

Método molecular identifica fungo que se aloja no pulmão

Técnica pode antecipar tratamento de pessoas imunossuprimidas portadoras do microrganismo

CARMO GALLO NETTO
carmo@reitoria.unicamp.br

O *Pneumocystis jirovecii* é um fungo ascomiceto, assim denominado por produzir uma caixa de esporos, unicelular, oportunista, que pode estar presente em pulmões humanos na sua forma dormente sem causar doença, como também pode dar origem à pneumonia grave em pessoas imunossuprimidas – que apresentam redução da atividade ou eficiência do sistema imunológico – principalmente as portadoras de HIV/Aids. Os métodos laboratoriais de baixo custo para a sua detecção empregados no Brasil utilizam a coloração em lâmina e são pouco sensíveis, evidenciando a presença do fungo somente em casos de infecção avançada. Os métodos moleculares são considerados mais eficientes e têm oferecido alternativas para o entendimento da biologia e da doença causada por esse microrganismo. A biologia molecular se dedica ao estudo da biologia em nível molecular, tendo como foco principal a determinação da estrutura e da função do material genético por ele expresso, as proteínas.

Com o objetivo de detectar com mais acurácia a presença de *Pneumocystis jirovecii* em pacientes com doença pulmonar, a bióloga Cristina Rodrigues dos Santos desenvolveu método molecular que usa a PCR, sigla derivada do inglês para designar a reação em cadeia da polimerase, que utiliza uma enzima de bactéria que auxilia a multiplicação do DNA. Enquanto a técnica de coloração de lâmina com azul de toluidina, pouco sensível, localiza apenas os cistos, ou seja, uma fusão de células, a PCR identifica fragmentos de DNA, permitindo múltiplas cópias dos seus segmentos. O método revelou alta positividade (65%) de casos de indivíduos que portavam o fungo, em situações em que estava na forma dormente ou tinha causado pneumonia.

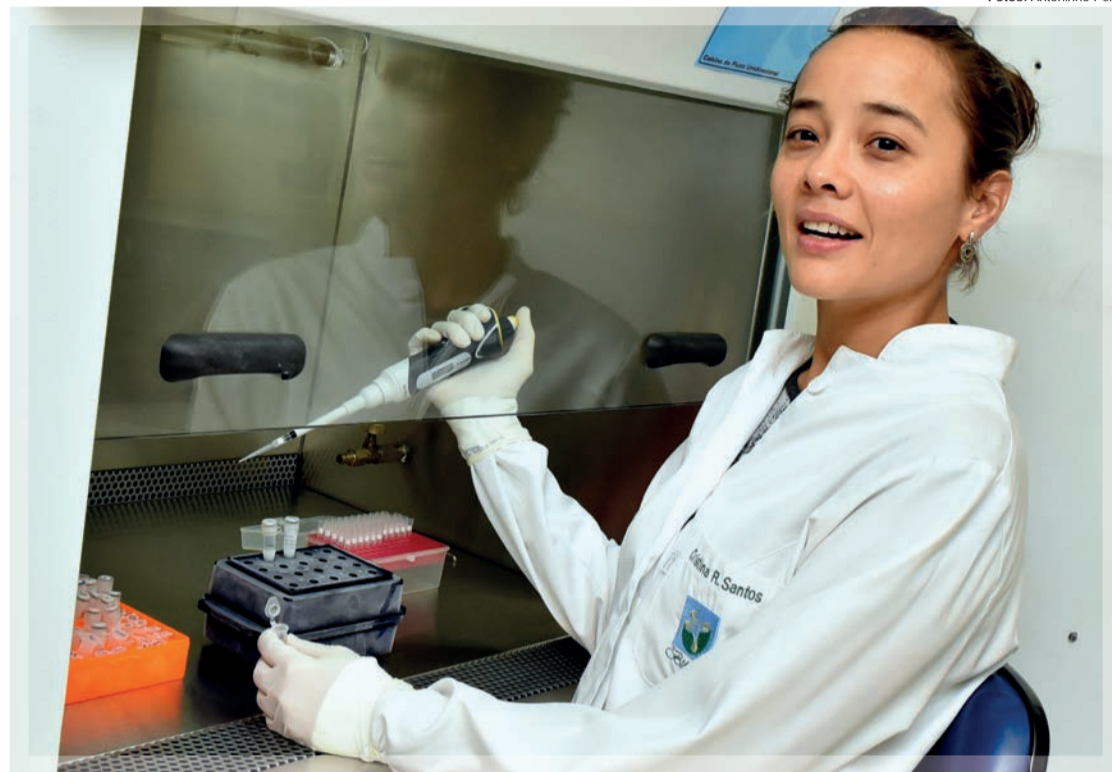
Somado à história clínica do paciente, o método estudado pode servir de auxílio no diagnóstico diferencial de pneumonia realmente causada pelo *Pneumocystis jirovecii*, permitindo pronto tratamento ou medidas preventivas nos casos ainda não manifestos.

O trabalho, desenvolvido junto ao Laboratório de Pesquisa em Aids do Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp, foi orientado pelo professor Francisco Hideo Aoki, da Área de Infectologia, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, e coorientado pela professora Ângela Maria de Assis, da mesma unidade. O docente explica que o Laboratório, por ele coordenado, é responsável por cerca de 95% dos exames realizados em pacientes com HIV/Aids atendidos pelo complexo hospitalar e pela macro região de Campinas. Ele faz questão de ressaltar que Cristina é funcionária regular do Laboratório – como o fora a médica Ângela Maria de Assis, onde presta serviços assistenciais, e foi admitida por processo seletivo. Não tendo direito à bolsa, realizou a pesquisa paralelamente ao trabalho do dia-a-dia, o que, segundo o orientador, comprova sua vontade, empenho e determinação no desenvolvimento de conhecimentos adicionais.

ANTECEDENTES

A área de infectologia da FCM acumula uma vasta experiência acerca de pacientes com HIV/Aids, uma síndrome que se revela através de um conjunto de sinais e sintomas relacionados à imunodeficiência adquirida. A infecção oportunista ocorre quando o indivíduo apresenta alguma deficiência de defesa do organismo que o torna suscetível a agentes que podem produzir alguma infecção, como no caso de fungos, protozoários, bactérias já incorporadas que podem se manifestar em situações de baixa resistência imunológica.

A deficiência de imunidade, além dos pacientes com HIV/Aids, ocorre também nos portadores de cânceres, dos vários tipos de neoplasias, de doenças hematológicas e ainda nos casos de transplante porque, para evi-



A bióloga Cristina Rodrigues dos Santos, autora da tese: método pode auxiliar no diagnóstico de pneumonia

tar rejeições, o paciente toma drogas imunossupressoras que atenuam o combate que seu sistema de defesa faria em relação ao corpo estranho, mesmo que compatível.

O fungo do gênero *Pneumocystis* da espécie *jirovecii* foi relatado pela primeira vez no Brasil, em 1909, por Carlos Chagas. Ele é encontrado em mamíferos como ratos, tatus, morcegos, gatos, cachorros, mas a espécie *jirovecii* só ocorre em humanos, em que os primeiros registros datam de 1938. No início de 2000 encontraram-se evidências de que a espécie que causa pneumonias em humanos é diferente da que leva à doença em outros animais. Não se conhece a origem desse fungo, mas se sabe que as espécies desenvolvidas nos mamíferos não contaminam os humanos. Nestes, a espécie prefere se alojar nos pulmões e ao se manifestar o faz na forma de pneumonia grave e não raro fatal.

Cristina conta que a proposta de pesquisa para identificar o fungo através de métodos moleculares foi do professor Aoki, em vista da constatação de sua recorrente manifestação em pacientes com HIV. Os métodos tradicionais para detecção do fungo utilizam um corante, sendo o mais comum o azul de toluidina, no HC da Unicamp aplicado sobre o escarro espalhado sobre uma lâmina. Os cistos do *Pneumocystis* adquirem então a cor lavanda. Esses métodos apresentam baixa positividade, o que é sério porque as suspeitas de sua presença recaem sobre pacientes altamente imunossuprimidos.

Clinicamente seus efeitos se manifestam através de dificuldades respiratórias, diminuição da oxigenação do sangue, alterações nas radiografias de tórax, parâmetros que sugerem aos médicos esse tipo de infecção.

Mas eles precisam de informações laboratoriais para um diagnóstico definitivo, embora as simples suspeitas os levem a entrar imediatamente com a medicação adequada. Mas, mesmo de posse dos resultados positivos dos exames laboratoriais, o especialista o faz sem ainda ter total certeza de que é o fungo o agente efetivamente responsável pela infecção. Trata-se de uma questão que demanda ainda solução, o que dá ideia da complexidade do problema.

A PESQUISA

Diante desse quadro, a proposta desenvolvida no mestrado da autora foi a pesquisa de um método mais sensível, que se valesse da biologia molecular, utilizada desde o início da década de 1990, para localizar fragmentos do DNA presentes no *Pneumocystis*, que correspondessem ao seu material genético e, portanto, correlacionados com o fungo em questão. O professor Aoki explica que “a biologia molecular permite afirmar com certeza que, para cada célula animal ou vegetal, microrganismo, vírus, bactéria ou fungo, há um fragmento do material genético do DNA que tem correlação com os agentes infecciosos e que corresponde precisamente a eles”. Os métodos da biologia molecular tornam efetiva a identificação desses agentes. No caso estudado, o método desenvolvido e padronizado pela pesquisadora tem sensibilidade em torno de 99% e o processo de análise demandado cerca de quatro horas para ser executado.

A ideia é colocar o processo desenvolvido em execução rotineira para que possa servir de auxílio aos clínicos que lidam com pacientes imunossuprimidos, de forma a permitir caracterizar com mais segurança um indivi-

duo portador da infecção gerada pelo fungo. Os pesquisadores consideram viável a implantação do processo já que a técnica que o envolve é de fácil reprodução. Entendem que esses tipos de procedimentos não são ainda vulgarizados no Brasil por falta de profissionais especializados, embora esse contingente seja passível de ser formado e treinado.

Questionada sobre o diferencial do método pesquisado em relação aos já existentes em outros países e qual da razão de não transpô-los para o Brasil, a pesquisadora esclarece: “A sua principal importância está no fato de termos realizado um trabalho criando nossos próprios protocolos, sem utilizar kits comerciais importados. Chegamos a um procedimento que pode ser reproduzido na rotina dos nossos hospitais, aplicável à realidade brasileira, bem diversa da de outros países”.

Para ela foi muito importante estudar como está a incidência do *Pneumocystis jirovecii*, mesmo em uma população pequena como a do HC da Unicamp: “Artigos científicos já comprovam que o Brasil apresenta alta positividade em relação ao fungo quando utilizado o método molecular. Mas, além da positividade que o método desenvolvido oferece, constatamos que o *Pneumocystis* apresenta algumas diferenças em relação a outros organismos da mesma espécie, abrindo caminho para estudá-lo com mais profundidade”. Ela considera a necessidade de estudar muito mais o organismo em questão em relação às diferenças dos que existem no resto do mundo.

CAMINHOS

O professor Aoki destaca que existem muitas perguntas que devem ser respondidas a respeito desse fungo relacionadas à sua própria biologia e, principalmente, com referência à sua eventual transitividade inter-humana e possíveis consequências entre indivíduos imunossuprimidos internados em hospitais, o que poderia levar à necessidade de isolar o paciente portador do fungo, principalmente se acometido de tosse, o que facilitaria sua transferência por via respiratória. A propósito diz o docente: “São questões que ainda não sabemos responder, pois não conhecemos bem a própria história natural do fungo como, por exemplo, porque ele é tão diferente no ser humano do encontrado em outras espécies de mamíferos”.

A procura das respostas a algumas destas questões fará parte do projeto de doutorado que Cristina está escrevendo. Ela considera que deu o primeiro passo, mas quer entender mais profundamente o organismo estudado, se existe diferença entre os microrganismos presentes em pessoas diferentes, como ele age no paciente, o seu comportamento em outros imunossuprimidos, além dos portadores de HIV/Aids estudados, pois cada um deles pode ter características diferentes, e ainda aprofundar os métodos moleculares.

Segundo a pesquisadora, o trabalho atingiu os objetivos, que era o de padronizar a técnica molecular, que permitiu o desenvolvimento de um método para diagnóstico do *Pneumocystis jirovecii* de alta positividade em comparação com o processo de coloração com azul de toluidina. Embora tenham sido encontradas diferenças entre os fungos estudados, que podem levar ao agravamento da doença, ela considera que esse é outro tema que precisa ser ainda mais bem estudado.



O médico e professor Francisco Aoki, orientador do estudo: técnica de fácil reprodução

Publicação

Dissertação: “Identificação de *Pneumocystis jirovecii* através de métodos moleculares em amostras de pacientes do Hospital de Clínicas da Unicamp”
Autora: Cristina Rodrigues dos Santos
Orientador: Francisco Hideo Aoki
Unidade: Faculdade de Ciências Médicas (FCM)