

Metodologias genotípicas aplicadas à detecção de espécies de parasitas e ao diagnóstico de resistência parasitária

Simone Cristina Méo Niciura

O diagnóstico acurado de doenças parasitárias e da resistência é etapa crucial para a prevenção, a sobrevivência, o controle e a epidemiologia dos parasitas. A utilização da biologia molecular (métodos genotípicos) para essa finalidade é capaz de suplantar as limitações observadas nos métodos parasitológicos tradicionais, que demandam muito tempo para sua execução, além do que podem ser pouco específicos e apresentam grande variabilidade, uma vez que o diagnóstico por sinais clínicos pode ser inespecífico e pouco preciso. Os testes sorológicos e imunológicos apresentam reatividade cruzada (menor especificidade), e o número de OPG nem sempre está relacionado com o número de nematoides no trato gastrointestinal do hospedeiro (GASSER et al., 2008).

Métodos diagnósticos para a detecção de espécies de parasitas e de polimorfismos relacionados à resistência parasitária, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido usados há vários anos. Várias são as técnicas que permitem a identificação de polimorfismos gênicos e, entre elas, destacam-se o sequenciamento gênico, o PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), o SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples) e a discriminação alélica, que pode ser realizada por PCR alelo-específico, ARMS-PCR (sistema de amplificação por mutação refratária) ou sistema TaqMan[®] em PCR, em tempo real.

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na resistência a anti-helmínticos, a resistência ao benzimidazol (BZD) foi o primeiro a ser elucidado. O mecanismo de ação dos anti-helmínticos à base de BZD começou a

ser compreendido quando se observou que a desintegração das estruturas microtubulares era o principal efeito causado pelo mebendazole sobre as células intestinais de *Ascaris suum* (BORGES; DE NOLLIN, 1975; FRIEDMAN; PLATZER, 1980). Desse modo, confirmou-se que os BZD ligam-se seletivamente à subunidade β da proteína tubulina de nematoides e cestódeos, e modificam o padrão de polimerização para a formação de microtúbulos (MOTTIER; LANUSSE, 2001). Isso provoca perda de homeostase celular, que, se persistente, pode ser letal ao parasita (LACEY, 1988). Assim, a resistência ao BZD é mediada por diminuição da afinidade de ligação à β -tubulina, resultando em aumento da tolerância à droga (BEECH et al., 1994).

A primeira mutação descrita que confere resistência ao BZD foi a transversoão T > A, que leva à substituição do aminoácido fenilalanina por tirosina na posição 200 (F200Y) no isotipo 1 do gene da β -tubulina, em *H. contortus*, *T. colubriformis* (KWA et al., 1994, 1995) e *Ostertagia circumcincta* (ELLARD et al., 1999). Em seguida, foram descritas as mutações E198A, F167Y e F167H. A resistência à ivermectina e à moxidectina também pode ser mediada pela β -tubulina e, dessa maneira, o uso de lactonas macrocíclicas pode predispor à resistência ao benzimidazol (ENG et al., 2006; PRICHARD, 2008). A partir desses conhecimentos, Kwa et al. (1994) desenvolveram o primeiro ensaio molecular baseado no uso de PCR para diagnóstico de *H. contortus* resistente ao BZD. Além disso, vale ressaltar que o acompanhamento das mudanças de frequências de resistência ao BZD serve de indicativo para o estado de resistência aos demais produtos químicos e, também, é sugestivo da eficiência do manejo utilizado no rebanho, de maneira a orientar a tomada de medidas corretivas (COLES, 2005).

Quanto aos outros anti-helmínticos, segundo Blackhall et al. (2008), as lactonas macrocíclicas ligam-se aos canais de cloro controlados por glutamato (GluCl) e entram nas células, resultando em hiperpolarização de células neuromusculares e paralisia. Assim, o polimorfismo em gene que codifica a subunidade " α " do canal GluCl já foi associado à resistência à ivermectina e à moxidectina em *H. contortus*. O gene para o canal GluCl não parece estar envolvido na resistência ao BZD. Além dos canais GluCl, mo-



dificações no gene que codifica o ácido γ -aminobutírico (GABA) já foram relacionadas à resistência às lactonas macrocíclicas, por alteração no alvo das drogas (BLACKHALL et al., 2008).

A resistência ao levamisol já foi associada ao polimorfismo no gene do receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) em *A. suum* (JAMES et al., 2009). Os receptores nAChR estão presentes na junção neuromuscular, na faringe, no músculo da cabeça e no gânglio central (PRICHARD, 2008).

A glicoproteína-P (PgP), uma proteína de transporte de membrana celular, possui especificidade muito ampla por substratos. Assim, modificações no gene que codifica a PgP foram associadas à resistência múltipla, pois afetam o transporte de ivermectinas, benzimidazóis (BLACKHALL et al., 2008) e imidazotiazóis (JAMES et al., 2009). Essas modificações não envolvem alteração no alvo das drogas (BLACKHALL et al., 2008), mas, sim, redução na quantidade da droga que atinge o sítio-alvo (JAMES et al., 2009). Assim, já que as mudanças nas frequências dos alelos é que explicam as modificações associadas à resistência aos anti-helmínticos, tais polimorfismos gênicos podem ser passíveis de detecção por técnicas de biologia molecular.