 120bp (compatível com *Leishmania*) foi realizada em gel de agarose corado com brometo de etídio. Como controle, foi utilizada amostra de baço de paciente com leishmaniose visceral. Dentre as 9 amostras testadas, 7 eram de pacientes com lesão cutânea (3 casos com diagnóstico histopatológico positivo e 4 casos sem confirmação na histopatologia) e 2 eram de pacientes com lesão mucosa (ambos com confirmação histopatológica). Além da amostra de leishmaniose visceral, foram observadas bandas de 120bp em quatro amostras de pele e nas duas amostras de lesão mucosa. Dentre as amostras de pele positivas na PCR, duas eram de pacientes sem confirmação diagnóstica na histopatologia. A realização de kDNA PCR em amostras processadas em resina GMA se mostrou bastante eficaz tantos em casos de lesões cutâneas quanto em lesão mucosa. A metodologia desenvolvida pode facilitar o manejo clínico destes pacientes, devendo ainda continuar com a quantificação da carga parasitária e sua correlação clínica.