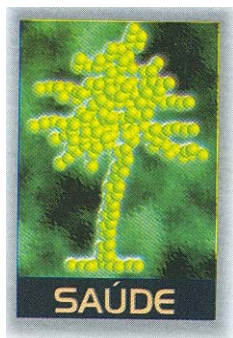


Doença de Chagas

NOVAS PERSPECTIVAS NO DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO



A doença de Chagas, ou tripanosomíase americana, afeta cerca de 17 milhões de indivíduos, de acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde. No Brasil, estimam-se cerca de 6 milhões de pessoas infectadas, com uma população de risco em torno de 20 milhões de habitantes. Esta doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado. A associação do *T. cruzi* com a doença, bem como o ciclo do parasito na natureza, foi primeiramente descrita graças ao trabalho de Carlos Chagas no início do século. O ciclo do *T. cruzi* na natureza envolve dois hospedeiros, um inseto triatomíneo (vulgarmente chamado de barbeiro ou chupão) e um mamífero. Quando o triatomíneo, um inseto hematófago, alimenta-se com o sangue de um mamífero (que pode inclusive ser o homem) infectado pelo *T. cruzi*, o mesmo ingere parasitos na forma tripomastigota, que é a forma que circula no sangue. Estes tripomastigotas transformam-se em epimastigotas na porção anterior do intestino do inseto. Diferentemente dos tripomastigotas que são formas infectivas e não-replicativas, os epimastigotas são capazes de se multiplicar e não são infectivos. Após vários ciclos de replicação, os epimastigotas migram através do intestino do inseto vetor e, nas porções terminais, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são formas infectivas. Durante o repasto de sangue do inseto no hospedeiro vertebrado, ocorre a dilatação do abdome do triatomíneo e as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes e urina do inseto, penetrando no interior do hospedeiro vertebrado através da pele (no local do ferimento provocado pela picada) ou através de mucosa. Uma vez na circulação, os tripomastigotas metacíclicos interiorizam-se em células, seja através da fagocitose promovida pelos macrófagos, seja através da penetração ativa em células não-fagocíticas, como células musculares. No interior das células do mamífero, os tripomastigotas metacíclicos transformam-se nas formas amastigotas. Estas são formas que apresentam um flagelo diminuto e são capazes de se replicar intracelularmente. Após

vários ciclos de replicação, quando a célula do mamífero já está repleta de amastigotas, ocorre a transformação destas formas em tripomastigotas que são liberados na corrente sanguínea após a lise celular. Estas formas tripomastigotas são capazes de infectar novas células ou podem ser ingeridas, através da picada, por triatomíneos durante o repasto de sangue, e o ciclo recomeça.

A observação do ciclo evolutivo do parasito mostra que é através do sangue do mamífero que o triatomíneo torna-se infectado e, portanto, transmissor da doença de Chagas. Da mesma forma, o homem pode infectar-se com o tripanosoma através do contato com sangue contaminado. Assim, é fundamental o controle do sangue a ser transfundido para evitarmos o contágio da doença de Chagas por via transfusional. Não há dados precisos sobre o número de casos de aquisição de doença de Chagas transfusional, mas pode-se estimar o risco se imaginarmos que ocorrem no Brasil cerca de 6 milhões de transfusões por ano, com cerca de 5% da população portadora do *T. cruzi*. Assim, o controle em bancos de sangue, do sangue a ser transfundido é essencial, não só para evitarmos novos contágios, mas também para que o portador da doença possa ser devidamente e corretamente informado.

Os métodos de diagnóstico podem basear-se na detecção direta do parasito ou na detecção da resposta do hospedeiro à invasão do parasito. No primeiro grupo, o método mais comumente utilizado é o de xenodiagnóstico, ou seja, coloca-se o paciente em contato com o inseto vetor e após algumas semanas busca-se o parasito nas fezes e urina do inseto. Alternativamente, a amostra de sangue do paciente é colocada em meio de cultura apropriado e busca-se, após algum tempo, a detecção do parasito; esta técnica é denominada de hemocultura. Estas técnicas, embora não deixem dúvidas quando se apresentam positivas, além de demoradas, originam muitos resultados falso-negativos, sem mencionarmos reações alérgicas adversas que alguns indivíduos podem apresentar à picada do triatomíneo. Mais recentemente, foram descritas metodologias que utilizam a técnica de PCR e que deverão melhorar as técnicas

Samuel Goldenberg & Marco Aurelio Krieger
Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz,
Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Avenida Brasil
4365, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900



de detecção direta do parasito.

O outro grupo de técnicas de diagnóstico baseia-se na detecção de uma resposta imune do hospedeiro vertebrado ao parasito. São estas as técnicas de hemoaglutinação, fixação de complemento, imunofluorescência, western blot e ELISA. Estas técnicas permitem resultados de diagnóstico em menor espaço de tempo e em alguns casos automação (por exemplo, a técnica de ELISA). Além disso, permitem a análise de um grande número de amostras simultaneamente, o que é vantajoso se imaginarmos a varredura de um banco de sangue. Entretanto, elas também apresentam limitações, como veremos a seguir.

Quando se fala em diagnóstico, há dois parâmetros importantes: a sensibilidade e a especificidade do método. A sensibilidade determina a capacidade de detecção de todos os pacientes soropositivos, enquanto a especificidade determina que só se detecte os pacientes soropositivos para a enfermidade investigada. O método ideal deve permitir valores máximos para estes dois parâmetros. Em geral, utilizam-se parasitos inteiros ou frações dos mesmos como substrato para a detecção de anticorpos reativos nas amostras de soro investigadas. O resultado da utilização destas misturas complexas é que perde-se em especificidade devido às reações cruzadas que ocorrem entre a doença de Chagas e outras moléstias como, por exemplo, leishmaniose, toxoplasmose, malária, sífilis ou ainda certas doenças auto-imunes, resultando em diagnósticos falso-positivos. O ideal seria a utilização de antígenos puros específicos ao *T. cruzi*, o que até pouco tempo atrás era limitante em função do custo de produção.

Com o advento das técnicas de DNA recombinante, tornou-se possível a expressão e produção em bactérias, ou em outro microrganismo conveniente, de proteínas heterólogas. O procedimento básico consiste em introduzirmos em bactérias o material genético (DNA) de outro organismo de tal forma que as bactérias agora "transformadas" processarão este DNA como seu próprio material genético. Assim, a partir deste DNA exógeno introduzido nas bactérias, as mesmas produzirão "proteínas recombinantes". Através de manipulações adequadas, bactérias foram transformadas com o material genético do *T. cruzi*, sendo gerada uma biblioteca de genes do parasito em bactéria, onde temos clones de bactérias expressando diferentes genes do parasito causador da doença de Chagas. Com o intuito de detectarmos clones de bactérias que es-

tavam expressando antígenos parasitários com valor no diagnóstico, a biblioteca foi varrida, através do uso de técnicas imunológicas apropriadas, com soros de pacientes portadores da doença de Chagas, de tal forma que foram detectados diversos clones de bactéria que estavam produzindo proteínas do *T. cruzi* que reagem (são reconhecidos) por soro de paciente chagásico. Estes clones foram posteriormente analisados individualmente frente a sua reatividade com soros negativos e positivos para a doença de Chagas. Desta forma, chegamos ao isolamento de dois clones de bactéria que estavam expressando proteínas de *T. cruzi*



com elevado valor preditivo de diagnóstico. O estudo posterior destes genes mostrou que ambos apresentavam uma estrutura onde havia a repetição de um mesmo motivo reconhecido por anticorpo (epitopo), sendo que um dos antígenos apresentava uma localização difusa no citoplasma enquanto o outro era flagelar. Em função de sua estrutura em epitopos repetitivos e sua localização, estes antígenos foram denominados de CRA ("cytoplasmic repetitive antigen" ou antígeno citoplasmático repetitivo) e FRA ("flagellar repetitive antigen" ou antígeno flagelar repetitivo).

A associação do uso de antígenos recombinantes com a metodologia de ELISA permitiu o desenvolvimento de um teste altamente específico para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. De fato, em um estudo coordenado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foram avaliados diferentes antígenos recombinantes com relação a sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença de Chagas, sendo comprovada a excelência do teste CRA+FRA. Uma das grandes vantagens do uso de antígenos definidos é o aumento da especificidade do teste diagnóstico, pois elimina-se o problema das reações cruzadas com outras doenças, que pode ocorrer quando se usa extratos totais ou semipurificados do parasito. No caso da sorologia chagásica convencional, são muito frequentes as reações cruzadas com pacientes portadores dos

diferentes tipos de leishmanioses (por exemplo, calazar), com pacientes apresentando parasitoses múltiplas, ou ainda pacientes portadores de doenças auto-imunes. Assim, a mistura de antígenos CRA+FRA é capaz de reconhecer o universo de soros portadores da doença de Chagas e não reagir com soros de pacientes portadores de outras doenças parasitárias ou auto-imunes.

Quando se fala em produção de kit para diagnóstico, há inúmeras vantagens no uso de um conjunto que utiliza antígenos recombinantes. Produzir antígenos (recombinantes) a partir de uma bactéria tem um custo muito menor do que produzi-los e purificá-los através do crescimento do parasito. Somando-se a isto, enquanto a bactéria recombinante é em princípio inócua para o homem, o parasito é infectivo e inúmeros são os relatos de infecção acidental em laboratório. Assim, em termos de custos e riscos é extremamente vantajoso o uso de antígenos recombinantes para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Um aspecto que também merece ser destacado trata do avanço tecnológico representado pelo desenvolvimento do trabalho utilizando antígenos recombinantes para o diagnóstico da doença de Chagas, já que a metodologia estabelecida e os conhecimentos adquiridos podem ser utilizados para a melhoria dos reagentes para diagnóstico de outras doenças parasitárias ou virais que acometem nossa população. De fato, de mais em mais a orientação do mercado é dirigida para a produção de reagentes de diagnóstico por técnicas de DNA recombinante, seja pela especificidade conferida pelos mesmos, seja pelo menor custo e maior segurança de produção.

O teste de diagnóstico utilizando os antígenos recombinantes CRA+FRA está atualmente em vias de produção, e sua utilização em bancos de sangue deverá reduzir consideravelmente (se não abolir totalmente) o risco de aquisição da doença de Chagas por via transfusional. Finalmente, um último aspecto a ser considerado é que o trabalho que resultou no desenvolvimento deste produto, de suma importância para a realidade da saúde pública do Brasil, foi inteiramente desenvolvido no país. Espera-se que o apoio do governo às instituições de pesquisa e ensino superior e o interesse do setor produtivo privado à atividade de pesquisa possam reverter o quadro atual de poucos investimentos em ciência e tecnologia no país. Afinal, é inconcebível o desenvolvimento nacional se não houver investimento em áreas estratégicas, como é o caso da biotecnologia.