

---

# Reação de Amplificação de Ácidos Nucléicos em *Cryptosporidium* sp: inibição, prevenção e controle

Therezinha Travassos Ribeiro de CARVALHO

Instituto Adolfo Lutz - Serviço de Parasitologia - Seção de Enteroparasitoses

O protozoário parasita *Cryptosporidium* sp tem sido reconhecido como um importante patógeno emergente. Na década de 1980, com a epidemia da Aids, a criptosporidiose emergiu como doença sem cura nessa população, e em 1993 alcançou conhecimento público com o surto de veiculação hídrica em Milwaukee, EUA, acometendo aproximadamente 403.000 pessoas, com 100 óbitos, sendo 69 indivíduos com Aids.

O fator limitante das técnicas convencionais de diagnóstico de parasitas, a microscopia, que ainda é o padrão ouro, e os testes imunológicos, é que nenhuma é específica para *Cryptosporidium hominis* ou *C. parvum* e requerem grande quantidade de oocistos para sua detecção. Além dessas duas espécies, outras seis espécies de *Cryptosporidium* já foram identificadas como causadoras de infecção humana, tanto em indivíduos imunodeprimidos quanto em imunocompetentes. Uma vez que as espécies de *Cryptosporidium* são muito pequenas, medindo de 4,5 a 6,0 µm de diâmetro, e morfológicamente semelhantes, difíceis de corar e de serem detectadas, não é possível a identificação específica pela microscopia óptica. Cada espécie possui ciclo de transmissão e hospedeiros diferentes, tornando necessário lançarmos mão do uso de uma ferramenta mais potente visando conhecer a epidemiologia de cada uma.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) descrita por Saiki e cols. (1985) e Mullis e Fallona (1986) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de uma região específica do ácido desoxirribonucléico (DNA) que fica compreendida entre duas regiões de uma sequência conhecida do DNA. É uma técnica potencialmente sensível, possibilitando detectar até uma única molécula de ácido nucléico, pois o método amplifica milhares de vezes o trecho do DNA alvo, com o uso de uma enzima termoestável<sup>4</sup>. A PCR e a tecnologia relacionada tornaram-se uma ferramenta muito rápida e confiável para o diagnóstico de grande variedade de doenças infecciosas. Tem sido utilizada para detecção de microorganismos em culturas microbiológicas, em tecidos e diretamente de amostras clínicas e ambientais e em alimentos.

Um dos problemas centrais encarados pelos microbiologistas que usam PCR é determinar o método mais eficiente - rápido e sensível - para isolar pequenas quantidades de DNA a partir de um número limitado de células.

As principais vantagens do uso dos métodos de amplificação de ácidos nucléicos para muitos microorganismos são a alta especificidade e sensibilidade das reações. Porém, para os coccídios, há que se atentar para a fidelidade dos resultados, uma vez que os problemas reportados são os resultados falso-positivos, devido à reação cruzada ou os resultados falso-negativos, devido à inibição da reação, por diversas fontes de contaminação.

A maneira de controlar os resultados falso-positivos é incluir em cada ensaio, reações-controle com amostras negativas, amostras positivas e amostras brancas (utilizando apenas os reagentes da PCR). O uso desses controles assegura a fidelidade dos resultados. A inibição pode ser consequência do controle inadequado das condições da reação, da própria amostra, de contaminantes nos reagentes ou nos frascos ou de eventual contaminação durante o preparo da reação.

Já existem várias metodologias para extração de DNA de microorganismos, com pequenas modificações de uma para outra, visando resolver problemas específicos para cada espécie em estudo.

Novos métodos de detecção de *Cryptosporidium* sp têm sido desenvolvidos com finalidade diagnóstica, para uso em estudos epidemiológicos ou experimentais, e para monitoramento da água e avaliação da viabilidade dos oocistos. Os oocistos persistem no ambiente podendo permanecer viáveis na água por mais de três meses e são resistentes aos processos usuais de tratamento da água para consumo humano.

Os parasitos protozoários, em particular os coccídios, apresentam como desafio fornecer, consistentemente, amostras de DNA limpas e confiáveis. Isto está diretamente relacionado à natureza do organismo, sua resistência ao rompimento e lise e a matriz onde o parasito está presente. Um procedimento eficiente para extração de DNA dos espécimes fecais deve liberar o DNA do parasito dos esporos, dos oocistos ou dos cistos; prevenir a adsorção do DNA aos constituintes fecais e remover os inibidores da PCR. Outro fator que dificulta todos os procedimentos de extração do DNA é a não uniformidade dos espécimes fecais, que podem variar grandemente em sua composição dependendo da dieta, das condições de saúde e da flora intestinal do paciente.

---

Numerosas pesquisas demonstram que as amostras orgânicas, como fezes, água e solo podem ter a sensibilidade da PCR muito reduzida devido à presença dessas substâncias inibidoras. Abordagens básicas que têm sido usadas para eliminar esses inibidores incluem a remoção e purificação dos oocistos de *Cryptosporidium* sp antes da extração do DNA, empregando-se métodos de concentração e de purificação através do uso de gradientes de densidade de sacarose ou de Percoll, da tecnologia de pérolas imunomagnéticas e a remoção dos inibidores durante a extração direta do DNA, como por exemplo, *spin columns*. No exterior, a maioria dos pesquisadores faz uso de vários kits para concentração, extração e purificação do DNA de *Cryptosporidium* sp, o que não é viável para os laboratórios brasileiros.

Vários autores citam problemas no isolamento e purificação de DNA de *Cryptosporidium* sp, tanto em amostras fecais como em amostras ambientais (água bruta, água tratada, lodo de esgoto, solo) e amostras de alimentos (verduras e frutas).

Os protocolos de extração utilizam a quebra física, mecânica ou enzimática da parede – dupla e muito resistente - do oocisto de *Cryptosporidium* sp. Em amostras fecais ou ambientais, o isolamento de DNA requer mecanismos que possam eliminar os problemas gerados durante a extração. O DNA alvo deve ser puro suficiente para não interferir nos tratamentos enzimáticos ou causar problemas durante a eletroforese.

A extração de DNA de células eucariontes consta fundamentalmente de três etapas: ruptura das células para liberação dos núcleos; desmembramento dos cromossomos em seus componentes básicos, DNA e proteínas e separação do DNA dos demais componentes.

As membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA. Essa etapa é realizada pela ação de um detergente como o SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Para oocistos de *Cryptosporidium* sp a solução de lise contendo TrisHCl, EDTA, SDS, β-mercaptoetanol e proteinase K, incubada a 65°C por três horas tem sido utilizada para amostras clínicas e ambientais, com bons resultados<sup>1,2,3</sup>.

O SDS é um tenso ativo utilizado para permeabilizar a membrana celular, dissolvendo os lipídeos (moléculas de gordura) e proteínas da célula, além de quebrar as ligações que mantêm a membrana celular intacta. A proteinase K é eficiente em remover proteínas adicionais do DNA durante a extração.

Deve-se evitar a ação de DNAses, que podem degradar o DNA. Por isso, os tampões de extração devem ter o pH por volta de 8,0. A adição de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) ao tampão de extração inibe a ação de DNAses.

Para proteger o DNA da ação dos compostos fenólicos que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando-o inacessível às enzimas de restrição, deve ser adicionado agentes anti-oxidantes, como o PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou β-mercaptoetanol ao tampão de extração. A adição desses facilitadores tem sido reportada como aumento na especificidade da PCR permitindo a amplificação de seqüências de DNA ricas em G-C, como é o caso de *Cryptosporidium* sp.

Os ácidos nucleicos precisam ser separados das proteínas e para isso acontecer realiza-se a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), que desnaturam as proteínas. Este é o protocolo padrão para diferentes tipos de espécimes biológicos incluindo tecidos animais e vegetais, material forense e arqueológico e fluidos do corpo.

O fenol é usado para desnaturar e remover proteínas e outros contaminantes da solução aquosa que contém os ácidos nucleicos. O clorofórmio ajuda a desnaturar proteínas e a remover o fenol residual. O álcool isoamílico é geralmente adicionado ao clorofórmio para reduzir espuma.

O álcool isopropanol gelado faz com que as moléculas de DNA se aglutinem (precipitem) formando uma massa filamentososa e esbranquiçada. Após uma lavagem com álcool etanol gelado, o DNA precisa ser seco para evaporar completamente o álcool e depois ser eluído com 50 ul de tampão TEII (Tris-EDTA) e armazenado a 4°C até o momento de ser utilizado na amplificação pela reação em cadeia da polimerase.

A extração de DNA baseada na utilização de fenol, apesar de bastante eficiente pode, no entanto, comprometer a qualidade do DNA caso resíduos de fenol permaneçam na amostra. O fenol pode inibir a ação da enzima Taq DNA polimerase impedindo o processo de amplificação do DNA.

Os espécimes fecais estão entre os mais complexos espécimes para detecção por PCR direto devido à presença de inibidores de PCR que freqüentemente são co-extraídos com o DNA do microorganismo alvo. Os inibidores potenciais encontrados nas fezes incluem sais biliares, complexos de carboidratos e complexos de polissacarídeos, possivelmente de origem vegetal.

A falta de uniformidade das amostras fecais em termos de matéria física, organismos alvos, e flora fecal associadas torna a extração de DNA de espécimes fecais altamente variável. Resultados de PCR falso-negativos podem ser devido à presença de pequeno número de organismos alvo no volume de amostra fecal examinada e da decrescente estabilidade das células estocadas.

Os fatores que inibem a amplificação dos ácidos nucleicos pela PCR estão presentes nos DNA alvos em diferentes tipos de amostras. Os inibidores geralmente atu-

am em um ou mais dos três pontos cruciais da reação. As substâncias inibidoras interferem na lise da célula, necessária para extração do DNA; interferem na degradação ou captura do ácido nucléico e inibem a atividade da polimerase para a amplificação do DNA alvo. Esses efeitos adversos têm implicações importantes nas investigações clínicas e de Saúde Pública, principalmente se as investigações envolvem triagem de alimentos ou de amostras ambientais. Inibidores comuns incluem vários componentes dos fluidos do corpo (hemoglobina, uréia, heparina), constituintes de alimentos (compostos orgânicos e fenólicos, glicogênio, gorduras) e compostos ambientais (compostos fenólicos, ácido húmico, metais pesados). Outros inibidores mais amplamente disseminados incluem constituintes de células bacterianas, DNA de outros organismos presentes na amostra, itens de laboratório como talco da luva, utensílios plásticos, celulose e pólen. É recomendável o uso de luvas sem talco ou a lavagem das luvas com talco antes de iniciar os procedimentos.

Contaminação e outros fatores intimamente ligados à reação, até mesmo componentes inertes podem causar inibição, ainda que seus mecanismos de ação não sejam compreendidos. A contaminação pode ser endógena (amostra, enzima, tubos) ou exógena (bactéria, poeira, pólen) aos componentes da reação.

A origem mais óbvia de contaminação endógena são os compostos presentes na amostra de DNA não purificado devidamente. Outros fatores incluem a qualidade da enzima e dos microtubos utilizados.

Um procedimento para diminuir o efeito dos inibidores da PCR, é diluir a amostra, potencialmente, sem mascarar o DNA pela diluição das substâncias inibidoras. Porém, ao mesmo tempo, a sensibilidade do teste pode ser comprometida por causa dos efeitos da diluição do DNA.

Um aspecto elementar na amplificação do DNA é a falha da exposição dos ácidos nucléicos como alvo de amplificação que resulta na falha da reação. A perda da integridade da parede celular às vezes não é suficiente para liberar o DNA e a degradação enzimática dos detritos celulares geralmente é necessária.

Para a amplificação do ácido nucléico usa-se uma mistura de PCR, a *master mix*, que já é comercializada pronta ou pode ser preparada pelo pesquisador.

A concentração ótima da dNTP - deoxinucleosídeo trifosfato – depende da concentração do  $MgCl_2$ , da estringência da reação, da concentração do *primer*, do comprimento do produto a ser amplificado e do número de ciclos da PCR.

Condições de reação subótimas devem-se principalmente a seleção imprópria dos iniciadores (*primers*), tempo e temperaturas impróprias, variação da qualidade da polimerase e concentração incorreta de  $MgCl_2$ . Esses

fatores podem ser otimizados fazendo-se vários perfis de temperatura baseados no cálculo do *melting point* dos iniciadores e de diluições seriadas de  $MgCl_2$ . Os íons  $Mg^{2+}$  são um co-fator vital para a *Taq*-polimerase e sua concentração afeta a especificidade da amplificação.

Autores sugerem que a adição de DMSO (dimetil sulfoxido) à mistura de PCR melhora o resultado porque elimina amplificação inespecífica ou porque o DMSO poderia aumentar a eficiência de anelamento dos iniciadores pela desestabilização das estruturas secundárias dentro do *template* (DNA molde).

Compostos húmicos são os inibidores mais comumente relatados em amostras ambientais. A adição de polivinilpirrolidona (PVP) ou polivinilpolipirrolidona (PVPP) supera a inibição e permite a separação dos compostos húmicos do DNA durante a eletroforese em gel de agarose. Alguns autores identificaram que a causa da inibição dos compostos húmicos é a sua interferência com as enzimas líticas, se ligando com o DNA e as proteínas e interferindo com a ligação entre o DNA alvo e a polimerase. Os compostos fenólicos das amostras ou carregados pelos procedimentos de purificação orgânica do DNA podem inibir a reação pela ligação ou desnaturação da polimerase. Proteinases e desnaturantes usados para a lise celular podem ser carregados e inativar a polimerase se a purificação do DNA for inadequada.

Resumidamente, as seguintes precauções devem ser tomadas a fim de otimizar as reações de PCR: utilizar material descartável livre de DNA e/ou RNA; utilizar reagentes previamente distribuídos em alíquotas e em lotes submetidos a um controle de qualidade; utilizar pipetas automáticas; analisar os produtos da amplificação em uma área fisicamente separada da área onde reagentes e amostras são preparadas; determinar empiricamente a concentração de  $MgCl_2$  ótima para cada reação, pois com pouca quantidade a *Taq* DNA-polimerase é inativa e o excesso de  $Mg^{2+}$  livre causa redução da fidelidade enzimática e aumento de produtos não específicos; é recomendado 1,25 U da *Taq* DNA-polimerase em 50 ul de reação (A adição de mais enzima não altera o produto da PCR. Rastros de DNA em gel (*smearing*) de agarose significam um tempo de extensão muito longo e excesso de enzima); os *primers* (iniciadores) devem ter o tamanho de 15 - 30 nucleotídeos e conter aproximadamente de 40 - 60% de G+C; determinar corretamente a temperatura e o tempo de anelamento dos primers; usar reagentes protetores da molécula de DNA como PVP e  $\beta$ -mercaptoetanol.

Observando-se esses preceitos, desenvolveu-se uma metodologia *in house* para extração de DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium* sp, presente em amostras clínicas e ambientais, eficiente, reprodutível, com preços acessíveis e compatível com a realidade brasileira<sup>1,2,3</sup>.

---

## REFERÊNCIAS

1. Almeida TTC de. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. São Paulo; 2004.[Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
2. Araújo, RS., Carvalho-Almeida TT., Matté GR., Rojas MVR., Pereira, A., Matté, MH. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água salobra. **BIAL** 2005; 15(2):
3. Carvalho-Almeida, TT., Casimiro, AM., Matté, GR., Matté MH. An improved method for extracting *Cryptosporidium* sp. DNA from preserved faeces and potential application for Cryptosporidiosis surveillance. **REVISA** 2005; 1(3): 208-14.
4. Newton CR., Graham A. **PCR**. 1997. 2<sup>nd</sup> ed. BIOS Scientific Publishers Limited, UK.