

UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA - PCR NA DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*

Henrique Douglas Melo Coutinho¹⁸

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas. Pertence a ordem Kinetoplastida, a subordem Trypanosomatina e a família *Trypanosomatidae*. Esta revisão tem por objetivo mostrar a utilização da biologia molecular para encontrar associações entre a genética do *Trypanosoma cruzi* e suas propriedades biológicas e médicas, utilizando-se uma organela especial, o DNA-cinetoplástico (kDNA). Trabalhos recentes estão sendo conduzidos na procura de terapias alternativas e novos testes diagnósticos para a Doença de Chagas, principalmente utilizando as características genéticas do microrganismo.

Palavras-Chave: *T. cruzi*. Doença de Chagas. DNA-cinetoplástico (kDNA). Características genéticas.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma antrozoose freqüente nas Américas e constitui ainda hoje, no Brasil e em diversos países da América Latina, um problema médico-social grave. No Brasil, essa endemia acomete milhões de habitantes, principalmente populações pobres que residem em condições precárias. A Doença de Chagas, segundo a OMS, constitui uma das principais causas de morte súbita que pode ocorrer com freqüência na fase mais produtiva do cidadão. Além disso, o chagásico é um indivíduo marginalizado pela sociedade, não lhe sendo dada nem mesmo a possibilidade de emprego, mesmo que adequado a sua condição clínica, que quase sempre não é suficientemente avaliada. Por isso, a Doença de Chagas constitui um grande problema social e sobrecarga para os órgãos de previdência social com um montante de aposentadorias precoces, nem sempre necessária (LANA & TAFURI, 2002). Os Estados de Minas Gerais (Virgem da Lapa), Paraíba e Piauí são áreas endêmicas tradicionais de Doença de Chagas, além da Bacia Amazônica, onde o *T. cruzi* está enzoótico (ANDRADE, 1974).

¹⁸ Professor da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Ao nível molecular, a habilidade para caracterizar raça, linhagens e clones do protozoário da ordem Kinetoplastida é fundamental que se entenda a epidemiologia das respectivas doenças e o *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas não representam exceção. Por mais simples que sejam os marcadores moleculares eles discriminam e definem clones ou linhagens do parasito (STOTHARD *et al.*, 2000).

Nos últimos 10 anos, o conhecimento sobre o DNA dos parasitas Kinetoplastidae avançou na implementação do PCR. Conseqüentemente, surgiu um novo campo de pesquisa, o qual tem sido definido genericamente como ‘Integração da Genética Epidemiológica de Doenças Infecciosas’, ao qual pesquisadores visam como objetivo encontrar subespécies ou subtipos de *Trypanosoma cruzi*, os quais têm despertado atenção considerável (STOTHARD *et al.*, 2000).

A divisão taxonômica do *T. cruzi I*, *T. cruzi II* e *T. cruzi* tinha como objetivo conhecer formalmente esta variação intra-específica. Zimodemas são populações que apresentam o mesmo perfil de isoenzimas. *T. cruzi I* e *T. cruzi II* são equivalentes aos Zimodemas I (Z1) e Zimodema II (Z2) (MILES *et al.*, 1977). Linhagens que exibem semelhanças híbridas de caracteres, ou esperam caracterização mais específica são do Zimodema III (Z3) e estão coletivamente referidos ao *T. cruzi* [sem o sufixo de designação do grupo]. Zimodemas I e III são constituídas por amostras precedentes do ciclo silvestre e Zimodema II representando amostras do ciclo peridomicilar. Devido a este fato, as infecções humanas crônicas por este parasito são ocasionadas pelo Z II (ANDRADE *et al.*, 1983; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; STOTHARD *et al.*, 2000; LANA & TAFURI, 2002).

2 ANÁLISE DA DOENÇA DE CHAGAS NA FASE CRÔNICA USANDO MÉTODOS SOROLÓGICOS E PCR

A fase crônica da Doença de Chagas é caracterizada por níveis muito baixos de parasitemia e altos títulos de anticorpos dirigidos contra antígenos de *T. cruzi*. O diagnóstico laboratorial, nessa fase, é realizado por provas sorológicas ou métodos parasitológicos indiretos onde a população de parasita pode ser amplificada através de Xenodiagnóstico e da Hemocultura. Embora altamente específico, o Xenodiagnóstico tem uma sensibilidade limitada, os parasitas são detectados em somente 20-50% dos indivíduos sabidamente infectados, culminando em muitos resultados falsos negativos (BRITTO *et al.*, 1999).

A Hemocultura não é usada frequentemente por causa de sua baixa positividade. A especificidade das técnicas sorológicas vêm sendo questionada, devido à frequência de infecções com outros tripanosomatídeos que circulam na mesma área geográfica do *T. cruzi* e são responsáveis por reação antigênica cruzada e resultados falso positivo. Essas limitações explicam o interesse em um método direto e sensível como o PCR para o diagnóstico da Doença de Chagas (BRITTO *et al.*, 1999).

O PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de kDNA (DNA-cinetoplástico) de *T.cruzi* presentes em amostras de sangue, soro ou tecidos do paciente infectado. Esta técnica é de alta sensibilidade, pois é capaz de detectar quantidades mínimas de DNA obtido a partir de uma única célula do parasito. O DNA extraído do paciente é submetido ao PCR utilizando “*primers*” complementares à seqüências de interesse no DNAk (BRITTO *et al.*, 1993,1995; LANA & TAFURI, 2002).

Estudos foram realizados usando “*primers*” específicos para *T. cruzi*, visando à detecção do parasito no DNA de amostras de sangue. As sequências específicas de *T. cruzi* do DNA cinetoplástico foram usadas como alvo para o diagnóstico da Doença de Chagas (WINCKER *et al.*, 1994).

Quando o kDNA é usado como alvo para amplificação, a rede cinetoplástica deve ser seccionada de forma a permitir uma distribuição homogênea das moléculas do DNAk em uma amostra de sangue. O uso de cobre nuclear químico e a detecção radioativa dos produtos amplificados, melhorou a sensibilidade do método detectando parasita em 20 ml de sangue. Isso permite um eficiente diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas crônica (WINCKER *et al.*, 1994).

Outro teste é a clivagem química do DNAk com endonucleases de restrição (Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição – RFLP), entretanto, a maior manipulação das amostras aumenta a possibilidade de contaminação cruzada e falso positivo baseado em protocolos de diagnóstico por PCR (WINCKER *et al.*, 1994).

O material obtido da clivagem de kDNA pode ser fundido simplesmente através de lisados de sangue com EDTA e guanidina. Esta descoberta permitiu o desenvolvimento de um protocolo simples, rápido, confiável e mais barato para a utilização de PCR para diagnóstico do *T.cruzi* em estudos clínicos e epidemiológicos (WINCKER *et al.*, 1994).

Usando a técnica do PCR com oligonucleotídeos complementares para blocos altamente conservados na sequência do minicírculo do kDNA de *T.cruzi*, um fragmento de 330 pb contendo regiões variáveis da molécula pode ser amplificada, demonstrando uma sensibilidade alta como descrita na literatura (ÁVILA *et al.*, 1990). Estas técnicas foram testadas de forma comparativa ao Xenodiagnóstico em Minas Gerais, Paraíba, Amazonas e Piauí.

Nos quatro estados, a soro-prevalência está na extensão de 6 a 13,3%. A descoberta de parasitas circulando em alguns indivíduos soropositivos foi interpretada por Xenodiagnóstico e amplificação do DNA cinetoplástico por PCR. Ambas as provas mostraram sensibilidades mais altas em pacientes chagásicos das regiões endêmicas. De fato, em Minas Gerais, Paraíba e Piauí, o Xenodiagnóstico mostrou, respectivamente 24,5%, 13%, 34,2% positivos, e a amplificação por PCR detectou parasita no DNA em 96,5% (Minas), 44,7% (Paraíba) e 59,4% (Piauí) dos indivíduos contaminados (ÁVILA *et al.*, 1990).

No Amazonas, o Xenodiagnóstico e o PCR revelaram positividade de 2,4% e 10% respectivamente, sugerindo um baixo nível de parasitemia naquela região (BRITTO *et al.*, 1999). Os métodos moleculares representam uma vantagem clara sobre as técnicas convencionais, visto que apresentaram um maior potencial para detecção de infecções crônicas que o Xenodiagnóstico em estados endêmicos, fato essencial para demonstrar infecções persistentes em pacientes com Doença de Chagas (BRITTO *et al.*, 2001).

Poucas drogas contra o *T. cruzi* estão atualmente disponíveis, e sua eficiência é questionada devido à falta de um sistema confiável para avaliar cura. A sorologia convencional é particularmente ineficaz nessa situação. Métodos imunológicos, tal como a Lise Mediada por Complemento e ELISA usando antígenos tripomastigotas, embora sendo promissores, não possuem resultados muito satisfatórios para serem incorporados em provas rotineiras (BRITTO *et al.*, 1999).

O método de detecção pelo PCR foi testado em indivíduos assistidos no Hospital Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro. Os resultados demonstraram que somente nove dos 32 pacientes tratados e analisados através da sorologia clássica são reativos ao PCR dentre os analisados usando sorologia clássica. Esse dado sugere que o PCR pode ser extremamente útil para avaliação terapêutica e seguimento da terapia, sendo possível assim monitorar a eficácia das diferentes alternativas terapêuticas para Doença de Chagas e estabelecer critérios confiáveis para o controle da cura (BRITTO *et al.*, 1999).

A metodologia da detecção por PCR de genes específicos e seqüências melhorou com o desenvolvimento da tecnologia do *Taq Man*, uma abordagem automatizada e quantitativa, baseada no uso de sondas fluorogênicas e uma medição em tempo real da reação de amplificação (*Real Time PCR*). Nesse sentido, nossas perspectivas são para desenvolver sondas fluorogênicas *Taq Man* específicas para *T.cruzi*, a fim de serem usadas na descoberta de regiões constantes e variáveis da seqüência do kDNA, de forma a medir a quantidade dos parasitos em pacientes chagásicos crônicos antes e após o tratamento, um dado necessário para o estabelecimento de um critério confiável de cura de pacientes sujeitos a terapia (BRITTO *et al.*, 1999).

Outras contribuições da tecnologia do PCR estão relacionadas com estudos paleoparasitológicos permitindo a identificação de DNA de material arqueológico. Recentemente foram recuperados DNA *T. cruzi* em tecidos de múmias chilenas datadas de 2,000 a 1,400 anos a.C., do deserto do Atacama, no qual a cidade de San Pedro de Atacama é considerada uma área endêmica para Doença de Chagas. Em seis tecidos mumificados foi amplificada a região conservada da molécula do DNAA, gerando um fragmento de 120 pb, foram achados em quatro dos 6 corpos mumificados. Promover experiências de hibridização com sondas moleculares específicas *T. cruzi*, provou que os produtos amplificados correspondiam a fragmentos genéticos do parasita (BRITTO *et al.*, 1999).

3 RIBOPRINTING

O processo do perfil de geração PCR-RFLP do RNAr 18S é também conhecido com *riboprinting*. O *riboprinting* permite a detecção da variação das seqüências genéticas específicas dentro de espécies, organismos não identificados e a rápida geração de dados usados em análises filogenéticas (CLARK *et al.*, 1999; CLARK, 1992).

Análises da seqüência de variação do gene do RNAr 18S tem sido usada para a análise filogenética entre os *tripanosomatídeos*. O uso dessa região para inferência filogenética, entretanto, não tem sido debatido. Em *T. cruzi*, existem aproximadamente 110 cópias do 18S por núcleo, a sua organização é altamente específica quando comparado com outro protozoário. Em uma menor escala da seqüência de DNA, variações dentro do 18S podem ser obtidas por muitas enzimas de restrição, especialmente aquelas que reconhecem 4 pares de bases; por exemplo, *Alu I*, tem várias seqüências de corte dentro do 18S.

Freqüentemente é utilizada uma bateria de enzimas de restrição. O 18S pode ser facilmente classificado e rapidamente analisado quanto a variações nucleotídicas dentro da seqüência de DNA escolhida. Além disso, através do PCR, os produtos de amplificação podem ser diretamente digeridos e separados por eletroforese para produzir padrões semelhantes ao *fingerprinting* de DNA. O *riboprinting* é menos sensível que o sequenciamento do DNA, isso é uma desvantagem para analisar a variação dentro do 18S. O 18S pode ser amplificado para produzir um fragmento. A seleção de enzimas de restrição pode, então, detectar variações dentro do *T. cruzi* que diferencia ZI de ZII/ZIII (STOTHARD *et al.*, 2000).

4 SSCP, GGE e DGGE

Uma variedade de avanços nos métodos eletroforéticos pode ser usada para analisar o DNA amplificado por PCR. Esses métodos para detecção de mutação são também coletivamente conhecidos como análise mutacional e incluem entre outros, análise de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP) e Eletroforese em Gel de Gradiente (GGE). Esses métodos são utilizados para separar fragmentos de DNA identificando tamanhos e seqüências diferentes que podem co-migrar durante a separação eletroforética convencional. Esses métodos, enquanto largamente aplicados na pesquisa biomédica, estão sendo adotados para identificar a linhagem do parasita (STOTHARD *et al.*, 2000).

O DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) é utilizado para separar fragmentos de DNA de tamanho idêntico, porém de seqüências diferentes, através da utilização de um gradiente químico, como, por exemplo, uréia e formamida. Esse gradiente é feito de gel de poliácridamida e o gradiente permanece estável durante sucessivas eletroforeses. O DGGE foi usado para analisar a porção do 18S amplificado de uma pequena seleção de linhagens do *T. cruzi* (STOTHARD *et al.*, 2000).

USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR ON DETECTION OF *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi* belongs to the order Kinetoplastida, suborder *Trypanosomatina* and family *Trypanosomatidae*. It's the ethiologic agent of Chagas' Disease. The aim of this study is show the utility of molecular biology to find associations between the genetical aspects of

T. cruzi and biomedical properties, using the Kinetoplast DNA (kDNA). Recent studies have been realized to find alternative therapies and new diagnostics tests to Chagas' Disease, mainly using the genetic traits of microorganism.

Key Words: *T. cruzi*. Chagas' Disease. Kinetoplast DNA. Genetic trait.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano. **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 3, p. 65-121. 1974.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 30, p. 27-35. 1997.

ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S.G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol. 76, p. 796-799. 1983.

AVILA, I. I. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from south and central américa by analysis of PCR – amplified minicircle variable region sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Vol. 42, p.175 – 188. 1990.

BRITTO, C. et al. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma Cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in Polymerase Chain Reaction (PCR) – based diagnosis of chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 88, p. 171-172.1993.

BRITTO, C et al. Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. **Parasitology**. Vol. 110, p. 241-247.1995.

_____. et al. Polymerase Chain Reaction detection: New Insights into the diagnosis of Chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 94, p. 305-306.1999.

_____. et al. O. Parasite persistence in treated chagasic patients Revealed by xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, 2001. p. 1-4.

CLARK, C. G. Riboprinting: a molecular approach to the taxonomy of protozoa. In: Lee, J.J. & Soldo, A.T. (Eds.): **Protocols in protozoology**. Allen Press. 1992 .

CLARK, C.G.; MARTIN, D.S.; DIAMOND, L.S. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. Vol. 42, p. 92-96. 1999.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. In: Neves, D. P.; Melo, A. L.; Genaro, A. & Linardi, P. M (Eds.): **Parasitologia Humana**; Ed. Atheneu. 2002.

MILES, M. A. et al. The identification by isozyme patterns of two distinct strain – groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** Vol. 71, p. 217-225. 1977.

STOTHARD, J. R et al. Analysis of Genetic Diversity of *Trypanosoma cruzi*: an application of Ribotyping and Gradient Gel Electrophoresis Methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Vol. 95, p. 545-551.2000.

WINCKER, P. et al. Use of a simplified Polymerase Chain Reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* v. 51, 1994. p. 771-777.