

FÁBIO LOPES DE MELO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM PCR PARA  
A DETECÇÃO DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

RECIFE-BRASIL

2006

FÁBIO LOPES DE MELO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM PARA A  
DETECÇÃO DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Saúde Pública, area de Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos de Doenças Infecciosas e Parasitarias.

Orientador: Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath

RECIFE-BRASIL

2006

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM PCR PARA  
A DETECÇÃO DE *Schistosoma mansoni*.

FABIO LOPES DE MELO

Banca Examinadora Composta dos seguintes membros:

---

Dr. JOSE VALFRIDO DE SANTANA (Titular)

**UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

---

Dr. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JUNIOR (Titular)

**UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

---

Dra. ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA (Suplente)

**UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

---

Dra. NILMA CINTRA LEAL (Titular)

**CPqAM – CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHAES**

---

Dra. CONSTANÇA SIMÕES BARBOSA (Titular)

**CPqAM – CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHAES**

---

Dra. ALZIRA MARIA PAIVA DE ALMEIDA (Suplente)

**CPqAM – CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHAES**

## **Sonho Impossível**

Sonhar,  
Mais um sonho impossível...  
Lutar  
Quando é fácil ceder,  
Vencer  
O inimigo invencível.  
Negar  
Quando a regra é vender...  
Voar  
No limite improvável.  
Tocar o inacessível chão...

É minha lei, é minha questão,  
Virar este mundo, cravar este chão.

Não me importa saber  
Se é terrível demais,  
Quantas guerras terei que vencer  
Por um pouco de paz...

E amanhã,  
Se esse chão que eu beijei  
For meu leito e perdão  
Vou saber  
Que valeu delirar  
E morrer de paixão...

E assim seja lá como for,  
Vai ter fim a infinita aflição  
E o mundo vai ver uma flor  
Brotar  
Do impossível chão.

de Chico Buarque e Rui Guerra

**Dedico esta tese a minha Família, em especial, a minha mãe que sempre acreditou em mim, e a meu filho Luis Victor que me dar força para seguir em frente.**

## AGRADECIMENTOS:

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por nos mostrar que só realizamos aquilo que ele deseja.

Ao meu orientador e amigo Frederico Abath, pela confiança e paciência e pela oportunidade que tanto contribuíram para meu aprendizado.

Ao grande professor e orientador Roberto Werkhauser, pela sua importante contribuição, competência, amizade e sabedoria, que foram essências no desenvolvimento desta tese.

Ao meu amigo Marcos, pela consideração na época em que mais precisei.

A Dra Silvia Montenegro, pelo o apoio com palavras sábias em todo o decorrer desta tese.

A Dra Yara Gomes, pelo apoio dedicado e a amizade que foram de enorme importância.

A Dra Nelma Leal, pela atenção e apoio no momento crucial deste trabalho

Um Agradecimento todo especial ao meu amigo Roni e a Raquel, pelo apoio a mim conferido.

A valiosa atenção, apoio e colaboração da mestrande Ana Lisa, essencial em vários momentos.

Aos meus amigos: Cláudia Lopes, Eduardo Henrique, José Guerra, Andréia, Fabiana, Rosana, Joelma, Germano, Clarice, Neide, Kirte, Mineo, Lula, Fábria, Virginia, Maria José Dias, Lílian, Valéria, Alinne, Milena 1 e 2.

Aos meus companheiros da Escola Nossa Senhora da conceição.

Ao pessoal da secretaria acadêmica, Nilda, Fabiana, Dete, Nalva.

A todos em enfim, que direta ou indiretamente contribuíram no meu trabalho, o meu agradecimento sincero.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> .....  | 53 |
| Figura 2: Desenho mostrando a parte mole de molusco do gênero <i>Biomphalaria</i> , vista do lado esquerdo, com o manto parcialmente levantado .....   | 71 |
| Figura 3: Iniciadores internos imobilizados na superfície interna da tampa do microtubo.....   | 72 |
| Figura 4: Protótipo eletromecânico ('rotator') construído artesanalmente com a finalidade facilitar e padronizar a eluição dos primers fixados na interface interna do tubo de reação.....                 | 73 |
| Figura 5: Alinhamento múltiplo usando Clustal W de vários segmentos do gene que codifica o rRNA 18S de várias espécies.....  | 79 |
| Figura 6: Eletroforese em gel de agarose mostrando a otimização da proporção de primers na nested PCR em único tubo.....   | 80 |
| Figura 7: Eletroforese em gel de agarose mostrando mostrando as especificidades por PCR.....   | 81 |
| Figura 8: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite das PCRs simples utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de <i>S. mansoni</i> com iniciadores externos.....                          | 82 |
| Figura 9: Eletroforese em gel de agarose utilizando quantidades diferentes de DNA genômico de <i>S.mansoni</i> , mostrando o limite de detecção da NPCR.....   | 83 |
| Figura 10: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da HNPCR.....   | 84 |
| Figura 11: Mapa de Jabotão dos Guararapes mostrando a localização correspondente à taxa de infecção natural dos moluscos vetores e a prevalência humana por quarteirão.....                                | 85 |
| Figura 12: Eletroforese em gel de agarose mostrando resultados da NPCR (iniciadores externos Schfo11e Unvre 16; iniciadores internos Schfo17 e Schre19) usando DNA purificado de pool de 50 caramujos..... | 86 |
| Figura 13: Eletroforese em de agarose mostrando resultados da PCR simples (iniciadores internos Schfo17 e Schre19) usando DNA purificado de pool de 50 caramujos.....                                      | 87 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Características de várias DNAs polimerases termoestáveis com atividade exonuclease 3'→5', utilizadas em PCR..... | 52 |
| Tabela 2: Características dos iniciadores desenvolvidos para detecção de S.mansoni utilizados nos sistemas de PCR.....     | 70 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ds DNA – DNA de dupla fita

mRNA – RNA mensageiro

BstI pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Bacillus stearothermophilus*

CAA, CCA – glicoproteínas do intestino do *Schistosoma mansoni*

cDNA – DNA complementar (fita de DNA complementar a um mRNA)

SDA – Amplificação por deslocamento da fita

dATP- desoadenosina 5'-trifosfato; dATP é requerido para síntese de ácidos nucleicos, como também são, analogamente, dCTP, dGTP, dTTP e dUTP

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Elisa – “Enzyme linked immunosorbent assay”

FRET – “Fluorescence Resonance Energy Transfer

HBV - Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

Kb – Kilobases, unidade correspondente a mil pares de bases

LCR – Reação em cadeia da ligase

Nasba – Amplificação baseada na sequencia do acido nucleico

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

cRNA – RNA complementar

Pfu pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Pyrococcus furiosus*.

Pwo pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Pyrococcus woesei*

QC- Competição quantitativa

qPCR - PCR quantitativa

rDNA – DNA codificador do RNA ribossomal.

RNase – Enzima que degrada especificamente o RNA

rRNA – RNA ribossomal

RT PCR – PCR com passo inicial de transcrição reversa

SSU - Subunidade pequena do RNA ribossômico

Taq – *Thermus aquaticus*, bactéria termófila da qual se obtém uma das DNAs polimerases termoestáveis utilizadas em PCR.

TAS – Sistema de amplificação baseado em transcrição

Tfi pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Thermus filiformis*

Tfl pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Thermus flavus*

Tm – Temperatura média de desnaturação de fitas de DNA

TMA – Amplificação mediada por transcrição

Tma pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Thermotoga maritima*

Tris – Hidroximetil amino metano

Vent pol – Enzima termoestável obtida da bactéria *Thermococcus litoralis*

WHO – World Health Organization

## RESUMO

Os “primers” que apresentam como alvo o gene que codifica o rDNA de SSU foram projetados para amplificar com elevada especificidade DNA de *Schistosoma mansoni*. Cinco sistemas de PCR foram desenvolvidos: PCR convencional, nested-PCR (NPCR) convencional, single tube nested PCR (STNPCR), hemi-nested PCR (HNPCR) convencional, e single tube hemi-nested PCR (STHNPCR). A nested-PCR é o modelo mais sensível de PCR. Entretanto, o risco da contaminação é muito alto, já que é necessário ajustar a reação em dois tubos diferentes. O objeto principal deste trabalho é o desenvolvimento de um sistema de STNPCR (patente depositada), visando diminuir o risco de contaminação cruzada, embora mantendo a sensibilidade elevada. O sistema de STNPCR compreendeu 60 ciclos em que concentrações limitadas de “primers” externos participam da PCR sem competir com os “primers” internos durante os primeiros 15 ciclos da reação, e os “primers” internos (imobilizados na face interna da tampa do microtubo) fossem introduzidos no sistema de PCR no décimo sexto ciclo por inversão do microtubo. As concentrações dos outros componentes da reação seriam as mesmas usadas em reações padrão de PCR. A avaliação do limite de detecção das PCRs foi realizada utilizando-se quantidades conhecidas de DNA genômico de *S. mansoni*, que variou de 10 ng a 0,001 fg. O limiar de detecção da PCR simples foi de 10 pg enquanto, a quantidade mínima detectada pelas PCRs nested convencional e STNPCR foram de 0,1 fg e 1 fg de DNA, respectivamente. Por sua vez o limite de detecção da HNPCR convencional também foi de 0,1 fg, e o da STHNPCR foi de 10 fg. Os sistemas desenvolvidos foram testados em pools de caramujos sadios e infectados com *S. mansoni*, apresentando resultados bastante satisfatórios em relação à especificidade e sensibilidade. A detecção rápida e precisa da infecção do caramujo pelo *S.*

*mansoni* é de grande importância para o controle da transmissão da esquistossomose, Diante das dificuldades para se realizar esse diagnóstico pelos métodos convencionais. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a utilidade das abordagens moleculares para identificar focos de transmissão da esquistossomose por meio da detecção do *S. mansoni* em pools de caramujos vetores.

**ABSTRACT**

Primers targeting the gene encoding the SSU rDNA were designed to amplify with high specificity DNA from *S. mansoni*. Five PCR systems were developed: conventional PCR, two-step nested-PCR (NPCR), single tube nested PCR (STNPCR), two-step hemi-nested PCR (HNPCR), and single tube hemi-nested PCR (STHNPCR). Two-step nested PCR is the most sensitive modality of PCR. However, the risk of contamination is very high, as it is necessary to set up the reaction in two different reaction tubes. One of the major objectives of the present thesis was the development of a novel STNPCR (patent pending), in order to decrease the risk of cross-contamination, although maintaining high sensitivity. The STNPCR system comprised 60 cycles in which limiting concentrations of external primers participated of the PCR without competition of internal primers during the first 15 cycles of the reaction, and internal primers (immobilized onto the internal face of the microtube cap) were introduced into the PCR system at cycle 16 by inverting the microtube. The concentrations of the other components of the reaction were the same used in standard PCR reactions. Another objective was to preliminarily evaluate the suitability of the molecular approaches to identify transmission foci of schistosomiasis by means of the identification of *S. mansoni* infection in pools of snails. The detection limits of PCR, NPCR and STNPCR were 10 pg, 0,1 fg and 1 fg of *S. mansoni* DNA, respectively. The molecular approaches had been tested in pools of healthy snails and infected ones with *S. mansoni*, presenting sufficiently satisfactory results in relation to the specificity and sensitivity. The detection of the infection in the snail for the *S. mansoni* has a great importance for the control of the transmission of schistosoma, chronic and endemic illness in Brazil. Finally, the systems described here are sensible, specific, and can be useful to identify potential small sites of

transmission of schistossoma. Although the approaches were validated by detecting DNA from *Schistosoma mansoni*. The novel STNPCR described here may also be useful to detect with high sensitivity and specificity other target DNA for which nested primers are available.

**SUMÁRIO**

|   |    |
|---|----|
| DEDICATÓRIA .....   | 4  |
| AGRADECIMENTOS.....   | 5  |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....   | 7  |
| LISTA DE TABELAS .....  | 8  |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....   | 9  |
| RESUMO.....   | 11 |
| ABSTRACT .....  | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 17 |
| 1.1 Diagnóstico através de detecção de DNA: comentários gerais.....                   | 18 |
| 1.2 Amplificação de DNA através da PCR.....   | 20 |
| 1.2.1 Teoria e desenvolvimento.....   | 20 |
| 1.2.2 PCR convencional.....   | 22 |
| 1.2.3 PCR multiplex.....  | 23 |
| 1.2.4 PCR quantitativa.....   | 24 |
| 1.2.5 Nested PCR.....   | 25 |
| 1.2.6 Nested PCR em único tubo (SNTPCR).....  | 26 |
| 1.2.7 PCR em tempo real.....  | 27 |
| 1.3 Aplicações ao diagnóstico.....  | 29 |
| 1.4 Limitações e problemas comuns no uso da PCR.....                                  | 32 |
| 1.5 Aspectos teóricos quantitativos da PCR.....                                       | 37 |
| 1.6 Propriedades da taq polimerase e de outras enzimas termoestáveis.....             | 39 |
| 1.7 Outras técnicas de amplificação de ácido nucléico.....                            | 41 |
| 1.7.1 Sistema de amplificação baseado em transcrição (TAS).....                       | 41 |
| 1.7.2 Reação em cadeia da ligase (LCR).....   | 42 |
| 1.7.3 Amplificação por deslocamento da fita (SDA).....                                | 43 |
| 1.8 Detecção de schistosoma mansoni através de PCR.....                               | 44 |
| 1.8.1 Comentários preliminares.....   | 44 |
| 1.8.2 Esquistossomose.....  | 44 |
| 1.8.3 Diagnóstico da esquistossomose e identificação de focos de<br>transmissão ..... | 46 |
| 1.8.4 Ciclo de transmissão do parasito.....   | 49 |
| 2 JUSTIFICATIVA.....  | 54 |



---

|  |     |
|--|-----|
| 3 OBJETIVOS.....   | 57  |
| 3.1 Geral.....   | 58  |
| 3.2 Específico.....  | 58  |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 59  |
| 4.1 Desenho dos iniciadores dos sistemas baseados PCR.....   | 60  |
| 4.2 Purificação das amostras.....  | 61  |
| 4.3 Extração de DNA de lotes de 50 caramujos.....  | 62  |
| 4.4 Análise e quantificação do DNA total.....  | 63  |
| 4.5 Desenvolvimento e otimização de sistemas de detecção baseados em PCR   | 63  |
| 4.5.1 Composição de iniciadores das abordagens de PCR desenvolvidas.....   | 63  |
| 4.5.2 PCR simples.....   | 64  |
| 4.5.3 Nested PCR clássica (NPCR).....  | 65  |
| 4.5.4 Tentativas iniciais para o seqüestro dos iniciadores internos da<br>primeira etapa de amplificação.....                                      | 65  |
| 4.5.5 Desenvolvimento da nested PCR em único tubo (“single tube nested<br>PCR - SNTPCR”) .....   | 66  |
| 4.5.6 Avaliação da especificidade e limite de detecção .....   | 68  |
| 4.6 Análise e registro dos resultados.....   | 69  |
| 5 RESULTADOS.....  | 74  |
| 5.1 Avaliação teórica da especificidade.....   | 75  |
| 5.2 Avaliação da proporção de iniciadores externos e internos.....   | 75  |
| 5.3. Avaliação experimental da especificidade dos sistemas baseados em PCR .   | 76  |
| 5.4 Desenvolvimento de um novo sistema baseado em nested PCR em único<br>tubo.....   | 76  |
| 5.5 Sistemas de PCR desenvolvidos: limite de detecção.....   | 77  |
| 5.6 Experimentos preliminares para aplicação ao diagnóstico de infecção em<br>lotes de caramujos infectados experimentalmente ou naturalmente..... | 77  |
| 6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....  | 88  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 99  |
| APÊNDICES.....   | 113 |
| APÊNDICE A - Manuscrito em preparação .....  | 114 |
| APÊNDICE B - Pedido de patente .....   | 130 |
| ANEXOS.....  |     |

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Diagnóstico através de detecção de DNA: comentários gerais

A engenharia genética, que permite a manipulação do material genético dos organismos, surgiu em 1972, quando cientistas da universidade de Stanford, nos Estados Unidos conseguiram combinar DNA (ácido desoxirribonucléico) de *Escherichia coli* ao do *Simiam papiloma vírus* (JACKSON et al., 1972). Em 1975, Nathans e Smith purificaram enzimas de restrição, ferramentas essenciais para a manipulação in vitro do DNA, incluindo o isolamento e propagação de fragmentos específicos de DNA para clonagem in vivo, tecnologia desenvolvida a partir das técnicas de DNA recombinante descritas por Berg (JACKSON et al., 1972). Também em 1975, uma nova abordagem metodológica, denominada Southern blotting (SOUTHERN et al., 1975), começou a ser usada para análise genética. O Southern blotting baseia-se na clivagem de DNA com enzimas de restrição, seguido por eletroforese, transferência de bandas para uma membrana, e finalmente, hibridização com sondas moleculares específicas. Esta abordagem marcou o início da aplicação de tecnologia moleculares analíticas ao aprimoramento diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, como enfatizaremos abaixo.

Os surgimentos de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes têm intensificado a necessidade de modalidades de diagnóstico mais rápidas e sensíveis (EHRlich; GREENBERG, 1994). Vários métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção de patógenos infecciosos, visando superar as dificuldades encontradas nos métodos convencionais. Embora as abordagens moleculares analíticas, que incluem hibridização e amplificação in vitro de DNA tenham várias

aplicações, inclusive em engenharia genética, e diagnóstico de doenças genéticas, focalizaremos a presente revisão bibliográfica introdutória no diagnóstico das doenças infecciosas. As sondas de DNA foram os primeiros métodos biológicos moleculares a serem desenvolvidos para o diagnóstico de doenças infecciosas. As sondas moleculares reconhecem e hibridizam com a seqüência alvo, que pode ser espécie-específica ou gênero-específica. A fim de aumentar a sensibilidade de detecção, a seqüência alvo precisa estar presente em múltiplas cópias e pode ser DNA ou RNA. Em geral devido à existência de maior número de cópias de RNA por célula, a sensibilidade de detecção é maior quando a seqüência alvo consiste em RNA (SINGH, 1997), particularmente RNA ribossomal, que representa aproximadamente 80% do total de RNAs de uma célula. A visualização da hibridização da sonda à seqüência alvo geralmente é feita através da marcação da sonda com radioisótopos. As sondas também podem ser ligadas diretamente a enzimas, sendo sua presença detectada com o uso de substrato cromogênico, o qual a enzima converte em produto corados insolúveis (SINGH, 1997).

A hibridização, apesar de ser uma abordagem de grande especificidade, apresentava limitações quando o alvo estava presente em pequeno número de cópias, como acontece com uma grande variedade de amostras biológicas, em que o patógeno infeccioso apresentava-se de forma escassa. O problema da baixa sensibilidade das reações de hibridização de DNA ou a baixa quantidade de DNA do patógeno presente na amostra foi contornado por um método capaz de amplificar milhões de vezes uma molécula de DNA alvo, com o uso de uma enzima, a reação em cadeia pela polimerase (MULLIS; FALLONA, 1987). Contudo, cabe mencionar que existem várias outras abordagens diagnósticas baseadas na amplificação específica do DNA, como abordaremos adiante.

## 1.2 Amplificação de DNA através da PCR

### 1.2.1 Teoria e desenvolvimento

A PCR (polymerase chain reaction) é uma técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detectar uma única molécula de DNA numa amostra ou um fragmento contanto que no mesmo o alvo esteja presente. Esta técnica está rapidamente substituindo a hibridização com sondas moleculares no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas. A PCR também vem revolucionando a medicina forense e viabilizando a identificação do indivíduo do qual a amostra se originou pelo seu *fingerprint* genético (ALBERTS ET AL.,1997). Na reação, regiões específicas do DNA, são amplificadas enzimaticamente. Durante a PCR, um segmento específico de ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla ou de fita simples pode ser amplificado através de sucessivos ciclos.

Apesar dos princípios da técnica de PCR terem sido conceitualmente descritos já em 1971 (KLEPPE et al., 1971), os primeiros dados experimentais só foram publicados em meados dos anos 80 (SAIKI et al., 1985). No início, a abordagem existente era lenta, cara e imprecisa. A técnica empregava banhos com temperaturas ajustadas e a enzima utilizada na reação era o fragmento obtido a partir da clivagem da DNA polimerase I da *E. coli* (o fragmento de Klenow), que não apresenta atividade exonucleásica 5'→'3. O uso do fragmento de Klenow (enzima termosensível) apresentava inúmeras limitações e exigia que a cada ciclo de desnaturação da dupla fita do DNA alvo, fosse adicionada mais uma alíquota de enzima (GELFAND, 1989; SAMBROOK et al., 1989). Essa manipulação para a adição da enzima proporcionava um trabalho árduo, e aumentava

consideravelmente a possibilidade de contaminação. Além disso, devido a termo-sensibilidade da enzima, a técnica apresentava a desvantagem do surgimento de bandas inespecíficas (MULLIS; FALOONA, 1987). A utilização do fragmento de Klenow permite que uma molécula específica seja reproduzida 200.000 vezes, mas apenas um pequeno percentual deste produto corresponde à seqüência alvo (SCHARF et al., 1986), fazendo-se necessário o uso de sondas específicas em ensaios de hibridação para visualização do produto específico amplificado (SAIKI et al., 1985; SAIKI et al., 1986).

No ano de 1988, Saiki e colaboradores descreveram o uso da DNA polimerase extraída da bactéria termófila *Thermus aquaticus* na PCR. O uso da DNA polimerase termoestável simplificou de forma extrema o procedimento e, permitiu que a reação fosse processada em temperaturas mais altas, já que a temperatura ótima de reação da enzima passou de 37° C para 72° C, elevando a estringência da reação. Com isso, melhorou significativamente a especificidade, e aumentou o percentual de produto amplificado. A utilização da enzima termoestável permitiu a automação no processo, pois tornou desnecessária a adição de mais enzimas durante o final de cada ciclo, diminuindo muito a possibilidade de contaminação por material nucléico exógeno ou amplificado de outra amostra. Com isso ao invés de banhos passou-se a utilizar termocicladores automáticos programáveis. Além disso, o uso da Taq DNA polimerase e de outras DNA polimerases termoestáveis, possibilitaram a minimização da obtenção de produtos inespecíficos, bem como a amplificação de produtos maiores que 400 pares de bases (pb), ampliando significativamente a aplicação da PCR (ERLICH, 1991; INNIS; GELFAND, 1990).

### 1.2.2 PCR convencional

A PCR baseia-se em ciclos que se repetem na forma de três etapas que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo, na presença de reagentes termo-estáveis, e seqüências específicas de DNA a serem amplificadas. Os reagentes são: (1) dois pequenos iniciadores (primers), sintetizados para serem complementares às seqüências conhecidas do DNA alvo, (2) grande quantidade dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e (3) a enzima termoestável Taq DNA-polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* e tampão (EISENSTEIN, 1990).

A PCR é um sistema que envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92/95°C, para quebrar as ligações tipo ponte de hidrogênio que mantêm as fitas unidas. Esta etapa expõe a fita de DNA, denominada "template" ou molde, à qual se anelará outra fita de DNA que contenha seqüência complementar a ela (iniciador). Esta técnica não exige que o DNA esteja puro, podendo ser detectado em misturas de DNAs ou deste com outras substâncias. No entanto, há maior sensibilidade da detecção em amostra contendo somente DNA purificado (EISENSTEIN, 1990; SCHEINERT et al., 2005). Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35/60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência dos iniciadores utilizados, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Os dois iniciadores não podem anelar-se um ao outro e seus sítios de anelamento devem ser suficientemente distantes um do outro, para permitir a síntese subsequente de novo produto (EISENSTEIN, 1990). Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão no sentido

5'→3' (TAYLOR, 1993) a uma velocidade de cerca de 24 nucleotídeos por segundo (SCHEINERT et al., 2005). Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. À medida que os ciclos vão se repetindo, os iniciadores são consumidos e o número de novas fitas de DNA aumentam (EISENSTEIN, 1990). Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo aumenta exponencialmente a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA especificamente amplificado, resultando em moléculas de DNA com seqüência homóloga ao DNA que serviu de origem (TAYLOR, 1993).

### **1.2.3 PCR Multiplex**

Nessa abordagem, são amplificados dois ou mais segmentos diferentes de DNA em uma única reação, utilizando-se para isso mais de um conjunto de pares de primers. Essa técnica permite a co-amplificação de mais de um segmento do genoma. Isso garante praticamente 100% de especificidade para a reação, no caso da identificação de microorganismos, diminuindo os riscos de falso-positivos. Também, usualmente, são incluídos na reação multiplex, iniciadores para controle interno da reação de amplificação. A inclusão do controle interno de amplificação visa à eliminação dos falso-negativos que ocorrem devido à presença de inibidores da reação de amplificação e permite, assim, uma análise de materiais como urina, líquido, líquido amniótico e efusões, onde a presença de inibidores da reação de amplificação tem sido descrita com freqüência.



Por permitir a amplificação simultânea de múltiplas regiões alvo a PCR multiplex vem sendo bastante útil na detecção da deleção de exon em desordens ligadas ao cromossomo X, tais como a distrofia muscular de Duchenne (CHAMBERLEIN et al., 1988) e síndrome de Lesch-Nyhan (GIBBS et al., 1990).

#### **1.2.4 PCR quantitativa**

PCR quantitativa (QPCR) vem sendo utilizada para detecção e diagnóstico de deleções genéticas, para estudo de expressão gênica e para estimação da carga viral de HIV-1. Enquanto a quantificação de DNA por multiplex PCR foi previamente descrita (METZKER ET AL., 1995), a quantificação de RNA vem sendo intensamente pesquisada. Para várias aplicações, estimar a quantidade relativa de produtos de PCR é suficiente para descrever a presença do agente etiológico. A quantificação absoluta de moléculas de RNA, entretanto, tem sido mais difícil do que para DNA por causa da dificuldade de gerar controles precisos. Padrões internos derivados de RNA sintético ou cRNA vem sendo desenhados para conter a mesma seqüência de primers que o alvo, mas gerando um produto de PCR de tamanho diferente que pode ser facilmente separado por eletroforese. cRNAs não são apenas co-amplificados com as seqüências alvo, mas também servem para quantificar a variabilidade da eficiência da síntese de cDNA. Mais ainda, QPCR é tipicamente realizada na fase log ou exponencial do processo de amplificação (ciclos 14-22) para obter resultados quantitativos precisos, a quantidade absoluta de mRNA pode ser quantificada por diluições seriadas da mistura alvo/controle interno e por extrapolações da curva padrão (METZKER; CASKEY, 2001).

A variabilidade da quantidade de alvos iniciais e a presença de vários inibidores podem, entretanto, afetar adversamente a cinética e eficiência da PCR.

A qPCR em tempo real (HEID et al., 1996) usando uma 5'-nuclease fluorogênica ou ensaio "TaqMan" (HOLLAND et al., 1991) vem sendo desenvolvidas para medir precisamente as quantidades iniciais de seqüências alvo. Diferentemente da eletroforese em gel de agarose, a QPCR em tempo real tem a vantagem única de começar em um sistema de tubo fechado, o qual pode significativamente reduzir contaminação ambiental. Usando esta técnica, pode-se facilmente monitorar e quantificar precisamente o acúmulo de produtos de PCR durante a fase log da amplificação. O ensaio de TaqMan utiliza um "repórter" e um "quencher" fluorescente corado que são ligados a uma seqüência sonda não extensível.

### **1.2.5 Nested-PCR**

Para aumentar a sensibilidade de detecção, a técnica de PCR tem sofrido algumas adaptações, como por exemplo, a dupla amplificação (Nested-PCR). Nesta modalidade de PCR o ensaio se realiza em duas etapas consecutivas (duas PCRs simples). Na primeira etapa, uma seqüência maior de DNA alvo é amplificada com um par de iniciadores externos. Uma alíquota, do amplicon assim obtido, é então submetida à segunda etapa, para amplificação de uma seqüência interna do DNA alvo, usando-se um novo par de iniciadores (internos em relação à posição de anelamento do primeiro par utilizado). Assim, ao final desta última etapa tem-se amplificada a seqüência alvo interna, que pode ou não se sobrepor a uma das terminações finais da seqüência alvo maior (PINGON et al. 1990). É precisamente esta segunda etapa de amplificação com iniciadores internos, que confere a nested PCR especificidade e sensibilidade superiores àquelas obtidas em PCR simples. Sua grande sensibilidade inclusive torna a nested PCR altamente recomendada para a detecção de alvos com baixo número de cópias (por exemplo, em amostras

clínicas, de solo, de água e alimentos) (DUPIN et al. 2002, TANJI et al., 2002). A necessidade de abertura do tubo de reação para a transferência dos amplicons, que serve de molde para a segunda etapa de amplificação, aumenta o risco de contaminação e o aparecimento de resultados falso positivos diminuindo a confiabilidade do método.

### **1.2.6 Nested PCR em único tubo (STNPCR)**

A implementação de duas reações de amplificação em um único tubo (STNPCR) reduz consideravelmente o risco de contaminação (LIOP et al., 2000; MATHIS et al., 1997; OLMOS et al., 1997; WOLFF et al., 1995, ABATH et al., 2002) Há basicamente duas abordagens básicas utilizadas no desenvolvimento da nested PCR em único tubo. Elas envolvem uso de iniciadores internos e externos com distintas temperaturas de anelamento (esta abordagem limita bastante as seqüências que poderiam vir a servir de alvo para amplificação, como também possibilita o aumento do aparecimento de bandas inespecíficas), e a separação física dos reagentes necessários à segunda etapa de amplificação. Como exemplo da separação física pode ser citado o recurso do tip de pipeta modificado para conter e isolar temporariamente os reagentes (da segunda etapa) do conteúdo restante do tubo de reação. Também se tem utilizado resinas ou componentes estranhos à reação para seqüestrar os componentes da segunda reação. No entanto, isto pode interferir na reação enzimática (TAO et al., 2004)

### 1.2.7 PCR em tempo real

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. Essa inovação tecnológica permite o monitoramento da PCR em tempo real. No princípio do desenvolvimento foi incluído um corante intercalante (brometo de etídio), específico para DNA dupla fita na PCR para monitorar as mudanças na fluorescência ao final de cada ciclo usando uma câmara digital e um fluorômetro ligados ao tubo de reação. A técnica foi modificada para usar o Sybr Green 1, um corante com propriedades similares (agente que emite luz em DNA de fita dupla) em um termociclador/fluorômetro de capilar de vidro especialmente desenhado (RIVAS et al., 2001) ou outros sistemas apropriados.

O uso desse método de detecção tem sido bastante empregado em ensaios de PCR quantitativo em tempo real, com a vantagem de ser mais barato em relação à construção de sondas marcadas. Porém, os *primers* específicos utilizados na reação de PCR devem ser desenhados cuidadosamente para evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, uma vez que esse corante se liga a qualquer DNA dupla fita. O monitoramento em tempo real elimina a necessidade da detecção dos produtos amplificados por eletroforese e simplifica a PCR quantitativa pela possibilidade de identificação do ciclo no qual a amplificação inicia (valor Ct). O padrão de concentração conhecida do DNA do organismo (template) e amostras desconhecidas são amplificadas ao mesmo tempo e seus valores de Ct determinados e comparados. Uma curva padrão pode ser construída com esses dados e calculado o número dos moldes iniciais desconhecidos nas amostras. O

aumento na emissão de fluorescência pode ser lido por um detector em tempo real, durante a reação de PCR e é uma consequência direta da amplificação da seqüência de DNA de interesse (GIULIETTI et al, 2001).

A PCR quantitativa em tempo real, pode ser usada para quantificar a expressão de RNAs mensageiros em baixos níveis, permitindo a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um só passo. O princípio da técnica baseia-se na atividade exonuclease 5'→3'da enzima *Taq* DNA polimerase e na construção de sondas de oligonucleotídeos marcadas duplamente. Estas sondas são baseadas no princípio FRET "Fluorescence Resonance Energy Transfer" e emitem sinal de fluorescência somente quando clivadas. Em PCR em tempo real utilizando-se sondas *TaqMan*, a sonda, específica para o gene de interesse, é marcada duplamente com um corante repórter em uma extremidade (5'), e uma substância que absorve a luz (quencher) na outra (3'). Na forma livre, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo repórter é absorvida pelo "quencher". Quando ocorre a degradação da sonda pela enzima *Taq* DNA polimerase, durante a PCR, os corantes repórter e silenciador são separados e a emissão de fluorescência do repórter não será mais absorvida pelo "quencher" resultando em um aumento de emissão de fluorescência pelo repórter que será detectada e quantificada. Recentemente, outros sistemas sofisticados têm sido desenvolvidos como *molecular beacons*, *scorpions* e sondas para hibridização. Esses sistemas são baseados no princípio FRET, porém sem a necessidade de hidrólise por atividade nuclease (WITTEWER et al., 1997).

### 1.3 Aplicações ao diagnóstico

A evolução na área da biologia molecular modificou e aperfeiçoou o diagnóstico de uma forma geral, e ainda é um processo que está em andamento. As técnicas, rotineiramente utilizadas no diagnóstico de diversas doenças possuem limitações. Por exemplo, a detecção de anticorpos específicos, é pouco específica, não permite uma diferenciação entre infecções prévias e recém adquiridas, dificultando o monitoramento da cura e tratamento eficaz.

Foi, porém, na última década, que as técnicas de clonagem, de produção in vitro de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e de seqüenciamento de material genético ficaram mais acessíveis e eficientes. Além de rápido, a PCR apresenta a vantagem de requerer quantidades muito pequenas de DNA. Teoricamente, a técnica pode ser eficaz até se realizada a partir de uma molécula de DNA proveniente de uma única célula, o que traz grandes vantagens no diagnóstico de várias doenças. A sensibilidade da PCR tem sido ressaltada também na pesquisa de doença neoplásica residual mínima, com uma média de detecção de uma célula clonal em  $2 \times 10^5$  células, superando, assim, outras técnicas utilizadas antes do advento da PCR (STETLER-STEVENSON *et al.*, 1988). A PCR também possibilita a amplificação de regiões do genoma, a partir de mínimas quantidades de DNA, mesmo que degradado (SAIKI *et al.*, 1988). Em vista disso, torna-se uma metodologia de escolha para a utilização em tecido fixado em formalina e incluído em blocos de parafina (SEPP *et al.*, 1994), além de outros materiais de arquivo e de fontes escassas de DNA, ampliando, assim, as possibilidades de utilização da técnica.

Concomitantemente, com os avanços no emprego e na realização da técnica de polimerização em cadeia, os métodos de extração de DNA também passaram por um processo de aprimoramento, melhorias e adequações, de forma a serem empregados nos mais diferentes tipos de fontes de DNA potenciais, ampliando o campo de utilização da PCR.

Esses avanços técnicos têm contribuído para o desenvolvimento de grande número de formas efetivas de “screening” e descobertas de mutações pontuais, antes desconhecidas. A PCR é uma técnica da biologia molecular que tem um grande potencial para a análise genética de tecidos. Isso inclui diagnóstico pré-natal rápido de doenças hereditárias (SAIKI *et al.*, 1988), detecção de doença residual (LEE *et al.*, 1987), detecção de clonalidade em lesões linfoproliferativas (MC CARTHY *et al.*, 1990), identificação de mutações pontuais em protooncogenes celulares (HALASSOS *et al.*, 1989), diagnóstico de infecções virais (LAURE *et al.*, 1988) detecção de DNA de plasmódio (SCHINDLER *et al.*, 2001) e de *S.mansoni* (ABATH *et al.*, 2002), e muitos outros patógenos infecciosos como: *Helicobacter pilory* (LAGE *et al.*,1995); *Herpes simplex* (CHESKY *et al.*, 1998; EISENSTEIN,1990); *Mycobacterium tuberculosis* (TAN *et al.*, 1999); Vírus da Hepatite B –HBV (URDEA,1993; EISENSTEIN, 1990); Vírus da Hepatite C – HCV (TOYODA *et al.*, 1996); *Toxoplasma gondii* (EISENSTEIN, 1990); *Yersinia pestis* (LEAL; ALMEIDA, 1999); *Entamoeba histolytica* (PINHEIRO *et al.*, 2004); *Streptococcus sp* (CHESKY *et al.*, 1998). O aprimoramento da técnica de PCR permitiu, além da detecção do ácido nucléico, a sua quantificação como, por exemplo a carga viral dos agentes etiológicos das hepatites B e C e do HIV. A quantificação desses vírus é um parâmetro preditivo de resposta terapêutica (LAU *et al.*, 1993).

No campo da epidemiologia, exames moleculares de populações particularmente em risco para um grupo de possíveis patógenos, é uma excitante área de desenvolvimento em microbiologia molecular. Por exemplo, numerosos agentes etiológicos causam gastroenterite debilitante em populações de pacientes imunossuprimidos, incluindo micobactérias (complexos *M avium* e *M. genevense*), parasitas (*Cryptosporidium*, *Microsporidium*), vírus (rotovírus, agente Norwalk), e típicos patógenos bacterianos (variantes de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, e *Campylobacter*). Tradicionalmente, diferentes métodos de detecção são usados para cada grupo de patógeno intestinal. Isso requer meios de detecção especiais, equipamentos e insumos caros para cultura de microorganismos; perícia na identificação de parasitas e ovos em preparações de fezes; e meios especiais para o trabalho com patógenos bacterianos entéricos. Apesar desses testes poderem ser individualmente baratos, um trabalho adequado com patógenos entéricos pode ser bem caro.

Técnicas moleculares existem e estão sendo desenvolvidas para serem usadas para análise de indivíduos dentro de uma população (em particular para os mais prováveis agentes etiológicos de doenças). Ácidos nucleicos extraídos de fezes de pacientes com gastroenterites podem ser detectados a partir de testes moleculares específicos. Desta maneira, um simples teste pode ser usado para identificar o agente etiológico da doença dentro de numerosas possibilidades.

Como exemplo, a PCR multiplex utiliza numerosos primers dentro de um único tubo de reação para então amplificar fragmentos de ácido nucleico de diferentes alvos, a amplificação de ácido nucleico específico deve ocorrer se o alvo apropriado de DNA estiver presente na amostra testada (ROBERTS; STORCH, 1997). Finalmente, diversos patógenos dentro do mesmo grupo taxonomicamente



relacionado podem ser analisados com uma variedade de primers e detectados por sequenciamento de ácidos nucleicos ou análise por sondas (COYLE et al.,1992). Primers são escolhidos com base na comparação da seqüência de ácidos nucleicos para incluir agentes patogênicos, e, para excluir possíveis contaminantes ambientais. Por exemplo, vários primers de PCR e análise de seqüências vêm sendo usados com sucesso para detectar doenças causadas por membros da família *Rickettsiaceae*; em particular, agentes da *Ehrlichiosis* vem sendo identificados e especificados (DUMLER et al., 1995). Esta técnica é extremamente útil em circunstâncias na qual o diagnóstico diferencial pode ser limitado a um grupo particular de organismos.

Aplicações futuras no campo da microbiologia molecular incluem a rápida detecção de resistência microbiana (SINGH, 1997). O que se espera, com o desenvolvimento de sistemas mais facilmente utilizáveis é a expansão destas tecnologias para pequenas instituições e hospitais. O uso destes métodos moleculares na identificação específica de agentes infecciosos ao nível de ácido nucleico, realmente representa um enorme avanço no diagnóstico de doenças e irão contribuir para a epidemiologia, prevenção e tratamento de doenças parasitárias.

#### **1.4 Limitações e problemas comuns no uso da PCR**

grande parte das reações de PCR propende à amplificação de seqüências específicas do DNA, daí, para que a reação possa se procesasar a necessidade que as regiões alvo sejam parcial ou totalmente seqüenciadas, afim de que os iniciadores possam ser sintetizados de modo a flanqueá-las. Isto limita bastante a expansão da metodologia para estudo de organismos com um pequeno número de seqüências disponíveis. Outro fator importante é o ajuste cuidadoso das condições

ideais de concentração dos componentes da reação, já que não existe um protocolo padrão que possa ser usado sem ajuste para todas as amplificações. O número de ciclos, a concentração de  $MgCl_2$ , de enzima, de DNA molde, e a temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores, devem ser cuidadosamente ajustados para cada tipo de reação que se proceda. Outro fator fundamental no preparo das reações é relacionado à fonte da qual o DNA foi ou será extraído. Deve-se considerar a introdução ou a presença de inibidores da DNA polimerase, durante o processo de extração do DNA. Entre os inibidores naturais estão substâncias como o grupo heme da hemoglobina, entre outros inibidores que geralmente são introduzidos no processo de coleta ou extração do material biológico estão: fenol e clorofórmio (inibidores da ação enzimática); proteinase-K (degrada a DNA polimerase); EDTA; heparina (quelantes dos íons  $MgCl_2$ ) (SAMBROOK et al., 1989).

Paradoxalmente, um dos problemas da PCR, é devido à sua altíssima sensibilidade, que permite a produção de milhões de cópias de DNA a partir de uma única molécula alvo. Esta sensibilidade torna efetivo o problema de contaminação de reações e a literatura demonstra grande preocupação com o fato (SARKAR; SOMMER, 1990; ERLICH et al., 1991). Para minimizar os resultados falso positivos, procedimentos de operação padrão já foram descritos, incluindo isolar fisicamente as salas para preparação de reagentes da PCR, das salas de preparação dos alvos de PCR e seus produtos, usar soluções autoclavadas, preparar e aliquotar reagentes, usar luvas descartáveis, evitar aerossóis, uso de pipetas exclusivas para o preparo da reação as quais jamais devem ser utilizadas com material já amplificado, adicionar o DNA por último, e escolher cuidadosamente controles positivos e negativos (KWOK; HIGUCHI, 1989).

A melhor abordagem para confrontar resultados dúbios é repetir o experimento cuidadosamente tendo particular atenção para detalhes e controles. Amostras biológicas coletadas ao mesmo tempo devem ser separadas em múltiplas alíquotas, assim extrações de DNA e experimentos com PCR independentes podem ser realizados para verificar e validar os resultados iniciais. Os dados devem ser descartados caso resultados inconsistentes positivos e negativos da PCR ocorram em vista da repetição do experimento. Enquanto controles negativos podem descartar contaminação de reagentes, o mesmo não acontece com contaminação esporádica, que pode não ser notada (SAMBROOK et al., 1989).

Há três fontes importantes de DNA contaminante: contaminação com amplicons do ambiente; contaminação cruzada entre materiais de múltiplas fontes; e plasmídeo contaminante de um clone recombinante que contenha a seqüência alvo. Das três, a contaminação do ambiente é considerada a principal fonte de contaminação, por causa da relativa abundância de seqüência alvo amplificada. A substituição de dTTP por dUTP na mistura de PCR vem sendo utilizada para evitar este tipo de contaminação (LONGO et al., 1990). O pretratamento da subsequente mistura de PCR previamente à ciclagem com uracil DNA glicolase resulta na remoção de dU de qualquer contaminante ambiente, sem afetar o DNA alvo. remoção de dU cria um sítio não básico que é degradada (baixa temperatura) durante os ciclos térmicos, prevenindo assim, a contaminação ambiente. Além disto, a luz ultravioleta pode reduzir o risco de contaminação de superfícies de trabalho e reagentes. Contaminação cruzada entre amostras é mais difícil de ser diagnosticada. Sendo assim, resultados suspeitos devem ser repetidos com extração de DNA e PCRs independentes para as amostras em questão (LONGO., 1990). Contaminação por plasmídios, por outro lado, podem ser identificadas por análise da seqüência e

comparação com todas as seqüências de plasmídio do laboratório (METZKER; CASKEY, 2001).

Outro fator importante é a seqüência e o comprimento dos iniciadores para uma amplificação bem sucedida. Os iniciadores, geralmente são sintetizados na faixa de 18-30 bases, que são utilizados na amplificação de DNA de baixa complexidade. Estes oligonucleotídeos são pequenos demais para formar híbridos estáveis na temperatura de polimerização (SAMBROOK et al., 1989). O desenvolvimento de iniciadores, embora essencialmente empírico, pode ser bastante melhorado pela adoção de alguns cuidados básicos. Assim, na construção de iniciadores deve se evitar: a) complementaridade interna; b) complementaridade de um iniciador em relação ao outro, particularmente na região 3' (TAYLOR, 1993). Uma alta concentração de iniciadores aumenta a probabilidade de anelamento espúrio, gerando produtos não específicos e dímeros, no entanto a falta deste componente interfere na amplificação. Desta forma, a concentração dos iniciadores deve estar usualmente em torno de 0,1-1,0 pmol/ $\mu$ l de reação (SCHEINERT et al., 2005).

A especificidade da amplificação depende principalmente das condições empregadas na etapa de anelamento, como está etapa envolve hibridação de oligonucleotídeos, a otimização desta temperatura representa um fator essencial para o sucesso do processo. Baixas temperaturas de anelamento aumentam a probabilidade de ocorrência de hibridizações inespecíficas, resultando na amplificação de diferentes regiões do DNA. Por outro lado, embora temperaturas muito altas propiciem um grande aumento na especificidade, ocorre um sensível decréscimo do rendimento (RYCHLIK et al., 1990). Portanto, a temperatura ótima de anelamento localiza-se em um ponto intermediário, onde há maximização de

especificidade e rendimento. A temperatura de anelamento é especialmente crítica na amplificação de fragmentos longos de DNA ou, ainda, quando o DNA genômico é utilizado como substrato da reação. Uma “hot start” PCR aumenta ainda mais a especificidade prevenindo a formação de produtos não específicos nos ciclos iniciais.

A temperatura de extensão é normalmente 70 a 72° C, por 0,5 a 3min, a Taq polimerase já apresenta atividade específica à 37° C. Contudo a 70° C a atividade da Taq polimerase é ótima, ocorrendo uma extensão de até 100 bases/seg. Portanto, um minuto é suficiente para amplificação de seqüências com 6kb (INNIS; GELFAND, 1990). A Clonagem de segmentos inteiros de produtos de PCR é problemática, pois as mutações induzidas pela PCR podem causar substituições de aminoácidos em relação à seqüência original. Assim esforços significantes vêm sendo empregados no seqüenciamento completo de múltiplos clones de PCR para identificar clones livres de mutações ou clones que possuam mutações que não alterem a seqüência da proteína codificada. Portanto, DNA polimerases termoestáveis, que possuam atividade 3' exonuclease para “proof-reading” de bases má incorporadas, foram recentemente introduzidas e incluem DNA polimerases isoladas de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), *Thermococcus litoralis* (*vent*), *Pyrococcus* espécies GB-D (Deep Vent) e *Pyrococcus woehsi* (*Pwo*).

Para a maioria das aplicações, as condições padrão de PCR podem seguramente amplificar alvos acima de 3-4kb de uma variedade de materiais. A amplificação de alvos maiores que 5kb, entretanto, é descrita na literatura usando condições convencionais de PCR, mas geralmente rendem quantidades menores de produto de PCR. O limite do tamanho da PCR pode ser atribuído a problemas de má incorporação de nucleotídeos que ocorrem 1 a cada 4000-5000 pb e que finalmente

reduz a eficiência da amplificação de regiões alvo longas. Para a produção de amplicons longos, pode-se usar combinadamente DNA polimerases termoestáveis, uma delas contendo a atividade 3' exonuclease (BARNES, 1994; CHENG et al., 1994). Para que haja PCR de amplicons longos é preciso que DNA polimerase realize uma síntese de DNA com alta fidelidade, junto com a atividade "proof-reading" da *Pfu*, *Pwo* ou *Vent* DNA polimerase. Uma vez que o nucleotídeo errado é corrigido, a *Taq* DNA polimerase pode completar a síntese de templates longos da PCR. Em estudos empíricos, apenas pequenas quantidades de DNA polimerases que apresentam atividade 3' exonuclease, são necessárias para realizar PCRs maiores do que 20kb. Outros importantes fatores para PCR longas são: a purificação de alta qualidade; alto peso molecular de DNA; proteção contra dano ao *template*, como depurinação durante os ciclos.

### 1.5 Aspectos teóricos quantitativos da PCR

Como já foi mencionado, o produto de amplificação de cada ciclo serve de molde para os ciclos subsequentes. Durante a ciclagem o amplicon formado sofre um aumento exponencial não linear, que pode ser representado pela equação abaixo Eq (1).

$$\text{Eq.(1)} \quad N = N_0 \times 2^n$$

N= número final de cadeias de DNA

$N_0$ = número inicial de DNA molde (*template*)

n= número de ciclos de amplificação

Um dos fatores que determina a confiabilidade da PCR é a eficiência de amplificação, que pode ser influenciada por inúmeros fatores: concentração de DNA-polimerase, dNTPs e do cofator  $Mg^{+2}$ , estrutura secundária e conteúdo G/C do alvo, a seqüência e composição dos iniciadores e presença de inibidores da DNA-polimerase. Por isso, na prática o processo de acumulação é mais bem descrito através da equação Eq. (2).

$$\text{Eq.(2)} \quad N=N_0 \times (1+E)^n$$

E= eficiência de amplificação

A equação (2) é utilizada na forma logarítmica, relacionando os valores logarítmicos do produto de PCR ( $\log N$ ) versus o número de ciclos de amplificação, um gráfico linear pode ser gerado. Experimentalmente, a cinética do produto de amplificação está longe do caso descrito pela equação (2), porque a amplificação não é exponencial durante todo processo. Nos primeiros ciclos os amplicons têm tamanhos variados e a produção é linear. Em seguida, o produto aumenta de forma exponencial. Durante os ciclos que se seguem, no entanto, o aumento da velocidade de reação cai (Kohler et al, 1995), de acordo com a descrição matemática de Michaelis Menten, após algum tempo gerando um efeito de saturação representado graficamente como um platô. Outro fator crucial é o tempo de meia vida da Taq polimerase que é de 30min a 95° C, em parte, o que desaconselharia para alguns a utilização de mais do que 30 ciclos de amplificação com a temperatura de desnaturação a 95° C, entretanto, é possível reduzir a temperatura de ação da desnaturação após os 10 primeiros ciclos de amplificação, porque o comprimento do DNA alvo diminui, então para moldes de 300 pb ou de menos e que apresente 50%

de G/C, a temperatura de desnaturação pode ser reduzida até 88° C (YAP; McGEE,1991). Nestas condições, não haverá muita diminuição na atividade da enzima mesmo com mais de 40 ciclos de PCR.

### **1.6 Propriedades da Taq polimerase e de outras enzimas termoestáveis**

A Taq DNA polimerase foi a primeira DNA polimerase termoestável caracterizada (KALEDIN et al., 1980). Repetidas exposições a 98°C em um tampão de reação têm pouco efeito sobre a atividade da enzima, que permaneceu com atividade significativa após exposição a 99°C. Embora a Taq polimerase exiba atividade exonuclease 5'→ 3', não foi detectada atividade exonuclease 3'→ 5'. Assim a fidelidade de inserção de bases é baixa e ela é incapaz de corrigir nucleotídeos mal inseridos (LING et al., 1991). Foi possível também determinar a taxa de erros de algumas polimerases em termos de pares de base (Alkami biosystems, 1999).

Enquanto o processo de PCR se desenvolve rapidamente através da invenção de melhores estratégias (MARIELLA, 2001), a falta de fidelidade continua a ser um sério desafio. Existem cinco atividades distintas que podem levar a ocorrência de erros pela atividade enzimática: taxa de formação de ligações fosfodiester; ligação de dNTP pela polimerase, taxa de liberação de pirofosfato, contaminação antes da incorporação e a capacidade de correção exonucleasica 3'→ 5' da enzima (Alkami Biosystems, 1999). As DNAs polimerases termoestáveis, como as outras DNA polimerases, requerem para a produção da fita de DNA a hidroxila da extremidade 3' livre.



Além da Taq DNA polimerase, diversas outras DNAs polimerases termoestáveis foram isoladas e seus genes clonados e expressados (Tabela 1). Uma das mais utilizadas na biologia molecular é a DNA polimerase *Pfu*, isolada da bactéria *Pyrococcus furiosus*. Esta enzima apresenta atividade exonucleásica 3'→5' e, até o momento, é a que parece ter a menor taxa de erro na adição de nucleotídeos,  $1,5 \times 10^{-6}$  pb; enquanto que a Taq fica em torno  $1 \times 10^{-4}$  a  $2 \times 10^{-5}$ . As enzimas que apresentam atividade exonucleásica 3'→5' geralmente apresentam taxas de erros menores. O tempo de meia vida da *Pfu* é de 1,6 h a 95 °C. Outra enzima que tem atividade exonucleásica é a *Vent*, proveniente da *Thermococcus litoralis*. Sua taxa de erro é intermediária entre a Taq e a *Pfu*, e seu tempo de meia vida é em torno de 7 h a 95 °C. Uma das questões que vem estimulando cientistas na área é a melhoria na fidelidade da PCR, cuja otimização do procedimento de PCR pode ser feita misturando-se uma polimerase padrão, como uma Taq polimerase, com polimerases mais específicas (*Pfu*, *Vent* e *Deep Vent*) (LING et al., 1991).

A fidelidade da síntese de DNA da Taq polimerase, no entanto, pode variar significativamente com mudanças na concentração de  $Mg^{2+}$  livre, mudanças no pH do tampão, ou um desequilíbrio na concentração dos quatro dNTP. Erros de má incorporação da polimerase são minimizados quando os quatro dNTPs estão equimolares e entre 50 e 200  $\mu$ mol (INNIS et al., 1988). Desde que falta a Taq DNA polimerase uma atividade 3' exonuclease, má incorporação de bases tipicamente causam uma terminação da síntese da cadeia de DNA que não são propagadas aos ciclos subseqüentes. Num pior cenário, ocorrendo à mutação e propagação de uma única molécula alvo durante o primeiro ciclo da PCR, existiria depois disso uma freqüência de 25% no produto final da PCR. Desde que centenas de cópias de alvos

são rotineiramente usadas como DNA origem na PCR e a maioria das más incorporações terminam a síntese de DNA, a freqüência de erro observada é significativamente menor que 25%. A enzima Phi29 que faz parte de um kit comercial (genomicPhi<sup>®</sup>, Amersham Biosciences) é capaz de usar primers hexâmeros e suporta a síntese por deslocamento de fita. A atividade de correção de erros da exonuclease 3'→ 5' resulta em DNA amplificado com maior fidelidade quando comparada a Taq DNA polimerase. Essa polimerase é altamente processiva e por isso é utilizada quando o material genético presente em amostras clínicas não está disponível em quantidade e/ou qualidade suficiente, impedindo a amplificação pela PCR usando Taq polimerase. A Phi 29 também permite a amplificação representativa de todo o genoma (AZEVEDO et al., 2004).

## **1.7 Outras técnicas de amplificação de ácido nucléico**

### **1.7.1 Sistema de amplificação baseado em transcrição (TAS)**

Descrito em 1989 por Kwoh et al., a TAS inclui a síntese da molécula de DNA complementar à molécula de ácido nucléico alvo (geralmente RNA) e transcrição in vitro com o cDNA recém sintetizado, assim como o template (KWOH et al., 1989). Variações neste processo são referidas como sistema de replicação auto-sustentável ("3SR"), amplificação baseada na sequência do ácido nucleico (NASBA), ou amplificação mediada por transcrição (TMA) (GUATELLI et al., 1990). Três enzimas, transcriptase reverse, RNase H, e T7 DNA-dependente RNA polimerase são usadas na reação. Etapas da amplificação envolvem a formação de cDNAs do RNA alvo usando primers contendo o sitio de ligação para a RNA polimerase. A RNase H então degrada a fita inicial do RNA alvo no híbrido RNA-

DNA, após este ter servido de template para o primeiro primer. O segundo primer liga-se ao cDNA recém formado e é prolongado, resultando na formação da fita dupla de cDNA no qual uma ou ambas as fitas são capazes de servir como “template” para transcrição para RNA polimerase. Apesar de ser tecnicamente menos robusta e sensível do que a PCR, a TMA tem vários méritos que a fazem uma opção atrativa: trabalha em condições isotérmicas e em um único tubo prevenindo riscos de contaminação (GUATELLI et al., 1990). A amplificação do RNA não apenas torna possível detectar vírus contendo RNA, mas também diminui o limite de detecção para certas bactérias e fungos patógenos usando um número alto de cópias de rRNA alvo (COMPTON J, 1991). Um sistema comercial para detecção de *M. tuberculosis* por TMA já está disponível pela Gen-Probe.

### **1.7.2 Reação em cadeia da ligase (LCR)**

Reação em cadeia da ligase (LCR), é uma técnica de amplificação por sonda inicialmente descrita em 1989 por Wu e Wallace (WU DY; WALLACE, 1989). Esta abordagem se faz através do posicionamento contínuo do pareamento correto dos finais 3' → 5' da sonda oligonucleotídica sobre a molécula de DNA alvo. Nesta técnica são utilizados “primers” muito longos que cobrem a quase totalidade da seqüência a estudar. A parte não coberta pelos “primers” é uma zona central, a qual após a hibridização dos primers é sintetizada por uma polimerase, e finalmente os dois fragmentos unidos por uma ligase. Assim, a existência do gene pode ser detectada pela detecção da união dos dois “primers”, a qual é dependente da hibridização, e conseqüentemente da existência do gene alvo. Um segundo grupo de “primers” complementares ao primeiro, usa esta fita duplicada como template alvo. A repetição do processo resulta em uma acumulação logarítmica dos produtos

da ligação, o qual pode ser detectado por meio dos “primers” marcados ligados aos oligonucleotídeos (SCHACHTER et al., 1994). A DNA ligase termoestável recentemente desenvolvida simplifica enormemente esta técnica e tem aumentado a especificidade, ajudando a evitar problemas de ligação inespecíficas em baixas temperaturas de anelamento (BARANY, 1991). Quando usada após um método de amplificação do alvo, como PCR, esta técnica pode ser sensível e é utilizável para a detecção de pontos de mutação. Apesar de automatizável, um inconveniente potencial da LCR é a difícil inativação dos produtos pós-amplificação. A natureza da técnica não permite aplicação dos métodos de prevenção de contaminação mais extensamente usados. A inclusão de um sistema de detecção dentro do mesmo tubo de reação iria diminuir enormemente o risco de contaminação, associado com a abertura dos tubos. Um kit LCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Nisseria gonorrhoea* concomitantemente já está comercialmente disponível pela Abbott Labs (CHERNESKY et al., 1994).

### **1.7.3 Amplificação por deslocamento da fita (SDA)**

SDA é outra técnica de amplificação de ácido nucléico não baseada em PCR, desenvolvida em 1991 (WALKER et al., 1992). Neste sistema a DNA polimerase inicia a síntese a partir de um “nick” em fita simples de DNA, liberando como consequência o segmento de DNA localizado a partir deste mesmo “nick” no sentido  $5 \rightarrow 3$ . A molécula de fita simples assim liberada serve então como substrato para “nickings” simultâneos adicionais e para novas reações de deslocamento. Este procedimento de amplificação isotérmico de DNA usa “primers” específicos, uma DNA polimerase e uma endonuclease de restrição, alcançando amplificação exponenciais do alvo. Apesar de complicada, SDA tem duas importantes vantagens:

exceto pela etapa de desnaturação inicial, a SDA é isotérmica e não requer um termociclador especializado. Além disso, SDA pode ser aplicado DNA de fita simples ou dupla (WALKER et al., 1992).

## **1.8 Detecção de *Schistosoma mansoni* através de PCR**

### **1.8.1 Comentários preliminares**

Para o desenvolvimento dos métodos moleculares descritos, utilizamos como alvo o DNA ribossomal (rDNA) do *S. mansoni*. Este alvo está presente em cerca de 100 cópias por genoma. É um complexo de aproximadamente 10 kb, compreendendo os genes que codificam a subunidade pequena (18S), 5,8S e 28S do RNA ribossomal (JOHNSTON et al., 1993). O rDNA apresenta regiões conservadas e variáveis entre espécies. Nas próximas seções discutiremos alguns aspectos da esquistossomose e do agente etiológico (*S. mansoni*) que julgamos relevantes.

### **1.8.2 Esquistossomose**

A esquistossomose é uma doença transmissível, causada no Brasil apenas pelo *Schistosoma mansoni*, afetando mais de 200 milhões de indivíduos no mundo. Deste total, aproximadamente 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões apresentam a forma grave da infecção. É endêmica em 74 países em desenvolvimento, com mais de 80% das pessoas infectadas residindo na África (REY , 1991). A Organização Mundial de Saúde recomenda que a pesquisa se concentre no desenvolvimento e avaliação de novas estratégias e ferramentas de controle da doença (WHO 2005).

Em Pernambuco, a área endêmica corresponde a 17,5% da área total do Estado, estimando-se que 62% da população de Pernambuco esteja sob risco de infecção (FAVRE *et al*, 2001). É uma doença parasitária crônica que ocasiona sérias conseqüências para o desenvolvimento sócio-econômico de regiões tropicais e subtropicais. Por ser debilitante e provocar invalidez e óbitos precoces, ela ocupa o segundo lugar em prevalência mundial, ficando atrás somente da malária, entre as doenças tropicais de importância em saúde pública (REY, 1991; WHO,1997).

A distribuição geográfica da esquistossomose vem mudando significativamente nos últimos 50 anos, devido ao controle da doença na Ásia, Américas e regiões do norte e leste Central da África (WHO, 1997). A esquistossomose já foi erradicada do Japão e a sua transmissão está diminuída nas Antilhas e Tunísia, enquanto que a transmissão é baixa em Marrocos, Filipinas, Arábia Saudita e Venezuela (WHO, 1995; 1997). Em 1991, estima-se que no Brasil existiam 6 milhões de infectados pelo *S. mansoni* (REY, 1991). A transmissão da doença por sua vez depende da existência dos hospedeiros intermediários que, no Brasil, são caramujos do gênero *Biomphalaria*. A distribuição do *B. glabrata* abrange todo os estados do Nordeste e do sudeste do país e ainda o Rio Grande do Sul e o Distrito Federal. O *B. tenagophila* é freqüentemente encontrado no sul do Brasil, enquanto o *B. straminea* está presente em todos os sistemas de drenagem do território brasileiro, sendo, inclusive, a espécie mais importante na transmissão da esquistossomose no Nordeste do Brasil (FUNASA, 2002).

### 1.8.3 Diagnóstico da esquistossomose e identificação de focos de transmissão

O método tradicional e mais usual para o diagnóstico da esquistossomose mansoni é a detecção de ovos nas fezes através da observação direta e quantitativa descrita por Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELEGRINO, 1972). Contudo, nas áreas onde a doença é de pouca intensidade, com manifestações leves e pouco específicas, com a maioria dos portadores eliminando menos de 100 ovos do parasita por gramas de fezes, a prevalência real da doença fica subestimada, quando se emprega somente esse método para diagnosticar a esquistossomose, (DIAS et al., 1992; EBRAHIM et al., 1997; GRYSEEL; DE VLAS, 1996; ALARCON DE NOYA et al., 1999). Isso ocorre por causa da baixa sensibilidade do método de Kato-Katz, que depende diretamente da quantidade de ovos eliminados pelo portador (BARRETO et al., 1990; ENGELS et al., 1996). Em parte, essas limitações podem ser atribuídas a flutuações diárias na excreção de ovos, a distribuição não uniforme dos ovos nas fezes (ENGELS et al., 1996, ENGELS et al., 1997), e possíveis desequilíbrios na relação de vermes machos e fêmeas (HAMILTON et al., 1998). Os problemas inerentes à detecção de ovos de *Schistosoma* nas fezes tornam-se particularmente importantes diante de baixas intensidades de infecção, como ocorre em áreas de baixa transmissão e nas fases crônicas da infecção (HAMILTON et al., 1998).

Uma vez que foi confirmada a presença de antígenos derivados do esquistossomo na circulação e secreções do hospedeiro infectado, abriu-se a possibilidade para o imunodiagnóstico da esquistossomose através da detecção de antígenos circulantes específicos (DEELDER et al., 1994; DE JONGE et al., 1991). As abordagens para a detecção de antígenos circulantes geralmente envolvem captura do antígeno por anticorpos monoclonais. Dois dos antígenos circulantes

mais comumente utilizados envolvem as glicoproteínas CAA e CCA, derivadas do epitélio intestinal dos parasitas (DEELDER et al., 1980). Em pacientes com esquistossomose mansoni, a sensibilidade de um teste baseado em ELISA de captura do CAA é similar a uma única contagem de ovos nas fezes (DE JONGE et al., 1988), sendo o limiar mínimo de detecção equivalente a 10 ovos por grama de fezes. De certa forma, há uma correlação positiva entre os níveis de antígenos circulantes e as taxas de excreção de ovos (DE JONGE et al., 1991; VAN LIESHOUT et al., 1995). Contudo, a sensibilidade desse tipo de ensaio é baixa nos casos em que a prevalência e intensidade de infecção são baixas, podendo até mesmo ser inferior aos testes parasitológicos (DE JONGE et al., 1991; VAN LIESHOUT et al., 1995). A presença de antígenos circulantes derivados do parasita é indicativo de infecção ativa (DE CLERQ et al., 1997).

Atualmente, os testes para o diagnóstico da infecção esquistossomótica através da detecção de anticorpos específicos freqüentemente se baseiam em ELISA e Western blot/dot blot (HAMILTON et al., 1998). Os antígenos mais freqüentemente utilizados são provenientes do verme adulto ou ovos, embora vários outros tenham sido ensaiados. Os métodos baseados na detecção de anticorpos específicos não permitem a discriminação de infecção presente ou passada. Além disso, também não se correlacionam com a intensidade de infecção e podem apresentar falso-positivos devido à reação cruzada com outros parasitas. Entretanto, os testes sorológicos podem ser bastante úteis, particularmente em regiões com baixa prevalência e no diagnóstico de viajantes e turistas após passagem por áreas endêmicas para esquistossomose.

Algumas poucas abordagens baseadas na detecção de DNA específico de *Schistosoma* foram descritas para a detecção desse parasita em moluscos (HANELT



et al., 1997; JANOTTI-PASSOS et al., 1997), na identificação de águas contaminadas com cercárias (HAMBURGER et al., 1998a), e na detecção em fezes humanas (PONTES et al., 2002)

Para que se possa identificar uma coleção de água (criadouro de *Biomphalaria*) como foco de transmissão é necessária a detecção de infecção em caramujos, que em termos de eliminação de cercárias só é possível após 30 dias de infecção (BARBOSA; SILVA, 1992). Tradicionalmente, a identificação de caramujos infectados se baseia na exposição à luz de caramujos individuais, em recipientes com água, observando-se, se ocorre a eliminação de cercárias. Alternativamente, os moluscos podem ser esmagados para observação de esporocistos (DESLANDES, 1951). As duas técnicas acima descritas são muito simples, de baixo custo laboratorial, mas com alto custo operacional, porque exigem uma estrutura adequada e pessoal especializado, envolvendo a coleta de caramujos nas zonas endêmicas, manutenção e análise individual dos caramujos. No caso específico do *Biomphalaria straminea*, mesmo o exame de muitos moluscos provenientes de áreas de alta prevalência de infecção humana pode resultar em fracasso na detecção do *Schistosoma* (BARBOSA et al 1992). Portanto, está claro que os métodos convencionais de identificação de focos de transmissão apresentam limitações, particularmente quando o vetor envolvido é o *B. straminea*.

#### 1.8.4 Ciclo de transmissão do parasito

O ciclo biológico do *S. mansoni* que é um parasito multicelular é complexo, pois é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo). Há, ainda, duas formas larvárias de vida livre no meio aquático (cercaria e miracídio), que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de cerca de 40 dias. No molusco, o ciclo é assexuado e dura, aproximadamente, 40 dias Figura 1.

Os vermes adultos vivem nos vasos sangüíneos que ligam o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) do hospedeiro vertebrado. Como não apresentam órgão copulador, a cópula ocorre pela justaposição dos orifícios genitais feminino e masculino, quando a fêmea está alojada no canal ginecóforo (fenda longitudinal, no macho, para albergar a fêmea e fecundá-la).

Uma fêmea coloca 300 ovos por dia, metade desses ovos são eliminados pelas fezes contaminando o meio ambiente e ao entrar em contato com a água, os ovos maduros eclodem e libertam larvas ciliadas, denominadas miracídios. Enquanto, a outra parte dos ovos retorna a circulação sanguínea indo se acumular nos seguintes órgãos: Fígado; baço e eventualmente medula e cérebro. A postura ocorre nos vasos capilares do intestino do hospedeiro, quando então passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes (REY, 1991). Ao entrar em contato com a água, os ovos maduros aumentam de volume, eclodem e libertam larvas ciliadas, denominadas miracídios.

O miracídio é o primeiro estágio de vida livre do *Schistosoma*. De formato oval e revestido por numerosos cílios. Onde não há rede de esgotos e as fezes infectadas são lançadas indevidamente em rios e lagos, os miracídios têm a chance de nadar ao encontro do hospedeiro intermediário, o caramujo, dando continuidade ao ciclo evolutivo do parasito e, conseqüentemente, possibilitando a transmissão da parasitose ao homem.

Ao penetrar nas partes moles do molusco, o miracídio perde parte de suas estruturas. As células remanescentes se reorganizam e, em 48 horas, transformam-se em um saco alongado repleto de células germinativas. Esse saco é o esporocisto. As células germinativas sofrem diferenciação e os esporocistos secundários migram para as regiões do hepatopâncreas e do ovotéstis do molusco, onde continuam a crescer, pouco a pouco, os aglomerados celulares vão se diferenciando para formar as cercárias.

As cercárias, oriundas do esporocisto, ganham os espaços sanguíneos que envolvem o hepatopâncreas e ovotéstis, encaminham-se pela corrente circulatória que envolve o intestino posterior (reto) e chegam até a pseudobrânquia e o colar do manto. Aí provocam a formação de minúsculas vesículas no tegumento dos moluscos, ao romperem as vesículas, saem para o meio exterior (REY, 1991). A cercária é uma larva com corpo e cauda, adaptada à vida aquática. Na pele do homem, a penetração é consumada pela ação lítica e pela ação mecânica devido aos movimentos intensos da larva. Nesse processo, que pode durar até 15 minutos, a cercária perde sua cauda. Depois de atravessar a pele, ela passa a ser chamada de esquistossômulo.

Os esquistossômulos são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro definitivo e penetram em seus vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos. Muitos

deles são vencidos pelo sistema de defesa humano e os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões e, posteriormente, migram para o fígado, onde esses pequenos vermes se alimentam e tornam-se adultos. O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (MILLER; WILSON,1978).

Tabela 1. Características de várias DNAs polimerases termoestáveis com atividade exonuclease 3'→5, utilizadas em PCR (Modificado de Haki & Rakshit, 2003).

| Polimerases   | Organismo                          | Reação de PCR    | Referências                                    |
|---------------|------------------------------------|------------------|--|
| BstI pol      | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | Alta fidelidade  | Mead et al. (1991)                             |
| Deep Vent Pol | <i>Pyrococcus sp. GB-D</i>         | Baixa fidelidade | Cline et al. (1996)                            |
| Pfu pol       | <i>Pyrococcus furiosus</i>         | Baixa fidelidade | Lundberg et al. (1991)                         |
| Pwo pol       | <i>Pyrococcus woesei</i>           | Baixa fidelidade | Frey; Suppman (1995)                           |
| Taq pol I     | <i>Thermus aquaticus</i>           | Alta fidelidade  | Jones; Foulkes (1989)                          |
| Tfi pol       | <i>Thermus filiformis</i>          | Não identificado | Perler et al. (1996)                           |
| Tfl pol       | <i>Thermus flavus</i>              | Não identificado | Kaledin et al. (1980)                          |
| Tth pol       | <i>Thermus thermophilus</i>        | Alta fidelidade  | Myers; Gelfand (1991), Pantazaki et al. (2002) |
| Tma pol       | <i>Thermotoga maritima</i>         | Baixa fidelidade | Bost et al. (1994)                             |
| Vent pol      | <i>Thermococcus litoralis</i>      | Baixa fidelidade | Perler et al. (1996)                           |

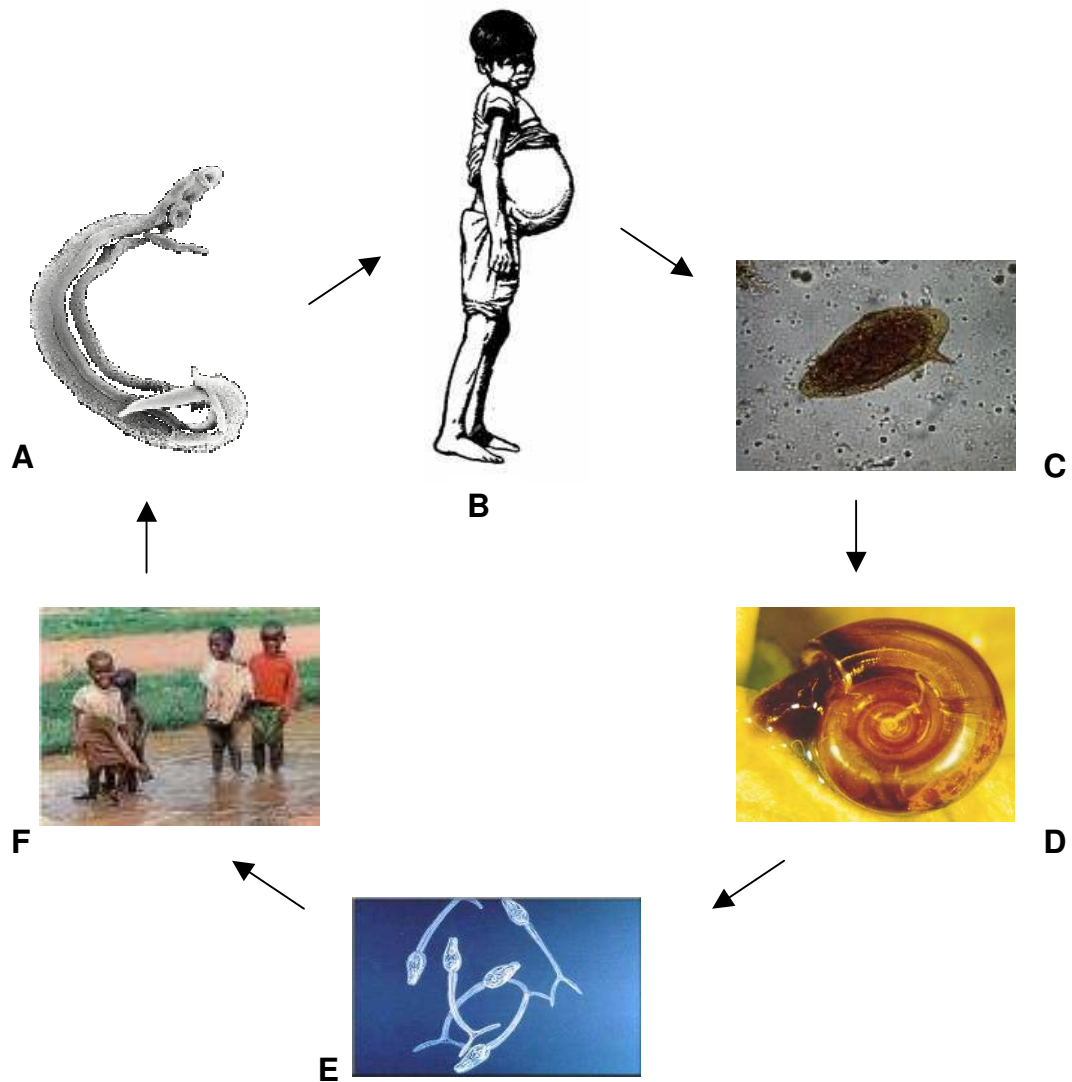
CLICO EVOLUTIVO DO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Figura 1: A – vermes adultos acasalados, de *Schistosoma mansoni*, que vivem nas vênulas mesentéricas. B – Eliminação dos ovos nas fezes dos pacientes. C- Os miracídeos eclodem na água e vão infectar o hospedeiro intermediário do gênero *Biomphalaria*. D- Os miracídeos se desenvolvem no hospedeiro invertebrado formando cercárias no seu interior. E- As cercárias são liberadas na água e penetram através da pele, no hospedeiro vertebrado. F- É através do contato com águas contaminadas com cercárias que o ser humano (hospedeiro vertebrado) adquire a esquistossomose, completando o ciclo biológico.

## **2 JUSTIFICATIVA**

---

## 2 JUSTIFICATIVA

Para que as doenças possam ser devidamente controladas e monitoradas, é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais acurados. Dentre tantas, a esquistossomose, devido à elevada prevalência e incidência, tem sido uma doença cujos esforços para o desenvolvimento de testes diagnósticos melhores e mais sensíveis se justificam.

Os conhecimentos de detalhes inerentes à distribuição, biogeografia e a situação de infecciosidade dos caramujos de água doce são importantes na medida em que esse grupo zoológico inclui espécies hospedeiras intermediárias de parasitas do homem, como *Schistosoma mansoni*. Juntamente com *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) e *B. tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835), *B. straminea* (DUNKER, 1848) formam um grupo que transmite naturalmente a esquistossomose, uma doença endêmica cujos casos ainda são muito freqüentes em vários pontos da Região Neotropical, principalmente do Nordeste e Sudeste brasileiro. O tratamento da esquistossomose é simples, devido à disponibilidade de drogas de ação rápida, em dose única, administradas por via oral (KATZ et al. 1989). O controle da esquistossomose baseia-se em programas públicos de tratamentos quimioterápicos, na conscientização da população e em medidas sanitárias.

O método parasitológico de fezes, segundo a técnica de Kato-Katz (KATZ et al., 1972), é a principal forma de diagnosticar a esquistossomose mansônica. Porém nas áreas onde a doença é de pouca gravidade, com manifestações leves e pouco específicas, sua prevalência fica subestimada (DE VLASS & GRYSSEL, 1992). Isso ocorre por causa da baixa sensibilidade do método de Kato-Katz, que depende



diretamente da quantidade de fezes examinadas e do número de ovos eliminados pelo portador (ENGELS et al., 1996). Existe, uma grande variedade de testes imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose, porém eles apresentam algumas limitações: 1) as reações cruzadas que podem ocorrer com outras helmintoses, faz com que esses testes não sejam específicos; 2) os testes não se correlacionam com a intensidade da infecção; 3) não asseguram se a infecção continua ativa ou não. Além disso, esses testes, podem permanecer positivos durante anos após a cura quimioterápica, não indicando com isso que o paciente necessariamente esteja com uma infecção ativa (SMITHERS; DOENHOFF, 1982; MONTENEGRO, 1992).

A técnica de PCR baseada na detecção de ácidos nucléicos apresenta uma grande sensibilidade e especificidade. O emprego desta abordagem vem ganhando cada vez mais espaço no diagnóstico de vários agentes infecciosos (LUCENA et al., 1998; LEAL et al., 1996, SCHINDLER et al., 2001). Essa abordagem já vem sendo empregada na detecção de DNA específico de *Schistosoma* (HALNET et al., 1997; JANOTTI-PASSOS et al., 1997). Foi utilizado na identificação do parasita em águas contaminadas com caramujos infectados e fezes (HAMBURGER et al., 1998b; PONTES et al., 2002), bem como na detecção de cercárias em amostra de plâncton (HERTEL et al., 2003), e em fezes humans (PONTES et al., 2002). Sendo assim, o emprego de novas abordagens diagnósticas bastante sensíveis e específicas, baseadas em PCR, podem ser potencialmente útil para a detecção do parasita em caramujos, no hospedeiro vertebrado e águas contaminadas, contribuindo para o sucesso do controle da esquistossomose.

## **3 OBJETIVOS**

---

### 3 OBJETIVOS.

#### 3.1 Objetivo Geral:

Desenvolver e validar novos métodos moleculares, tendo como alvo o gene que codifica o Subunidade pequena do RNA ribossomal (SSU rRNA), visando detectar *S.mansoni*.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Alinhar as sequências de SSU rRNA disponíveis de *Schistosoma*, e seus hospedeiros vertebrado e invertebrado;
- Identificar regiões no gene que possam ser utilizadas para o diagnóstico de *Schistosoma* por PCR;
- Desenvolver sistemas diagnósticos sensíveis baseados em “PCR” incluindo nested PCR em um único tubo.
- Avaliar o limiar de detecção e especificidade dos sistemas diagnósticos utilizando DNA purificado de *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, camundongo e seres humanos;
- Avaliar preliminarmente dos métodos com amostras biológicas do hospedeiro invertebrado.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho dos iniciadores dos sistemas baseados PCR

O gene que codifica a subunidade pequena do RNA ribossomal (DNAr 18S) foi selecionado como alvo para detecção através de PCR. Este gene está presente em cerca de 100 cópias por genoma haplóide e apresenta regiões conservadas e variáveis. Para a obtenção das seqüências alinhadas dos genes referentes ao RNAr 18S de *Schistosoma*; *Biomphalaria glabrata*; *Homo sapiens* e *Mus musculus* , foi utilizado o banco mantido pelo Departamento de Sistema Vegetal da Universidade de Biologia de Gent (RUG) na Bélgica (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/ssu/index.html>).

Através da comparação das seqüências alinhadas, foram identificadas regiões bastante conservadas, e regiões muito variáveis, o que permitiu a construção de “primers” universais, e específicos para o parasita. O desenho dos “primers” foi realizado com o auxílio do software Primer Select, Lasergene (Dnastar). Os seguintes parâmetros físico-químicos desejáveis nos iniciadores foram respeitados: ausência de formação de “hairpin” e dímeros, baixa complementaridade interna, estrutura secundária ausente ou restrita, baixa estabilidade da extremidade 3'. Vários iniciadores foram construídos. Suas especificidades e características físico-químicas podem ser observadas na Tabela 2.

## 4.2 Purificação das amostras

Para a obtenção do DNA de camundongos mantidos no Biotério de Criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz, utilizaram-se amostras de fígado destes animais. Os exemplares de caramujos (*Biomphalaria glabrata*) e vermes (*Schistosoma mansoni*), foram provenientes do Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. O DNA humano foi obtido de biópsia cutânea realizada como rotina diagnóstica do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

A purificação de DNA foi realizada com o kit comercial “Genomic Prep Cells and Tissue Isolation Kit” (Amersham Pharmacia Biotech, USA), seguindo-se as instruções do fornecedor. Resumidamente, 10 a 20 mg de tecido foram macerados, homogeneizados e tratados com 600 µl da solução de lise em microtubo Eppendorf de 1,5 ml, e incubado a 65 °C por 15 min. Após a incubação, o lisado foi misturado com 200 µl da solução de precipitação de proteína, vorticidado por 20 s e centrifugado a 13.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo contendo 600 µl de isopropanol a 100% e, em seguida, centrifugado com a mesma rotação anterior por 1 min, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento contendo DNA ressuspendido em 50 µl de H<sub>2</sub>O ultrapurificada Tipo 1 pela ASTM (American Society for Testing and Materials).

### 4.3 Extração de DNA de lotes de 50 caramujos

Vários lotes de caramujos foram processados, incluindo caramujos provenientes de área endêmica; infectados em laboratório e não infectados.

Os caramujos foram sacrificados através da imersão por 30 s em água fervente e as carapaças foram removidas. Em seguida foram excisadas as partes moles referentes à massa cefalopodal e ao componente visceral que incluía o hepatopâncreas e ovoteste (Figura 2). Este material biológico era mantido congelado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a extração de DNA. Para extração de DNA, utilizou-se o método do fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.*(1989), com algumas adaptações de escala. Resumidamente, a amostra tecidual foi macerada, homogeneizada e suspensa em solução de lise (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; SDS 0,5%; Proteinase K 20mg/ml) na proporção de 1,2 ml/g de tecido e incubado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h; em seguida a amostra foi extraída uma vez com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio (1:1) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A cada etapa de extração o homogenato era centrifugado a 5.000 rpm por 7 min. Após, desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em álcool isopropílico absoluto gelado e centrifugado a 5000 rpm por 7 min. O “pellet” foi lavado uma vez com etanol a 70%, centrifugado e seco ao ar, durante 30 min. O sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de TE, incubado durante 1h a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior quantificação. Dois  $\mu\text{l}$  eram utilizados para PCR.

#### 4.4 Análise e quantificação do DNA total

As amostras de DNA extraído foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 2mM), e corados com brometo de etídio, com a finalidade de verificar a integridade e a qualidade da amostra.

A quantificação do DNA foi realizada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro, DU-65, Beckman instruments INC, UV/VIS, Glenrothes, Scotland e Bio-Rad, Model 3550, microplate Reader, E.U.A). O DNA foi estocado a – 20 °C até sua utilização.

#### 4.5 Desenvolvimento e otimização de sistemas de detecção baseados em PCR

Os experimentos de amplificação preliminares foram realizados com o termociclador automático (Touchdown™ Thermal Cycler, Hybaid Limited), e subseqüentemente otimizados no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburger-Germany).

##### 4. 5.1 Composição de iniciadores das abordagens de PCR desenvolvidas

Foram desenvolvidas três modalidades de PCR para detecção de DNA de *S.mansoni*:

- a) PCR simples: os iniciadores utilizados foram Schfo11/ Unvre16 e Schfo17/ Schre19, gerando amplicons de 941e 721 pb, respectivamente.
- b) PCR nested (NPCR) Schfo11 e Unvre16 foram utilizados como iniciadores externos, enquanto que Schfo17 e Schre19 como iniciadores internos.



Alternativamente, foi desenvolvido uma heminested PCR (HNPCR), tendo Schfo17 e Unvre16 como iniciadores externos os primers Schfo17 e Schre19.

a) STNPCR: utilizava os mesmos iniciadores descritos acima. Alternativamente, uma STHNPCR foi desenvolvida com os iniciadores descritos acima para HNPCR.

#### 4.5.2 PCR simples

Foram desenvolvidas e otimizadas duas PCRs simples: uma delas utilizava os iniciadores Schfo11 e Unvre16 (produzindo amplicons de 941 pb) em um protocolo de 30 ciclos (desnaturação, 92 °C por 30 s, anelamento a 65°C por 1 min e extensão a 75 °C por 1 min. A ciclagem era precedida por uma etapa de desnaturação a 92 °C por 5 min, havendo uma extensão a 72 °C de 5 min ao final. A outra PCR utilizava os iniciadores Schfo17 e Schre19 (produzindo amplicons de 721 pb). As condições de ciclagem eram as mesmas descritas acima, exceto a temperatura de anelamento, que era de 58 °C. As misturas das duas reações de amplificação eram compostas de KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA), 50 pmol de cada primer e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µl.

As temperaturas ótimas de anelamento foram definidas por meio de experimentos com gradientes de temperatura de anelamento. A concentração ótima de MgCl<sub>2</sub> na mistura de reação foi estabelecida em experimentos utilizando concentrações variáveis de MgCl<sub>2</sub> (1 - 2,5 mM).

#### **4.5.3 Nested PCR clássica (NPCR)**

Foram utilizados dois pares de primers em duas reações seqüenciais, em tubos diferentes em um total de 60 ciclos (30 ciclos cada). Na primeira reação, Schfo11 e Unvre16 foram utilizados como primers externos, enquanto que na segunda reação, uma alíquota do produto amplificado da primeira PCR (2 µl) serviu como molde para uma nova amplificação utilizando primers (Schfo17 e Schre19) que anelam em região internas ao amplicon produzido na primeira reação. Para que os amplicons gerados na primeira PCR, sejam introduzidos na segunda reação, há necessidade de abrir o tubo da primeira reação. As misturas das reações de amplificação consistiram em KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,2mM (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 50 pmol de cada primer e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Na 1<sup>o</sup> reação, a fase de desnaturação foi realizada a 92°C por 30 s, a de anelamento a 65°C por 1 min e a de extensão a 75°C por 1 min, em um total de 30 ciclos. Na segunda PCR as condições de ciclagem foram quase às mesmas, mudando apenas a temperatura de anelamento para 58°C. Em paralelo, foi desenvolvido uma hemi-Nested (HNPCR). Nessas abordagens, Schfo17/Unvre16 e Schfo17 e Schre19, foram utilizados como pares de iniciadores externos e internos, respectivamente. Schfo17 e Unvre16 produziram um amplicon de 793 pb.

#### **4.5.4 Tentativas iniciais para o seqüestro dos iniciadores internos da primeira etapa de amplificação**

No desenvolvimento da nova variante de PCR nested em um único tubo de reação (STNPCR), onde os iniciadores internos da segunda etapa de amplificação apenas participam da mistura reacional após o término da primeira amplificação,

foram necessárias várias tentativas preliminares que tinham como finalidade o seqüestro dos oligonucleotídeos internos da primeira etapa de amplificação. Várias estratégias foram utilizadas: a) imobilização dos iniciadores internos em diferentes tipos de membranas fixados no topo dos microtubos de reação: polisulfona hidrofílico HT- 200 TUFFYN, poro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Gelman Sciences Inc, Michigan, USA); difluoreto de polivinilideno (PVDF) Durapore, hidrofílico, poro de 22  $\mu\text{m}$  (Millipore corporation, Bedford, MA, USA); celulose pura 3MM, poro de 0,33  $\mu\text{m}$  (Whatman - Bellevue, WA, USA); ésteres mistos de acetato de celulose (nitrato e acetato), hidrofílico, poro de 0,3  $\mu\text{m}$  (Millipore corporation, Bedford, MA, USA); papel de filtro qualitativo, hidrofílico, poro de 14  $\mu\text{m}$  (Prolab<sup>R</sup>, PR, Brasil); b) disposição dos iniciadores internos diluídos em solução aquosa ou apresentando diferentes proporções de água e álcool (etanol e isopropanol), para modificar a solubilidade, tensão superficial e densidade específica. Nesta abordagem 10 – 20  $\mu\text{l}$  de solução contendo os iniciadores eram mantidos sobre diversas interfaces oleosas (óleo mineral, silicone, parafina líquida).

#### **4.5.5 Desenvolvimento da nested PCR em único tubo (“single tube nested PCR - SNTPCR”)**

Os iniciadores internos foram imobilizados na superfície interna da tampa dos microtubos de reação, através da evaporação (em estufa a 37°C) em um volume de 10  $\mu\text{l}$  contendo 50 pmoles de cada iniciador em azul de bromofenol 1 $\mu\text{g/ml}$  (Figura 3 A)

A primeira etapa da SNTPCR (com os primers externos Schfo11 e Unvre16), consistiu em 15 ciclos, compostos por desnaturação (92 °C, por 30 s), anelamento (65 °C, por 45 s) e síntese (72 °C, por 1 min), esses primeiros ciclos da reação

continham apenas 0,1 pmol/ $\mu$ l de iniciadores externos em volume final de 50  $\mu$ l, contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,2mM, (Amersham Pharmacia Biotech, USA) e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Após o 15<sup>o</sup> ciclo de reação foi feita uma breve interrupção a 92 °C, para que fossem feitas repetidas inversões dos tubos, a fim de que os iniciadores internos entrassem em contato com a mistura reacional, passando a participar do segundo estágio da SNTPCR (Figura 2 B). A dissolução na mistura reacional podia ser visualizada pela coloração azulada devido ao azul de bromofenol. O segundo estágio da STNPCR utilizava iniciadores internos e consistia em 45 ciclos (92 °C por 30 s, anelamento a 58°C por 1 min e extensão a 75 °C por 1 min). Em paralelo, foi desenvolvida uma heminested-PCR em único tubo (STHNPCR). Na primeira reação, utilizando como iniciadores externos Schfo17 e Unvre16, foi produzido um amplicon de 793 pb que serviu como molde para a segunda etapa de amplificação. Na segunda reação os iniciadores internos foram Schfo17 (que também participou da primeira etapa) e Schfo19.

A definição da proporção ótima de primers internos e externos foi realizada através de experimentos prévios em que foi fixada uma determinada quantidade para os iniciadores internos (50 pmoles), e para os externos foram feitas diluições de fator 10 variando de 50 a 0,005 pmoles. Foram também utilizados dois controles, um contendo apenas 50 pmoles de iniciadores internos e outro 50 pmoles de iniciadores externos. Este tipo de experimento foi realizado com 1ng e 100pg de DNA de *S. mansoni*.

Com a finalidade de padronizar e facilitar a eluição dos iniciadores imobilizados foi construído um protótipo eletromecânico com o eixo de rotação na horizontal (o equipamento usado foi um “rotator” construído artesanalmente, constituído de um

pequeno rotor alimentado por corrente contínua de 7,5V (Figura 4). Este equipamento permite que tubos de microcentrifuga (com capacidade de 0,5 ml e medindo 3,1 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro externo em sua tampa) fossem fixados de forma que os fundos dos mesmos ficassem voltados para o eixo central de rotação do equipamento. Assim, o movimento giratório do aparelho formava uma roda cujo aro era constituído pela peça de suporte dos tubos de microcentrifuga e cujos raios, dirigidos para o eixo central, eram definidos pelos corpos desses mesmos tubos. Considerando que o nosso “rotator” alcança uma velocidade de 750 rpm e que a distância (raio) entre a tampa do tubo fixado e o centro do eixo de rotação era de 4,2 cm, a força centrífuga relativa (RCF) era de: 26,48 x g na tampa do tubo (raio= 4,2 cm); 16,07x g no terço médio do tubo (raio= 2,55cm); 6,93x g no fundo do tubo (raio= 1,1 cm).

#### **4.5.6 Avaliação da especificidade e limite de detecção**

Inicialmente, avaliamos teoricamente a especificidade dos iniciadores, através do alinhamento múltiplo das regiões correspondentes do gene alvo do parasita e alguns de seus hospedeiros utilizando o Clustal W (<http://www.bi.ac.uk/clustalw/>).

A especificidade dos primers construídos foi confirmada experimentalmente através de amplificações utilizando 1 ng de DNA genômico purificado de várias espécies pertinentes ao estudo, através da técnica de PCR simples, NPCR e STNPCR.

Para definição do limite de detecção foi construída uma curva de calibração a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *S. mansoni*, com o objetivo de avaliar a quantidade mínima de DNA que os sistemas de PCRs ( simples, NPCR e SNTPCR) eram capazes de amplificar. Foram feitas diluições de fator 10,

seriadas, que resultaram nas seguintes concentrações (5 ng/ $\mu$ l, 0,5 ng/ $\mu$ l, 50 pg/ $\mu$ l, 5 pg/ $\mu$ l, 500 fg/ $\mu$ l, 50 fg/ $\mu$ l, 5 fg/ $\mu$ l, 0,5 fg/ $\mu$ l, 0,005 fg/ $\mu$ l, 0,0005 fg/ $\mu$ l). Dois  $\mu$ l de cada diluição eram adicionados nas reações.

#### **4.6 Análise e registro dos resultados**

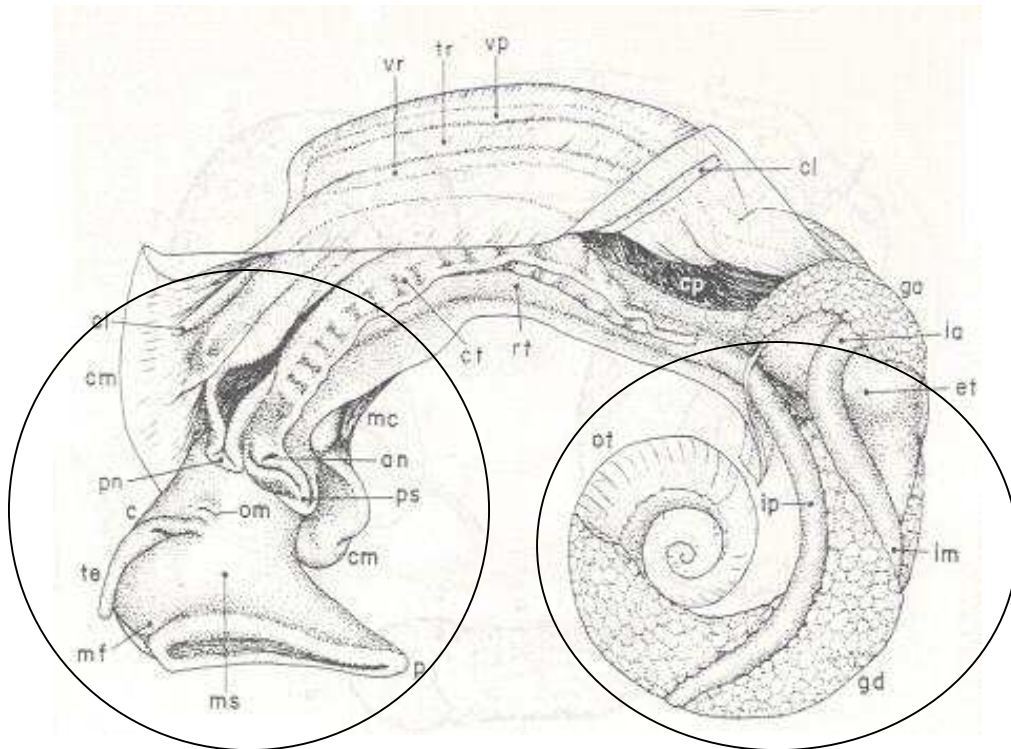
Dez microlitros dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% com coloração pelo brometo de etídio de acordo com metodologia padronizada (Sambrook et al,1989). As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4+ System<sup>TM</sup> (Sigma, St. Louis, MA, USA).

**Tabela 2:** Características dos iniciadores desenvolvidos para detecção de *S.mansoni* utilizados nos sistemas de PCR.

| Primer   | Seqüência              | TM   | Posição de anelamento* | Fita que polimeriza | Especificidade |
|----------|------------------------|------|------------------------|---------------------|----------------|
| Unvfo2   | TGGAGGGCAAGTCTGGTG     | 51,2 | 566-583                | Senso               | Universal      |
| Unvfo4   | CRACTCAACACGGGAAACTCA  | 56,5 | 1303-1324              | Senso               | Universal      |
| Unvre16  | CCGGACATCTAAGGGCATCA   | 54,8 | 1620-1639              | Anti-senso          | Universal      |
| Schfo11  | GTTACGATCAGGACCAGTGT   | 46   | 699-718                | Senso               | Específico     |
| Schfo17  | GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC | 58,1 | 771-792                | Senso               | Específico     |
| Schre 19 | CTAAACGAGCACAGAGGAC    | 44,4 | 1473-1491              | Anti-senso          | Específico     |
| Unvere6  | GGTGAGTTTTCCCGTGTGAGT  | 54,5 | 1303-1326              | Anti-senso          | Universal      |

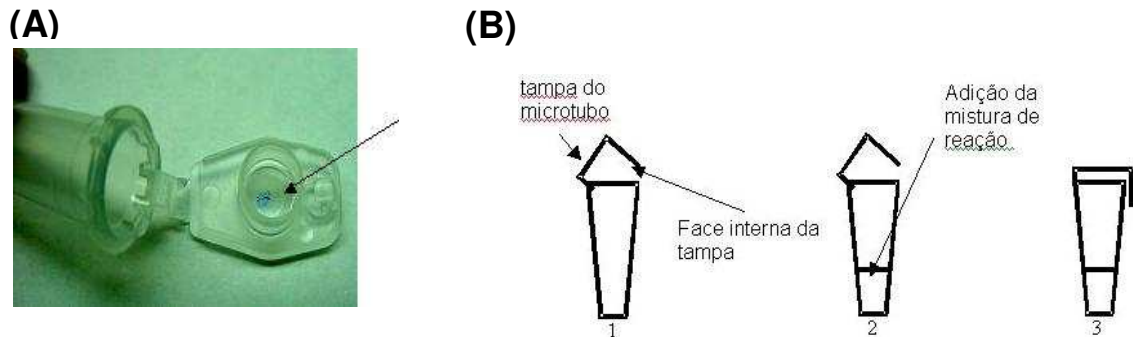
Tm = temperatura de fusão (“melting temperature”).

\* posição nucleotídica na seqüência de DNA ribossomal de *Schistosoma mansoni* (GenBank, número de acesso X53047).

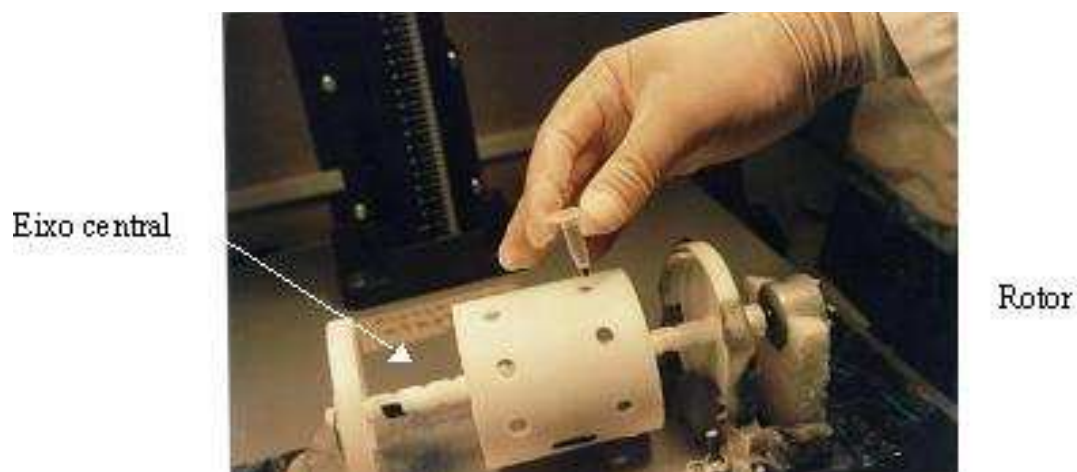


**Figura 2:** Desenho mostrando a parte mole de molusco do gênero *Biomphalaria*, vista do lado esquerdo, com o manto parcialmente levantado. As regiões destacadas foram excisadas (massa cefalopodal e componente visceral incluindo o hepatopâncreas e o ovoteste). Estas regiões foram utilizadas para extração de DNA. an: ânus; c: cabeça; cl: crista dorsolateral; cm: colar do manto; cp: cavidade pulmonar; ct: crista retal; et: estômago; ga: glândula de albúmen; gd: glândula digestiva ou hepatopâncreas; ia: intestino anterior; im: intestino médio; ip: intestino posterior; mc: músculo columelar; mf: mufla; ms: massa cefalopodal; om: orifício genital masculino; ot: ovoteste; p: pé; pn: pneumótorax; ps: pseudobrânquia; rt: reto; te: tentáculo; tr: tubo renal; vp: veia pulmonar; vr: veia renal.





**Figura 3:** Painel A. Iniciadores internos imobilizados na superfície Interna da tampa do microtubo, reação indicado por seta. Painel B. Diagrama mostrando a fixação da solução aquosa de primers na face interna do microtubo aberto através de evaporação (1). Em seguida, a mistura de reação é introduzida (2), sendo o tubo fechado (3), para o início da PCR em único tubo.



**Figura 4:** Protótipo eletromecânico (“rotator”) construído artesanalmente com a finalidade facilitar e padronizar a eluição dos primers fixados na interface interna do tubo de reação. Setas mostram o eixo central e o rotor.

## **5 RESULTADOS**

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação teórica da especificidade

A especificidade teórica dos iniciadores construídos foi avaliada através do alinhamento múltiplo de seqüências de DNA alvo de diversas espécies: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, (Figura 5). Notou-se que as seqüências são bastante divergentes no que se refere às espécies envolvidas na análise, o que possibilitou a seleção de regiões alvos.

### 5.2 Avaliação da proporção de iniciadores externos e internos

A fim de se evitar a competição entre os iniciadores externos e internos pelo DNA alvo, foram realizados experimentos cujo objetivo era o estabelecimento das condições que garantiriam a exaustão dos iniciadores externos ainda durante a primeira etapa de amplificação, de forma que o produto diagnóstico produzido de 721 pb, referente ao amplicon dos iniciadores internos, fosse alcançado de maneira mais eficiente. Utilizando 1 ng e 0,1 ng de DNA genômico, os resultados indicam que a proporção ótima de iniciadores externos e internos na STNPCR era de 0,5 - 5 para 50 pmoles (Figura 6), enquanto que na STHNPCR de 0,5 para 50 pmoles (dados não mostrados). Essas proporções produziram uma banda diagnóstica intensa, na ausência aparente do produto resultante de iniciadores externos. Essas quantidades foram então adotadas nos experimentos subseqüentes.

### 5.3 Avaliação experimental da especificidade dos sistemas baseados em PCR

A análise dos produtos de PCR utilizando DNA genômico de vários organismos (*S.mansoni*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Biomphalaria glabrata*), mostrou que os iniciadores internos (Schfo 17 e Schre 19) e externos (Schfo 11 e Unvre16) desenhados, exibiram especificidade satisfatória (tanto em relação a PCR simples como a PCR Nested), só amplificando de forma eficiente e específica o DNA genômico de *S.mansoni* (Figura 7). Como previsto pelas análises teóricas dos alinhamentos múltiplos de seqüências, as abordagens de PCR desenvolvidas não amplificaram DNA de espécies que são hospedeiros vertebrados (*H. sapiens*, *M. musculus*) e invertebrados (*B. glabrata*) do *S.mansoni*. Os iniciadores Schfo11 e Schre19 amplificaram, um produto de 941 pb, enquanto que os iniciadores Schfo17 e Schre19 produzem um amplicon de 721 pb.

### 5.4 Desenvolvimento de um novo sistema baseado em nested PCR em único tubo

Dentre as diversas técnicas (vide metodologia) testadas para possibilitar o seqüestro de iniciadores da primeira etapa de amplificação possibilitando a STNPCR, a única que apresentou resultados consistentes e reproduzíveis foi a que utilizou a imobilização dos iniciadores internos na interface interna da tampa do tubo de reação. Desta forma esta abordagem foi utilizada para os experimentos de otimização. A técnica que utilizou iniciadores internos imobilizados em diferentes tipos de membranas, não apresentou reprodutibilidade na eluição dos iniciadores quando a membrana entrava em contato com a mistura reacional. Em relação às

tentativas de dispor os iniciadores internos (solução de água e álcool), sobre interfaces oleosas, não foi possível padronizar a introdução dos iniciadores na mistura reacional no momento apropriado para o início da segunda etapa de amplificação.

### **5.5 Sistemas de PCR desenvolvidos: limite de detecção**

A avaliação do limite de detecção das PCRs foi realizada se utilizando uma curva de calibração (fator de diluição 10) com quantidades conhecidas de DNA genômico de *S.mansoni*, que variou de 10 ng a 0,001 fg. O limite de detecção das PCRs simples com iniciadores externos e internos, foi de 1 pg (Figura 8). Usando-se a curva de calibração supracitada, foi avaliado o limiar de detecção da PCR nested convencional e da nova variante de PCR nested em único tubo (STNPCR). A quantidade mínima detectada de DNA genômico purificado pelas PCRs nested convencional e STNPCR foi de 0,1 fg e 1 fg de DNA, respectivamente (Figura 9 ). Por sua vez o limite de detecção da HNPCR convencional também foi de 0,1 fg, enquanto o da STHNPCR foi de 10 fg (Figura 10).

### **5.6 Experimentos preliminares para aplicação ao diagnóstico de infecção em lotes de caramujos infectados experimentalmente ou naturalmente**

Foram coletados 3 lotes de *Biomphalaria glabrata* em diferentes regiões do estado de Pernambuco: região 6 B (Jaboatão dos Guararapes , prevalência da doença de 25-49%; região 7 A (Jaboatão dos Guararapes, prevalência da doença > 50 %) (Figura 11) ; Pau Amarelo (lagoa do Aruá). Para evitar resultados falso positivos

devido aos inibidores de PCR, as amostras foram testadas em diluições diferentes (Figura 12 ). A NPCR foi positiva para as regiões 7A e Pau Amarelo, em algumas diluições. A taxa de infecção do grupo de caramujos coletados em Pau Amarelo era de 22%. Contudo, a taxa de infecção para as amostras coletadas em Jaboatão dos Guararapes não é conhecida. Nos experimentos em que foram utilizados grupos de caramujos infectados experimentalmente com 10 miracídios e não infectados em proporções diferentes, DNA específico de *S.mansoni* foi amplificado pela PCR simples (Figura 13) e NPCR (não mostrado) em lotes independentes de caramujos, compostos por 10 caramujos infectados e 40 caramujos não infectados. Como controle utilizamos 1 lote de 50 caramujos não infectados (dados não mostrados). Estão em andamento experimentos comparativos entre o método convencional de diagnóstico de infecção de caramujos coletados em focos suspeitos de transmissão e as três modalidades de PCR (Ana Lisa V. Gomes, resultados não mostrados).

## Schfo11 5' GTTACGATCAGGACCAGTGT 3'

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| H.sap | GATCTTGGGAGCGGGCGGGCGGTCCGCCGCGAGGCGA-----GCCACCGCCCG-----                      | 877 |
| M.mus | GATCTTGGGAGCGGGCGGGCGGTCCGCCGCGAGGCGA-----GTCACCGCCCG-----                      | 738 |
| S.man | AATCTGGGTCGTGCGGTGCGCATGCCGTTGCTTGTTCACGCGT-TTG <b>GTTACGATCAGGACCAGTGT</b> TTC | 751 |
| B.gla | GATCTCAGGCGCAGGCGGGCGGTCCGCCGCGCGCGG-----CTCACTGCCCG-----                       | 716 |

## Schfo17 5' GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC 3'

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| H.sap | CCCCTTGC-----C   | 886 |
| M.mus | CCCTTGC-----C-   | 747 |
| S.man | CGTGTCTGTGTTA-----AACGGGT <b>GCTGGTG-GGTTGACGAGTTC</b> --- | 792 |
| B.gla | CCCTACCCGT-----  | 726 |

## Schre19 5' GTCCTCTGTGCTCGTTTAG 3'

|       |   |      |
|-------|---|------|
| H.sap | AACGAACGAGACTCTGGCATGCTAACTAG-----TTA-----CGCGACCCCC                              | 1567 |
| M.mus | AACGAACGAGACTCTGGCATGCTAACTAG-----TTA-----CGCGACCCCC                              | 1426 |
| S.man | AACGAACGAGACTTTAACCTGCTAAATAG-----TAGACTG <b>GTCCTCTGTGCTCGTTTAGG</b> GCGCGGCTTCT | 1529 |
| B.gla | AACGAACGAGACTCTAGCCTATTAAATAG-----TTCGC-----CGGTTCTCT                             | 1406 |

## Unvre16 5' TGATGCCCTTAGATGTCCGG 3'

|       |  |      |
|-------|--|------|
| H.sap | CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCTGCACGCGCGCTACACTGA           | 1678 |
| M.mus | CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCTGCACGCGCGCTACACTGA           | 1537 |
| S.man | CAGGTCTCT <b>TGATGCCCTTAGATGTCCGG</b> GGCCACACGTGCGCTACAATGA | 1661 |
| B.gla | CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGA           | 1516 |

Figura 5: Alinhamento múltiplo usando Clustal W de vários segmentos do gene que codifica o rRNA 18S de várias espécies. As seqüências em negrito correspondem à localização dos primers desenhados.



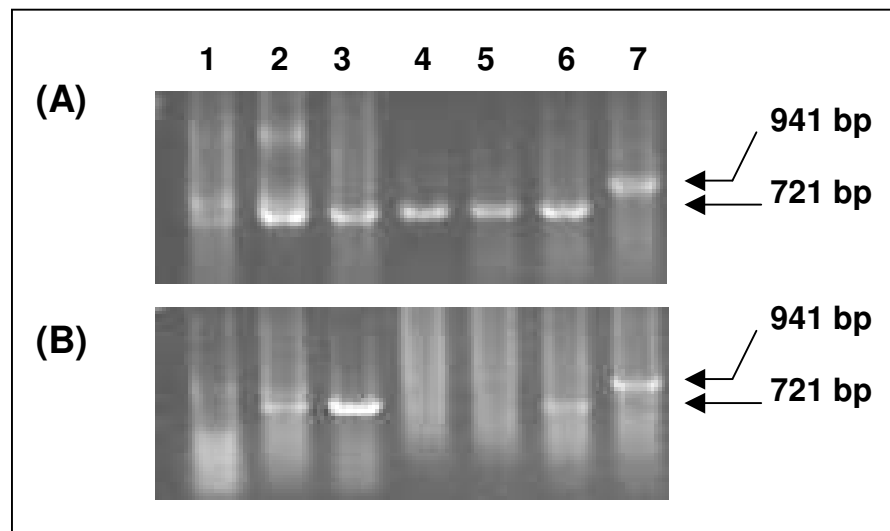


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose mostrando a otimização da proporção de primers na nested PCR em único tubo. Usando DNA de *S. mansoni* A (1 ng) e B (0,1 ng) em diferentes proporções de picomoles de primers externos/internos. Faixa 1, 50:50, Faixa 2, 5:50, faixa 3, 0,5:50, Faixa 4, 0.05:50, faixa 5, 0,005:50, Faixa 6, 0:50, faixa 7, 50:0. As setas indicam o tamanho dos amplicons.

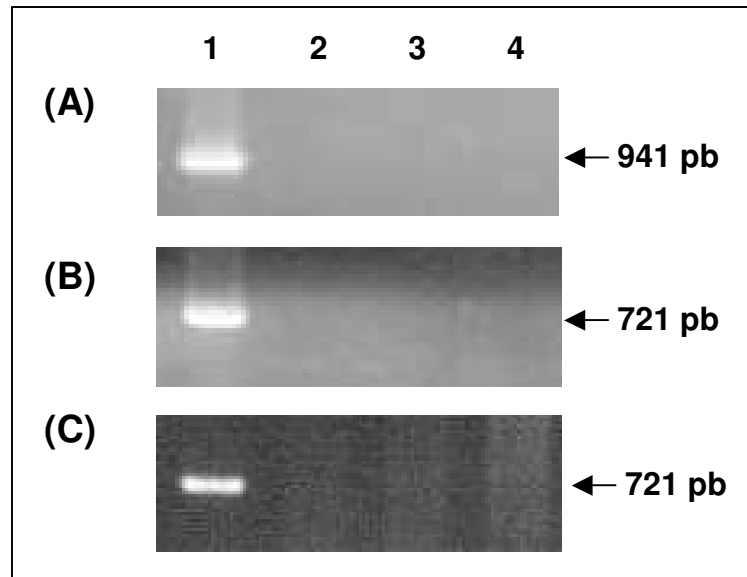


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose mostrando as especificidades por PCR: Painel A, iniciadores externos (Schfo11 x Unvre16) Painel B, iniciadores internos (Schfo17 x Schre19) Painel C, STNPCR. Foi usado 1 ng de DNA genômico de: *S. mansoni* (1) ; *Homo sapiens* (2); *B. glabrata* (3); *Mus musculus* (4). As setas indicam os tamanhos dos amplicons.

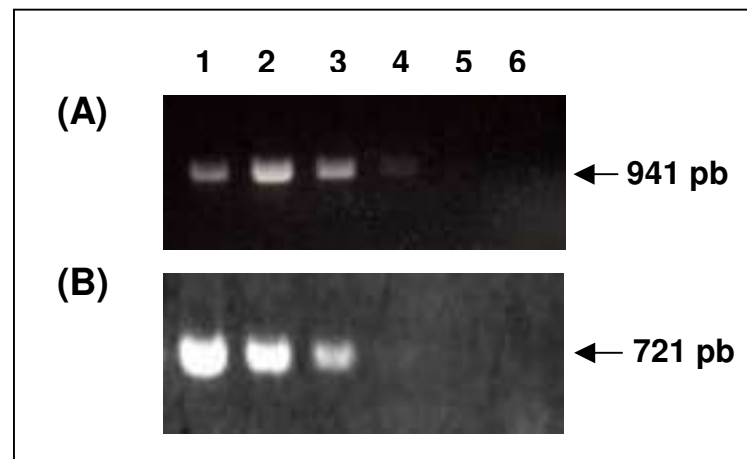


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite das PCR simples utilizado diferentes quantidades de DNA genômico de *S. mansoni* com iniciadores externos (Painel A) e iniciadores internos (Painel B). Faixa 1, 1 ng, Faixa 2, 0,1 ng, Faixa 3, 10 pg, Faixa 4, 1 pg, Faixa 5, 10fg, Faixa 6, 1 fg. As setas indicam o tamanho dos amplicons.

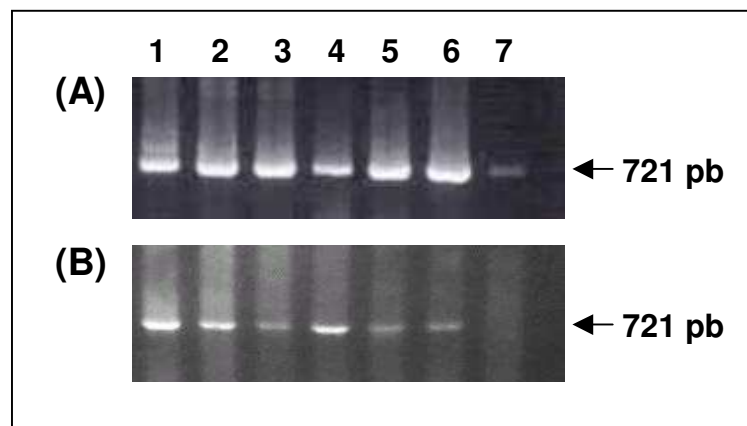


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose utilizando quantidades diferentes de DNA genômico de *S. mansoni*, mostrando o limite de detecção da NPCR (Painel A) e da STNPCR (Painel B). Faixa 1, 0.1 ng, Faixa 2, 10 pg, Faixa 3, 1 pg, Faixa 4, 0.1 pg, Faixa 5, 10 fg, Faixa 6, 1 fg, Faixa 7, 0.1 fg. As setas indicam o tamanho dos amplicons.

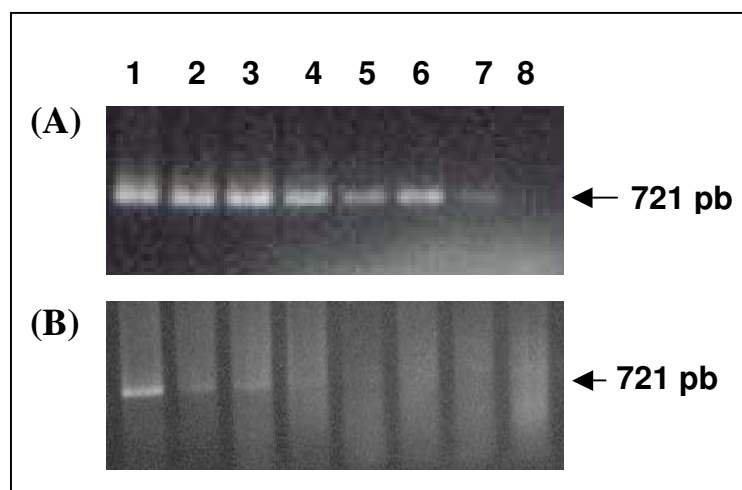


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da HNPCR (Painel A) e da STHNPCR (Painel B), com diferentes quantidades de DNA genômico de *S. mansoni*. Faixa 1, 0.1 ng, Faixa 2, 10 pg, Faixa 3, 1 pg, Faixa 4, 0.1 pg, Faixa 5, 10 fg, Faixa 6, 1 fg, Faixa 7, 0.1 fg. As setas indicam o tamanho dos amplicons.

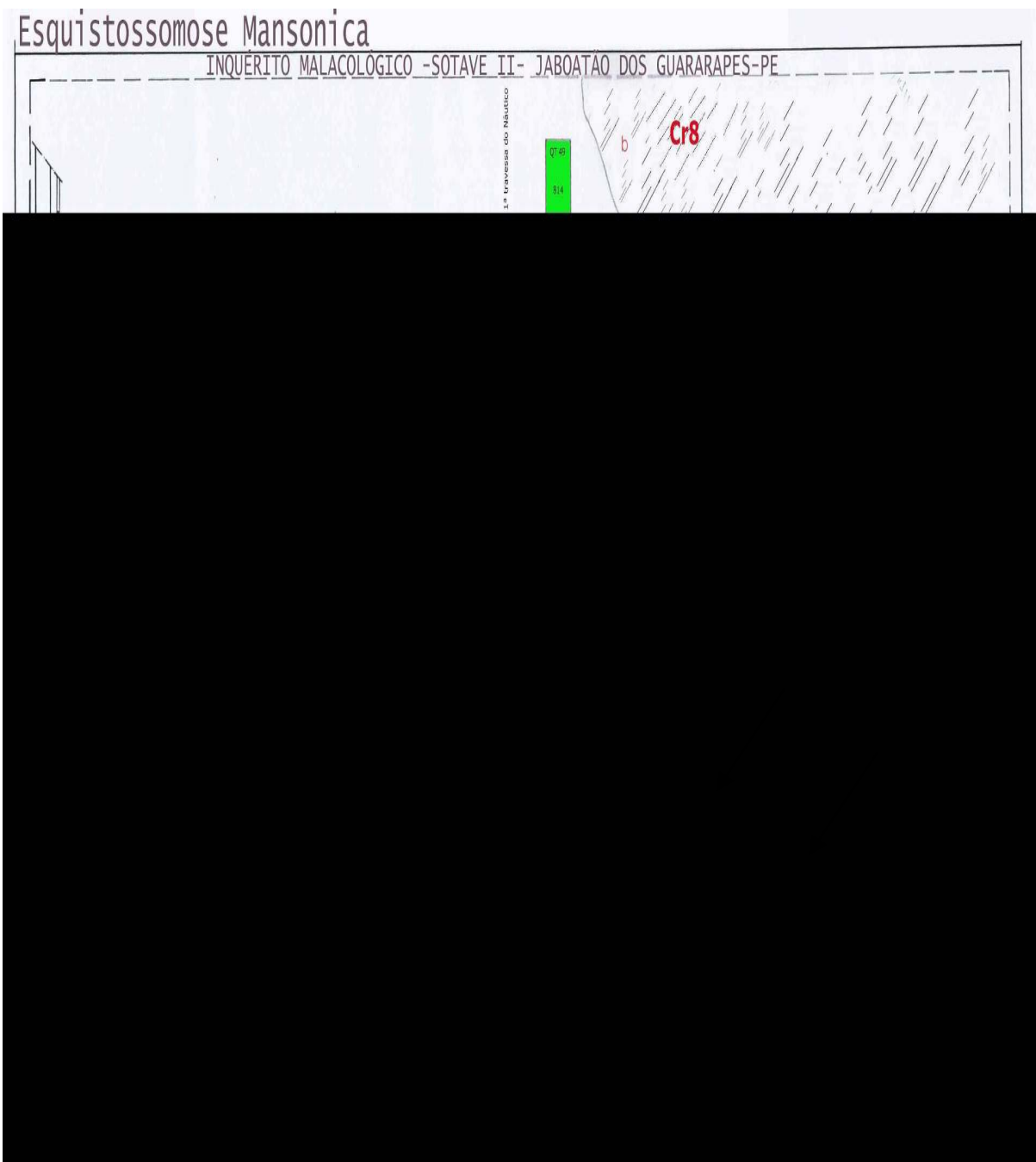


Figura 11: Mapa de Jaboatão dos Guararapes mostrando a localização correspondente à taxa de infecção natural dos moluscos vetores e a prevalência humana por quarteirão. As setas indicam as regiões 6B e 7A referentes às coletas de caramujos.

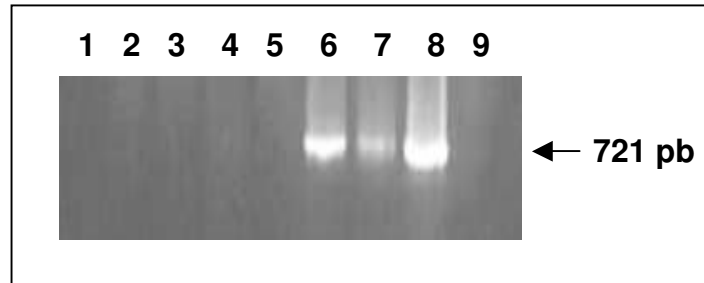


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose mostrando resultados da NPCR (iniciadores externos Schfo11e Unvre 16; iniciadores internos Schfo17 e Schre19) usando DNA purificado de pool de 50 caramujos. As amostras foram purificadas com phenol/clorofórmio e ressuspendidas em 1 ml. Foram usados 2 $\mu$ l em cada PCR: faixa 1, região 6B; faixa 2, região 6B diluição 1:10; faixa 3, região 6B diluição 1:100; faixa 4, região 7 A; faixa 5, região 7A diluição 1:10; faixa 6, região 7 A diluição 1:100; faixa 7, Pau Amarelo, diluição 1:100; faixa 8, Pau Amarelo, diluição 1:1000; faixa 9, controle negativo (H<sub>2</sub>O). A seta indica o tamanho do amplicon.

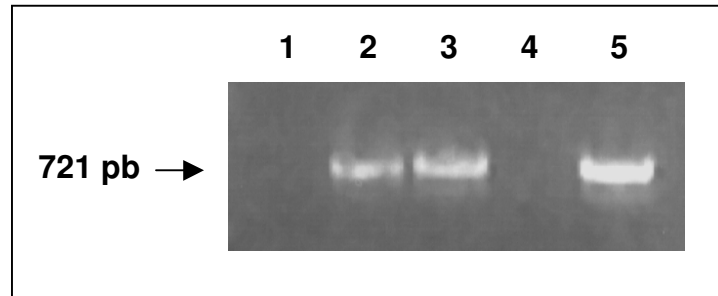


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose mostrando resultados da PCR simples (iniciadores internos Schfo17 e Schre19) usando DNA purificado de pool de 50 caramujos. As amostras foram purificadas com fenol/clorofórmio e ressuspendidas em 1 ml. Foram usados 2 $\mu$ l em cada PCR. Os caramujos foram infectados experimentalmente com 10 miracídios: faixa 1, pool de caramujos não infectados; faixa 2, pool de caramujos não infectados e infectados (40:10); faixa 3, pool de caramujos não infectados e infectados (40:10); faixa 4, controle negativo (H<sub>2</sub>O); faixa 5, controle positivo (1 ng de DNA purificado de *S. mansoni*). A seta indica o tamanho do amplicon.



## **6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

---

## 6 DISCUSSÃO

A abordagem de PCR nested em um único tubo pode ser utilizada em todas as situações em que “primers” externos e internos estejam disponíveis. Isto é particularmente útil para o diagnóstico, onde a sensibilidade é importante e o potencial de contaminação deve ser minimizado.

A PCR convencional é usualmente ineficiente na detecção de alvos moleculares raros, como ocorre em infecções com poucos organismos infecciosos, ou com poucas células cancerosas em uma grande população de células normais. Diversos estudos descreveram a utilização da nested PCR em duas etapas na detecção de organismos infecciosos (LEAL et al., 1996; LUCENA et al., 1998; SCHINDLER et al., 2001). As vantagens da nested PCR são o aumento da sensibilidade e especificidade, juntamente com a diluição de componentes inibidores que podem estar presentes nas amostras biológicas. Por outro lado, a grande desvantagem é o aumento da probabilidade de contaminação de espécimes negativos com “amplicons” derivados de amplificações positivas, pois os tubos de reação contendo concentrações altas de produtos da primeira PCR têm que ser abertos e manipulados para que a segunda amplificação seja realizada (PICKEN et al., 1996).

Para evitar este risco adicional, vários métodos foram desenvolvidos, de forma a que, a primeira e segunda amplificação pudessem ser realizadas em um único tubo, que não precisava ser aberto até o estágio de análise dos amplicons, após a finalização da reação. Uma possível vantagem da PCR nested convencional, em duas etapas, é a diluição de inibidores potenciais da Taq DNA polimerase durante a transferência dos produtos de amplificação da primeira PCR para as novas

reações na segunda etapa de amplificação (PICKEN et al., 1996). Para que a eficiência máxima seja alcançada na STNPCR, os inibidores devem ser removidos através de uma purificação apropriada da amostra. Contudo, a vantagem associada à diminuição do risco de contaminação compensa esta desvantagem. A maioria dos métodos propostos para realização de STNPCR se baseiam na utilização de pares de primers com diferentes conteúdos de G+C, resultando em pares de primers com temperaturas de anelamento bastante diferentes (CHANG et al., 1996; HOMAN et al., 1999; PICKEN et al., 1996; TANG et al., 1997; TRKA et al., 2000; YLITALO et al., 1995; YUEN et al., 1997). No entanto, esta abordagem restringe a seleção de primers. De fato, esta abordagem torna bastante difícil a amplificação de seqüências de DNA alvo, quando as opções para a seleção de regiões alvos são limitadas. Uma outra abordagem envolve a separação física dos componentes da primeira e segunda reações de amplificação, através de uma camada fina de óleo mineral (FÉRAY et al., 1992). Essa abordagem é simples, mas não eficiente, haja vista que freqüentemente há dificuldades em manter os componentes da segunda reação apropriadamente separados durante o tempo necessário para que haja a finalização do primeiro processo de amplificação (dados não mostrados). Outros sistemas são baseados no seqüestro da mistura de reação (incluindo a DNA polimerase termoestável) através da imersão em resina de agarose no interior de uma câmara central construída na tampa do tubo (YOURNO, 1992). Apesar do método ser interessante, o procedimento é trabalhoso, requerendo a utilização de tubos de reação especialmente manufaturados, e placas superiores de resfriamento para proteger a resina gelificada. Além disto, a presença da agarose é estranha à mistura de reação da PCR, podendo interferir com a reação. Os mesmos comentários se

aplicam aos métodos que usam trealose como resina em vez de agarose (WOLFF et al., 1995).

Com o objetivo de superar as limitações das abordagens de STNPCR atualmente disponíveis, desenvolvemos um sistema muito simples, reproduzível e consistente que permite a realização da nested PCR em um único tubo (ABATH et al., 2002). Durante as experimentações foi demonstrado que apenas os oligonucleotídeos internos precisavam ser seqüestrados, e isto foi eficientemente realizado através de um procedimento simples no qual os primers internos eram imobilizados na face interna da tampa do microtubo, sendo facilmente dissolvidos na mistura de reação para participar da segunda etapa de amplificação por meio da inversão do tubo. O sistema desenvolvido é conveniente, pois utiliza reações e ciclagem de PCR convencionais. O primeiro estágio de amplificação inclui concentrações limitantes de primers externos, de forma que estes são exauridos ao fim da primeira PCR. Já que a concentração de primers externos é de apenas 0,1 pmol/ul, a produção do amplicon externo é limitada, embora seja suficiente para servir de molde para o segundo estágio de amplificação. Na primeira amplificação, os primers internos não estão disponíveis para anelamento ao alvo. Por outro lado, na segunda PCR os primers externos praticamente não estão disponíveis, porque foram quase completamente exauridos na primeira amplificação.

Apesar de termos apresentado apenas os resultados da aplicação à detecção de DNA de *Schistosoma*, a abordagem pode ser facilmente adaptada para a detecção de DNA de *Plasmodium* (MONTENEGRO et al., 2004), *Y. pestis* (SOUZA, 2005), *V. cholerae* (MENDES, 2005) e *M. tuberculosis* (Haiana Schindler, resultados não publicados). De fato, a STNPCR pode ser utilizada em todas as situações nas

quais a nested PCR convencional é indicada. Portanto, o sistema de PCR proposto nesta tese pode ser facilmente adaptado ao diagnóstico de outras doenças.

No Brasil, a esquistossomose é causada apenas pelo *Schistosoma mansoni*, e existem três espécies de hospedeiros intermediários: o *Biomphalaria glabrata*, o *B. straminea* e o *B. tenagophila*. Durante o desenvolvimento do ciclo de vida, o *S. mansoni* se diferencia em diversos estágios. Os esquistossomos adultos liberam ovos com as fezes do hospedeiro, que em contato com a água originam os miracídios, os quais são as formas infectivas para os caramujos. Miracídios diferenciam-se em esporocistos imediatamente após a penetração, migrando através dos tecidos do caramujo, originando a cercária. Seres humanos são infectados pelo contato com água infestada com cercárias, as quais são capazes de penetrar ativamente pela pele.

O *Biomphalaria glabrata* é considerado o mais eficiente vetor devido a sua alta susceptibilidade a infecção. Por outro lado, o *B. straminea* é altamente resistente a infecção por *S. mansoni*, e biologicamente menos eficiente na produção de cercárias em comparação ao *B. glabrata* (BARBOSA, 1992). No entanto, o *B. straminea* é importante na transmissão epidemiológica, devido a sua grande distribuição geográfica, e habilidade para invadir e colonizar fontes de água. Na verdade, estas espécies estão presentes em áreas com alta prevalência de esquistossomose (FAVRE et al., 1995).

A identificação dos focos de transmissão de esquistossomose é geralmente realizada através da detecção de focos de água contendo caramujos infectados por *S. mansoni*. A identificação convencional de caramujos infectados é baseada na exposição de caramujos à luz e observação de liberação de cercárias. Alternativamente, eles podem ser esmagados entre duas lâminas de vidro e

observados em microscópio para identificar a presença de esporocistos. Ambas as técnicas descritas acima são simples e baratas, mas consomem tempo e têm alto custo operacional, pois requerem pessoal treinado e estrutura laboratorial apropriada. O processo todo envolve a coleta de caramujos em áreas suspeitas, bem como a manutenção e análise individual dos caramujos.

Apesar de técnicas baseadas em PCR terem sido amplamente relatadas para o diagnóstico de vários patógenos infectantes, as aplicações para detecção de *S. mansoni* têm sido escassas. No contexto, uns poucos estudos foram publicados sobre a detecção de parasitas em caramujos (HAMBURGER et al., 1998a; HANELT et al., 1997; JANNOTTI-PASSOS et al., 1997), monitoramento de cercárias na água (Hamburger et al., 1998b), e diagnóstico da infecção em humanos (PONTES et al., 2002). No entanto, as abordagens potencialmente úteis na identificação de focos de transmissão (Hamburger et al., 1998a; Hanelt et al., 1997; Jannotti-Passos et al., 1997), não foram apropriadas para uso em larga escala, ou formalmente validadas em áreas endêmicas. A sensível e precisa identificação de locais de transmissão de esquistossomose pela detecção da infecção no caramujo vetor é da maior importância no controle da doença. Este trabalho relata o desenvolvimento de técnicas baseadas em PCR sensíveis e específicas para a detecção da infecção por *S. mansoni* em pools de caramujos. Estes sistemas são potencialmente úteis para o monitoramento em larga escala de focos de transmissão em áreas endêmicas.

A identificação dos focos de transmissão para esquistossomose, como já mencionado, é geralmente realizada pela detecção de caramujos infectados por *S. mansoni* na água. No entanto a detecção da liberação de cercárias só é possível após 30 dias de infecção (BARBOSA, 1992), resultando na subestimação da prevalência da infecção. Além disso, a distinção de cercárias de *S. mansoni* das de

outros trematódeos é necessária e algumas vezes não é fácil. Em particular no caso do *B. straminea*, o exame de vários caramujos de áreas endêmicas pode resultar negativo (BARBOSA; SILVA, 1992; FAVRE et al., 1995). Com relação a isso, um atraso na liberação de cercárias ou localização ectópica de esporocistos pode ocorrer em caramujos menos susceptíveis (RICHARDS et al. 1992). Além disto, os caramujos podem morrer antes de poderem ser examinados (HALNET et al 1997). Claramente os métodos convencionais de detecção de focos de transmissão apresentam limitações, particularmente quando o vetor de transmissão envolvido é o *B. straminea*.

Foram desenvolvidos cinco sistemas sensíveis e extremamente específicos para detecção de *S. mansoni*: PCR convencional, NPCR, STNPCR, HNPCR e STHNPCR. O limite de detecção obtido para PCR convencional foi de 10 pg de DNA genômico de *S. mansoni*. NPCR e STNPCR foram mais sensíveis do que a PCR convencional, mostrando limites de detecção de 0.1 e 1 fg de DNA de parasita, respectivamente. Logo STNPCR e NPCR são potencialmente 100 a 1000 vezes mais sensíveis do que PCR convencional, respectivamente. Por sua vez o limite de detecção da HNPCR convencional também foi de 0,1 fg, e o da STHNPCR foi de 10 fg. Foi mostrado previamente que a extração de DNA de 10 miracídios de *S. mansoni* produz aproximadamente 0,45 ng (JANNOTTI-PASSOS et al., 1997). Estima-se que um miracídio possui aproximadamente ~ 45 pg de DNA. Considerando-se que o genoma de *S. mansoni* contém cerca de 580 fg de DNA, teoricamente nosso sistema de PCR pode detectar DNA correspondente a menos de 1 miracídio; e as variantes de NPCR podem detectar DNA correspondente a menos de uma única célula do parasita multicelular *S. mansoni*.

Já havíamos mencionado rapidamente que alguns artigos publicados relatavam o desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de infecção por *S. mansoni* em caramujos. Uma nested PCR tendo como alvo o rDNA 18s de *S. mansoni* foi desenvolvida para detecção de *S. mansoni* em caramujos infectados (HANELT et al., 1997). Em outro estudo, primers foram desenhados baseados em seqüências de DNA altamente repetitivas e organizadas; e um ensaio de PCR foi desenvolvido para a identificação de cercárias na água (HAMBURGER et al., 1998b) e detecção de infecção precoce de prepatente *S. mansoni* em caramujos (HAMBURGER et al., 1998a). O uso de amplificação por PCR de minissatélites repetidos do DNA mitocondrial de *S. mansoni* foi proposto para identificar caramujos infectados (JANNOTTI-PASSOS et al., 1997). Como as duas últimas abordagens resultam num perfil em forma de escada refletindo a amplificação de repetições postas em tandem (HAMBURGER et al., 1998a; JANNOTTI-PASSOS et al., 1997), existe a possibilidade de variação no perfil, devido a variabilidade genética, causando dificuldades para o uso destes procedimentos em larga escala. Assim, investigações adicionais são necessárias para entendimento mais completo da especificidade do método e para demonstrar a possibilidade do uso destes em locais de transmissão natural.

É crucial que estes ensaios discriminem *S. mansoni* em meio a outros parasitas que eventualmente co-existam em caramujos naturalmente infectados causando problema para o diagnóstico morfológico diferencial (CHINGWENA et al., 2002; HERTEL et al., 2003; THIENGO et al., 2004). Assim, atenção especial deve ser dada para as regiões alvo para que a infecção de caramujos por *S. mansoni* seja detectada com alta especificidade. Os sistemas de PCR desenvolvidos durante a tese foram altamente específicos para a detecção de DNA de *S. mansoni*, não



amplificando, como esperado, DNA de hospedeiros vertebrados ou invertebrados do parasita. Além do mais, parasitas relacionados com *S. mansoni* foram analisados, tais como *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum*, *cercaria minensis*, *cercaria macrogranulosa*, *cercaria caratinguensis* e *Echinostoma paraensis* (Ana Lisa V. Gomes, resultados não publicados). O sistema de PCR composto pelos primers Schfo11 e Unvre16 amplificou apenas DNA de *S. mansoni*, enquanto que o uso do par de primers Schfo17 e Schre19 foi menos discriminativo, amplificando o DNA de *S. mansoni*, *S. bovis*, e *S. haematobium*. O uso dos primers Schfo11 e Unvre16 (primers externos) e Schfo17 e Schre19 (primers internos) na nested PCR resultou na amplificação apenas de *S. mansoni* e *S. haematobium*. Nenhum dos outros trematodos foi amplificado por este sistema. Logo, os primers usados, particularmente Schfo11 e Schfo17, são extremamente discriminativos e os sistemas desenvolvidos podem ser usados para detectar especificamente *S. mansoni*, apesar de que no formato nested PCR, DNA de *S. haematobium* também pode ser detectado. Nós desenhamos um outro par de primers para ser usado em PCR quantitativa em tempo real que amplifica especificamente DNA de *S. mansoni* (Abath et al., resultados não publicados). Para maiores investigações da especificidade dos “primers”, realizamos uma análise teórica alinhando várias seqüências rDNA 18S de representantes de famílias de parasitas que comumente infectam *Biomphalaria* no Brasil. Entretanto, é necessário que um número maior de cercárias não pertencentes ao gênero *Schistosoma* sejam testados para uma avaliação mais completa da especificidade dos ensaios.

Apesar de já ter sido demonstrado que o pool de DNA purificado de caramujos individuais pode ser usado para PCR (HAMBURGER et al., 1998a), a purificação de DNA de um pool de caramujos, seguido por PCR seria mais

apropriado para análise em larga escala em áreas endêmicas, pois evita que cada caramujo seja processado individualmente. Muito recentemente, um sistema de PCR que apresentava como alvo uma seqüência de DNA tandem, denominada Dra I, no genoma de *S. haematobium* foi usada para estudo da dinâmica da infecção do caramujo em áreas endêmicas de *S. haematobium* (HAMBURGER et al., 2004). No entanto, era específico para *S. haematobium* e foi baseada na purificação de DNA de caramujos individuais, e o sistema não foi considerado prático para o uso em campo por estes autores. No presente artigo, métodos de purificação foram adaptados para processamento de pools de 25-50 moluscos de *B. glabrata*. Isto diminui os custos e permite o uso de ferramentas moleculares de detecção em larga escala num contexto custo benefício favorável. Todo o processo de diagnóstico, incluindo a extração de DNA pode ser completado em 1 dia. Apesar do custo por reação continuar relativamente alto, os reagentes e equipamentos para técnicas moleculares estão ficando mais baratos, fazendo a discussão a cerca dos altos custos se tornar menos relevante. Estudos comparativos de seqüências de DNA 18S de *Schistosoma* têm mostrado grande homologia entre as espécies (JOHNSTON et al., 1993). A grande especificidade do nosso sistema resulta de uma seleção criteriosa dos sítios primários das regiões do gene rDNA18S. Os sistemas de PCR publicados previamente objetivando a detecção do DNA de *S. mansoni* apresentaram limites de detecção que variavam de (1fg a 10 pg), sendo capazes de detectar estágios muito iniciais de infecção prepatente em caramujos (HAMBURGER et al., 1998a; HANELT et al., 1997; JANNOTTI-PASSOS et al., 1997). Como nossos sistemas têm limites de detecção, é esperado que tenham a mesma capacidade de detectar infecções prépatente, apesar de não termos formalmente investigado essa questão.

Em conclusão, os sistemas descritos aqui são sensíveis, específicos, e podem ser usados para detectar DNA de parasita em pool de caramujos. Estamos atualmente desenvolvendo uma PCR quantitativa em tempo real para detecção de *S. mansoni*, com a vantagem adicional de estimar a carga parasitária de infecção. No entanto, estudos validativos em áreas endêmicas são cruciais para investigar completamente o potencial das ferramentas descritas para monitoramento confiável dos focos de transmissão, com benefícios para o controle da esquistossomose.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, Dec. 2002.

ALARCON DE NOYA, B. et al. The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 139-146, Mar./Apr. 1999.

ALBERTS, B. et al. Tecnologia do DNA recombinante. In: \_\_\_\_\_. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 7. p.291-334.

ALKAMI BIOSYSTEMS. **Alkami quick guide™ for PCR**. United States of America: Alkami Biosystems Inc., 1999. p. 63-65.

AZEVEDO, F. M.; MITNE, M.; MAGALHÃES, V. D. The use of a novel amplification tool for molecular diagnosis of challenging samples. **Einstein**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 20-22, Jan./ Mar. 2004.

BARANY, F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 1, p. 189-193, Jan. 1. 1991.

BARBOSA, C. S. Methods for malacological work in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, suppl. 4, p. 311-312, 1992.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B. Epidemiologia da esquistossomose mansônica no Engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 83-87, Jan./Mar. 1992.

BARNES, W. M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 6, p. 2216–2220, Mar. 15. 1994.

BARRETO, M. L.; SMITH, D. H.; SLEIGH, A. C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 84, n. 4, p. 554-555, July/Aug. 1990.

BOST, D. et al. Enzymatic characterization of *Thermotoga maritima* DNA polymerase and a truncated form, Ultra DNA polymerase. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 8, p. A1395, 1994.

CHAMBERLAIN, J. S. et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 23, p. 11141–11156, Dec. 9. 1988.

CHAN, C. et al. Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 49, n. 4, p. 290-294, Apr. 1996.

CHENG, S. et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 12, p. 5695–5699, June 7. 1994.

CHERNESKY, M. A. et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis urethral infection in symptomatic and asymptomatic men by testing first-void urine in a ligase chain reaction assay. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 170, n. 5, p. 1308-1311, Nov. 1994.

CHESKY, M. et al. Diagnóstico molecular das infecções do Sistema Nervoso Central pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 131-136, 1998.

CHINGWENA, G. et al. Susceptibility of freshwater snails to the amphistome calicophoron microbothrium and the influence of the species on susceptibility of bulinus tropicus to schistosoma haematobium and schistosoma. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 3, p. 880-883, Oct. 2002.

CLINE, J.; BRAMAN, J.; HOGREFE, H. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 18, p. 3546–3551, Sept. 15. 1996.

COMPTON, J. Nucleic acid sequence-based amplification. **Nature**, London, v. 350, n. 6313, p. 91–92, Mar. 7. 1991.

COYLE, M. B. et al. Laboratory aspects of "Mycobacterium genavense," a proposed species isolated from AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 12, p. 3206-3212, Dec. 1992.

DE CLERCQ, D. et al. Assessment of cure by detection of circulating antigens in serum and urine, following schistosomiasis mass treatment in two villages of the Office du Niger, Mali. **Acta Tropica**, Basel, v. 68, n. 3, p. 339-346, Dec. 1997.

DE JONGE, N. et al. Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 82, n. 4, p. 591-594, 1988.

DE JONGE, N. et al. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Transactions of the**

**Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 85, n. 6, p. 756-759, Nov./Dec. 1991.

DE VLAS, S. J.; GRYSCELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 8, n. 8, p. 274-277, Aug. 1992.

DEELDER, A. M. et al. Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infection by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Tropical and Geographical Medicine**, Amsterdam, v. 46, n. 4, p. 233-238, 1994.

DEELDER, A. M. et al. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. **Experimental Parasitology**, New York, v. 50, n. 1, p. 16-32, Aug. 1980.

DESLANDES, N. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 371-382, 1951.

DIAS, L. C. S. et al. Field trials for immunodiagnosis with reference to *Schistosoma mansoni*. In: BERGQUIST, N. R. (Org.). *Immunodiagnostic Approaches in Schistosomiasis*. Chichester: John Wiley & Sons, 1992. p. 39-47.

DUMLER, J. S. et al. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, May. 1995.

DUPIN, N. et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. **AIDS**, London, v. 16, n. 18, p. 2419-2424, Dec. 6. 2002.

EBRAHIM, A. et al. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 6, p. 706-708, Dec. 1997.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 322, n. 3, p. 178-183, Jan. 18. 1990.

ENGELS, D. et al. Intraspecimen fecal egg count variation in *Schistosoma mansoni* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 5, p. 571-577, Nov. 1997.

ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSSEESL, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 54, n. 4, p. 319-324, Apr. 1996.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 252, n. 5013, p. 1643-1651, June 21. 1991.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 6, p. 569-576, Nov./Dec. 2001.

FAVRE, T. C. et al. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 5, p. 565-567, Sept./Oct. 1995.

FERAY, C. et al. Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 89, n. 4, p. 1361-1365, Apr. 1992.

FREY, B.; SUPPMAN, B. Demonstration of the expand(tm) PCR system's greater fidelity and higher yields with a *lacl*-based PCR fidelity assay. **Biochemica**, Heidelberg, v. 2, p. 34-35, 1995.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Esquistossomose Mansônica. In: \_\_\_\_\_. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5. ed. Brasília, DF: FUNASA, 2002. p. 275-186.

GELFAND, D. H. Taq DNA Polimerase. In: ERLICH, H. A. (Org.), **PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton Press, 1989. p. 17-22.

GIBBS, R. A. et al. Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. **Genomics**, San Diego, v. 7, n. 2, p. 235-244, June 1990.

GILLILAND, G. et al. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, n. 7, p. 2725-2729, Apr. 1990.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 386-401, Dec. 2001.

GRYSEELS, B., DE VLAS, S. J. Worm burdens in schistosome infections. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 115-119, Mar. 1996.

GUATELLI, J. C. et al. Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by multienzyme reaction modeled after retroviral replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 5, p. 1874-1878, Mar. 1990.



HALASSOS, A. et al. Modification of enzymatically amplified DNA for detection of point mutations. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 3606, May 11. 1989.

HAMBURGER, J. et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 872-876, Dec. 1998a.

HAMBURGER, J. et al. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 468-473, Sept. 1998b.

HAMBURGER, J. et al. Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 71, n. 6, p. 765-773, Dec. 2004.

HAMILTON, J. V.; KLINKERT, M.; DOENHOFF, M. J. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. **Parasitology**, London, suppl. 117, p. S41-S57, 1998.

HANELT, B. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 387-394, June 1997.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-994, Oct. 1996.

HERTEL, J.; HABERL, B.; HAMBURGUER, J. H. W. Description of a tandem repeated DNA sequence of *Echinostoma caproni* and methods for its detection in snail and plankton samples. **Parasitology**, London, v. 126, pt. 5, p. 443-449, May 2003.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, Aug. 15. 1991.

HOMAN, W. et al. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. **Parasitology**, London, v. 85, n. 8-9, p. 707-712, Aug. 1999.

INNIS, M. A. et al. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 24, p. 9436–9440, Dec. 1988.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization on PCRs. In: INNIS, M. A. (Org.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. cap. 1.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, Oct. 1972.

JANNOTTI-PASSOS, L. K. et al. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 395-399, June 1997.

JOHNSTON, A.; KANE, R. A.; ROLLINSON, D. Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. **Parasitology**, London, v. 107, pt. 2, p. 147-156, Aug. 1993.

JONES, M.; FOULKES, N. Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 20, p. 8387– 8388, Oct. 25. 1989.

KALEDIN, A. S.; SLIUSARENKO, A. G.; GORODETSKII, S. I. Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. **Biokhimiia**, Moskva, v. 45, n. 4, p. 644-651, Apr. 1980.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 397-400, Nov./Dec. 1972.

Katz, N.; Dias, E.P.; Souza, C.P.; Bruce, J.I.; Coles, G.C. Rate of Action of schistosomicides in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 183-186, 1989.

KLEPPE, K. et al. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 56, n. 2, p. 341-361, Mar. 14. 1971.

KÖHLER, T. D. et al. **Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: Nonradioactive PCR Methods**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 165.

KWOH, D. Y. et al. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich

hybridization format. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 4, p. 1173-1177, Feb. 1989.

LAGE, A. P. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of the *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2752-2756, Oct. 1995.

LAU, R. et al. Epstein-Barr virus productive cycle gene expression *in vivo*. **Inserm Colloquium**, Paris, v. 225, p. 203-209, 1993.

LAURE, F. et al. Detection of HIV 1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet**, London, v. 2, n. 8610, p. 538-541, Sept. 3. 1988.

LEAL, N. C. et al. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 371-373, Sept./Oct. 1996.

LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 339-342, Nov./Dec. 1999.

LEE, M. S. et al. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. **Science**, Washington, v. 237, n. 4811, p. 175-178, July 10. 1987.

LING, L. L. et al. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 1, n. 1, p. 63-69, Aug. 1991.

LIZARD, P. M. et al. Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. **Biotechnology**, Stoneham, v. 6, p. 1197-1202, 1998.

LLOP, P. et al. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2071-2078, May 2000.

LUCENA, W. A. et al. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from microfilaraemic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 92, n. 3, p. 290-293, May/June 1998.

LUNDBERG, K. et al. High-fidelity amplification using a thermostable polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-6, Dec. 1. 1991.

MARIELLA, R. Development of a battery-powered, hand-held, real-time PCR instrument. **Biomedical Instrumentation Based on Micro- and Nanotechnology**, Bellingham, v. 4265, p. 58-64, May 2001.

MATHIS, A. et al. Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 7, p. 1691-1695, July 1997.

MCCARTHY, K. P.; SLONE, J. P.; WIEDERMAN, L. M. Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 43, n. 5, p. 429-432, May 1990.

MEAD, D. A. et al. Bst DNA polymerase permits rapid sequence analysis from nanogram amounts of template. **Biotechniques**, Natick, v. 11, n. 1, p. 76-78, 80, 82-87, July 1991.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. cap. 22.

MENDES, C. A.; LEAL, N. C. **Padronização da Técnica de Nested PCR em único tubo para diagnóstico de Cólera**. Recife: UPE, 2005. Originalmente apresentada como dissertação de curso de especialização, Universidade de Pernambuco, 2005. 39 p.

METZKER, M. L.; ALLAIN, K. M.; GIBBS, R. A. Accurate determination of DNA in agarose gels using the novel algorithm GelScann (1.0). **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 187-194, Apr. 1995.

METZKER, M. L.; CASKEY, C. T. Polymerase Chain Reaction (PCR). **Encyclopedia Of Life Sciences**. Nature Publishing Group, 2001. Disponível em: <<http://www.els.net>> Acesso em: 1 Oct. 2005.

MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, London, v. 77, n. 3, p. 281-302, Dec. 1978.

MONTENEGRO, L. M. et al. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 10, p. 619-625, Oct. 2004.

MONTENEGRO, S. M. L. . Immunodiagnosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 87, n. 4, p. 333-335, 1992.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MYERS, T. W.; GELFAND, D. H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. **Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 31, p. 7661–7666, Aug. 1991.

NATHANS, D.; SMITH, H. O. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 44, p. 273-293, 1975.

OLMOS, A. et al. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1564-1565, Mar. 15. 1999.

PANTAZAKI, A. A.; PRISTA, A. A.; KYRIAKIDIS, D. A. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 1, p. 1-12, Jan. 2002.

Pantazaki, A. et al., **Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus***. Appl. Microbiol. Biotechnol. Greece v. 58, n. 1, p. 1-12. Jan. 2002

PERLER, F.; KUMAR, S.; KONG, H. Thermostable DNA polymerases. **Advances in protein chemistry**, New York, v. 48, p. 377-435, 1996

PICKEN, M. M. et al. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**. Wiesbaden, v. 15, n. 6, p. 489-498, June 1996.

PIGNON, J. M. et al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K**, Baltimore, v. 4, n. 2, p. 83-86, Feb. 1990.

PINHEIRO, S. M. B. et al. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of northeastern Brazil by a Polymerase Chain Reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 2, p. 221-224, Feb. 2004.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, n. 2, p. 157-162, Feb. 2002.

REY, L. *Schistosoma* e esquistossomose: epidemiologia e controle. In: \_\_\_\_\_. Parasitologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 35, p. 389-410.

RICHARDS, C. S.; KNIGHT, M.; LEWIS, F. A. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology today**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 171-174, May 1992.

RIVAS, M. A., HARBOUR, M. G. MaRTE OS: An ada kernel for real-time embedded applications. **Lecture Notes In Computer Science**, London, v. 2043, p. 305-316, springer 2001.

ROBERTS, T. C. G. A.; STORCH, G. A. Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 1, p. 268-269, Jan. 1997.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 21, p. 6409-6412, Nov. 11. 1990.

SAIKI, R. K. et al. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, London, v. 324, n. 6093, p. 163-166, Nov. 13-19. 1986.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dec. 20. 1985.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 29. 1988.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARKAR, G.; SOMMER, S. More light on PCR contamination. **Nature**, London, v. 347, n. 6291, p. 340-341, Sept. 27. 1990.

SCHACHTER, J. et al. Ligase chain reaction to detect *Chlamydia trachomatis* infection of the cervix. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 10, p. 2540-2543, Oct. 1994.

SCHARF, S. J.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified sequences. **Science**, Washington, v. 233, n. 4768, p. 1076-1078, Sept. 5. 1986.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Eppendorf North America, Apr. 8. 2003. Disponível em: [http://www.eppendorfna.com/applications/PCR\\_appl\\_protocolsMC.asp](http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp) acesso em: 3 Nov. 2005.

SCHINDLER, H. C. et al. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 355-361, Oct. 2001.

SEEP, S. et al. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 47, n. 4, p. 318-323, Apr. 1994.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, Oct. 1997.

SMITHERS, S. R.; DOEDNHOF M. J. Schistosomiasis. In: COHEN, S.; WARREN, K. S. (Org.). Immunology of parasitic diseases. Oxford: Blackwell Scientific, 1982. p. 527-607.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 98, n. 3, p. 503-517, Nov. 5. 1975.

SOUZA, G. T.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. **Avaliação da técnica Nested – PCR Tbu para aplicação no diagnóstico da peste**. Recife: CPqAM, 2005. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Centro de Pesquisas Aggeu, 2005. 64 p.

STETLER-STEVENSON, M. et al. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. **Blood**, New York v. 72, n. 5, p. 1822-1825, Nov. 1988.

TAN, S. H.; TAN, B. H.; GOH, C. L. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA using PCR in cutaneous tuberculosis and tuberculids. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 122-127, Feb. 1999.

TANG, X. et al. A single-tube nested PCR for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1597-1599, June 1997.

TAO, S. C. et al. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 179-183, Feb. 2004.

TAYLOR, C. et al. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochemical Journal**, London, v. 291, pt. 2, p. 493-504, Apr. 15. 1993.

THIENGO, S. C.; MATTOS, A. C.; BOAVENTURA, F. M.; LOUREIRO, M. S.; SANTOS, S. B.; FERNANDEZ, M. A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni

in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V - Norte Fluminense Mesoregion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, suppl. 1, p. 99-103, Aug. 2004.

TOYODA, H. et al. Comparison of serum hepatitis C virus RNA concentration by branched DNA probe assay with competitive reverse transcription polymerase chain reaction as a predictor of response to interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C patients. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 48, n. 4, p. 354-359, Apr. 1996.

TRKA, J.; DIVOKY, V.; LION, T. Prevention of product carry-over by single tube two-round (ST-2R) PCR: application to BCR-ABL analysis in chronic myelogenous leukemia. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 22, p. 4736-4737, Nov. 25. 1995.

URDEA, M. S. Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for the direct and quantitative detection of CMV, HVB, HCV and HIV. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 39, n. 4, p. 725-726, Apr. 1993.

VAN LIESHOUT, L. et al. Analysis of worm burden variation in human *Schistosoma mansoni* infections by determination of serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 172, n. 5, p. 1336-1342, Nov. 1995.

WALKER, G. T. et al. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 1, p. 392-396, Jan. 1. 1992.

WALKER, G. T. et al. Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 1691-1696, Apr. 11. 1992.

WITTEWER, C. T. et al. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. **BioTechniques**, Natick, v. 22, n. 1, p. 176-181, Jan. 1997.

WOLFF, C. et al. Single-tube nested PCR with room-temperature-stable reagents. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 4, n. 6, p. 376-379, June 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. In: \_\_\_\_\_. Tropical Diseases Research: Progress 1975-1994. Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 1995. cap. 5, p. 77-86.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. In: \_\_\_\_\_. Tropical Diseases Research: Progress 1991-1992. Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 1993. cap. 3, p. 29-36.



WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. In: \_\_\_\_\_. **Tropical disease research: progress 2003-2004**. Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2005. p. 50-53. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/pr17.pdf> > Acesso em : 1 Oct. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. In: \_\_\_\_\_. **Tropical Diseases Research: Progress 1995-1996**. Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 1997. cap. 5, p. 62-73.

WU, D. Y.; WALLACE, R. B. The ligation amplification reaction (LAR)--amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. **Genomics**, San Diego, v. 4, n. 4, p. 560-569, May 1989.

YAP, E. P.; MCGEE, J. O. Slide PCR: DNA amplification from cell samples on microscopic glass slides. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 15, p. 4294, Aug. 11. 1991.

YLITALO, N.; BERGSTROM, T.; GYLLENSTEN, U. Detection of genital human papillomavirus by single-tube nested PCR and Type-specific oligonucleotide hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 7, p. 1822-1828, July 1995.

YOURNO, J. A method for nested PCR with single closed reaction tubes. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 2, n. 1, p. 60-65, Aug. 1992.

YUEN, K. Y. et al. Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1385-1389, June 1997.

## **APÊNDICES**

---