



Acta Scientiarum. Health Sciences

ISSN: 1679-9291

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá  
Brasil

Gasparino, Eliane; de Sá Osório, Paulo; Menck Soares, Maria Amélia; Sommer Marques, Débora;  
Veloso Blanck, Danielly; Luizetti, Fabiane

Uso da bioinformática na diferenciação molecular da Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar

Acta Scientiarum. Health Sciences, vol. 30, núm. 2, 2008, pp. 101-106

Universidade Estadual de Maringá  
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307226623002>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Uso da bioinformática na diferenciação molecular da *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*

Eliane Gasparino<sup>1\*</sup>, Paulo de Sá Osório<sup>2</sup>, Maria Amélia Menck Soares<sup>2</sup>, Débora Sommer Marques<sup>1</sup>, Danielly Veloso Blanck<sup>1</sup> e Fabiane Luizetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Oeste de Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: egasparino@uem.br

**RESUMO.** Amebíase invasiva, causada por *Entamoeba histolytica*, é microscopicamente indistinguível da espécie não-patogênica *Entamoeba dispar*. Com auxílio de ferramentas de bioinformática, objetivou-se diferenciar *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por técnicas moleculares. A análise foi realizada a partir do banco de dados da *National Center for Biotechnology Information*; pela pesquisa de similaridade de sequências, elegeu-se o gene da cisteína sintase. Um par de *primer* foi desenhado (programa *Web Primer*) e foi selecionada a enzima de restrição *TaqI* (programa *Web Cutter*). Após a atuação da enzima, o fragmento foi dividido em dois, um com 255 pb e outro com 554 pb, padrão característico da *E. histolytica*. Na ausência de corte, o fragmento apresentou o tamanho de 809 pb, referente à *E. dispar*.

**Palavras-chave:** *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, PCR, bioinformática.

**ABSTRACT.** Molecular discrimination of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by bioinformatics resources. Under microscopic conditions, the invasive *Entamoeba histolytica* is indistinguishable from the non-pathogenic species *Entamoeba dispar*. In this way, the present study was carried out to determine a molecular strategy for discriminating both species by the mechanisms of bioinformatics. The gene cysteine synthetase was considered for such a purpose by using the resources of the National Center for Biotechnology Information data bank in the search for similarities in the gene sequence. In this way, a primer pair was designed by the Web Primer program and the restriction enzyme *TaqI* was selected by the Web Cutter software program. The DNA fragment had a size of 809 bp before cutting, which is consistent with *E. dispar*. The gene fragment was partitioned in a first fragment with 255 bp and a second one with 554 bp, which is similar to the genetic characteristics of *E. histolytica*.

**Key words:** *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, PCR, bioinformatics.

## Introdução

As parasitoses intestinais representam um dos grandes problemas médico-sanitários à sociedade, pela frequência com que ocorrem e, especialmente, pela possibilidade de incapacitar o indivíduo atingido, ou mesmo levá-lo a óbito (Neves, 2005). No Brasil, as parasitoses intestinais constituem um grave problema de saúde, pela dificuldade de acesso ao saneamento básico e pelas condições socioeconômicas precárias de grande parte da população (Brasileiro, 2002).

Amebíase invasiva é um grave problema de saúde em muitos países tropicais (Kimura *et al.*, 1997). Estima-se que, no mundo, 50 milhões de indivíduos adoecem anualmente por amebíase, com 100.000 mortes por ano (Martinez-Palomo e Espinoza-Cantellano, 1998). No Brasil, pelas diferenças sociais, econômicas e culturais do país, além da diversidade

geográfica, as comparações são incompletas e difíceis de serem elaboradas. De maneira geral, na Região Sul e Sudeste, a incidência de *E. histolytica* e *E. dispar* varia de 2,5 a 11%; na Região Amazônica, chega a 19% e, nas demais regiões, apresenta cerca de 10% (Nozaki *et al.*, 1990; Neves *et al.*, 2002). Entretanto, portadores assintomáticos de *E. histolytica* e *E. dispar* são, frequentemente, encontrados em todas as regiões, com exceção da Região Norte, onde a doença apresenta a forma mais séria, tanto intestinal quanto extraintestinal (Cunha *et al.*, 1977), sendo considerada um grave problema de saúde na região metropolitana de Belém (Silva *et al.*, 2005).

*Entamoeba histolytica* e *E. dispar* são duas espécies estreitamente relacionadas, mas genética (Tannich *et al.*, 1989; Tannich e Burchard, 1991; Diamond e Clark, 1993; Petter *et al.*, 1993) e bioquimicamente distintas (Sergeant *et al.*, 1978; Ortner *et al.*, 1997).

Embora ambas possam colonizar o intestino humano e sejam indistinguíveis por critérios morfológicos, somente a *E. histolytica* pode invadir os tecidos e causar doenças, como colite hemorrágica ou abscessos extraintestinais (Willhoeft et al., 1999). Pode-se afirmar que, pelo menos 90% das infecções, antes prescritas como causadas por *E. histolytica*, sejam em consequência da *E. dispar* (Zaki e Clark, 2001).

A detecção e a diferenciação entre as duas espécies fazem-se necessárias, pois, além de *E. dispar* ser três a dez vezes mais frequente que *E. histolytica*, ela não é patogênica, não necessitando medicar o indivíduo (Villela, 2002). Segundo este autor, a não-diferenciação entre essas espécies leva a tratamentos desnecessários, com drogas que são potencialmente tóxicas e, em muitos casos, ineficazes. Portanto, fazer a diferenciação entre os dois organismos é de grande importância clínica.

Alguns testes têm sido empregados na diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar*, como por exemplo, tipagem com anticorpos monoclonais contra antígenos específicos de superfície (adesinas), por meio da análise do RNA microssomal, análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (Villela, 2002) e ELISA (Sharma et al., 1999). Entretanto, os trabalhos encontrados, que envolvem técnicas de biologia molecular, utilizam meios de cultura para o crescimento celular (Clark e Diamond, 1991; Britten et al., 1997; Zindrou et al., 2001), tornando o método muito laborioso. Raros são os trabalhos que oferecem metodologia mais simplificada para a diferenciação por PCR (Evangelopoulos et al., 2000) ou por PCR seguido de digestão com enzimas de restrição (Tannich e Burchard, 1991) e, quando algumas metodologias são comparadas, há vantagem do uso da PCR (Evangelopoulos et al., 2001). Todavia, o diagnóstico oferecido pela grande maioria dos laboratórios no Brasil não distingue as duas espécies.

O presente estudo teve como objetivo diferenciar *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por intermédio das ferramentas da bioinformática, oferecendo mais uma opção de análise por meio de PCR seguido de digestão com enzima de restrição.

## Material e métodos

Este trabalho compreendeu buscas em banco de dados genéticos (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA (NCBI, 2002) por genes que fossem similares nas duas espécies em estudo (*E. histolytica* e *E. dispar*), porém diferentes do DNA humano ou bacteriano. Após a escolha do gene apropriado, foi iniciada a busca por diferenças entre as duas sequências de DNA com a utilização de enzimas de restrição. *Primers* específicos foram desenhados para que

apenas a região de interesse pudesse ser amplificada para análise e elaboração do diagnóstico por DNA genômico. O trabalho foi constituído por análise computacional e análise laboratorial.

### Escolha do gene de interesse

Para a escolha do fragmento de DNA, foram estabelecidos alguns critérios. Não foram utilizados segmentos de DNA obtidos por transcrição reversa de RNA mensageiro, o DNA complementar (cDNA). Outro critério foi a desconsideração de sequências de DNA muito semelhantes ao DNA humano ou bacteriano.

Duas sequências gênicas da cisteína sintase foram obtidas do NCBI – *Nucleotides*, uma de *E. histolytica* (AB000266) e outra de *E. dispar* (AB028631). Estas sequências foram comparadas entre si utilizando-se o programa Blast (Altschul et al., 1997).

### Análise de restrição

As sequências de DNA do gene da cisteína sintase de *E. histolytica* e *E. dispar* foram analisadas pelo programa *WebCutter* ([www.firstmarket.com/cutter/cut2.html](http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html)). Foi elaborado um mapa de restrição com base nas enzimas que reconheçam e digeriam a sequência de DNA apenas uma vez.

Os mapas de restrição resultantes foram comparados entre si para que se detectasse uma enzima apropriada. Foi selecionada a enzima de restrição que reconheceu apenas uma das sequências de DNA, a sequência de *E. histolytica*.

### Desenho dos primers

As sequências de DNA dos genes da cisteína sintase de *E. histolytica* e de *E. dispar* foram submetidas ao programa *Web Primer* (<http://alces.med.umn.edu/websub.html>). Os parâmetros fornecidos para que o programa pudesse sugerir pares de *primers* foram: tamanho entre 19 a 27 bases; temperatura de anelamento variando entre 64 a 68°C; dez *primers* diretos (D) e dez *primers* reversos (R). Os demais parâmetros do programa não foram alterados.

Os dez pares de *primers* sugeridos pelo programa foram analisados para que o par adequado fosse separado. Para isso, cada *primer* foi calculado individualmente quanto à temperatura de anelamento e variação de energia livre ( $\Delta G$ ), conforme descrito por Rychlik (1993).

Para a escolha dos *primers* também foram consideradas suas posições na sequência de DNA, de modo que *primers* D e R posicionados muito distantes ou muito próximos um do outro foram desprezados.

### Isolamento das amebas

Por centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust *et al.*, 1939), as amebas foram separadas das fezes. Cinco gramas de fezes foram homogeneizadas em 10 mL de água destilada e, em seguida, filtradas em gaze dobrada quatro vezes. O filtrado foi centrifugado por 1 min. a 2.500 rpm. O *pellet* foi ressuspensionado em água. Esta operação foi repetida três vezes, quando resultou em líquido sobrenadante de cor clara. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em solução de sulfato de zinco a 33%, densidade de 1,18 g mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram levados à centrifugação por 1 min. a 2.500 rpm, e o sobrenadante foi utilizado para a extração do DNA.

### Isolamento do DNA

Em um microtubo de 2 mL foram colocados 200 µL da suspensão obtida no passo anterior e 500 µL do tampão de lise: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2 M EDTA; 2% brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), 0,2% β-mercaptoetanol. O material foi agitado vigorosamente em *vortex*. Após ter sido incubado em banho-maria, a 65°C, por 1h, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização e nova centrifugação a 14.000 rpm, por 15 min., o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 250 µL de isopropanol, homogeneizado e mantido a 4°C por 30 min. Após nova centrifugação de 30 min. a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 1 mL de etanol a 75%, por duas vezes. Ao *pellet* foi adicionado tampão Tris:EDTA (TE). O DNA extraído foi mantido a -20°C (solução estoque) e a 4°C (solução uso).

### Amplificação do fragmento

A reação de amplificação foi realizada com 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase em 50 µL de volume final da reação. Os reagentes utilizados foram: 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl, 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfato, 1,0 µM de cada *primer* e diferentes concentrações de DNA.

O programa no termociclador consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C, por 3 min., 30 ciclos de amplificação, compreendendo desnaturação das fitas de DNA a 94°C, por 1 min., anelamento dos *primers* a 42°C, por 2 min., e extensão do fragmento a 72°C, por 2 min. Ao final, seguiu-se mais um passo de extensão a 72°C, por 5 min.

O resultado da reação foi analisado em gel de agarose a 1%, corado em brometo de etídeo e observado em transiluminador de luz ultravioleta.

### Resultados e discussão

As principais ferramentas da bioinformática são os programas de computadores e os bancos de dados disponíveis na *internet*, atividade fundamental para a análise de sequências de DNA e proteínas (Bayat, 2002). Este instrumento é capaz de oferecer aumento de velocidade na análise de sequências de DNAs de diferentes fontes, na comparação de variabilidades e na previsão de resultados de análises.

Alguns genes de *E. histolytica* e *E. dispar* foram selecionados, como, por exemplo, o gene da hexoquinase, da peroxidoxina e da cisteína, após a busca em banco de dados. Foi escolhido o gene da cisteína sintase por se enquadrar nas exigências estabelecidas e, principalmente, por se tratar de um DNA genômico, diferente dos outros dois genes.

As sequências de DNA, obtidas do *GenBank* por intermédio de seus códigos de acesso AB000266 para o gene de *E. histolytica* e AB028631 para *E. dispar*, foram utilizadas para todas as análises que se seguiram.

O alinhamento entre as duas sequências de DNA do gene da cisteína sintase de *E. histolytica* e *E. dispar* (Figura 1) ilustra as bases que se apresentam diferentes nas duas espécies, e os asteriscos, colocados abaixo das duas sequências, estão ausentes. Diferenças genéticas entre cepas patogênicas e não-patogênicas também foram encontradas por Tannich e Burchard (1991).

```

E. histolytica      ATTCTTGAACATTGGAGGTACGCCATTAGTAGAATTCATGGAGTAACAGACATCCA
E. dispar          ---CTTGAACATTGGAGGTACTCCTTCTAGTTGAATTCATGGAGTAACAGACATCCC

E. histolytica      AGAATTAAGAAAGAACACGAAATTTAGTTAAATAGAGATTTCATCAATGTGTCATCA
E. dispar          ACTATTAAAAAATACAAAGTCTCTTGAAGTTAGAGTTTCAATCAATGTGTCATCA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      GTTAAAGATCGTGTGGATTAAATATTGTTATCAAGCTATTAAAGATGGAAGATATAAA
E. dispar          GTTAAAGATCGTGTGGATTAAATATTGTTATCAAGCTATTAAAGATGGAAGATATAAA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      CCAGGAATGGAGATTGATCTACATCAGGAATACAGGAATGCACTTGTCTCAAGCT
E. dispar          CCAGGAATGGAGATTGATCTACATCAGGAATACAGGAATGCACTTGTCTCAAGCT
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      GGAGCTGTTTTTGGGTATCGAGTTAATGCAATGCCATCAACATGTGCTTGAAGA
E. dispar          GGTGCTGTTTTTGGGTATCCAGTGAATATAGTAATGCCATCAACATGTGCTTGAAGA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      CAAATGATTATGAAGCATTGGAGCCGAATTAATCTCACTGAAGGAAGAAAGGAATG
E. dispar          CAAATGATCATGAAGCATTGGAGCTAATTTAGTTCTTTCAGATGGAACAAAGGAATG
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      CCAGGTCTATTGAAGAGTTAAACAAATGATAAAGAAATCCAGGAATATTTTGT
E. dispar          CCAGGAGCTATTGCAAAATGAAGAGCTTATCAACACACATCCAAATGAATTTTCCA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      GCAATCAATTTGGTAAATCCAGACATACCGAGACATCACTACACTGCTAATGAGATT
E. dispar          GCCAACCAATTTGGTAATCCTGATAATCTGAGACACATATTATCTGCTAATGAGATT
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      TGGGAAGATACAGATGGAGAAGTTGACATTGTTGTTCTGCTGTTGGAACATCAGGAACT
E. dispar          TGGGAAGATACAAATGGAGAAGTTGACATTGTTGTTCTGCTGTTGGAATCAGGAACT
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      GTTATTGGGGTTGCTGAGAAATTAAGAAAGAAAGAAAGGAATTAAATATAGCAGTT
E. dispar          GTTATTGGAGTTGGCGAGAAATTTGAAGAAAGAAACAGGAGTTAAAGTTGTTGCTGTA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      GAGCCAGAAGATCAGCAGTTGTTGAAGTAAAGCAAGGAGACACATGGAATTCAGGA
E. dispar          GAGCCAGAGATCAGCAGTTTATCAGGAACCTTAAGGACACATGGAATTCAGGA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      ATTGGAGCAGGTTTTATTCCAGATATTATAAGAAAGAAATTTGTTGATGAATATAACCA
E. dispar          ATTGGAGCAGGATTTGTTACTGATATTATTAAGAAAGAAATTTGTTGATGAATATAACCA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      ATTAACACACAGATGCATGGAAATGGCAAGAGCAGTAGTTAAATATGATGGAATTAAG
E. dispar          ATTAACACACAGATGCATGGAAATGGCAAGAGCAGTAGTTAAATATGATGGAATTAAG
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

E. histolytica      TGTGAATGTCAAGTGTGTCAGCAATTTTACAGGATTAA
E. dispar          TGTGAATGTCAAGTGTGTCAGCAATTTTACAGCAATTTTACAGCAATTTTACAGCA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

**Figura 1.** Comparação da sequência de nucleotídeos de *E. histolytica* e *E. dispar*. As letras em caixa alta e negrito indicam os *primers*, e as letras em caixa baixa e negrito indicam o sítio de restrição da *TaqI*.

Com o alinhamento também foi possível verificar a ocorrência de 121 mutações pontuais, com alta incidência de transversões (66%), em relação às transições (45%) neste gene, entre as duas espécies. Segundo Futuyma (1995), as transições são as variações mais frequentemente observadas.

A submissão da sequência de DNA ao programa *Web Primer* resultou em dez sequências de *primers* diretos (D) e dez reversos (R). A Tabela 1 apresenta a relação destes *primers* juntamente com os resultados dos cálculos de variação de energia livre e temperatura de anelamento.

**Tabela 1.** Cálculo de  $\Delta G$  da extremidade 3' dos 20 *primers* analisados para amplificar o gene da cisteína sintase de *E. histolytica* e *E. dispar*. Estão representadas as sequências dos *primers*, os valores de  $\Delta G$  e as temperaturas de anelamento deles. Os *primers* selecionados estão em negrito. D = *primer* direto; R = *primer* reverso.

Nº do <i>primer</i>	Sequência dos <i>primer</i> 5'→3'	Valores de $\Delta G$ em kcal mol <sup>-1</sup>	Temperatura de anelamento em °C
1	D- CAGAAGAATCAGCAGTGTGGAAGG	-6,6	74
2	D- TTGGAAGGTAAAGCAAAGGGACC	-6,0	60
3	D- GTTGAAGGTAAAGCAAAGGGACC	-6,0	72
4	D- TTCATGGAGTAACAGAACATCCAAGAA	-5,1	70
5	D- ACATGGAATTCAAGGAATTGGAGC	-6,3	68
6	D- CACATGGAATTCAAGGAATTGGAGC	-6,3	72
7	D- TGGAAATTATGTGTGGAATGTCAAGTG	-4,8	72
8	D- ATGGAATTATGTGTGGAATGTCAAGTG	-4,8	74
9	D- GAACATCAGGGACTGTTATTGGGG	-9,3	72
10	<b>D- CTGTGAAACTATTGGAGGTAC</b>	-3,6	56
11	R- GCTAAAAATTGCTGCACCACTTGACA	-4,8	76
12	R- GGTCCCTTTGCTTTACCTTCCAA	-6,9	68
13	R- CCTTGAAATTCATGTGGTCCCTT	-6,6	68
14	R- GCCATTTTCCATGCATCTTGTGT	-4,5	66
15	R- TCGTGTTCCTTTCTTAAATCTTGGATG	-5,0	74
16	R- GCTAAAAATTGCTGCACCACTTGACAT	-4,7	74
17	R- AATTCCTTGAATTCATGTGGTCC	-6,0	68
18	R- GCTAAAAATTGCTGCACCACTTGAC	-4,8	70
19	R- CCAAAACAGCTCCAGCTTGACAA	-5,1	70
20	<b>R- GCTAAAAATTGCTGCACCCAC</b>	-6,8	56

$\Delta G$  = diferença de energia livre; D = *primer* direto; R = *primer* reverso.

A escolha correta do *primer* frequentemente dita o sucesso ou o fracasso da amplificação por PCR. Cuidadoso desenho dos *primers* pode significar economia de tempo e de gastos (Sharrocks, 1994). Assim, uma das principais considerações em um protocolo de desenho de *primer* é obter um único e específico produto prescrito pelos *primers* selecionados. O primeiro passo para o desenho de um *primer* é garantir a sua especificidade (Griffin e Griffin, 1994). Os *primers* direto (D) e reverso (R), selecionados a partir de uma lista de opções, foram os de número 10 e 20 (Tabela 1). Estes *primers* foram localizados nas sequências de DNA das duas espécies, e a contagem da distância entre eles resultou em um fragmento de 809 pb, tamanho adequado para as análises pretendidas. *Primers* que apresentaram anelamento a uma distância superior a

900 pb ou inferior a 200 pb foram rejeitados.

Outro fator que foi levado em consideração foram os valores de  $\Delta G$ , os quais apresentaram grande variação, de -3,6 até -9,3. Os *primers* D e F selecionados neste estudo apresentaram valores calculados de  $\Delta G$  de -3,6 e -6,8, respectivamente. Segundo Rychlik (1993), *primers* que formam duplex na região 3'-terminal com valores de  $\Delta G$  inferiores a -5,0 kcal mol<sup>-1</sup> rendem menos de 50% de produto de PCR, em relação à quantia esperada, se o valor da energia livre fosse maior; recomenda-se que *primers* específicos tenham valores de energia livre superiores a -9,0 kcal mol<sup>-1</sup>.

Também foram levados em consideração os valores de temperatura de anelamento de cada *primer*. Os que foram selecionados apresentam a mesma temperatura de anelamento, facilitando a padronização das condições de amplificação.

Essas observações quanto aos cuidados referentes ao desenho de *primers* ditam a eficiência da PCR e, por este motivo, deve ser a etapa mais cuidadosa. Para auxiliar nesta tarefa, a bioinformática é uma ferramenta essencial e atualmente sem substituto. Na revisão realizada por Abd-Elsalam (2003), podem ser encontrados muitos programas específicos para a tarefa.

#### Escolha das enzimas de restrição

Foi utilizada a enzima de restrição *TaqI* que reconhece a sequência TCGA no DNA, promovendo um corte entre as bases T e C. Esta enzima foi selecionada por reconhecer apenas um sítio no DNA do gene da cisteína sintase da *E. histolytica*. Tannich e Burchard (1991) identificaram um segmento de 428 pares de base que diferem internamente por sítios de restrição pelas endonucleases *XmnI*, *TaqI* e *AccI*, para ambos os isolados. Esses achados sustentam ainda mais o conceito de que a *E. histolytica* patogênica e a não-patogênica são espécies distintas. Clark e Diamond (1991), com estudos de genes ribossômicos da *Entamoeba*, também conseguiram demonstrar a existência de duas espécies, embora estreitamente relacionadas, mas geneticamente distintas, a patogênica (*E. histolytica*) e a não-patogênica (*E. dispar*).

A posição na sequência de DNA do gene da cisteína sintase de *E. histolytica*, em que a enzima *TaqI* reconhece e corta o DNA, está representada em caixa baixa e negrito (Figura 1). Após a atuação da enzima, o fragmento foi dividido em dois, um com 255 pb e outro com 554 pb, padrão característico da *E. histolytica*. Na ausência de corte, o que ocorre quando o sítio da enzima não está presente, o

fragmento apresentou o tamanho de 809 pb, referente à *E. dispar*. Outros trabalhos utilizando *primers* específicos e enzimas de restrição (Tannich e Burchard, 1991; Katzwinkel-wladarsch *et al.*, 1994) obtiveram sucesso na diferenciação da espécie patogênica da não-patogênica.

Um problema observado neste trabalho refere-se à obtenção do DNA das amebas de forma pura e íntegra e em quantidade suficiente. A extração de DNA das amebas, a partir de fezes contaminadas, rendeu pequena quantidade de material para análise. Novos testes serão realizados, seguindo metodologia proposta em Evangelopoulos *et al.* (2000).

## Conclusão

As ferramentas de bioinformática possibilitaram selecionar o gene da cisteína sintase para diferenciar a *Entamoeba histolytica* da *Entamoeba dispar*. Possibilitaram também obter a sequência de *primers* específicos e enzima de restrição apropriada (*TaqI*) para o teste. A inclusão deste teste em rotinas laboratoriais será necessária para verificar sua eficácia comercial.

## Referências

- ABD-ELSALAM, K.A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr. J. Biotechnol.*, Nairobi, v. 2, n. 5, p. 91-95, 2003.
- ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BAYAT, A. Bioinformatics: science, medicine and the future clinical review. *BMJ*, London, v. 324, n. 7344, p. 1018-1022, 2002.
- BRASILEIRO, G.F. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Departamento de Medicina. *Parasitologia*. 2002. Disponível em: <<http://www.acssjr.hpg.ig.com.Br/parasitologia.htm>>. Acesso em: 30 out. 2002.
- BRITTEN, D. *et al.* An improved colorimetric PCR-based for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 35, n. 5, p. 1108-1111, 1997.
- CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 297-302, 1991.
- CUNHA, A.S. *et al.* Patogenia da amebíase I. Aspectos clínicos da amebíase no Brasil com especial referência aos estudos realizados em 3 grupos populacionais de regiões geográficas distintas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 289, 1977.
- DIAMOND, L.S.; CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, separating it from *Entamoeba dispar*. *J. Euk. Microbiol.*, [S.l.], v. 40, n. 3, p. 340-344, 1993.
- EVANGELOPOULOS, A. *et al.* A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* em faeces. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 94, n. 3, p. 233-240, 2000.
- EVANGELOPOULOS, A. *et al.* Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitol. Int.*, The Netherlands, v. 50, n. 3, p. 185-189, 2001.
- FAUST, E.C. *et al.* Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. *J. Parasitol.*, Lawrence, v. 25, n. 2, p. 241-262, 1939.
- FUTUYMA, D.J. *Biologia evolutiva*. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.
- GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. PCR technology: current inovations. *CRC Press Inc*, Boca Raton, v. 2, n. 1, p. 5-10, 1994.
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S. *et al.* Direct amplification and diferentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Mclean, v. 5, n. 1, p. 115-118, 1994.
- KIMURA, K. *et al.* Amebiasis: modern diagnostic imaging with pathological and clinical correlation. *Semin. Roentgenol.*, Philadelphia, v. 32, n. 4, p. 250-275, 1997.
- MARTINEZ-PALOMO, A.; ESPINOZA-CANTELLANO, M. Amoebiasis: new understanding and new goals. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 1-3, 1998.
- NCBI-National Center for Biotechnology Information. *Genbank*. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 13 jul. 2006.
- NEVES, D.P. *et al.* Amebíase. In: NEVES, D.P. *et al.* *Parasitologia humana*. 10. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p. 114-124.
- NEVES, D.P. *Parasitologia humana*. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.
- NOZAKI, T. *et al.* Zymodemes of *Entamoeba histolytica*, isolated in Amazon and the Northeast Regions of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 84, n. 3, p. 387-388, 1990.
- ORTNER, S. *et al.* Molecular biology of the hexokinase isoenzyme pattern that distinguishes pathogenic *Entamoeba histolytica* from nonpathogenic *Entamoeba dispar*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 85-94, 1997.
- PETTER, R. *et al.* Electrophoretic karyotype and chromosome assignments for a pathogenic and nonpathogenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, Washington, D.C., v. 61, n. 9, p. 3574-3577, 1993.
- RYCHLIK, W. Selection of primers for polymerase chain reaction. In: WHITE, B.A. (Ed.). *Methods in molecular biology*. Totawa: Human Press, 1993. p. 31-40.
- SERGEAUNT, P.G. *et al.* The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme eletrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 72, n. 5, p. 519-21, 1978.
- SHARMA, R. *et al.* Identification of novel genes of non-pathogenic *Entamoeba dispar* by expressed sequence tag

- analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 279-285, 1999.
- SHARROCKS, A.D. The design of primers for PCR. *CRC Press Inc*, Boca Raton, v. 2, n. 1, p. 5-10, 1994.
- SILVA, M.C.M. et al. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 969-973, 2005.
- TANNICH, E. et al. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, [S.l.], v. 86, n. 13, p. 5118-5122, 1989.
- TANNICH, E.; BURCHARD, G.D. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 29, n. 2, p. 250-255, 1991.
- VILLELA, M.S.H. *Complexo Entamoeba histolytica - Entamoeba dispar*: porque é necessário realizar a diferenciação entre estas duas espécies. 2002. Disponível em: <<http://www.cotonbafolelotuca.hpg.ig.com.br>>. Acesso em: 29 ago. 2002.
- WILLHOEFT, U. et al. DNA sequences corresponding to the ariel gene family of *Entamoeba histolytica* are not present in *E. dispar*. *Parasitol. Res.*, Berlin, v. 85, n. 5, p. 787-789, 1999.
- ZAKI, M.; CLARK, C.G. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 39, n. 3, p. 897-905, 2001.
- ZINDROU, S. et al. Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. *Acta Trop.*, Basel, v. 78, n. 2, p. 117-125, 2001.

Received on April 16, 2008.

Accepted on September 02, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.