

## Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais\* *Molecular biology in tropical dermatoses\**

Ana Maria Roselino<sup>1</sup>

**Resumo:** São apresentados conceitos básicos sobre célula, código genético e síntese protéica, e sobre algumas técnicas de biologia molecular, tais como PCR, PCR-RFLP, seqüenciamento de DNA, RT-PCR e *immunoblotting*. São fornecidos protocolos de extração de nucleotídeos e de proteínas, como *salting out* no sangue periférico e métodos do fenol-clorofórmio e do trizol em tecidos. Seguem-se exemplos comentados da aplicação de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico etiológico e pesquisa em dermatoses tropicais, com ênfase na leishmaniose tegumentar americana e hanseníase.

**Palavras-chave:** Biologia molecular; Biologia molecular/métodos; Hanseníase; Hanseníase/diagnóstico; Leishmaniose; Leishmaniose mucocutânea/diagnóstico; Reação em cadeia da polimerase; Polimorfismo genético

**Abstract:** *Initially, basic concepts are presented concerning the cell, genetic code and protein synthesis, and some techniques of molecular biology, such as PCR, PCR-RFLP, DNA sequencing, RT-PCR and immunoblotting. Protocols of nucleotides and of proteins extraction are supplied, such as salting out in peripheral blood allied to phenol-chloroform and trizol methods in skin samples. To proceed, commented examples of application of those techniques of molecular biology for the etiologic diagnosis and for research in tropical dermatoses, with emphasis to American tegumentary leishmaniasis and leprosy are presented.*

**Keywords:** *Leishmaniasis; Leishmaniasis, mucocutaneous/diagnose; Leprosy; Leprosy/diagnose; Molecular biology; Molecular biology/methods; Polymerase chain reaction; Polymorphism, genetic;*

### INTRODUÇÃO

As doenças tropicais no Brasil, citadas também como doenças exóticas, procedem da contaminação dos índios por ocasião da colonização, permitida pelas temperaturas elevadas e pelo excesso de umidade nos trópicos, condições ideais para essas doenças. O desmatamento sem critério, resultando em intensa alteração ambiental local e global, somado às condições climáticas e à baixa qualidade de vida – característica da quase-totalidade dos países situados em regiões tropicais –, vem estimulando a ocorrência de epidemias.<sup>1</sup>

Várias têm sido as discussões em relação ao impacto do aquecimento global sobre epidemias

decorrentes de transmissão do agente etiológico pelo ar e doenças relacionadas aos artrópodes, apontando que medidas ambientais, econômicas, regulatórias legais, como também medidas de saúde pública, se tornam necessárias.<sup>2</sup>

Entre as doenças tropicais situam-se as doenças negligenciadas, que ocorrem em regiões pobres e que, por sua vez, agravam a pobreza.<sup>3,4</sup> Quando associadas à Aids, a situação torna-se pior.<sup>5-8</sup> Mais recentemente, as doenças tropicais se transformaram em problema de âmbito mundial, devido à migração populacional e ao turismo internacional, refletido também

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 05.06.2008.

\* Trabalho realizado no no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / Conflict of interest: None

Suporte financeiro / Financial funding: FAEPA-HCFMRP-USP (Fundação de Auxílio ao Ensino, Pesquisa e Assistência); APH (Associação Paulista contra a Hanseníase - processos nos 092/2005; 112/2007); CNPq (proc. no 400930/05-6); Fapesp (proc. no 2007/54416-2).

<sup>1</sup> MD, PhD. Professora-associada, Laboratório de Biologia Molecular, Divisão de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

em sua transmissão durante transplantes de órgãos sólidos.<sup>9,10</sup>

Em relação, mais especificamente, às dermatoses tropicais, todos os dermatologistas – não só latinos, mas de todo o mundo – necessitam ter familiaridade com as doenças tropicais que cursam com lesões cutâneas, justamente devido ao aumento de viagens para países tropicais e subtropicais.<sup>11</sup>

As dermatoses tropicais podem ser classificadas segundo o agente etiológico envolvido como virais;<sup>12,13</sup> bacterianas, em especial, as micobacterianas;<sup>14,15</sup> fúngicas e parasitárias.<sup>16-18</sup> Em inquérito de consultas dermatológicas em consultórios e em serviços credenciados, realizado no Brasil, a hanseníase aparece em 20º lugar no país e em quarto lugar na Região Centro-Oeste.<sup>19</sup> Entre as mais comumente relatadas nas áreas rurais do Panamá, citam-se micetomas, paracoccidiodomicose, lobomicose, cromomicose, histoplasmose, rinosporidiose, esporotricose, hanseníase, rinoscleroma e leishmaniose cutânea e mucocutânea.<sup>20</sup>

#### Biologia molecular e dermatoses tropicais

Para o diagnóstico das dermatoses tropicais, vários são os métodos subsidiários que, quando aliados ao exame clínico, permitem o diagnóstico etiológico de cada uma delas. Para cada dermatose, existem excelentes revisões na literatura.<sup>12-18, 21-29</sup>

Entre as dermatoses bacterianas, fúngicas e parasitárias, com exceção do bacilo *Mycobacterium leprae*, todos os organismos infectoparasitários são cultiváveis, permitindo o diagnóstico etiológico da doença em investigação. Porém, cada doença, por sua vez, manifesta-se de forma distinta no homem, quer pela virulência do agente etiológico, quer pela susceptibilidade genética e resposta imune do hospedeiro.<sup>30,31</sup> Por isso, algumas manifestações clínicas, por exemplo, de doenças bacterianas, fúngicas ou parasitárias no hospedeiro com imunidade celular exacerbada, podem fugir do usual, pois o antígeno pode encontrar-se escasso na biópsia da lesão, e o emprego de métodos diagnósticos clássicos, em busca da definição do agente infeccioso, pode retardar o diagnóstico etiológico final.<sup>32,33</sup> Também vale a pena ressaltar que o emprego da biologia molecular pode auxiliar no diagnóstico etiológico diferencial entre as lesões sarcoídicas e da própria sarcoidose.<sup>34,35</sup>

Com a descoberta da molécula do ácido desoxirribonucléico (DNA), por Watson e Crick em 1953, o estudo dos tecidos e das células passa da observação morfológica, macroscópica ou microscópica, para a molecular. A biologia molecular, além de sua relevância clínica e epidemiológica, representa um campo em potencial para a pesquisa na área médica.<sup>36</sup>

Além desses aspectos, o estudo *per se* das doen-

ças parasitárias, que envolvem vetores e hospedeiros intermediários, muito tem contribuído para o desenvolvimento da biologia celular e molecular, assim como para a imunologia.<sup>37</sup>

Por outro lado, a aquisição de conhecimentos na área de biologia molecular gerou, em 1973, por Herbert Boyer e Stanley Cohen, novas possibilidades para a construção do DNA recombinante, que, teoricamente, leva à probabilidade de criação de novas formas de vida.<sup>38</sup>

A seguir, faz-se breve revisão dos conceitos básicos e das aplicações das técnicas de biologia molecular, com exemplos práticos laboratoriais envolvendo resultados parciais de projetos das linhas de pesquisa. Serão apresentadas as técnicas de biologia molecular rotineiramente usadas para o diagnóstico do agente etiológico presente no tecido do hospedeiro e também aquelas que buscam identificação de proteínas e de polimorfismos genéticos do microorganismo ou do hospedeiro, que podem ou não estar relacionados à susceptibilidade ou resistência do hospedeiro frente ao parasito. Para que sejam sedimentados os conceitos aqui descritos, sugere-se consultar o livro “DNA Segredos e Mistérios”<sup>38</sup> e, para mais detalhes, o livro “*Molecular biology of the cell*”.<sup>39</sup>

#### Conceitos básicos sobre a célula

As células são compostas por núcleo e citoplasma. No núcleo, está contido o material genético das células; no citoplasma, as organelas responsáveis por suas funções e pela síntese de proteínas, que ocorre nos ribossomos.

Os organismos unicelulares, chamados de procariotos, como as bactérias, vírus e algumas algas, não apresentam membrana nuclear separando o conteúdo nuclear do citoplasma. As plantas e animais possuem um núcleo verdadeiro, organismos eucariotos, onde se situa o código genético, ou DNA. As regras gerais que regem a informação genética se aplicam a todos os organismos vivos, quer procariotos, quer eucariotos.

As bactérias representam as células mais simples, posto que os vírus, que são ainda mais simples do que as bactérias, não podem sobreviver de forma independente. Os vírus são formados basicamente pelas moléculas de DNA ou de ácido ribonucléico (RNA), empacotadas em uma cápsula de proteína. Os vírus mais estudados são os bacteriófagos, ou fagos, que se perpetuam ao infectar uma bactéria.

Vírus, bactérias e qualquer outra forma de vida utilizam o código genético para a expressão proteica. Da mesma forma que uma bactéria aceita a infecção de um vírus, permitindo a duplicação do DNA viral e a síntese das proteínas codificadas, um gene humano pode também ser introduzido em uma bactéria, resultando a produção de proteína em gran-

de quantidade, configurando a engenharia genética. Assim, a estrutura da molécula DNA é semelhante nos vírus, bactérias, plantas e seres humanos.

Um gene representa a unidade codificadora de uma proteína. O DNA, molécula composta por vários genes, é empacotado por proteínas – histonas –, formando os nucleossomos. Cada cromossomo é formado por única molécula de DNA de dupla hélice supercondensada com proteínas. Nas células humanas existem 44 cromossomos autossômicos (22 pares) e dois cromossomos sexuais (XX na mulher e XY no homem). Os cromossomos humanos arranjados aos pares constituem o cariótipo humano.

Os organismos multicelulares se desenvolvem a partir de uma única célula, o zigoto. Como as células se multiplicam por mitose, todas as células têm o mesmo número de cromossomos e de genes, e a mesma informação genética da célula inicial, salvo as mutações que podem ocorrer no decorrer do processo. Assim, quando se pretende examinar um gene, isso pode ser feito em amostra de qualquer tecido. O que diferencia um tecido do outro é a expressão de determinados genes. Portanto, quando se quer verificar a expressão de um determinado gene, busca-se o RNA no tecido que é alvo de estudo.

### Conceitos básicos sobre código genético e síntese de proteínas

O DNA é molécula de carga negativa, composta por nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada.

O grupo fosfato, de carga negativa, liga-se ao átomo carbono de número 5' do açúcar. As bases nitrogenadas são formadas de anéis de carbono e nitrogênio. As bases citosina (C) e timina (T) são formadas por um anel, enquanto as bases adenina (A) e guanina (G), por dois anéis de carbono e nitrogênio. A ligação de uma base ao carbono 1' do açúcar forma o nucleotídeo completo (Figura 1).

O açúcar e o fosfato são invariáveis nos nucleotídeos, representando a estrutura do DNA. A informação para a síntese das proteínas está contida na seqüência das bases nitrogenadas.

Por meio de uma ligação fosfodiéster os nucleotídeos formam a cadeia do DNA. A molécula do DNA é composta por duas cadeias de nucleotídeos, que se ligam fracamente por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, constituindo a dupla hélice do DNA. Uma base A sempre se liga a uma T, enquanto uma C sempre se liga a uma G (Figura 1). Em situações experimentais, aumentando-se a temperatura, as pontes de hidrogênio se rompem facilmente, constituindo o processo de desnaturação. Quando a temperatura esfria, ocorre a hibridização, e uma

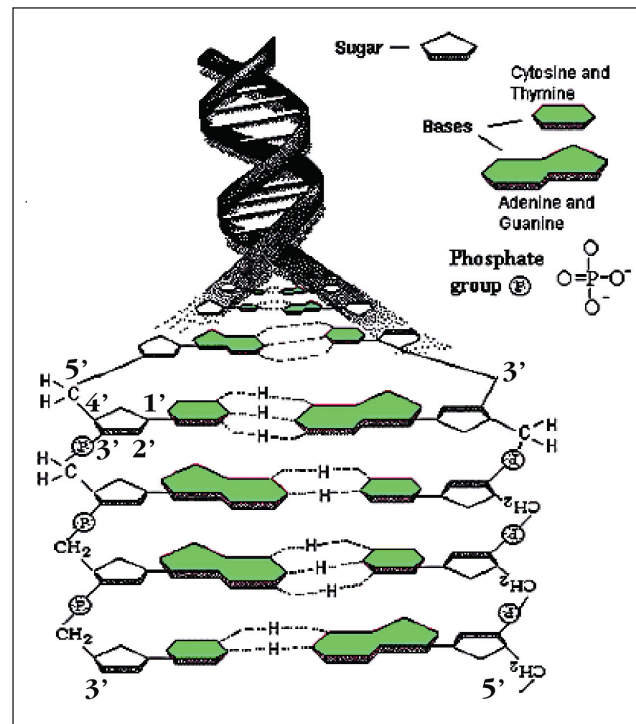


FIGURA 1: Molécula de DNA. O grupo fosfato liga o carbono 3' do açúcar de um nucleotídeo ao carbono 5' do açúcar do nucleotídeo seguinte. Portanto, haverá sempre uma das pontas da cadeia com um grupo fosfato livre no carbono 5' da desoxirribose (terminal 5') e outra ponta constituída por um grupo OH livre ligado ao carbono 3' (terminal 3'). A ligação de duas cadeias de nucleotídeos é feita por pontes de hidrogênio formando a dupla hélice do DNA. A ligação entre os nucleotídeos adenina e timina se faz por duas pontes de hidrogênio, enquanto a ligação entre citosina e guanina, por três pontes de hidrogênio

Fonte: <http://images.google.com.br/>

hélice volta a complementar a outra pelo pareamento das bases nitrogenadas.

O DNA é composto por seqüências de bases nitrogenadas que são transcritas ao RNA (éxons) e por seqüências não transcritas (íntrons).

O RNA assemelha-se ao DNA, com a diferença de que o açúcar é ribose, que apresenta um grupo OH ligado ao carbono 2' em vez de um átomo de hidrogênio, como na desoxirribose. Outra diferença, é que é formado por única hélice, embora possa dobrar-se e formar cadeia dupla entre as bases complementares. Em relação às bases, a uracila (U) no RNA substitui a timina do DNA.

Existem três tipos de RNA: o RNA mensageiro (mRNA), que carrega a informação do código genético do DNA nuclear ao citoplasma; o RNA ribossômico (rRNA), que se liga às proteínas para compor os ribossomos; e o RNA transportador (tRNA), que carrega os aminoácidos no citoplasma para formar a cadeia poli-

peptídica protéica.

**Quando ocorre a informação para a expressão genética, a síntese de proteínas se faz em três etapas:**

1- Transcrição: Inicialmente, há formação de uma molécula de RNA nuclear (hnRNA), cuja fita complementar corresponde exatamente à fita do DNA, respeitando a ligação A-U e C-G. Ocorre na região promotora do DNA, onde a enzima RNA polimerase dá início a seu processo.

2- Processamento do RNA (ou *splicing*): Ainda dentro do núcleo, as seqüências correspondentes aos íntrons são removidas, sendo adicionadas a molécula CAP (7-metil-guanosina) no terminal 5' e a cauda poli-A no terminal 3', constituindo-se o mRNA.

3- Tradução: Uma vez no citoplasma, o mRNA servirá de molde para o tRNA, quando no ribossomo. Para cada códon (três bases), um aminoácido é acrescentado à cadeia polipeptídica.

As proteínas são formadas pela ligação dos aminoácidos, que podem ser de 20 tipos. Todo aminoácido é composto por uma estrutura básica: um átomo de carbono central ligado a um grupo amino, a um grupo carboxila e a um átomo de hidrogênio. O que diferencia um aminoácido do outro é o quarto grupo lateral ligado ao carbono. O grupo amino tem carga positiva e o grupo carboxila tem carga negativa. Portanto, a carga final do aminoácido dependerá da carga do grupamento lateral.

Para a síntese de uma proteína, o grupo carboxila de um aminoácido reage com o grupo amino do outro, com a eliminação de uma molécula de água, formando a cadeia polipeptídica. Uma proteína pode ter uma ou mais cadeias polipeptídicas. Depois que os aminoácidos são ligados de forma linear (estrutura primária), a cadeia peptídica dobra-se sobre si mesma, formando a estrutura espacial ou terciária da proteína. A interação dos diferentes grupamentos laterais de cada aminoácido é que determina a estrutura espacial de uma proteína e, portanto, sua função. Se ocorrer uma mutação pontual na seqüência de bases do DNA, o códon gerado pode determinar a inserção de um aminoácido trocado na cadeia polipeptídica. Esse aminoácido distinto pode resultar ou não numa proteína não funcional.

As proteínas podem ser classificadas em: estruturais, quando são responsáveis pela estrutura celular, como as proteínas que compõem a membrana celular, e pela manutenção das funções celulares; anticorpos, responsáveis pela defesa do organismo contra elementos estranhos; de transporte celular, proteínas responsáveis pelo transporte de moléculas, como as proteínas de membrana com a função de troca de íons

para o meio intra ou extracelular; e enzimas, responsáveis por todas as reações químicas da célula.

A característica mais importante das enzimas é sua especificidade – cada enzima só catalisa um tipo de reação química, atuando apenas sobre determinado substrato. Porém, como não participa intrinsecamente da reação, uma mesma molécula pode atuar inúmeras vezes.

As enzimas que muito interessam à biologia molecular são denominadas enzimas de restrição ou endonucleases e foram descobertas em 1970. São produzidas naturalmente em bactérias para protegê-las contra a introdução do material genético viral. A bactéria reconhece o DNA viral como estranho e destrói a molécula utilizando as enzimas de restrição, que a cortam em vários fragmentos, restringindo a replicação viral.

Essas enzimas são específicas para determinados sítios de restrição, por isso não digerem o DNA da própria bactéria. Por outro lado, quando presentes no DNA da bactéria, esses sítios de restrição são protegidos por um grupamento metil (CH<sub>3</sub>), que é adicionado à molécula do DNA pela ação da enzima metilase. Muitas vezes, os genes que codificam a enzima de restrição e a metilase encontram-se em posição adjacente no genoma.

São conhecidas aproximadamente 900 enzimas de restrição, isoladas de mais de 230 espécies. Essas enzimas são designadas de acordo com o microorganismo do qual foram extraídas. As três primeiras letras se referem ao nome científico do microorganismo, portanto devem ser escritas em itálico. A letra seguinte se refere à linhagem da bactéria, e o número romano designa a ordem da descoberta da enzima. Por exemplo, *EcoRI* é a enzima extraída de *Escherichia coli*, linhagem R, sendo a primeira enzima de restrição identificada nessa bactéria.

Com a possibilidade de serem cortados fragmentos de DNA de uma mesma espécie ou de espécies diferentes e de serem ligados numa segunda etapa, surge o DNA recombinante.

## TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 1. PCR, PCR-RFLP e seqüenciamento do DNA

Para as três técnicas – PCR, PCR-RFLP e seqüenciamento – utiliza-se DNA extraído da amostra a ser analisada, quer seja sangue, células ou tecido. A extração e a purificação do DNA de uma dada amostra podem ser feitas por métodos laboratoriais caseiros ou por kits comerciais. Sugere-se consultar o livro "*Practical skills in biomolecular sciences*".<sup>40</sup>

- Extração e purificação do DNA



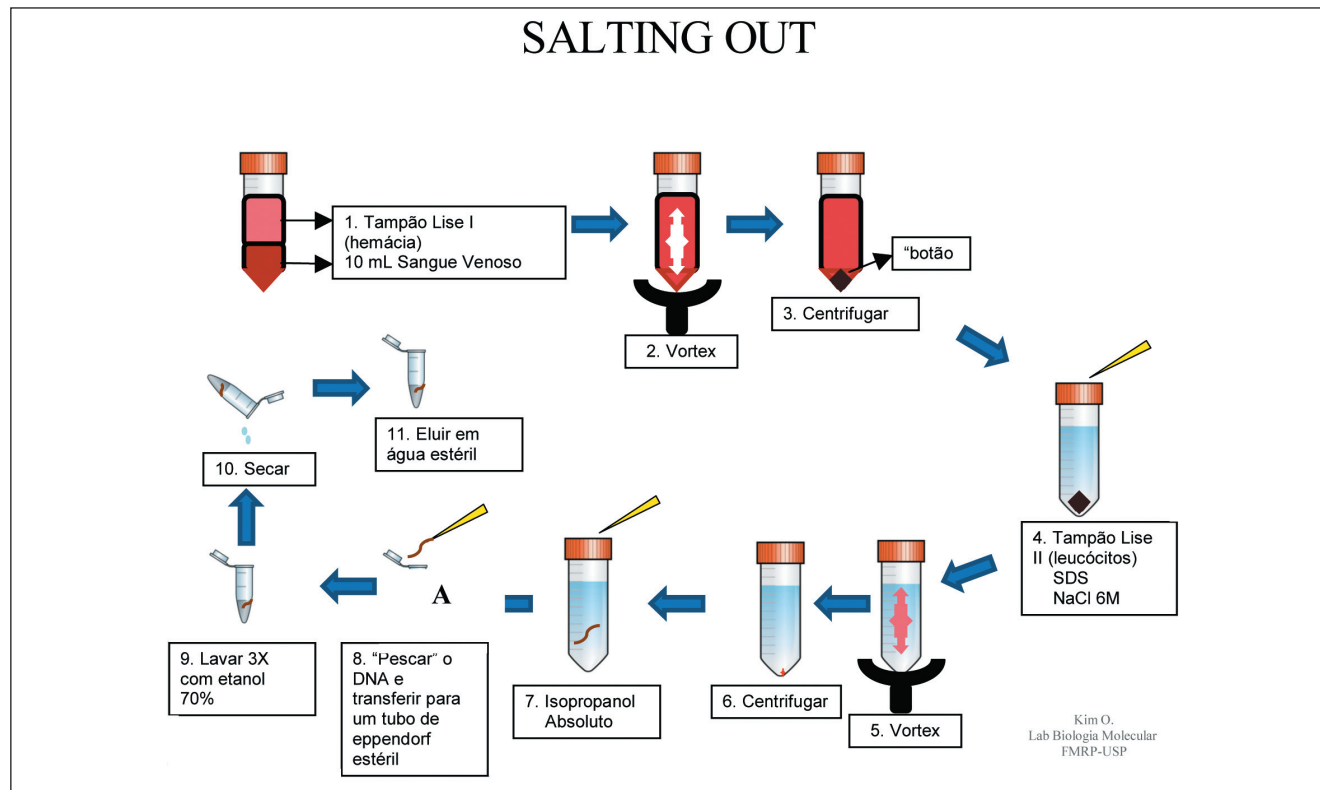


FIGURA 2: Extração de DNA de sangue periférico pelo método *Salting out*

A extração do DNA genômico do sangue total periférico, conhecida como *salting-out*, é técnica simples, cujo esquema pode ser visto na figura 2.

Se existe a intenção de se extrair DNA de células mononucleares periféricas, pode ser utilizado o reagente Ficoll-Hypaque, que tem o inconveniente de não ser barato. Esse método é muito utilizado em experimentos que visam ao estudo da resposta imunocelular *in vitro*; por exemplo, desafiando-se as células mononucleares, mantidas em meios de cultura, contra determinado antígeno, pode-se estudar a blastogênese, assim como a expressão de citocinas no sobrenadante por Elisa, ou por mRNA extraído das células.

Além do sangue periférico, outras amostras podem ser utilizadas, como vírus, bactéria, fungos,<sup>41</sup> células vegetais ou animais. Para estudar as células mantidas em meio de cultura, torna-se necessário separá-las por centrifugação. Mais comumente, a intenção é a de extrair DNA de fragmentos ou biópsias do tecido, que podem ser mecanicamente homogeneizados previamente. As amostras de tecido podem ser oriundas de animais,<sup>42</sup> de insetos,<sup>43</sup> etc.

A purificação e, por conseguinte, a quantificação do DNA de amostra congelada é mais vantajosa em comparação com a amostra fixada em formol e conservada em blocos de parafina. Porém, existem

protocolos eficientes para a obtenção de DNA dessas amostras<sup>44</sup> e até de amostras citológicas coradas em lâminas.<sup>45</sup>

Mais recentemente, tem-se utilizado amostra de tecido coletada na forma de *imprint* em papel de filtro e no momento da feitura da biópsia para exame anatomopatológico. Também se têm utilizado amostras de linfa coletadas na forma de *imprint* em papel de filtro no momento em que se coleta amostra para baciloscopia, das regiões dos lóbulos de orelhas, cotovelos, joelhos e de lesão cutânea, em paciente com suspeita clínica de hanseníase. O papel de filtro é inserido em envelope contendo os dados do paciente, podendo ser estocado em temperatura ambiente, se a intenção é extrair somente DNA. A grande vantagem reside no envio dessas amostras pelo correio para laboratórios de biologia molecular.

• PCR (*polymerase chain reaction*)

Trata-se de técnica descrita por Kary Mullis nos anos 80, que lhe rendeu o prêmio Nobel de Química em 1993, e cujo princípio se baseia na síntese de milhares de cópias de DNA *in vitro* catalisada pela *Taq* polimerase. Essa enzima – isolada da bactéria *Thermus aquaticus* que, por viver na natureza em

fontes de água quente, evoluiu para sobreviver em altas temperaturas – mantém-se estável depois de repetidas exposições a 94°C.

#### A PCR compreende três passos:

1- Desnaturação do DNA: a ruptura das pontes de hidrogênio, que ligam a dupla hélice do DNA, é feita em altas temperaturas, de 94°C a 98°C, por 5min.

2- Anelamento dos *primers*: esse passo ocorre quando a temperatura é reduzida entre 37°C e 65°C, por 30seg.

3- Extensão ou síntese do DNA: esse passo se dá em intervalo de tempo que varia de dois a 5min, a 72°C, temperatura ideal para que a *Taq* polimerase atue, havendo incorporação das bases nitrogenadas às fitas copiadas.

Esse ciclo é repetido de 25 a 35 vezes, sendo que a partir do segundo ciclo, o tempo de desnaturação pode ser reduzido a 30seg.

Uma vez obtido o produto de DNA amplificado, ele pode ser observado em gel de agarose ou de poliacrilamida, através da eletroforese, verificando-se o tamanho da banda esperada. Como o DNA tem carga negativa, devido ao ácido fosfórico, as amostras irão migrar do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo).

A agarose permite a separação de fragmentos de 200pb a 50kb. Quanto menor a concentração de agarose (0,3%), menor a resistência à migração da molécula de DNA, facilitando, portanto, a migração de

fragmentos maiores. Por outro lado, para fragmentos pequenos de DNA, torna-se necessário aumentar a concentração de agarose (2% ou mais). Para fragmentos menores, até 1000pb, o gel de acrilamida é melhor, sendo ideal para produtos de seqüenciamento, permitindo a distinção de fragmentos que diferem em um par de bases.

Para o DNA ser visualizado no gel de agarose, torna-se necessária a incubação do gel com um corante fluorescente, o brometo de etídeo, cujas moléculas se intercalam entre os nucleotídeos da dupla hélice, tornando-se fluorescente à radiação ultravioleta. Existem outros corantes, que não são tóxicos como o brometo de etídeo, mas são mais dispendiosos. O gel de poliacrilamida é fixado e corado pela prata.

Para se observar o tamanho do fragmento amplificado no gel de agarose ou de acrilamida, usa-se um marcador de DNA com peso molecular conhecido. Um comumente utilizado é o DNA do fago *lambda* digerido com a enzima de restrição *HindIII*. Os fragmentos digeridos possuem peso molecular predefinido, podendo ser vistos no gel como bandas.

Para se comprovar se a banda é correta, isto é, se o produto amplificado é o esperado, pode ser feita confirmação: a) transferindo-se o DNA do gel para uma membrana de nitrocelulose pelo método de *Southern*, com posterior hibridização com sonda complementar; b) digerindo-se o produto da PCR com enzima de restrição; ou c) seqüenciando-se o produto da PCR.

#### • PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length

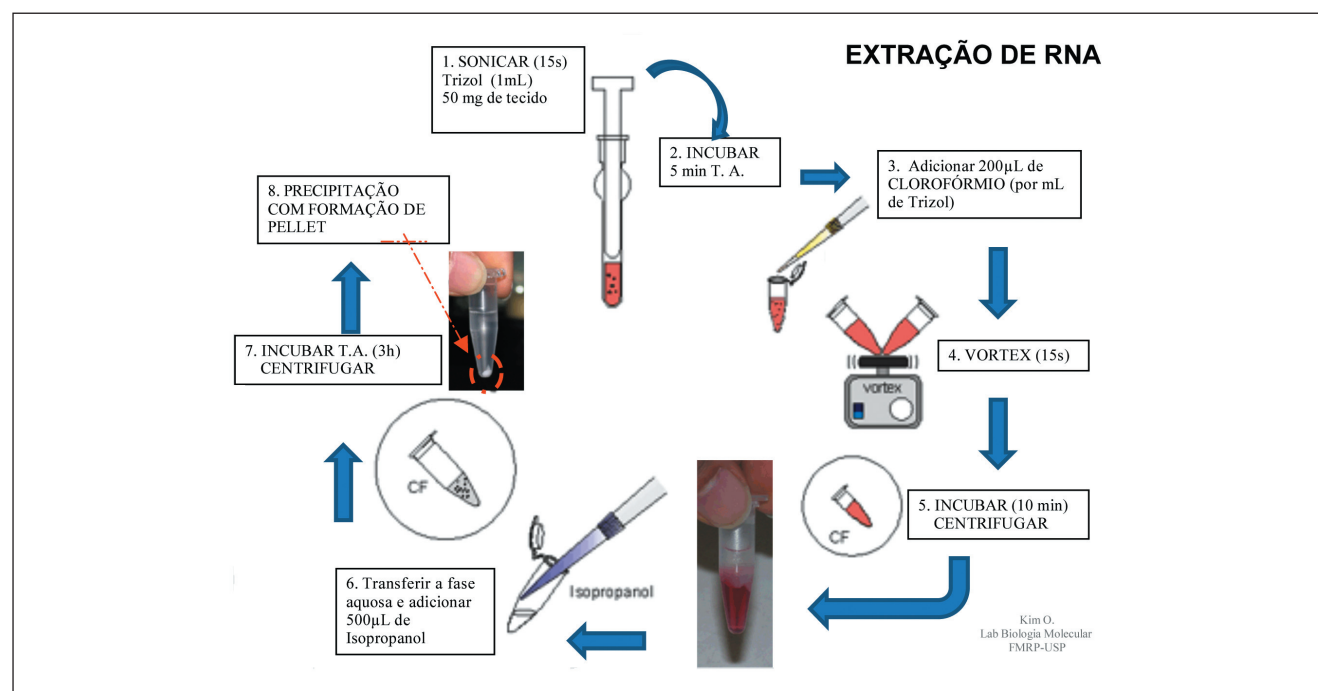


FIGURA 3: Extração de RNA pelo método do trizol

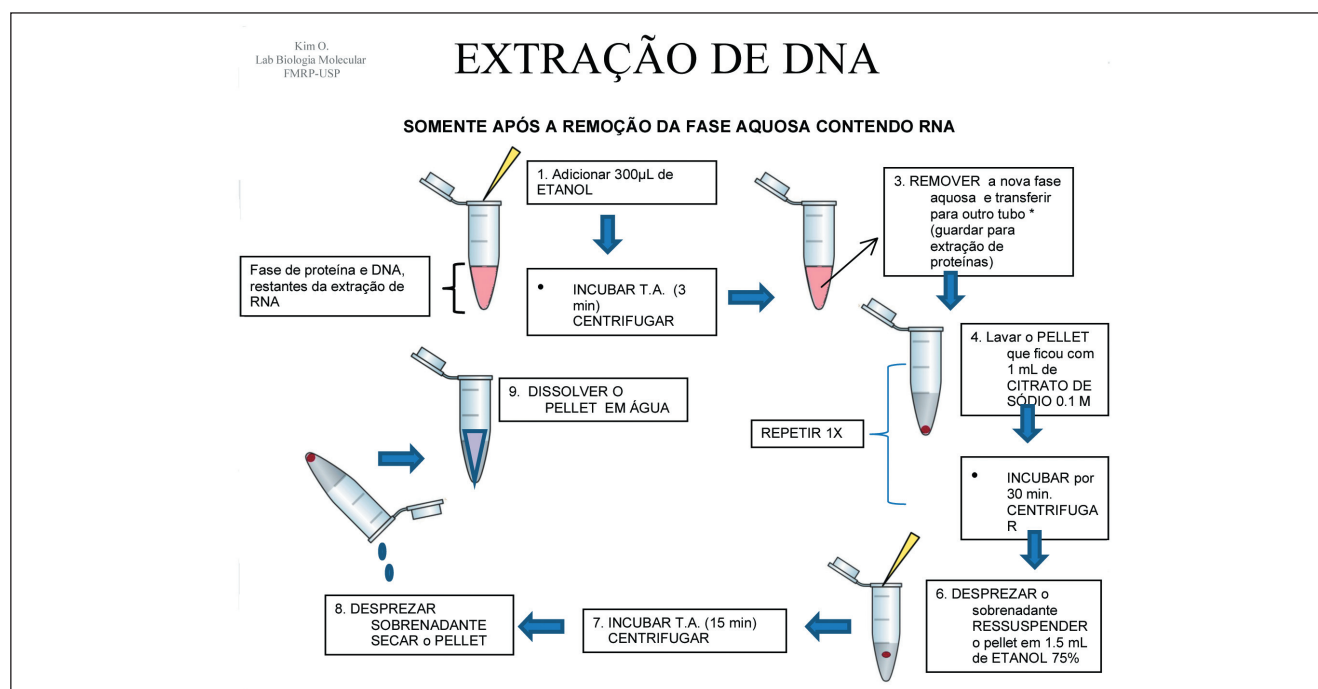


FIGURA 4: Extração de DNA pelo método trizol

polymorphism)

Esse método é bastante útil quando se pretende confirmar determinado fragmento amplificado por PCR. Conhecendo-se a seqüência amplificada, existem sites que fornecem os sítios de restrição daquele fragmento com as enzimas correspondentes (<http://www.neb.com/nebecomm/default.asp>). O ideal é que se tenha um único sítio de restrição para determinada enzima. Se as enzimas apresentarem mais que um sítio de restrição, deve-se optar por aquela que corte o fragmento em outros fragmentos com pesos moleculares distintos, e também que não sejam fragmentos tão pequenos.

#### • Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi descrito em 1977 por Walter Gilbert e Fred Sanger, que dividiram o prêmio Nobel de química em 1980.

O seqüenciamento do produto da PCR, ou da banda de DNA eluída do gel de agarose, empregando-se kits comerciais, é utilizado para a confirmação da PCR ou quando se está diante de um fragmento amplificado ainda desconhecido.

O seqüenciamento compreende nova PCR com o primer sense ou anti-sense; portanto, haverá amplificação de uma cadeia simples de DNA. Os nucleotídeos incorporados são dideoxinucleotídeos (ddNTPs) fluorescentes, cada um com uma cor diferente, análogos aos nucleotídeos usuais, mas que impedem a pro-

gressão da síntese, pois na posição 3' do carbono do açúcar aparece um hidrogênio no lugar do grupo OH. Assim, cada vez que um dideoxi é incorporado, a reação é interrompida, e o seqüenciador automático faz a leitura daquela base marcada.

Uma vez obtida, a seqüência do DNA é comparada com seqüências já depositadas no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e, caso não seja encontrada, pode ser depositada com sua autoria.

## 2. RT-PCR (reverse transcription-PCR)

A RT-PCR é utilizada quando se quer verificar a expressão de determinado gene, por exemplo, a expressão de genes de citocinas em amostras de tecidos.<sup>46</sup> Para tal, torna-se necessária a extração de RNA.

Cada célula contém cerca de 10pg de RNA, sendo 80-85% de rRNA, 10-15% de tRNA e 1-5% de mRNA. Enquanto rRNA e tRNA são de pequeno tamanho, o mRNA é heterogêneo e apresenta em sua cadeia centenas a milhares de nucleotídeos. O RNA é mais difícil de ser purificado, comparado ao DNA, devido à fácil degradação durante o processo de extração atribuída a ribonucleases contaminantes, e também porque o tratamento rigoroso para separá-lo das proteínas resulta na fragmentação de sua cadeia.

Quando se quer extrair RNA de determinada amostra, pode ser usado o método fenol-clorofórmio ou o método do trizol. Este último reagente permite a extração inicial do RNA, seguida pela extração de DNA

e de proteínas de uma mesma amostra (Figuras 3-5).

Mais recentemente, tem sido extraído RNA de apenas uma célula, empregando-se a técnica de microdissecção a laser.<sup>47</sup>

O método da RT-PCR consiste na combinação da técnica de transcriptase reversa com a PCR, envolvendo três etapas:

- 1- extração do mRNA;
- 2- síntese do cDNA, fita complementar do mRNA, pela enzima transcriptase reversa;
- 3- amplificação do DNA pela *Tac* polimerase.

Algumas DNAs polimerases estáveis, por exemplo a enzima *rTtb*, podem utilizar mRNA como fita molde para a síntese de cDNA, permitindo que o método completo seja feito em tubo único.

### 3. Eletroforese de proteínas – Immunoblotting

A eletroforese baseia-se na separação de moléculas com cargas elétricas distintas em um campo elétrico. A corrida eletroforética dependerá do tamanho da molécula, da carga elétrica dos aminoácidos e do pH do buffer.

A eletroforese de proteínas em gel de poli-acrilamida (*Page*) é a mais utilizada na análise de proteínas. O gel de poli-acrilamida é formado por monômeros de acrilamida, cujas cadeias se interligam com N,N'-metileno bisacrilamida (*bis*), com formação de polímeros de acrilamida. Após a corrida eletroforética com amostras de proteínas em estudo, o gel deve ser fixado com ácido tricloroacético e corado com prata

ou Coumassie Blue, sendo que o método pela prata mostra sensibilidade de cinco a 200 vezes maior.

O termo *blotting* refere-se à transferência das frações protéicas contidas no gel de poli-acrilamida para uma membrana de nitrocelulose (*Western blotting*). A utilização de anticorpos marcados contra determinada proteína recebe o nome de immunoblotting.

Para esse processo, inicialmente tem-se que obter a proteína em estudo (ver extração de proteínas pelo método trizol), o gel de poli-acrilamida, *buffer* apropriado e o aparelho de eletroforese vertical. Faz-se o gel em duplicata. Um deles é corado para visualização das bandas protéicas, e o outro é transferido para membrana de nitrocelulose, utilizando-se um aparelho de transferência de proteínas.

### BIOLOGIA CELULAR APLICADA AO ESTUDO DE DERMATOSES TROPICAIS

#### Leishmaniose tegumentar americana

Justifica-se a utilização da PCR para o diagnóstico etiológico da LTA pela baixa porcentagem de achado do parasito na biópsia de pele, em especial na forma mucosa. Levantamento realizado na região nordeste do Estado de São Paulo demonstrou aproximadamente 55% de identificação do parasito na biópsia, comparada a 85-90% na PCR.<sup>48,49</sup>

Quando se trata da forma mucosa, a porcentagem do encontro do parasito na biópsia é ainda menor, reforçando o emprego da PCR para seu diag-

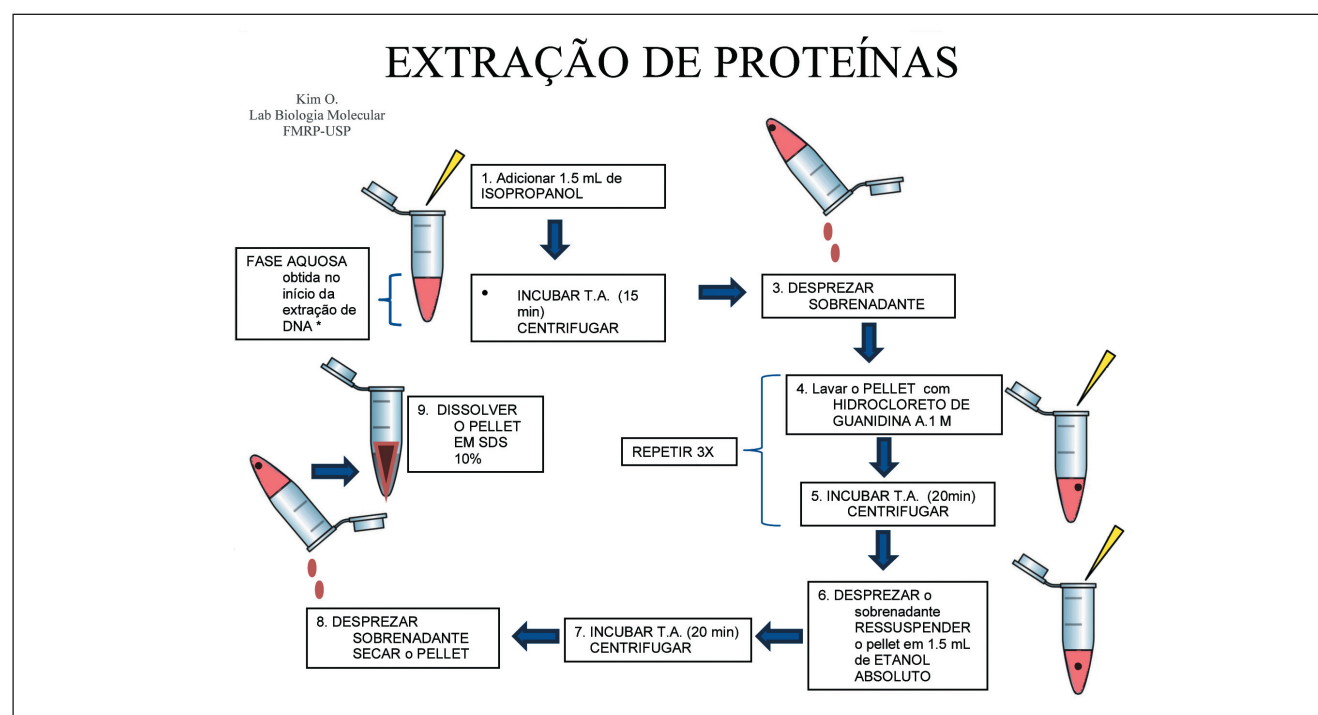


Figura 5: Extração de proteínas pelo método trizol



nóstico.<sup>48-51</sup>

Há vários pares de *primers* descritos na literatura para o diagnóstico molecular das leishmanioses.<sup>48-51</sup> Tem-se a alternativa de uso de primers que amplificam seqüências específicas de espécies de leishmânias<sup>48</sup> ou *primers* que amplificam seqüências comuns a todas as espécies. Neste último caso, existe a opção do uso de *primers* que amplificam seqüência do DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA), comum a todas espécies de leishmânia.<sup>49-51</sup>

A utilização de enzimas de restrição para determinar a espécie da leishmânia tem sido muito descrita na literatura, sendo método mais barato e mais rápido do que o seqüenciamento do produto da PCR.<sup>49,52</sup> Com a utilização da PCR-RFLP, identificou-se a espécie *L. (L.) amazonensis* na forma mucosa da LTA na região de Ribeirão Preto (SP).<sup>53</sup>

Em relação à amostra a ser estudada para o diagnóstico da LTA, tem-se dado preferência a métodos de coleta não invasivos, como a escarificação da borda da lesão<sup>54</sup> ou coleta de amostra em papel de filtro, seguida pela extração do DNA.<sup>55</sup> Ultimamente, tem-se utilizado o eluído da amostra, coletada em papel de filtro na forma de *imprint*, diretamente na PCR, seguida da confirmação por restrição enzimática, com resultados comparáveis à extração do DNA da biópsia de pele ou de mucosa de paciente com LTA.<sup>56</sup>

A PCR para pesquisa do parasito também pode ser aplicada ao flebótomo,<sup>43</sup> assim como a espécie identificada em amostras humanas pode estar relacionada à resposta terapêutica da LTA.<sup>57</sup>

A manifestação clínica das leishmanioses depende da tríade: espécie do parasito-vetor-hospedeiro. Entre os fatores genéticos descritos no hospedeiro, relacionados à susceptibilidade e resistência a parasitos, tem-se o gene NRAMP1, que expressa uma proteína de transporte de membrana. A proteína Nramp1 (natural resistance-associated macrophage protein) localiza-se na membrana de lisossomos de macrófagos e tem como função a troca de íons dos meios intracelular e extracelular, estando relacionada à resposta imune do hospedeiro.<sup>58</sup> Assim, procuraram-se polimorfismos do gene que expressa a proteína Nramp1 pelo método PCR-RFLP em amostra populacional da região nordeste do Estado de São Paulo. Os resultados mostraram que o alelo C do polimorfismo 274C/T está relacionado à proteção para o desenvolvimento da LTA, enquanto o genótipo TT do polimorfismo 823C/T mostrou-se associado à forma mucosa da LTA.<sup>59</sup>

Em relação ao parasito, desde a descrição de seu genoma, as espécies vêm sendo comparadas para se encontrar DNA-alvo que tenha potencial para uso terapêutico ou em vacinas.<sup>60</sup> O DNA responsável pela expressão da enzima topoisomerase I tem sido considerado molécula promissora no tratamento do parasito

procaríoto.<sup>61</sup>

Alguns resultados de PCR e de PCR-RFLP para identificação de DNA de leishmânias em amostras de pele ou de mucosa são mostrados nas figuras 6-8<sup>48,52,55</sup>

### Hanseníase

A despeito da diminuição de casos de hanseníase registrados, o número de casos novos diagnosticados ainda permanece inalterado, e o diagnóstico con-

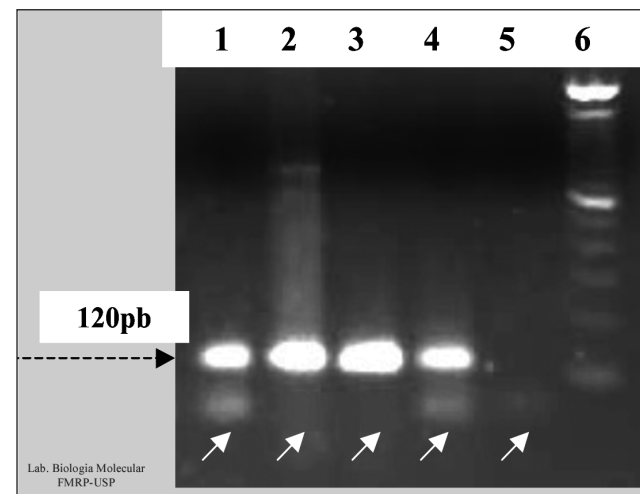


FIGURA 6: Gel de agarose 1,5%. Produtos de PCR com amostras mantidas em cultura, utilizando-se par de primers específico para kDNA, que amplifica fragmento de 120pb, comum a todas as leishmânias

Colunas: 1. *L. (V) braziliensis* (Lbb. 2903); 2. *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); 3. *L. (L.) chagasi* (LV 9.3); 4. amostra de DNA extraído de sangue de cão com calazar; 5. *Trypanosoma cruzi*; 6. PM 100pb. Observar amplicon de 120pb para todas as amostras, com exceção da cultura de *T. cruzi*, confirmando a especificidade dos primers para *Leishmania spp.*. Observe neste gel que está havendo consumo quase completo da concentração de primers utilizada nas reações (setas).

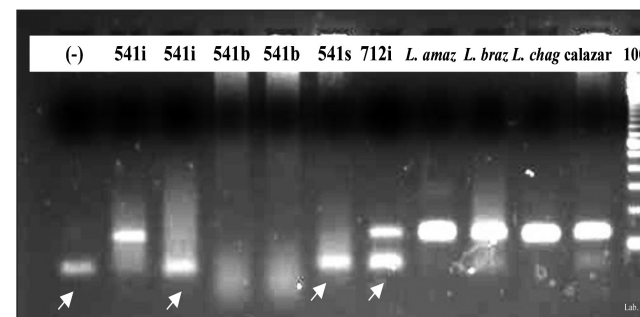
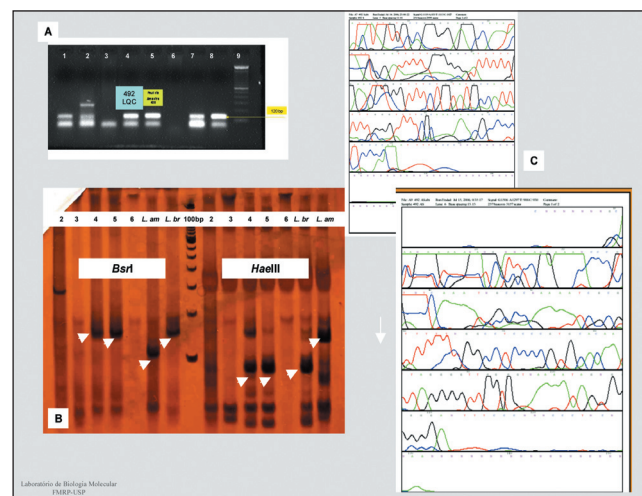


FIGURA 7: Gel de agarose 1,5%. Produtos de PCR com amostras de DNA de pacientes com suspeita clínica de LTA: 541 e 712 (i: *imprint*; b: biópsia; s: sangue). Utilizou-se par de primers específico para kDNA de leishmânias, cujo amplicon é de 120pb. (-): controle negativo, sem adição de DNA. Comparar os resultados com as amostras de leishmânias mantidas em cultura. A PCR da amostra 541i é positiva. Observe o resto de primers (setas). A PCR da amostra 712i é duvidosa, pois o resto de *primers* é maior do que a banda de 120pb



**FIGURA 8:** Amostras na forma de imprint de pacientes com suspeita clínica de LTA. A. Gel de agarose 1,5%. Colunas 7 e 8 representam os controles positivos para LTA (PCR com amostras de culturas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*). Colunas 1, 4, 5: amostras positivas; 3, 6: negativas; 2: PCR duvidosa, com amplificação inespecífica, entre 200 e 300pb; 8: PM 100pb. B. Gel de acrilamida 10%. Padrão enzimático dos produtos das PCRs mostrados no gel de agarose digeridos com a enzima BsrI à esquerda do PM 100pb, e com a HaeIII, à direita. Houve confirmação da negatividade das PCRs para LTA nas amostras 2, 3, 6. Observar os padrões de restrição, comparando os resultados das amostras 4 e 5 com as amostras de leishmânias mantidas em cultura (setas). C. seqüenciamento do produto da PCR da amostra 4, com *primers* sense e anti-sense, confirmando tratar-se de LTA por *L. (V.) braziliensis*, quando acessado o GeneBank

tinua sendo essencialmente clínico em várias regiões do país. Em centros maiores, têm-se métodos subsidiários auxiliares ao diagnóstico, como a baciloscopia, a pesquisa do bacilo na biópsia e o método sorológico que pesquisa anticorpos antiPGL1.<sup>25,62</sup> O impasse reside nos doentes paucibacilares, quando não se encontra o bacilo nas amostras pesquisadas, assim como a pesquisa de antiPGL1 torna-se ineficaz nessa forma da hanseníase. Assim, ainda se buscam antígenos específicos para o imunodiagnóstico da hanseníase.<sup>63</sup>

A biologia molecular tem-se mostrado útil para o diagnóstico etiológico nas formas paucibacilares, nos contactantes, e quando há suspeita de recidiva. Vários são os pares de primers utilizados no diagnóstico por PCR, e métodos moleculares têm sido comparados.<sup>64,65</sup>

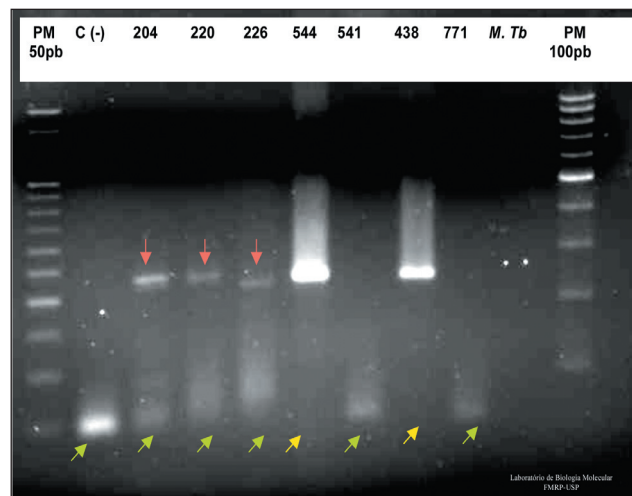
Quando há suspeita de recidiva, tem-se que saber se o bacilo é viável, e, para tal, não basta o achado de DNA nas amostras, sendo necessário o reconhecimento da expressão gênica, sendo a RT-PCR o método ideal.<sup>66</sup>

Como o bacilo não é cultivável, a descrição do genoma de *M. leprae*<sup>67</sup> vem permitindo o estudo molecular do bacilo em busca de genes-alvo para a terapêutica. Assim, encontra-se em andamento o estu-

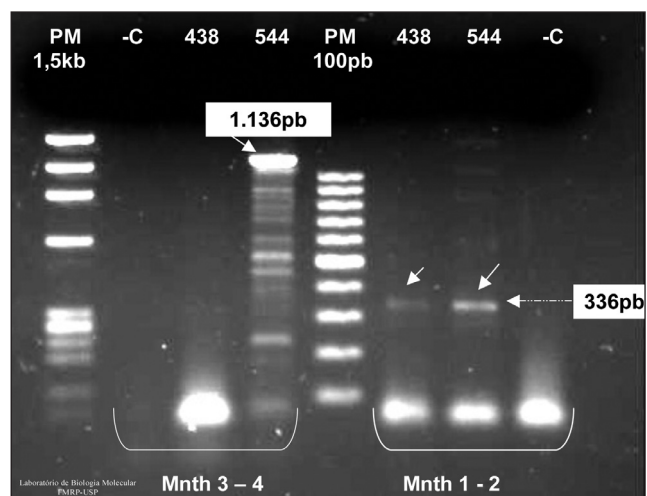
do de um gene – MntH – do bacilo *M. leprae* em amostras de pacientes com hanseníase.

As figuras 9 e 10 mostram resultados de PCR com *primers* específicos para *M. leprae* em amostras de tecido,<sup>66</sup> assim como a amplificação do gene MntH do bacilo *M. leprae* em DNA extraído de biópsias de pacientes com hanseníase.

Em relação ao hospedeiro, buscam-se polimor-



**FIGURA 9:** Gel de agarose 1,5%. Produtos de PCR com *primers* P2/P3<sup>66</sup> e DNA extraído de amostras de pele de pacientes com hanseníase forma multibacilar (204, 220, 226, 544, 438) e com diagnóstico a esclarecer (541, 771). As PCRs das amostras 541 e 771 são negativas, assim como a amostra de *M. tuberculosis* (*M. Tb*) mantida em cultura, confirmando a especificidade dos primers para *M. leprae*. Observar as PCRs positivas para as amostras 544 e 438, além do uso completo de *primers* na reação (setas). As PCRs das amostras 204, 220 e 226 resultaram banda fraca, provavelmente devido ao baixo número de cópias, que precisam ser confirmadas. Para tal, pode ser realizada nova PCR com o produto da PCR, ou *real time* – PCR, ou tentar o seqüenciamento dessas amostras. C (-): controle negativo, sem adição de DNA



**FIGURA 10:** Gel de agarose 1,5%. Produtos de PCR com DNA extraído de amostras de pele (ver Figura 9). As PCRs foram realizadas com dois pares de *primers* específicos para o gene MntH do bacilo *M. leprae*, que amplificam seqüências de 336 e de 1.136pb

fismos genéticos que possam estar implicados na apresentação clínica da hanseníase. Nesse sentido, tem a autora estudado o gene que expressa a  $\beta$ 2GP1 ( $\beta$ -2-glicoproteína 1) ou apolipoproteína H em amostra populacional com hanseníase.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O arsenal de técnicas de biologia molecular tem crescido consideravelmente, assim como os aparelhos desenhados para sua aplicação. Para acompanhar o desenvolvimento da ciência molecular, os conceitos básicos devem ser aprofundados no dia-a-dia.

Os dermatologistas com atividades essencialmente clínicas devem também inteirar-se do assunto, haja vista que muitos laboratórios de análises clínicas já empregam em sua rotina técnicas de biologia molecular para diagnóstico.

Em relação à pesquisa em dermatoses tropicais, muito se tem adquirido com a utilização da biologia molecular, sendo que o objetivo mais atual se encontra dirigido para o desenvolvimento de fármacos e de vacinas para seu controle. □

#### AGRADECIMENTOS

À técnica do Laboratório de Biologia Molecular, FMRP-USP, Sandra Silva Rodrigues dos Santos e aos alunos de pós-graduação Andreza Furquim da Cruz, Maria José Brochado e Olívia Kim, pelo apoio técnico e revisão do manuscrito.

#### REFERÊNCIAS

1. Barros M. Clima e endemias tropicais. *Estudos Avançados*. 2006;20:297-306.
2. Diaz JH. The influence of global warming on natural disasters and their public health outcomes. *Am J Disaster Med*. 2007;2:33-42.
3. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007;357:1018-27.
4. Reddy M, Gill SS, Kalkar SR, Wu W, Anderson PJ, Rochon PA. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases: a systematic review. *JAMA*. 2007;298:1911-24.
5. Rosatelli JB, Machado AA, Roselino AM. Dermatoses among Brazilian HIV-positive patients: correlation with the evolutionary phases of AIDS. *Int J Dermatol*. 1997;36:729-34.
6. Machado AA, Coelho IC, Roselino AM, Trad ES, Figueiredo JF, Martinez R, et al. Histoplasmosis in individuals with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of six cases with cutaneous-mucosal involvement. *Mycopathologia*. 1991;115:13-8.
7. de Almeida AM, Roselino AM, Foss NT. Leprosy and HIV infection. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1994;62:133-5.
8. Rosatelli JB, Souza CS, Soares FA, Foss NT, Roselino AM. Generalized cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998;10:229-32.
9. Martín-Dávila P, Fortún J, López-Vélez R, Norman F, Montes de Oca M, Zamarrón P, et al. Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:60-96.
10. Roselino AM, de Almeida AM, Foss NT, Lima VJ, Raspanti EO, Ferraz AS. Renal transplantation in leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1993;61:102-5.
11. High WA, Bravo FG. Emerging diseases in tropical dermatology. *Adv Dermatol*. 2007;23:335-50.
12. Lupi O, Tying SK. Tropical dermatology: viral tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51:1038-9.
13. Carneiro SC, Cestari T, Allen SH, Ramos-e-Silva M. Viral exanthems in the tropics. *Clin Dermatol*. 2007;25:212-20.
14. Lupi O, Madkan V, Tying SK. Tropical dermatology: bacterial tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:559-78.
15. Hussain T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. *Crit Rev Microbiol*. 2007;33:15-66.
16. Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:723-4.
17. Jacobson CC, Abel EA. Parasitic infestations. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:1026-43.
18. Ahmed AA, van de Sande WW, Fahal A, Bakker-Woudenberg I, Verbrugh H, van Belkum A. Management of mycetoma: major challenge in tropical mycosis limited international recognition. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20:146-51.



19. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol.* 2006;81:549-58.
20. Tapia Collantes A. Dermatologia en el tropico. *Rev Med Panama.* 1995;20:65-71.
21. Medeiros ACR, Roselino AMF. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. *An Bras Dermatol.* 1999;74:329-36.
22. Gontijo B, Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36:71-80.
23. Vale ECS, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An Bras Dermatol.* 2005;80:421-8.
24. Nagar R, Pande S, Khopkar U. Intradermal tests in dermatology-I: Tests for infectious diseases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2006;72:461-5.
25. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bulletin.* 2006;77-78:103-21.
26. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opin Pharmacother.* 2007;8:2689-99.
27. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexandre B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:581-96.
28. Shaw J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:541-7.
29. Marques SA, Cortez DB, Lastória JC, Camargo RSM, Marques MEA. Paracoccidiodomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. *An Bras Dermatol.* 2007;82:411-7.
30. Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:593-617.
31. Hill AVS. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet.* 2006;40:469-86.
32. Ghosn S, Dahdah MJ, Kibbi AG. Mutilating lupoid leishmaniasis: Twelve years to make the diagnosis! *Dermatology.* 2008;216:187-9.
33. Marques SA, Lastória JC, Putinatti MSMA, Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidiodomycosis: infiltrated, sarcoid-like cutaneous lesions misinterpreted as tuberculoid leprosy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50:47-50.
34. Fidler HM, Rook GA, Johnson NM, McFadden J. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissue affected by sarcoidosis. *BMJ.* 1993;306:546-9.
35. Daldon PEC, Arruda LHF. Granulomas não-infecciosos: sarcoidose. *An Bras Dermatol.* 2007;82:559-71.
36. Pinho MSL. Pesquisa em biologia molecular: como fazer? *Rev Bras Coloproct.* 2006;26:331-6.
37. Colley DG. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 21st century. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(Suppl 1):79-87.
38. Farah SB. DNA segredos e mistérios. 2 ed. São Paulo: Sarvier; 2007.
39. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science; 2002.
40. Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A. Practical skills in biomolecular sciences. 2nd ed. UK: Addison Wesley Longman Ltda; 1998.
41. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2913-9.
42. Soares MJV, Moraes JRE, Roselino AMF. Polymerase chain reaction in detecting *Leishmania* sp in symptomatic and asymptomatic seropositive dogs. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2005;11:532-9.
43. Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:540-3.
44. Tordini G, Giaccherini R, Pacenti L, Miracco C, Zazzi M, Zanelli G. Cutaneous leishmaniasis: usefulness of PCR on paraffin-embedded skin biopsies as part of routine investigation. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007;101:745-9.
45. Volpini AC, Marques MJ, Lopes dos Santos S, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored up to 36 years. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:815-8.
46. Maffei CML, Mirels LF, Sobel RA, Clemons KV, Stevens DA. Cytokine and inducible nitric oxide synthase mRNA expression during experimental murine Cryptococcal meningoencephalitis. *Infect Immun.* 2004;72:2338-49.
47. Saal I, Gustin A, Rombaut K, Pelaez P, Rorive S, Rimmelink M, et al. Laser-assisted microdissection applied to frozen surgical pathologic specimens – methodological aspects on RT-PCR. *J Exp Ther Oncol.* 2003;3:325-35.
48. Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:421-4.
49. Garcia FCB, Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo-mucosas. *An Bras Dermatol.* 2005;80(Supl3):340-5.
50. Oliveira JGS, Novais FO, Oliveira CI, Cruz Junior AC, Campos LF, Rocha AV, et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop.* 2005;94:55-9.
51. Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, Oliveira MC, Castro M, et al. *Leishmania* (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51:185-90.
52. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the



- assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2006;44:459-67.
53. Motta AC, Lopes MA, Ito FA, Carlos-Bregni R, de Almeida OP, Roselino AM. Oral leishmaniasis: a clinico-pathological study of 11 cases. *Oral Dis.* 2007;13:335-40.
54. Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:368-71.
55. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1435-9.
56. Freitas SF. Padronização e formulação do custo da PCR-RFLP para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar Americana em papel de filtro [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007. 112 p.
57. Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195:1846-51.
58. Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics: *Nrampl* as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med.* 1998;49:275-87.
59. Chociay-Gatti MF. Polimorfismos do gene *SLC11A1* (*NRAMP1*) na leishmaniose tegumentar Americana em população de uma região do sudeste do Brasil [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007. 122 p.
60. Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol.* 2007;37:1173-86.
61. Reguera RM, Redondo CM, Gutierrez de Prado R, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R. DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1759:117-31.
62. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Trumman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:338-81.
63. Araújo R, Honoré N, Banu S, Demangel C, Cissoko Y, Arama C, et al. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. *Microbes Infect.* 2006;8:2270-6.
64. Almeida EC, Martinez NA, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EM, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:509-12.
65. Martinez NA, Britto CFPC, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Clin Microbiol.* 2006;44:3154-9.
66. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supapkul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan P. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;48:319-28.
67. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science.* 2005;308:1040-2.

---

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Ana Maria Roselino  
 Divisão de Dermatologia – FMRP-USP  
 Av. Bandeirantes 3900  
 14049 900 Ribeirão Preto SP  
 Fax: +55.16.36336695  
 E-mail: amfrosel@fmrp.usp.br

Como citar este artigo / *How to cite this article*: Roselino AM. *Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais*. *An Bras Dermatol.* 2008;83(3):187-203.

*An Bras Dermatol.* 2008;83(3):187-203.

## Questões e resultados das questões

1. Em relação às doenças tropicais, assinale a resposta INCORRETA:
  - a) Elas recebem esse nome porque incidem em países tropicais e subtropicais, e estão relacionadas à pobreza.
  - b) As doenças negligenciadas, incluídas nas doenças tropicais, agravam a pobreza.
  - c) A temperatura elevada e a umidade nos trópicos contribuem para o controle das epidemias.
  - d) As doenças tropicais podem ser relatadas, segundo o agente etiológico, como virais, bacterianas e fúngicas.
2. Em relação ao diagnóstico das doenças tropicais, assinale a resposta CORRETA:
  - a) As doenças tropicais, quer bacterianas, quer fúngicas, são confirmadas pelo cultivo do agente etiológico, incluindo as micobacterioses.
  - b) Quando o hospedeiro apresenta resposta imune celular exacerbada a determinada doença tropical, seu agente etiológico é facilmente encontrado ao exame histopatológico.
  - c) Em algumas doenças tropicais, como nas leishmanioses, o emprego de técnicas de biologia molecular facilita o diagnóstico etiológico.
  - d) Nas doenças tropicais, a virulência do agente etiológico e a resposta imunológica do hospedeiro não influenciam a apresentação da forma clínica da doença.
3. Em relação à célula, assinale a resposta CORRETA:
  - a) Eucarioto é definido como organismo unicelular que não apresenta membrana nuclear separando o núcleo do citoplasma.
  - b) A síntese protéica é realizada no citoplasma, em organelas chamadas ribossomos.
  - c) No organismo procaríoto, o DNA se situa no núcleo, responsável pelo código genético.
  - d) A definição de um organismo procaríoto ou eucarioto reside na presença da membrana citoplasmática, que separa as organelas citoplasmáticas do núcleo.
4. Em relação aos organismos procaríotos, assinale a resposta CORRETA:
  - a) Os vírus representam os organismos unicelulares mais simples, possuindo DNA ou RNA nuclear, envolto em cápsula protéica.
  - b) As bactérias permitem que os vírus introduzam seu material genético em seu interior e, assim, a síntese de proteínas virais.
  - c) Os fagos são bactérias que permitem a replicação viral e sua perpetuação.
  - d) Um gene humano pode ser introduzido no núcleo de um vírus por meio da engenharia genética.
5. Nucleossomos representam genes empacotados por proteínas em uma molécula de DNA. De acordo com o enunciado, assinale a resposta INCORRETA:
  - a) As proteínas responsáveis pelo empacotamento dos genes são denominadas histonas.
  - b) A molécula de DNA é composta por vários genes.
  - c) O cromossomo é composto por vários genes e, por conseguinte, por várias moléculas de DNA empacotadas por proteínas.
  - d) Uma molécula de DNA é supercondensada por proteínas, compondo um cromossomo.
6. Em relação a DNA, RNA e proteínas, assinale a resposta CORRETA:
  - a) A molécula de DNA é formada por uma fita simples constituída por nucleotídeos, grupamento fosfato e um açúcar, a desoxirribose.
  - b) Enquanto o DNA se situa no núcleo, o RNA se situa nas organelas citoplasmáticas, em especial no retículo endoplasmático.
  - c) O código genético, ou códon, é formado por três bases nitrogenadas, e cada códon incorpora um dipeptídeo à molécula da proteína.
  - d) Um gene representa a unidade codificadora de uma proteína.
7. Quanto a DNA, RNA e proteínas, assinale a resposta INCORRETA:
  - a) O DNA é molécula cujas seqüências de bases nitrogenadas originarão o código genético para a síntese protéica.
  - b) O RNA, molécula de fita simples, é responsável pelo encaminhamento da informação genética do núcleo ao citoplasma.
  - c) A molécula de DNA é composta por éxons e íntrons, sendo as seqüências dos íntrons transcritas para o mRNA.
  - d) A molécula de RNA é menor do que a do DNA, pois só são transcritas seqüências específicas.
8. As proteínas são formadas por aminoácidos. Assinale a resposta INCORRETA:
  - a) Quando duas moléculas de aminoácidos se unem, o grupo carboxila de um deles se liga ao grupo amina do outro, com eliminação de uma molécula de água, formando um dipeptídeo.

- b) Todos os 20 aminoácidos conhecidos têm carga elétrica negativa e, quando ligados de forma linear, constituem a estrutura primária de uma proteína.
- c) A síntese de uma proteína está diretamente relacionada ao código genético. Portanto, se houver alteração de uma base no códon, esta pode resultar em uma proteína alterada ou não.
- d) Se todas as células humanas possuem o mesmo código genético, todas as células expressam proteínas semelhantes.
9. Enzima é uma proteína. Assinale a resposta INCORRETA:
- a) Enzimas são responsáveis pelas reações químicas de uma célula; são específicas, atuando sobre determinado substrato.
- b) As endonucleases são enzimas de restrição que podem cortar uma molécula de DNA em vários fragmentos.
- c) As enzimas de restrição, produzidas no citoplasma viral, auxiliam a introdução do material genético viral em uma bactéria.
- d) As endonucleases são denominadas de acordo com o microorganismo do qual foram extraídas; algumas suportam altas temperaturas, como a Taq polimerase.
10. Assinale a frase INCORRETA:
- a) Todas as células humanas possuem o mesmo número de genes, portanto, a mesma informação genética.
- b) Todas as células humanas expressam todos os genes, portanto, a expressão de uma proteína pode ser estudada em qualquer célula.
- c) Se todas as células humanas possuem o mesmo código genético, um determinado gene poderá ser estudado em qualquer célula.
- d) Todas as células humanas, com exceção das células sexuais, possuem 46 cromossomos, constituindo o cariótipo.
11. A técnica da PCR consiste na síntese *in vitro* de milhares de cópias de DNA, catalisada pela enzima termoestável Taq polimerase. Assinale a resposta CORRETA:
- a) A PCR é técnica simples, que consiste na desnaturação das duas cadeias do DNA, seguida pelo anelamento dos primers, e síntese do DNA, catalisada por uma polimerase.
- b) Para a técnica da PCR, extrai-se RNA de qualquer célula ou tecido com o intuito de se estudar a expressão proteica.
- c) A dupla hélice do DNA é formada por duas cadeias de polipeptídeos ligadas por pontes de hidrogênio.
- d) A extração de DNA para a PCR só é alcançada de amostra congelada a -70°C.
12. Para se realizar uma PCR, prepara-se a solução de reagentes, denominada mix, com o buffer, os oligonucleotídeos, os primers, a amostra de DNA e a Taq polimerase. Assinale a resposta INCORRETA:
- a) Um elemento muito importante no buffer é o  $Mg^{2+}$ , que atua como co-fator da polimerase.
- b) Os primers devem ser desenhados cuidadosamente, pois, quando inespecíficos, se ligam a vários fragmentos do DNA genômico.
- c) As bases A, U, C e G devem ser incorporadas ao mix, porque a síntese do DNA dependerá de sua concentração no mix.
- d) A Taq polimerase é enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, que se mantém estável a altas temperaturas.
13. Assinale a resposta CORRETA:
- a) Quando se quer estudar a expressão de determinado gene, faz-se a extração do RNA total da amostra, a seguir, com a enzima transcriptase reversa, transforma-se o RNA em cDNA, e, finalmente, a PCR, constituindo a técnica de RT-PCR.
- b) As técnicas de PCR e PCR-RFLP (restrição enzimática) muito se prestam à investigação etiológica do agente causal em uma amostra, quer humana, animal ou de inseto, cujos primers não necessitam ser tão específicos.
- c) O seqüenciamento do DNA é técnica mais dispendiosa, pois depende de um seqüenciador automático, e nada mais é do que uma PCR da PCR, originando fita dupla a ser analisada.
- d) Não existem técnicas de extração de DNA e de RNA de uma única amostra, tendo-se que optar por uma das moléculas a ser estudada.
14. Qual a melhor técnica de biologia molecular para se estudar um polimorfismo de determinado gene?
- a) A PCR, sem dúvida, podendo-se extrair RNA do sangue periférico, constituindo o RNA genômico.
- b) Se o polimorfismo já é descrito, pode-se verificar na seqüência do DNA qual a enzima que poderá cortar a seqüência justamente no sítio polimórfico. Portanto, pode-se usar a PCR-RFLP.
- c) Necessariamente, tem-se que proceder ao seqüenciamento do DNA após a PCR.
- d) Os polimorfismos genéticos são estudados por RT-PCR.
15. Quais as técnicas laboratoriais para se verificar a expressão de um gene?
- a) Faz-se inicialmente a extração de RNA total da amostra e, a seguir, a RT-PCR com primers específicos para a seqüência do gene em estudo. Também pode ser realizada hibridização *in situ*,

- com probes que se ligarão ao mRNA específico.
- b) Pode-se buscar pela expressão protéica no tecido, por exemplo, imuno-histoquímica com anticorpo específico contra a proteína.
- c) Pode-se realizar cultura das células que expressam o gene em estudo, e, por Elisa, quantificar a proteína sintetizada no sobrenadante, ou proceder immunoblotting com anticorpo contra a proteína.
- d) Todas as respostas estão corretas.

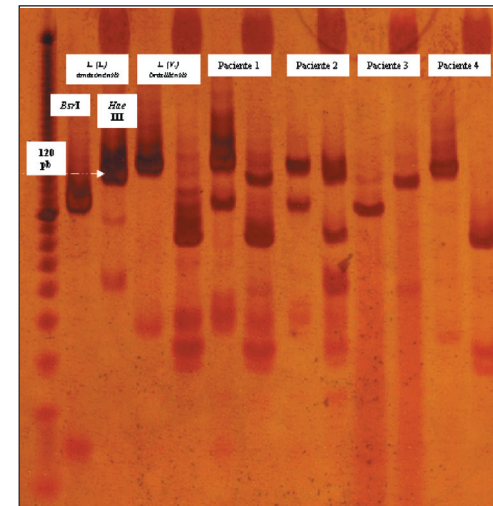
16. Para se visualizarem os produtos de DNA ou frações protéicas, utiliza-se a eletroforese. Assinale a alternativa INCORRETA:

- a) A eletroforese baseia-se na separação de moléculas com cargas elétricas distintas ou de tamanhos diferentes.
- b) O DNA, por ser molécula de carga negativa, devido aos grupamentos fosfatos, migra do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo).
- c) A eletroforese com gel de acrilamida é a mais utilizada para a análise de proteínas, que, em geral, é realizada em sistema vertical.
- d) O DNA pode ser observado em gel de agarose ou de poliacrilamida, porém, para estudo de moléculas maiores, dá-se preferência ao gel de acrilamida.

17. Consultando a Figura 8B do texto, qual a sua análise do padrão de restrição enzimático para as amostras 4 e 5? Assinale a alternativa CORRETA:

- a) Ambas as amostras são de *L. (V.) braziliensis*, comparadas às amostras de leishmanias mantidas em cultura.
- b) Ambas as amostras são de *L. (L.) amazonensis*, comparadas às amostras de leishmanias mantidas em cultura.
- c) A utilização das enzimas de restrição BsrI e HaeIII não se presta ao diagnóstico diferencial entre as espécies de leishmanias.
- d) A enzima BsrI corta o fragmento de DNA somente de *L. (V.) braziliensis*, enquanto a HaeIII corta somente de *L. (L.) amazonensis*.

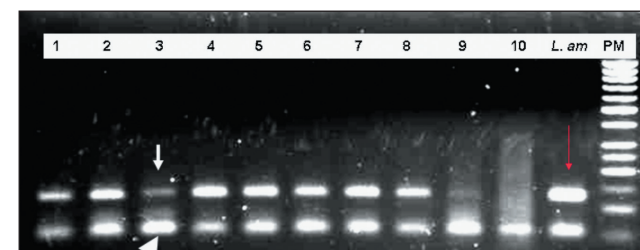
18. Observe a figura abaixo e assinale a resposta INCORRETA:



Gel de acrilamida 10%. Produtos de digestão com as enzimas BsrI e HaeIII em amostras com suspeita clínica de LTA. As amostras dos pacientes a a d devem ser comparadas com as amostras de leishmanias mantidas em cultura

- a. A amostra 3 é de *L. (L.) amazonensis*.
- b. A amostra 4 é de *L. (V.) braziliensis*.
- c. As amostras 1 e 2 apresentam padrão de restrição semelhante entre si e provavelmente são de *L. (V.) braziliensis*, porém o padrão de restrição da BsrI não permite descartar *L. (L.) amazonensis*.
- d. Todas as amostras são de *L. (V.) braziliensis*.

19. Como você interpreta os resultados das PCRs mostrados na figura abaixo? Assinale a resposta INCORRETA:



Gel de agarose 1,5%. Produtos de PCR de amostras de pacientes com suspeita clínica de LTA (colunas 1-10), coletadas na forma de imprint em papel de filtro, que deverão ser comparadas ao amplicon de 120pb, obtido de amostra de *L. (L.) amazonensis* mantida em cultura



- a) As amostras 2, e 4 a 8 são positivas, mas seria importante confirmar com digestão enzimática.
- b) A amostra 1 também é positiva, sem dúvida.
- c) A amostra 9 mostra rastro de DNA, mas parece haver uma banda fraca na altura de 120pb.
- d) Os restos de primers das amostras 2, e 4 a 8 se assemelham ao resto de primers da amostra controle, reforçando o resultado positivo.

20. Ainda em relação à figura acima, assinale a alternativa INCORRETA:

- a) Os rastros das amostras 9 e 10 provavelmente são devidos a excesso de DNA.
- b) A PCR da amostra 3 é muito duvidosa, pois o resto de primers é mais intenso do que a própria banda de 120pb (setas).
- c) Seria interessante diminuir a concentração de primers das reações.
- d) A concentração de DNA total extraído do tecido é igual para todas as amostras, já que foram extraídas usando-se o mesmo protocolo.

#### Gabarito

Disidrose: aspectos clínicos, etiopatogênicos e terapêuticos. 2007;83(2):107-15.

1 b	11 b
2 a	12 c
3 c	13 d
4 a	14 d
5 d	15 a
6 b	16 b
7 a	17 b
8 c	18 d
9 a	19 a
10 b	20 c