

PARASITOLOGIA MOLECULAR

CAPÍTULO 13

AUTORES:

Ana Helena Pereira de Almeida
Beatriz Cabral
Milena Portela Greskiv
Flavia Ferrari de Moraes Ramos
Ketlelin Maria Rodrigues Vieira
Laiza Helloísa Oliveira Lucindo
Tyffany da Silva Neves
Vitória Rodrigues dos Santos
Wanessa Robles Yaros
Priscilla Bianca de Oliveira
Luciano Lobo Gatti
Douglas Fernandes da Silva

PARASITOLOGIA MOLECULAR

Capítulo 9

PANORAMA HISTÓRICO

A Parasitologia Molecular é a área dedicada ao estudo da estrutura, função e evolução dos genomas e das macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) de organismos parasitários. Seu principal objetivo é elucidar os mecanismos de sobrevivência, patogenicidade, adaptação e desenvolvimento dos parasitos ao longo de seu ciclo de vida. Os avanços na área possibilitaram progressos importantes em três eixos centrais:

- **Avanço no Diagnóstico:**

As ferramentas moleculares permitem a detecção altamente sensível e específica de parasitos, mesmo em concentrações muito baixas ou em fases iniciais e assintomáticas da infecção.

- **Compreensão da Doença:**

A análise molecular revela os mecanismos de interação parasito-hospedeiro, contribuindo para o entendimento da patogênese e

da modulação da resposta imune.

- **Controle e Tratamento:**

A caracterização de genes e proteínas essenciais ao parasito possibilita a identificação de alvos terapêuticos, favorecendo o desenvolvimento de novos fármacos, terapias direcionadas e vacinas.

Historicamente, o diagnóstico das parasitoses baseava-se em métodos convencionais, como a análise microscópica de fezes e sangue (parasitoscopia) e os testes sorológicos voltados à detecção de anticorpos. Embora fundamentais, esses métodos apresentam limitações, incluindo menor sensibilidade em casos de baixa carga parasitária, dependência da habilidade técnica do examinador e tempo prolongado de processamento.

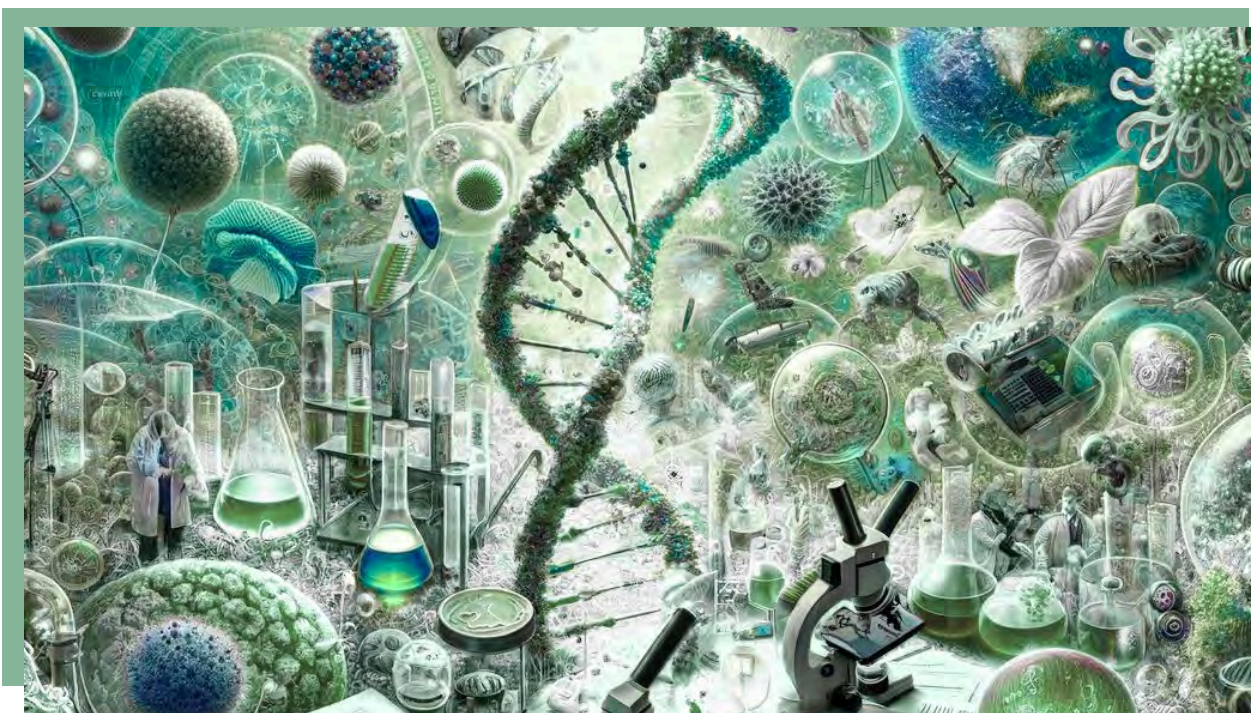
PARASITOLOGIA MOLECULAR

Unifio  BIOMEDICINA
Centro Universitário de Ourinhos

ASPECTOS COMPLEMENTARES

As infecções parasitárias afetam milhões de pessoas todos os anos, contribuindo significativamente para a morbidade global e, em casos mais graves, para a mortalidade, sobretudo em populações vulneráveis e em áreas com recursos limitados.

O estudo integrado das diferentes parasitoses, aliado aos avanços das técnicas de diagnóstico molecular, tem sido fundamental para ampliar a compreensão sobre a epidemiologia, os mecanismos de patogênese e as estratégias de controle dessas doenças. Essa abordagem multidisciplinar fortalece ações de vigilância, prevenção e desenvolvimento de terapias mais eficazes.

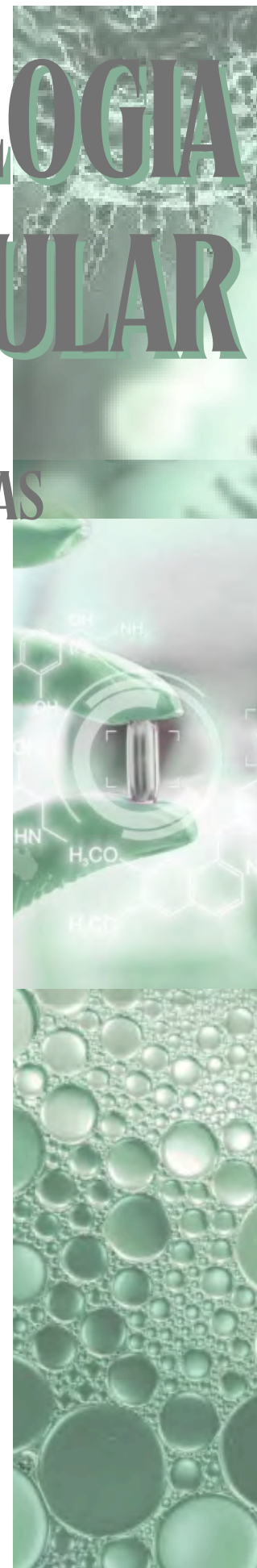


PARASITOLOGIA MOLECULAR

PARASITOLOGIA MOLECULAR: NOVAS ABORDAGENS DIAGNOSTICAS

A Parasitologia Molecular tem promovido uma profunda transformação no diagnóstico das infecções parasitárias por meio da aplicação de técnicas avançadas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), o sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS), o sistema de edição gênica CRISPR e a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). Essas metodologias permitem a detecção de parasitos com maior sensibilidade, especificidade e rapidez quando comparadas aos métodos diagnósticos convencionais, como os exames coproparasitológicos e os testes sorológicos.

Além disso, as abordagens moleculares possibilitam a identificação de espécies crípticas, a diferenciação entre infecções ativas e infecções pregressas, o monitoramento da resistência a fármacos e a realização de vigilância epidemiológica em tempo real. Dessa forma, a incorporação dessas tecnologias ao diagnóstico clínico e laboratorial contribui de maneira significativa para a tomada de decisões terapêuticas mais precisas e para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes das parasitoses.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

O BIOMÉDICO NA PARASITOLOGIA MOLECULAR

O biomédico exerce um papel fundamental na Parasitologia Molecular, área que integra conhecimentos de biologia molecular, genética e ciências da saúde com o objetivo de compreender, diagnosticar e combater as doenças causadas por parasitos.

Historicamente, o diagnóstico das parasitoses baseava-se em métodos convencionais, como exames microscópicos e testes sorológicos. Embora relevantes, essas abordagens apresentam limitações quanto à sensibilidade e à especificidade, especialmente em infecções com baixa carga parasitária ou em fases iniciais da doença.

Nesse contexto, a atuação do biomédico torna-se estratégica, uma vez que esse profissional é capacitado para aplicar e interpretar técnicas moleculares avançadas. Essas ferramentas ampliam a precisão diagnóstica, fortalecem a pesquisa científica e contribuem de forma decisiva para o controle, a vigilância epidemiológica e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no campo das parasitoses.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

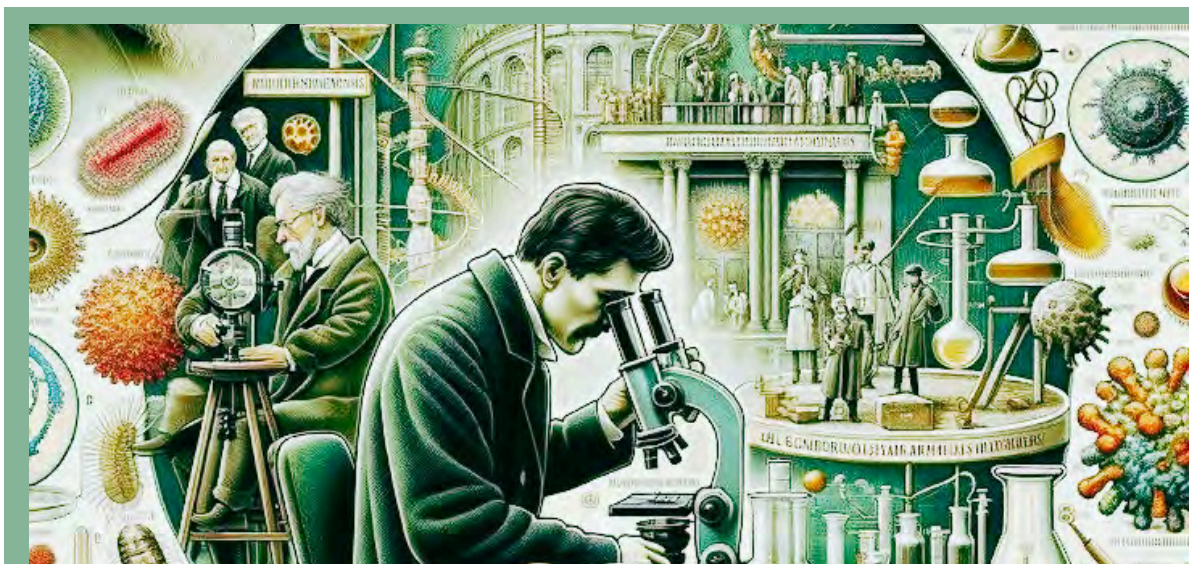
Unifio  BIOMEDICINA
Centro Universitário de Ourinhos

PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES DO BIOMÉDICO

O biomédico exerce um papel fundamental na Parasitologia Molecular, área que integra conhecimentos de biologia molecular, genética e ciências da saúde com o objetivo de compreender, diagnosticar e combater as doenças causadas por parasitos.

De forma comum, o diagnóstico das parasitoses baseava-se em métodos convencionais, como exames microscópicos e testes sorológicos. Embora relevantes, essas abordagens apresentam limitações quanto à sensibilidade e à especificidade, especialmente em infecções com baixa carga parasitária ou em fases iniciais da doença.

Nesse contexto, a atuação do biomédico torna-se estratégica, uma vez que esse profissional é capacitado para aplicar e interpretar técnicas



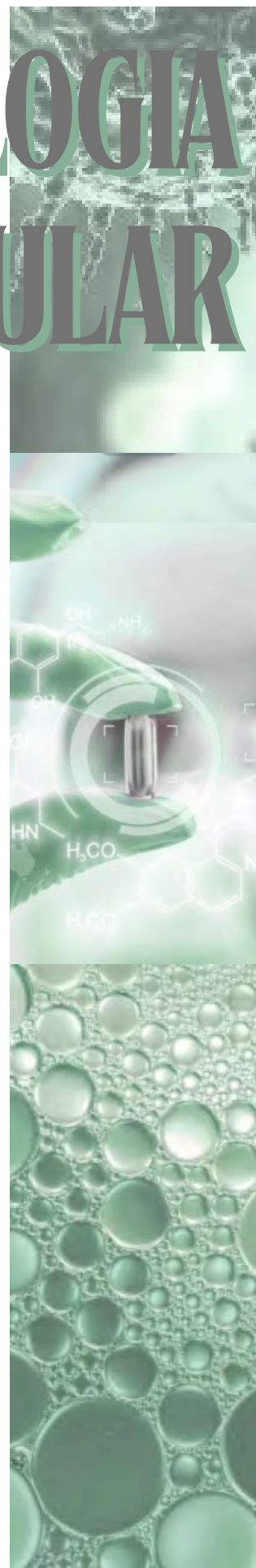
PARASITOLOGIA MOLECULAR

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES

O diagnóstico molecular representa um avanço significativo na Parasitologia, ao possibilitar a detecção, identificação e caracterização genética de parasitos com elevado grau de sensibilidade e especificidade. Essas técnicas baseiam-se na análise direta do material genético dos agentes parasitários, superando limitações frequentemente observadas nos métodos diagnósticos convencionais.

A incorporação das ferramentas de biologia molecular tem ampliado a capacidade de diagnóstico precoce, a diferenciação entre espécies morfologicamente semelhantes e o monitoramento da dinâmica das infecções parasitárias. Além disso, essas abordagens contribuem para o entendimento da epidemiologia molecular, da resistência a fármacos e dos mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

Nos tópicos a seguir, serão abordadas, de forma individual, as principais técnicas de diagnóstico molecular aplicadas à Parasitologia, destacando seus princípios, aplicações e relevância no contexto clínico, laboratorial e em saúde pública.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

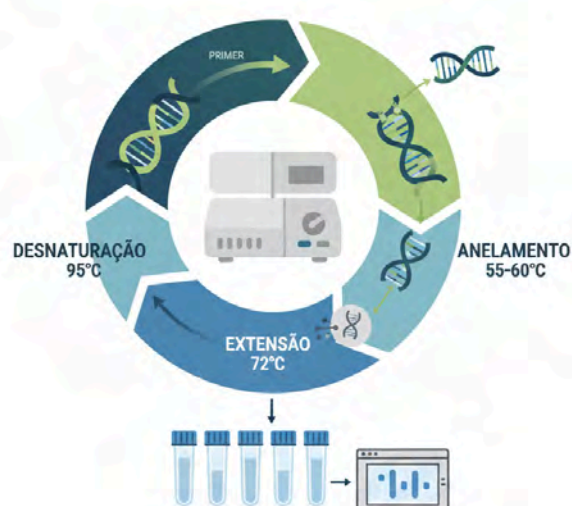
TÉCNICA PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de amplificação de DNA que permite a detecção de fragmentos específicos do material genético de parasitos, mesmo quando presentes em quantidades muito reduzidas em amostras clínicas.

O método baseia-se em ciclos repetitivos de aquecimento e resfriamento, que compreendem três etapas fundamentais:

- Desnaturação: aquecimento do DNA para separação das duas fitas complementares.
- Anelamento (hibridização): ligação dos primers, pequenas sequências de DNA, às regiões complementares do DNA-alvo.
- Extensão: síntese de novas fitas de DNA pela enzima DNA polimerase a partir dos primers.

Entre as principais vantagens da PCR destacam-se a elevada sensibilidade e especificidade, a rapidez do diagnóstico e a capacidade de detectar infecções em estágios iniciais. Como limitações, ressaltam-se o risco de contaminação e a necessidade de rigoroso controle de reagentes, equipamentos e condições laboratoriais.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

TÉCNICA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A PCR em tempo real, ou qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), é uma variação da PCR convencional que permite o monitoramento da amplificação do DNA em tempo real por meio do uso de fluoróforos específicos. Durante a reação, o aumento da fluorescência ocorre de forma proporcional à quantidade de DNA amplificado, possibilitando tanto a detecção qualitativa quanto a quantificação da carga parasitária presente na amostra.

Além da elevada sensibilidade, a qPCR reduz o risco de contaminação, uma vez que o sistema permanece fechado durante todo o processo. Essa técnica é amplamente empregada em estudos epidemiológicos, no diagnóstico clínico e no monitoramento da resposta ao tratamento.

- **Vantagens:** quantificação precisa, rapidez e maior segurança analítica.
- **Limitações:** custo elevado e necessidade de equipamentos especializados.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

TÉCNICA PCR MULTIPLEX

A PCR multiplex é uma variação da PCR convencional que permite a amplificação simultânea de múltiplos fragmentos de DNA em uma única reação, por meio do uso de diferentes pares de primers específicos.

Essa técnica é especialmente útil para a identificação de múltiplas espécies de parasitos ou para a detecção simultânea de diferentes genes de um mesmo organismo, proporcionando maior eficiência diagnóstica.

- **Vantagens:** rapidez, economia de amostra e reagentes, além da possibilidade de diagnóstico diferencial.
- **Limitações:** necessidade de otimização rigorosa da reação e risco de interferência entre os primers.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

TÉCNICA NESTED PCR (PCR ANINHADA)

A Nested PCR, ou PCR aninhada, consiste na realização de duas reações consecutivas de PCR. Na primeira etapa, amplifica-se uma região mais ampla do DNA-alvo; na segunda, o produto obtido é utilizado como molde para a amplificação de uma região interna (nested), aumentando a precisão do método.

Essa abordagem eleva significativamente a sensibilidade e a especificidade da técnica, sendo indicada para amostras com baixa carga parasitária ou com dificuldade na extração do material genético.

- **Vantagens:** elevada sensibilidade e redução de resultados falso-negativos.
- **Limitações:** maior tempo de execução e aumento do risco de contaminação entre as duas etapas da reação.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento de DNA permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos (A, T, C e G) que compõem o material genético dos parasitos, fornecendo informações detalhadas sobre sua identidade e organização genética.

O método clássico de Sanger é indicado para a análise de fragmentos curtos de DNA e é amplamente utilizado na identificação de espécies. Em contraste, as tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing - NGS*) possibilitam a análise simultânea de milhares de fragmentos, viabilizando estudos de diversidade genética, evolução molecular e resistência a fármacos.

- **Vantagens:** alta precisão na identificação e na caracterização da variabilidade genética dos parasitos.
- **Limitações:** custo elevado e necessidade de infraestrutura laboratorial e análise bioinformática especializada.



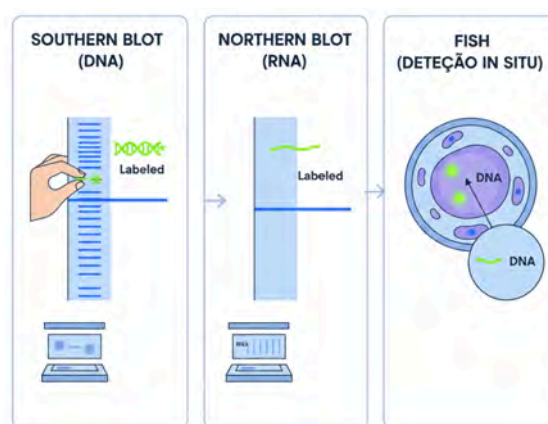
PARASITOLOGIA MOLECULAR

TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A hibridização de ácidos nucleicos baseia-se na capacidade de uma sonda de DNA ou RNA ligar-se especificamente a uma sequência complementar do material genético do parasita. Essas sondas podem ser marcadas com substâncias radioativas, enzimáticas ou fluorescentes, permitindo a detecção e visualização do alvo.

As principais variações dessa técnica incluem:

- *Southern blot*: identificação de sequências específicas de DNA.
 - *Northern blot*: detecção de moléculas de RNA, possibilitando a análise da expressão gênica.
 - *FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)*: utilização de sondas fluorescentes que se ligam a sequências-alvo em células ou tecidos, permitindo a localização espacial do parasita.
- **Vantagens:** elevada especificidade e possibilidade de visualização direta das sequências-alvo.
 - **Limitações:** técnicas laboriosas e, em geral, menor sensibilidade quando comparadas à PCR.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

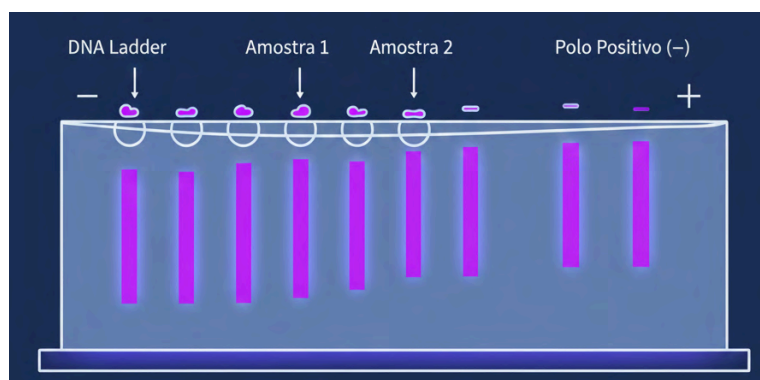
TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL

A eletroforese em gel é uma técnica utilizada para a separação de fragmentos de DNA ou RNA de acordo com seu tamanho molecular.

Durante o procedimento, as amostras são aplicadas em um gel de agarose ou poliacrilamida e submetidas a um campo elétrico. Devido à carga negativa do DNA, os fragmentos migram em direção ao polo positivo, sendo que os fragmentos menores se deslocam mais rapidamente pelo gel.

Após a corrida eletroforética, o gel é corado com substâncias específicas que permitem a visualização das bandas sob luz ultravioleta. A eletroforese é amplamente empregada para confirmar o sucesso da PCR, verificar o tamanho dos produtos amplificados e avaliar a integridade e a pureza das amostras.

- **Vantagens:** técnica simples, rápida e de baixo custo.
- **Limitações:** fornece apenas informações sobre o tamanho dos fragmentos, sem revelar a sequência nucleotídica.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

OUTRAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

- **Clonagem Molecular:**

Consiste na inserção de fragmentos de DNA parasitário em vetores para amplificação e estudo, sendo utilizada na produção de sondas, proteínas recombinantes e no desenvolvimento de vacinas.

- **Microarranjos de DNA (DNA Microarrays):**

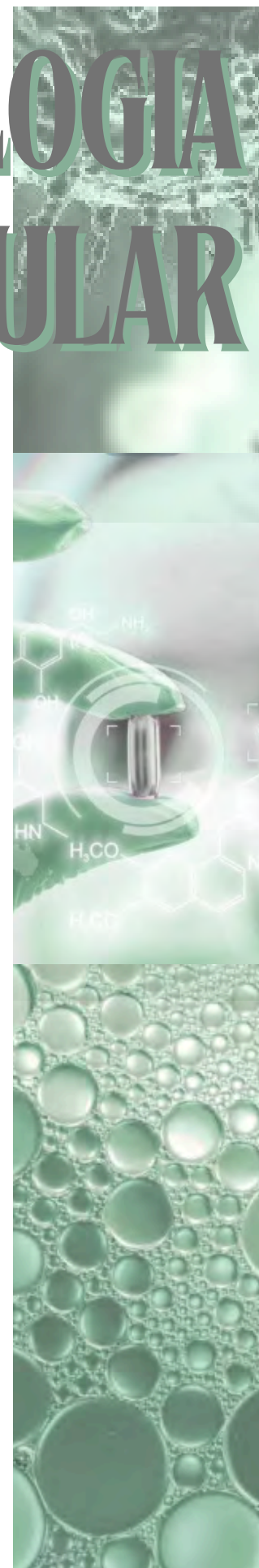
Permitem a análise simultânea da expressão gênica ou a detecção de múltiplos parasitos por meio de milhares de sondas fixadas em uma superfície sólida.

- **Técnicas de Proteômica e Transcriptômica:**

Envolvem o estudo global das proteínas (proteômica) e do RNA mensageiro (transcriptômica) dos parasitos, auxiliando na identificação de biomarcadores e potenciais alvos diagnósticos e terapêuticos.

- **CRISPR/Cas9 e Edição Genética:**

Ferramentas moleculares utilizadas para a modificação dirigida de genes parasitários, permitindo o estudo da função gênica e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

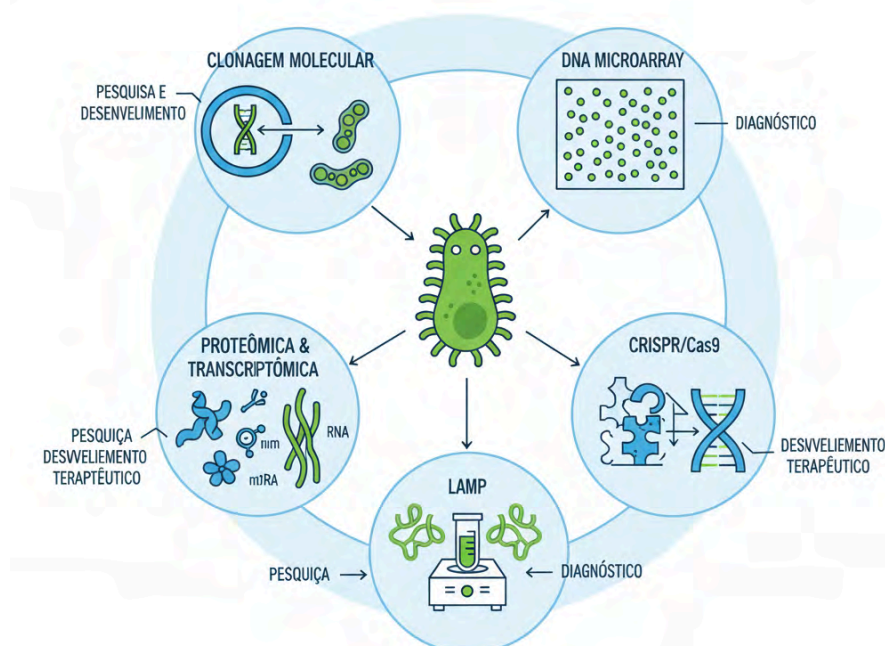


PARASITOLOGIA MOLECULAR

OUTRAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

- **LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification):**

Técnica de amplificação de DNA realizada a temperatura constante, geralmente entre 60 °C e 65 °C, utilizando uma DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita. Diferentemente da PCR, dispensa ciclos térmicos, tornando-se uma alternativa rápida e aplicável em ambientes com infraestrutura limitada.



PARASITOLOGIA MOLECULAR

ATIVIDADE DE FIXAÇÃO

1. **Como a técnica de LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*) se destaca em relação à PCR tradicional para o diagnóstico de parasitos em regiões endêmicas com poucos recursos?**

Resposta: A técnica de LAMP destaca-se por dispensar o uso de termocicladores, uma vez que a amplificação do DNA ocorre a temperatura constante. Essa característica torna o método mais rápido, de menor custo e facilmente aplicável em campo, mantendo elevada sensibilidade e especificidade, o que o torna especialmente adequado para regiões com infraestrutura laboratorial limitada.

2. **De que forma o uso do NGS (*Next-Generation Sequencing*) e dos microarranjos de DNA amplia as possibilidades de vigilância epidemiológica e detecção de múltiplos parasitos em uma única análise?**

Resposta: O NGS e os microarranjos de DNA permitem a análise simultânea de grandes volumes de material genético, possibilitando a identificação de múltiplas espécies de parasitos, variantes genéticas e genes associados à resistência a fármacos. Essas tecnologias favorecem estudos populacionais, a vigilância epidemiológica e o monitoramento de surtos com maior abrangência e precisão.

PARASITOLOGIA MOLECULAR

ATIVIDADE DE FIXAÇÃO

3. O que é a PCR e qual a sua principal função no diagnóstico molecular?

Resposta: A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de amplificação de DNA que permite a detecção de fragmentos específicos do material genético de patógenos, tornando possível identificar infecções mesmo quando o DNA está presente em quantidades muito reduzidas.

4. Qual a diferença entre a PCR convencional e a PCR em tempo real (qPCR)?

Resposta: A PCR convencional permite apenas a detecção qualitativa da presença do DNA-alvo, enquanto a PCR em tempo real (qPCR) possibilita o monitoramento da amplificação em tempo real, permitindo a quantificação da carga genética presente na amostra.