

TESTES MOLECULARES NO APOIO À CLÍNICA VETERINÁRIA

VETERINARY MOLECULAR TESTS

Ana Elisabete Pires, Margarida Alves

CBIOS/Faculdade de Medicina Veterinária; Universidade Lusófona, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa - Portugal

Resumo: O presente artigo consiste numa breve resenha da aplicabilidade dos testes moleculares ao serviço da Clínica Veterinária. Os testes moleculares actualmente disponíveis são muito abrangentes, permitindo por exemplo a identificação de agentes patogénicos causadores de doença ao nível da espécie, o diagnóstico de doenças genéticas e até a identificação molecular do sexo em espécies de aves que não apresentam dimorfismo sexual. O recurso a estes testes durante a prática clínica pode acelerar o diagnóstico, permitir uma prescrição médica mais específica e ser de apoio à criação animal. São, ainda, apresentados os testes moleculares que presentemente estão disponíveis no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Palavras-chave: testes moleculares; identificação molecular de agentes patogénicos; despiste molecular de doença do rim poliquístico felina; sexagem molecular em aves.

Abstract: This paper summarizes the benefit of using molecular tests in the veterinary practice. The available molecular tests are extremely resourceful allowing the identification of pathogens at the species level, the diagnostic of genetic diseases, as well as the molecular sexing of bird species which do not exhibit sexual dimorphism. The use of these tests can speed up the medical diagnosis, allow a more specific prescription and assist in animal breeding. Molecular tests that are available at Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias are also described.

Keywords: molecular tests; pathogens' molecular identification; molecular screening for feline polycystic kidney disease; molecular sexing in birds.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da estrutura em dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (ADN) feita em 1953, por James Watson e Francis Crick, constituiu um marco na história da ciência e abriu caminhos para a chamada revolução molecular. Desta revolução fizeram, também, parte outras descobertas igualmente importantes, nomeadamente i) as enzimas de restrição, que vieram permitir a manipulação *in vitro* do ADN, ii) a sequenciação de fragmentos de ADN e iii) a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR, sigla anglo-saxónica para *PolymeraseChainReaction*). Esta última metodologia foi impulsionadora de importantes avanços no diagnóstico laboratorial ao nível molecular, permitindo o desenvolvimento de testes que possibilitam a análise dos ácidos nucleicos, ADN e ácido ribonucleico (ARN).

1.1. Diagnóstico molecular em Medicina Veterinária

Em Medicina Veterinária o diagnóstico molecular encontra grande aplicabilidade na identificação de agentes infecciosos (*Leishmania infantum*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., Vírus da Imunodeficiência Felina (VIF), Vírus da Leucemia Felina (VLeF), entre outros) e de alterações no genoma responsáveis por doenças hereditárias (Doença do Rim Poliquístico em gatos, Cistinúria e Atrofia Progressiva da Retina em cães, entre muitas outras). Estes testes podem ser realizados em todo o tipo de amostras biológicas – sangue, fluidos corporais e biopsias de tecidos. No caso da detecção de agentes infecciosos, o tipo de amostra a analisar dependerá da patofisiologia do microrganismo.

A detecção molecular de agentes infecciosos baseia-se na análise do ADN ou ARN do

agente patogénico, permitindo determinar, rapidamente, a sua presença na amostra testada. Esta metodologia pode ser particularmente útil no caso de microrganismos de crescimento fastidioso ou daqueles em que não é possível isolar ou crescer em cultura. A ausência de necessidade em manter os microrganismos em cultura, não só aumenta a rapidez com que o resultado é disponibilizado, como reduz os riscos de manipulação de agentes infecciosos. Para além disso, é, ainda, possível identificar a espécie ou estirpe do agente infeccioso, detectar a presença de genes que conferem resistência a antibióticos, monitorizar a evolução da infecção através da quantificação do agente patogénico e fazer a identificação simultânea de vários microrganismos (Viveiros *et al.*, 2014).

No domínio da genética, a tecnologia molecular permite, não só detectar a presença da mutação responsável por uma doença genética em animais em que a mesma já se manifeste, como identificar portadores assintomáticos, permitindo uma selecção informada dos animais reprodutores e uma criteriosa gestão dos cruzamentos. Actualmente, existem disponíveis testes moleculares para a detecção de mais de uma centena de mutações, responsáveis por doenças em animais de companhia, nomeadamente cães e gatos (Lyons, 2012; Mellersh, 2012).

1.2. Sensibilidade e especificidade dos testes moleculares

Os testes moleculares têm por base a reacção de PCR, um método *in vitro* que permite amplificar até níveis detectáveis o número de cópias de uma região de interesse de ADN ou ARN (neste último caso, a PCR deverá ser precedida de uma reacção de transcriptase reversa).

Os testes com base na PCR são específicos, reprodutíveis e muito sensíveis quando comparados com os métodos convencionais (ex. cultura, serológicos, histopatologia) e têm, ainda, a vantagem de requerer pequenas

quantidades de amostra biológica (Viveiros *et al.*, 2014). Um resultado positivo na PCR confirma a presença do agente patogénico, podendo este encontrar-se viável ou inviável. As principais limitações dos testes de PCR incluem resultados falso positivos, em consequência de contaminações cruzadas com ADN exógeno, e resultados falso negativos, resultado de uma reduzida quantidade de amostra, e/ou baixa quantidade de agente patogénico e/ou da presença de inibidores da reacção, que podem ter origem na amostra ou nos reagentes utilizados para o isolamento do DNA (Viveiros *et al.*, 2014; Yang e Rothman, 2004).

Os resultados falso positivos podem ser reduzidos e evitados através da adopção de rigorosas medidas de boas práticas laboratoriais, da descontaminação de superfícies, equipamentos (micropipetas, mini centrífugas), de reagentes e consumíveis (tubos, pontas de micropipeta) e da separação física entre áreas de pré e pós-amplificação de ADN (Viveiros *et al.*, 2014; Yang e Rothman, 2004).

A avaliação de uma eventual ocorrência de resultados falso negativos pode ser feita através da amplificação de um controlo interno, que pode ser um gene constitutivo do genoma do animal a ser testado. É, assim, possível identificar e contornar problemas como a quantidade de amostra, o processo de extracção do ADN e a presença de inibidores da amplificação do ADN (Viveiros *et al.*, 2014; Yang e Rothman, 2004).

Os grandes avanços verificados na área da Biologia Molecular têm, pois, constituído um precioso auxílio ao diagnóstico em Medicina Veterinária.

1.3. Testes moleculares disponíveis no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da ULHT

O Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT) disponibiliza testes moleculares para detecção de doenças genéticas e

diagnóstico de agentes infecciosos em algumas espécies domésticas. Estes testes são realizados e validados por uma equipa de analistas com largos anos de experiência em Biologia Molecular. Na Tabela 1 encontram-se descritos os testes actualmente disponíveis, sendo que se encontram em desenvolvimento novos testes, no sentido de responder às necessidades identificadas na prática clínica.

Os testes disponibilizados pelo LACH para a detecção de agentes infecciosos no cão são realizados por PCR convencional, através da utilização de *primers* desenhados para

amplificarem especificamente o ADN alvo de cada um dos microrganismos, permitindo a sua identificação até ao nível do género (*Anaplasmaspp.*, *Bartonellaspp.*, *Ehrlichiaspp.*) (Maggi, 2006) ou da espécie (*Leishmaniainfantum*) (Cortes *et al.*, 2004). Para gatos, o LACH disponibiliza a quantificação da carga viral do Vírus da Leucemia Felina por PCR em Tempo Real através da utilização do sistema “Real Time PCR Detection Kit for FelineLeukemia Vírus” (Genesig). Esta quantificação é importante para a monitorização da infecção viral e evolução da doença.

Tabela 1: Testes moleculares disponíveis no LACH para apoio ao diagnóstico clínico ou à criação animal.

Espécie	Amostra biológica
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	
<i>Leishmaniainfantum</i>	Punção medular ou ganglionar
<i>Anaplasma spp.</i>	Sangue total em tubo com EDTA
<i>Bartonella spp.</i>	Sangue total em tubo com EDTA
<i>Ehrlichia spp.</i>	Sangue total em tubo com EDTA
Gato (<i>Felis catus</i>)	
Doença do Rim Poliquístico	Sangue total em tubo com EDTA
VLeF – quantificação da carga viral	Sangue total em tubo com EDTA
Aves (várias espécies, excepto ratites)	
Determinação molecular do sexo	Sangue total em tubo com EDTA

A **Doença do Rim Poliquístico** é uma doença hereditária autossómica dominante que causa a formação de quistos nos rins levando, frequentemente, a insuficiência renal. É a doença hereditária mais prevalente em gatos, afectando cerca de 38% dos gatos Persa, o que corresponde a ~6% da população mundial de gatos (Lyons *et al.*, 2004). A doença surge em consequência de uma mutação pontual (C>A) no exão 29 do gene PKD1, localizado no cromossoma E3 do gato. Esta mutação origina um codão STOP com perda de 25% do terminal carboxilo da proteína. Quando em

homozigotia, o animal morre em estado embrionário (Lyons *et al.*, 2004). Todos os animais doentes se apresentam como heterozigóticos. Lyons e colaboradores (2004) descreveram um teste molecular que permite determinar precocemente se um gato é portador da mutação genética e se irá desenvolver a doença. Informação objectiva relativamente a esta doença é fundamental para qualquer criador de gatos de raça Persa ou raças suas derivadas, de que são exemplo as raças Himalaio, Sagrado da Birmânia e Exótico, entre outras. Perante um resultado positivo, o criador deve ter consciência de

que existe uma probabilidade de 50% desse animal transmitir a mutação e a doença à descendência, perpetuando, assim, o problema genético na raça e comprometendo a qualidade de vida dos animais.

Na Figura 1 é apresentado o resultado da análise molecular de quatro gatos, dois saudáveis e dois portadores da mutação no gene *PKD1*.

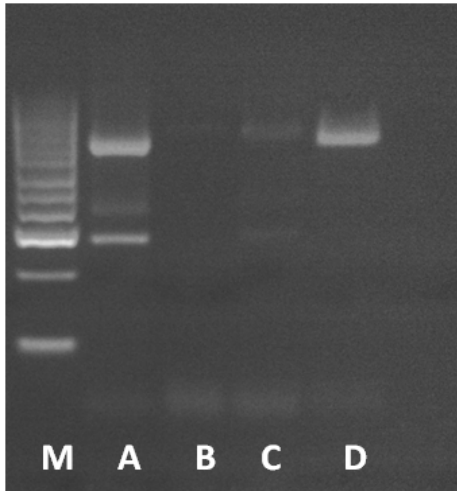


Figura 1 – Resultado da hidrólise enzimática do produto de PCR de gatos em teste. Todos os animais afectados exibem uma banda de maior peso molecular e fragmentos de hidrólise de menor peso molecular. M: Marcador de pesos moleculares (HyperLadder IV, Bioline); A, C: perfil de restrição de animais com a mutação; B, D: perfil de restrição característico de animais sem a mutação e, conseqüentemente, livres da doença.

A determinação molecular do sexo em aves nem sempre é fácil. Certas espécies não apresentam dimorfismo sexual evidente o que dificulta a gestão dos animais em contexto de criação ou da sua conservação *ex-situ*. O desenvolvimento de testes moleculares com base, entre outros, em marcadores cromossómicos permitiu diferenciar machos de fêmeas de forma eficaz e rápida, a partir de amostras de penas ou sangue (Griffiths *et al.*, 1998; Morinhaet *al.*, 2012). Exemplos de aves sem dimorfismo sexual em que o teste molecular é útil são as pertencentes aos géneros *Ara*, *Spheniscus*, *Psittacus*, *Trichoglossus*.

Na Figura 2, é possível observar-se o resultado da análise, por PCR, a aves do

género *Spheniscus* para identificação molecular do sexo.

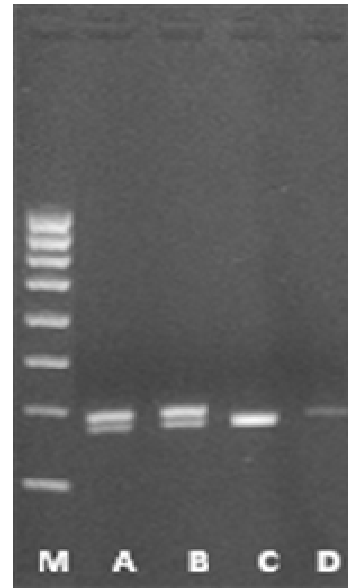


Figura 2 – Resultado da amplificação, por PCR, do gene Chromo-Helicase-DNA-binding (CHD) localizado nos cromossomas sexuais (W/Z), para aves cujo sexo se pretende determinar. M: marcador de pesos moleculares (HyperLadder IV, Bioline); A, B: perfil molecular característico de fêmeas (sexo heterogamético); C, D: perfil molecular específico de machos.

REFERÊNCIAS

- Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmaniadonovanis*.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98(1), 12-7.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., & Dawson R.J.G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7(8), 1071–1075.
- Lyons, L.A., Biller, D.S., Erdman, C.A., Lipinski, M.J., Young, A.E., Roe, B.A., Qin, B., Grahn, R.A. (2004). Feline polycystic kidney disease mutation identified in *PKD1*, *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(10), 2548-55.

Lyons, L.A. (2012). Genetic testing in domestic cats. *Molecular and Cellular Probes*, 26(6), 224-30.

Maggi, R.G. (2006). The use of molecular diagnostic techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* species in arthropods or patients. In: *The International Canine Vector-Borne Disease Symposium* (pp. 8-13). 1st International CVBD Symposium; Billesley, Reino Unido, Abril, 2006.

Mellersh, C. (2012). DNA testing and domestic dogs. *Mammalian Genome*, 23(1-2), 109-23.

Morinha F, Cabral J.A., Bastos E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*, 78(4), 703-14

Viveiros, M., Couto, I., Rossetti, M.L., Almeida da Silva, P. E. (2014). Otimização, validação e controlo de qualidade de testes moleculares de diagnóstico. In: M.V. Cunha, J. Inácio (Eds.), *Abordagens Moleculares em Veterinária* (1ª ed., pp. 51-64). Lisboa: Lidel – Edições Técnicas.

Yang, S, Rothman, R.E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet*, 4(6), 337-348.