



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Guilherme Lucas de Jesus Magalhães

**ESTUDO PRÁTICO SOBRE A CLONAGEM MOLECULAR DO GENE CISTEÍNA
PEPTIDASE DO *Trypanosoma cruzi***

Rio de Janeiro

2022

Guilherme Lucas de Jesus Magalhães

**ESTUDO PRÁTICO SOBRE A CLONAGEM MOLECULAR DO GENE DE CISTEÍNA
PEPTIDASE DO *Trypanosoma cruzi***

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio –
Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como
requisito parcial para aprovação no Curso Técnico
em Biotecnologia.**

Orientador(a): Tainah Silva Galdino de Paula

Coorientador(a): Dário Eluan Kalume

Rio de Janeiro

2022

*Dedico este Trabalho para minha mãe, Érika; e
minha avó, Cenira, que sempre me inspiraram a
continuar seguindo frente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Tainah Silva Galdino de Paula por me auxiliar deste do pré-projeto. Graças a ela fui capaz de escolher com precisão o tema deste trabalho, e de ter obtido materiais para praticar as metodologias de Biologia Molecular.

Agradeço ao meu coorientador Dário Eluan Kalume por me aceitar como coorientando e oferecer sua bancada para realizar as metodologias. Também agradeço a paciência, a educação e os ricos ensinamentos teóricos e práticos de laboratório e Biologia Molecular.

Agradeço a todos envolvidos por fornecer os materiais necessário para realização prática desta monografia.

Agradeço a minha mãe e minha avó por serem mulheres trabalhadoras e guerreiras, se tornando minha fonte de inspiração para continuar me esforçando mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Deus por tudo ter ocorrido bem durante o cenário caótico de Pandemia, prejudicando o desenvolvimento do projeto em si. Contudo, foi possível realizar o objetivo principal.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é uma enfermidade tropical e classificada como negligenciada. Dados dos relatórios da Organização Mundial de Saúde, revelam que há aproximadamente 6 milhões de pessoas infectadas em 21 países da América Latina e 14 mil mortes anuais. Metodologias de biologia molecular têm sido vastamente usadas para se investigar o mecanismo de infecção, em pesquisas para desenvolvimento de fármacos, diagnóstico da doença, e na classificação das cepas de *T. cruzi*. Neste trabalho de conclusão do estágio do ensino médio, baseou-se na abordagem da metodologia de clonagem molecular usando o gene da cisteíno peptidase de *Trypanosoma cruzi* como modelo. Esta enzima está relacionada, entre outras funções, à sobrevivência e diferenciação do parasito durante a morfogênese, a invasão de células hospedeiras e aos processos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Portanto, a estratégia usada neste projeto, envolveu inicialmente, o cultivo de cepas Dm28c, a extração do seu DNA total, sua quantificação e análise qualitativa por eletroforese. Para a amplificação da região de interesse do gene da cisteíno peptidase por PCR qualitativa (Reação em Cadeia da Polimerase), foram usados iniciadores previamente desenhados, cujos produtos gerados pela PCR (*amplicons*), de 115 pb, foram monitorados por eletroforese em gel de agarose e por acrilamida. Para a clonagem, o *amplicon* foi ligado ao vetor linearizado pGEM-T easy vector, e posteriormente, usado para transformação das células quimicamente competentes, *E. coli* cepa DH5 α . Após semeadura e cultura em meio LB ágar, as colônias foram selecionadas para a execução da PCR colônia. O resultado da inserção do fragmento clonado foi monitorado por eletroforese em gel de agarose, cuja banda esperada foi de 347 pb. Por fim, as análises do perfil eletroforético das várias colônias selecionadas confirmou a clonagem da região do gene da cisteíno peptidase.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*; Clonagem Gênica; PCR colônia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Figura 02 - Fluxograma das metodologias utilizadas	15
Figura 03 - Vetor plasmídeo (pGEM – T easy vector)	21
Figura 04 - Análise da eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total extraído de <i>T.cruzi</i> (cepa CL-Brener).	25
Figura 05 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR	26
Figura 06 - Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% do produto de PCR	27
Figura 07 - Clonagem das ligações em células de <i>E.coli</i>	28
Figura 08 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR colônia	29
Figura 09 - Mapa do vetor de clonagem pGEM – T- easy vector	30

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Quantificação do material genético de <i>T.cruzi</i> cepa Dm28c extraídos por <i>In-house</i> e DNAZOL®	24
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EPSJV	Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramma
g/v	Gramma por volume
IOC	Instituto Oswaldo Cruz

LIPMed Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas

LIT *Liver Infusion Triptose*

M Molar

mg Miligrama

MgCl₂ Cloreto de magnésio

min Minuto

mL Mililitro

mM Milimolar

NaCl Cloreto de sódio

ng Nanograma

ng/μL Nanograma por microlitro

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Tampão fosfato salino

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

s Segundos

TA Tampão de amostra

TBE Tris Borato EDTA

TEMED Tetrametiletilenodiamina

UV Ultravioleta

v/v Volume por volume

°C Graus Celsius

μL Microlitro

® Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
1.1. A DOENÇAS DE CHAGAS	09
1.2. PROTOZOÁRIO, MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA	09
1.3. BIOLOGIA MOLECULAR E A PCR NA DOENÇA DE CHAGAS	11
1.4 CLONAGEM GÊNICA	12
1.5. JUSTIFICATIVA	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. CULTIVO E COLETA DAS CÉLULAS EPIMASTIGOTAS	15
3.2. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL	16
3.2.1 EXTRAÇÃO POR DNAZOL®	16
3.2.2 EXTRAÇÃO BASEADO NO PROTOCOLO <i>in house</i>	17
3.3. QUANTIFICAÇÃO EM Qubit™ 4 Fluorometer	17
3.4. ANÁLISE DE DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	17
3.5. PCR – AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO GÊNICA DE CISTEÍNA PEPTIDASE	18
3.6. ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	19
3.7. CLONAGEM GÊNICA	20
3.7.1. REAÇÃO DE LIGAÇÃO	20
3.7.2 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS BACTERIANAS	21
3.8. SELEÇÃO DAS COLÔNIAS E PCR COLÔNIA	22
4. RESULTADOS	23
4.1. CONTAGEM DAS CÉLULAS Dm28c	23
4.2. QUANTIFICAÇÃO EM Qubit™ DOS DNAs EXTRAÍDOS (Dm28c)	24
4.3. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS DNAs PREVIAMENTE EXTRAÍDOS DE CL-Brener	24
4.4. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR EM GEL AGAROSE	26

4.5. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR EM GEL DE POLIACRILAMIDA	27
4.6. CLONAGEM	28
4.7. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORE DA PCR COLONIA EM GEL AGAROSE	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	32
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9. APÊNDICES	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), a doença de Chagas é uma enfermidade tropical e negligenciada, causando um total de 14 mil mortes e 300 mil casos por ano. Há aproximadamente 6 milhões de pessoas infectadas em 21 países da América Latina, atingindo 10 milhões de pessoas no mundo e calcula-se que 70 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença. A infecção é mais comum em países da América do Sul, sendo os mais acometidos o Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e Venezuela. Porém, um arquivo publicado em 2007, apresenta que alguns países europeus e norte-americanos possuem infectantes (DIAS, 2007). Geralmente a infecção ocorre em áreas rurais ou mais pobres que podem favorecer a colônia de triatomíneos (DIAS; QUEIROZ; DIOTAIUTI; PIRES, 2016).

Baseado nos sintomas da doença, observa-se duas fases: aguda e crônica. Na primeira, a maioria dos pacientes não apresenta sintomas, mas quando ocorre podem apresentar: febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, chagoma de inoculação (cutânea), náuseas, edema de pálpebra, diarreia, vômito, hepatoesplenomegalia, miocardite e dificuldade para respirar. Na fase crônica o paciente pode desenvolver depois de anos ou décadas do aparecimento da fase aguda, podendo permanecer assintomático ou sintomático. Nesta fase ocorre a destruição ou alteração das fibras cardíacas, prejudicando a capacidade de contração do coração; cerca de 10% dos infectados desenvolvem o aumento excessivo do esôfago (megaesôfago) ou do cólon (megacólon) provocado pela destruição de fibras nervosas (OMS, 2010; AMENDOEIRA, 2012).

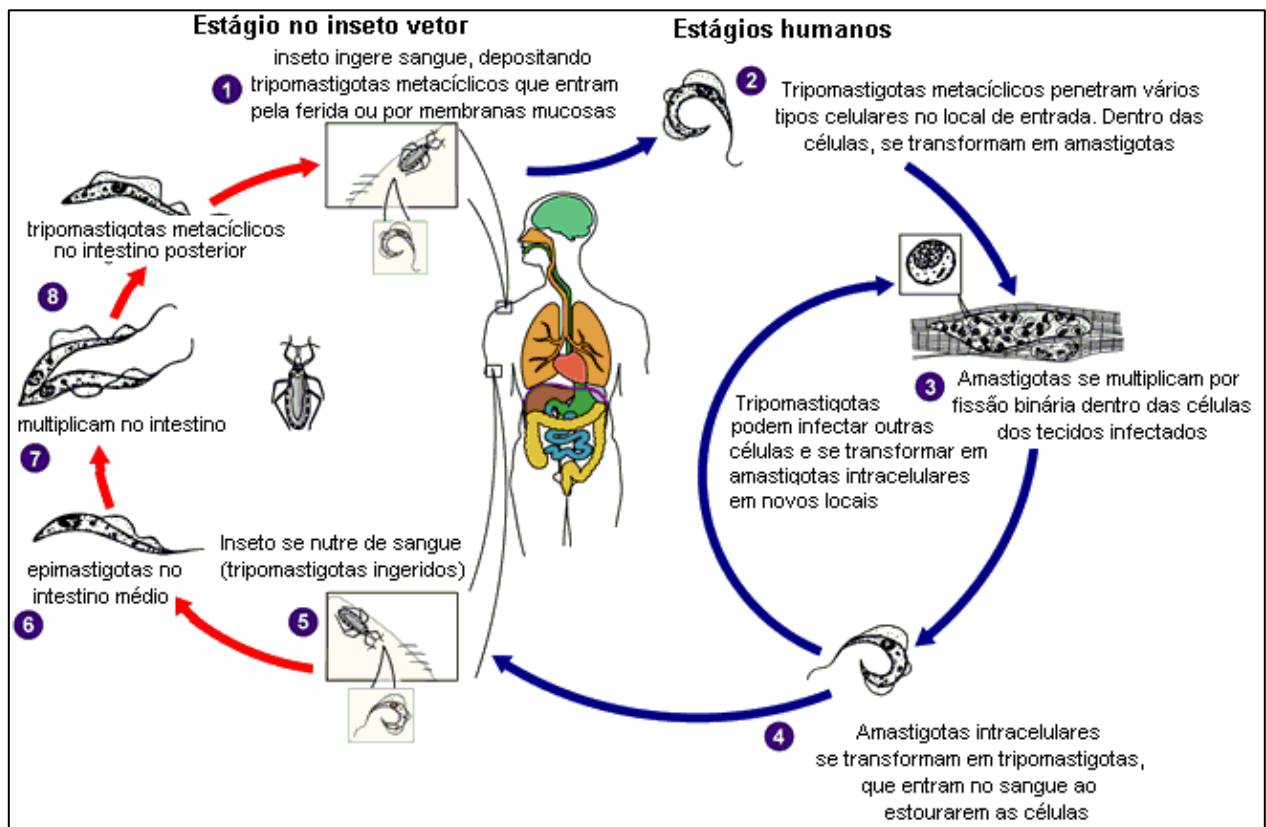
1.2 PROTOZOÁRIO, MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, também denominada Tripanossomíase Americana, identificada pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (1909). O parasito pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, de ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae e de gênero *Trypanosoma* (AMENDOEIRA, 2012; CHAGAS, 1909). Há 3 formas evolutivas do protozoário, as quais foram baseadas na forma geral, na posição do núcleo, no cinetoplasto (contendo o kDNA) e do flagelo: tripomastigotas, amastigota e epimastigota (CHAGAS, 1909) (MEM INST OSWALDO CRUZ, 94 (SUPPL.I): 17-34, 1999.)

Os tripomastigotas são formas alongadas, flageladas e não replicativas do parasito. Possui duas formas infectantes, tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas circulantes. Os metacíclicos estão localizados no final do tubo digestório do inseto, após serem eliminados nas fezes e na urina do vetor, e são capazes de infectar os mamíferos. Os circulantes estão localizados na circulação sanguínea dos mamíferos, e são responsáveis por infectar o inseto através da picada (AMENDOEIRA, 2012). As formas amastigotas são arredondadas, não flageladas e replicativas. Multiplicam-se somente dentro da célula do hospedeiro vertebrado (AMENDOEIRA, 2012). Epimastigotas possuem formato fusiforme, são flagelados e replicativas do protozoário. Diferente da amastigota, multiplica-se somente no trato digestório do hospedeiro invertebrado (AMENDOEIRA, 2012).

O ciclo de vida do parasito (Figura 1) envolve um inseto vetor e um mamífero hospedeiro, que pode ser o humano, um marsupial ou ainda o tatu.

Figura 01 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: Estágio 1 representa invasão do parasito na forma tripomastigota metacíclico dentro do hospedeiro vertebrado assim que o vetor realiza seu repasto sanguíneo; Estágio 2 representa a invasão celular das formas

metacíclicas, se convertendo para amastigota; Estágio 3 representa a multiplicação das formas amastigotas dentro da célula do mamífero; Estágio 4 representa conversão dos amastigotas para tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea; Estágio 5 representa infecção do hospedeiro invertebrado assim que realiza seu repasto no hospedeiro vertebrado infectado com os circulantes; Estágio 6 representa a conversão das formas circulantes para epimastigotas no intestino médio, assim, migrando-se para o final do intestino do inseto; Estágio 7 representa multiplicação das formas epimastigotas no intestino do inseto; Estágio 8 representa conversão das formas epimastigotas, aderidos no final do intestino do inseto, para tripomastigotas metacíclicas. Fonte: (<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>)

Os principais vetores do *T. cruzi* são os insetos (hemípteros) hematófagos pertencentes à ordem Reduviidae e à subfamília Triatominae, chamados de triatomíneos. O estudo dos barbeiros, como são conhecidos devido suas picadas serem na face, foi impulsionado com a descoberta da Tripanossomíase Americana em 1909 (CHAGAS, 1909). Quando um triatomíneo se alimenta do sangue de um mamífero infectado, os tripomastigotas circulantes aderem-se ao estômago do inseto. A partir de então inicia-se o processo de diferenciação para a forma replicativa, epimastigotas, e sua migração ao longo do intestino. Próximo do final do intestino, os epimastigotas aderem-se às paredes intestinais, e iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (AMENDOEIRA, 2012).

Após o repasto sanguíneo, o triatomíneo tem o hábito de defecar e/ou urinar, causando a eliminação dos tripomastigotas metacíclicos que estão aderidos à parede intestinal na sua parte final. Ao coçar o local da picada, o hospedeiro vertebrado se infecta ao levar os parasitos para as mucosas ou pele lesionada hospedeiro. Em seguida, os tripomastigotas se transformam em sua forma infectiva e replicativa intracelular, os amastigotas. Após multiplicarem-se diversas vezes, os amastigotas assumem a forma tripomastigotas circulantes e rompem as células hospedeiras, sendo liberados na circulação sanguínea e disseminando-se por todo organismo. Os tripomastigotas circulantes são capazes de invadir macrófagos, fibras musculares esqueléticas, cardíacas e nervosas (AMENDOEIRA, 2012).

1.3 BIOLOGIA MOLECULAR E A PCR NA DOENÇA DE CHAGAS

A aplicação dos métodos de biologia molecular tem sido cada vez mais necessária no âmbito de pesquisa assim como no diagnóstico da doença. Os avanços nessa área permitiram

caracterizar o sequenciamento do material genético de diversas cepas de *T.cruzi*, assim como a identificação de antígenos na superfície do parasito (DEGRAVE, 2017).

A técnica de PCR, desenvolvido por Kary Mullis (1983), consiste em três etapas: A separação, onde a dupla fita de DNA será separada a uma temperatura em torno de 95° C por 30s – 1 min. Após a separação, ocorre a etapa de anelamento onde cada fita do DNA se liga com um iniciador (ou *primer*) que complementa a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada. No processo de extensão corre a síntese da fita com dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) usando a DNA polimerase (Taq polimerase). No contexto da doença, o método é aplicado para identificar regiões específicas do DNA, permitindo detectar a presença do parasito no material analisado (FERREIRA; CABRAL; MARTINS; ARAUJO *et al.*, 2018) (ALVES, 2018). A PCR e suas variantes, também são vastamente empregadas em pesquisas de busca por marcadores moleculares que permitam a classificação de cepas (Zingales, B et al., 2009), ou ainda, na investigação de genes que apresentam papel importante no ciclo de vida do parasito, como transialidases e enzimas relacionadas a invasão de células hospedeiras. Uma delas é o grupo das cisteíno peptidases, foco deste trabalho, cuja PCR foi usada para investigar uma região do gene responsável pela síntese dessa enzima. Ressalta-se que uma das componentes mais abundantes do grupo das cisteíno peptidases no *T. cruzi* é a cruzipaina. Dentre suas principais funções, destacam-se a sobrevivência e multiplicação no interior da célula hospedeira, participação na diferenciação do parasito, degradação de proteínas, invasão celular e escape do sistema imune do hospedeiro vertebrado (UEHARA, 2010).

1.4 CLONAGEM GÊNICA

A clonagem molecular é um importante método aplicado em laboratórios para estudar ou produzir proteínas através da expressão do gene de interesse. Resumidamente, a técnica consiste em isolar e amplificar o fragmento de DNA de interesse através de uma PCR; os *amplicons* gerados serão ligados por um vetor formando um DNA recombinante; o DNA recombinante passará pela etapa de transformação, onde é inserido em célula hospedeira (células competentes) capaz de replicar o DNA recombinante. Na medida que essas células se replicam em meio sólido, os clones com o inserto podem ser selecionados dos que não o possuem. Uma das opções metodológicas capazes de se certificar que os fragmentos de interesse nos vetores híbridos foram realmente

clonados corretamente é a PCR colônia. Primers específicos são desenhados para amplificar a região (no plasmídeo) onde ocorre a inserção do gene alvo, e seu monitoramento é através de eletroforese.

1.5 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a doença de Chagas é uma enfermidade endêmica que acaba atingindo, pela via de transmissão clássica, as populações mais vulneráveis socioeconomicamente que vivem nas zonas rurais, sendo assim, despreocupa aqueles que vivem em áreas urbanas. No entanto, a forma de transmissão oral, através dos surtos, vem crescendo ao longo dos anos tornando-se a principal via de infecção (Ferreira, 2014). Mesmo que a doença atualmente seja controlada, ainda pode ser fatal caso o paciente não se trate adequadamente. Por essa razão, ampliar os estudos relacionados ao protozoário é um fator preponderante de saúde pública.

A cisteína peptidase do *T.cruzi* é uma proteína expressa em todos os estágios do parasito, porém é mais abundante em sua fase epimastigota. O papel desta proteína é evitar que parasito seja fagocitado por macrófagos durante a invasão no organismo hospedeiro, sendo assim, um importante mecanismo de escape para sobrevivência do *T.cruzi* (CAMPO, 2016).

Dessa forma, o estudo desta região gênica através da clonagem molecular pode ser preciosa ferramenta metodológica de investigação frente às informações na interação parasito-hospedeiro, contribuindo na geração de informações pertinentes ao campo de estudo. Os resultados ou o processo que irá ser levantado neste estudo poderá ser utilizado como base para futuros projetos que envolvam o gene ou o seu produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a clonagem de uma região gênica correspondente a cisteína peptidase de cepas CL Brener de *Trypanosoma cruzi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

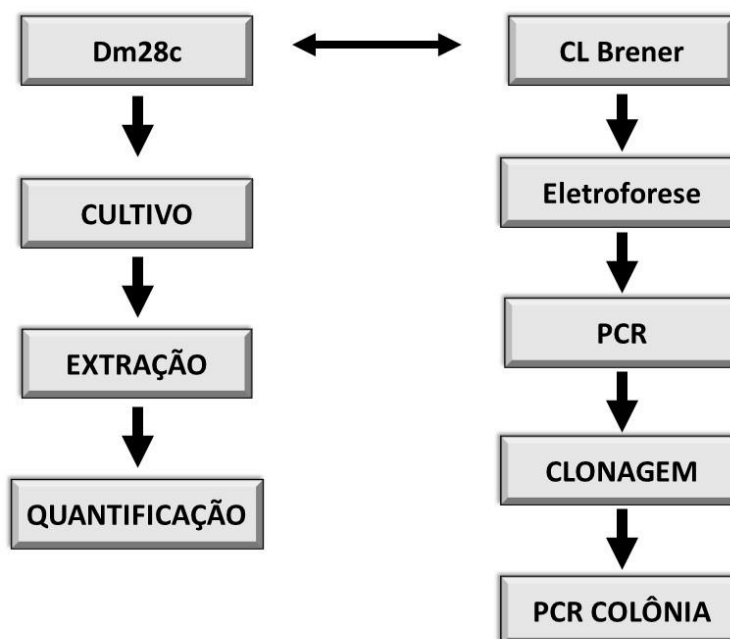
- 1) Investigar a região gênica da cisteína peptidase através da PCR.

- 2) Certificar a clonagem dos plasmídeos híbridos através da PCR colônia.

MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma de trabalho ocorreu de forma paralela com duas cepas de *T. cruzi* CL Brener e Dm28c (Figura 2). Com a cepa Dm28c, para aprendizagem e desenvolvimento prático, iniciou-se a cultura de células epimastigotas seguido da extração e quantificação de DNA total. A partir desse ponto, deu-se continuidade das metodologias com o DNA previamente extraído de cepa CL-Brener, seguido da análise em gel agarose, PCR, clonagem e PCR colônia. Resumidamente, a metodologia foi elaborada da seguinte forma:

Figura 02: Fluxograma das metodologias utilizadas



Legenda: Fluxograma representa cada metodologia aplicada nas diferentes cepas. Para Dm28c, foi realizado a metodologia de cultivo de células, extração do material genético e a quantificação destes materiais. Enquanto em paralelo, realizava análise dos materiais já extraídos de cepa CL Brener, dando continuidade as posteriores técnicas da clonagem, finalizando na PCR Colônia.

3.1. CULTIVO E COLETA DAS CÉLULAS EPIMASTIGOTAS

As células epimastigotas da cepa Dm28c de *T. cruzi* foram gentilmente doadas pelo Doutor Otacílio da Cruz Moreira, coordenador da Plataforma de PCR em tempo real do IOC. As culturas

axênicas de células epimastigotas foram realizadas em meio de Warren modificado (Warren, 1960) com extrato de BHI (Brain Heart Infusion, OXOID, EUA) na concentração de 37 g/L e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As células foram cultivadas em quatro frascos de cultura, denominados C1, C2 e cada uma contendo 50 mL (10 mL de inóculo, 10 mL de SBF e 30 mL de meio BHI). Também, se cultivou as células em menor escala contendo 10 mL de meio de cultura (denominada C3). As culturas de células foram iniciadas com densidade celular correspondentes a cerca de $2,2 \times 10^7$ células/mL e cultivadas por 7 dias na incubadora BOD a 28°C até atingirem a fase estacionária. Em seguida, as células foram coletadas, reunidas e distribuídas em 4 tubos de fundo cônico (Falcon, EUA) de 50 ml, e centrifugada por 10 minutos a 2600 rpm (1000 g) a temperatura ambiente (cerca de 20°C). O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspensionado em cerca de 20 mL de tampão fosfato-salino (PBS) (Fosfato monobásico 20 mM, KCl 2.7 mM, e NaCl 137 mM pH 7,4). Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 2600 rpm (1000 g) a temperatura ambiente (cerca de 20°C). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, sendo mantidos apenas os *pellets*, os quais foram ressuspensos em 5 ml de PBS, e novamente centrifugados por 10 minutos a 2600 RPM. O processo de lavagem e centrifugação foi repetido mais uma vez, e os *pellets* foram aliquotados em seis microtubos e congelados a -20°C até o seu imediato uso para extração de DNA.

3.2. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

3.2.1 EXTRAÇÃO POR DNAZOL®

Acrescentou-se 1 mL de DNAZOL® e 50 µL de Proteinase K na massa celular, homogeneizando em seguida. Distribuiu-se 500 µL da mistura em 2 tubos (2 mL), adicionando 300 µL de etanol absoluto em cada um. Após homogeneizar invertendo ambos os tubos por cerca de 5 minutos e deixando-os imóveis por 1 minuto em temperatura ambiente, houve formação de precipitado (DNA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 75% (v/v). Ambos os DNA foram ressuspensionados com 400 µL de NaOH (8mM) e armazenados em -15° C.

3.2.2 EXTRAÇÃO BASEADO NO PROTOCOLO *In-house*

Foi adicionado 1,05 mL de tampão de lise (Apêndice 1) na massa celular, distribuindo 650 μ L em 2 tubos (2 mL). Ambos os tubos foram incubados no termobloco por 30 minutos a 65° C sob agitação de 1000 rpm. Após a incubação, foi adicionado 1300 μ L de etanol absoluto em cada tubo, homogeneizando delicadamente foi possível observar a formação de precipitado (DNA). Os tubos foram centrifugados (14000 rpm a 4° C por 10 min) e o precipitado foi para o fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e ambos os tubos foram novamente para o termobloco (65° C por 10 min sem agitação) para “secar” o precipitado. Os DNAs foram ressuspensos com 400 μ L de tampão de ressuspensão (Apêndice 2), e armazenados a – 15° C.

3.3. QUANTIFICAÇÃO EM Qubit™ 4 Fluorometer

A quantificação dos DNA extraídos foram realizadas no equipamento Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen). Todos os reagentes usados foram do Kit Qubit™ dsDNA. Misturou-se 10 μ L de cada um dos dois padrões de 0 ng/ μ L e 10ng/ μ L com 190 μ L de *Qubit working solution* (Apêndice 3) para a calibragem do equipamento. Para o uso, as amostras de DNA extraídas por ambos os métodos foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos para remoção de partículas em suspensão. Misturou-se, então, 1 μ L de amostra e 199 μ L de *Qubit working solution* e incubadas por dois minutos, antes da leitura da fluorescência no equipamento (Tabela 1).

3.4. ANÁLISE DE DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A qualidade dos DNAs que foram extraídos de formas epimastigotas cepa CL-Brener, em 27/08/2019, pela ex-aluna Thaís no laboratório de ensino da EPSJV, foi analisada em uma eletroforese em gel de agarose 1%. Cada amostra de DNA foi identificada pelo método correspondente a sua extração: dois por DNAzol® (Thermo Fisher Scientific) identificados como “DNAzol 1” e “DNAzol 3”; dois DNAs extraídos por Trizol® (Thermo Fisher Scientific) identificados como “Trizol 2” e “Trizol 3”; e dois DNAs extraídos pelo protocolo *in house* identificados como “In house 1 A” e “In house 3 A”.

Para a confecção do gel, pesou-se 0,5 g de agarose (Uniscience™, USA) e se dissolveu em 50 mL de TBE 0,5X (Apêndice 4). A mistura foi, então, aquecida em micro-ondas por cerca de 1 minuto ou a completa homogeneização da solução e completa dissolução da agarose. Após seu breve resfriamento, a solução de agarose foi vertida em um molde (5 cm x 10 cm) para géis e inserido um pente de 22 poços. Para a preparação das amostras, adicionou-se 3µL de TA 6X (Apêndice 5) a 5 µL de cada alíquota de DNA. Em cada poço, aplicou-se um volume total de 8 µL.

Antes da aplicação das amostras nos poços, o gel foi transferido do molde para uma cuba de eletroforese horizontal e, então preenchida com solução-tampão TBE 0,5X, o suficiente para cobrir o gel. As amostras foram aplicadas no gel como se segue: Poços 1 e 2 - Marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen); Poço 3- sem aplicação de amostra; Poço 4- DNAZOL 1; Poço 5- DNAZOL 3; Poço 6- sem aplicação de amostra; Poço 7- TRIZOL 2; Poço 8- TRIZOL 3; Poço 9- sem aplicação de amostra; Poço 10- IN HOUSE 1A; Poço 11- sem aplicação de amostra; Poço 12- IN HOUSE 3A.

Para a eletroforese, conectou-se os cabos positivos e negativos a uma fonte de eletroforese, e aplicou-se uma voltagem constante de 100 V por cerca de 2 horas ou até a frente de migração marcado pelo primeiro corante eluir do final do gel. O gel foi corado em GelRed ® (Apêndice 6) mantido por 15 minutos, e posteriormente documentado em um fotodocumentador GelDoc EQ Universal Hood da BioRad (Figura 04).

3.5. PCR – AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO GÊNICA DE CISTEÍNA PEPTIDASE

Para a PCR, as ferramentas usadas foram previamente esterilizadas em luz UV na cabine de PCR, assim como o preparo do Mix. Foram executadas duas reações usando o Kit da *Promega*® - 60 *Taq Flexi DNA Polymerase* para a preparação do mix. Na preparação, foram usados os seguintes reagentes: 4 µL de buffer (5X); 1 µL de dNTP (10mM); 4 µL MgCl₂ (25mM); 0,25 µL de Taq polimerase; 30,75 µL de H₂O; e 1 µL de cada iniciador (*primers*) da cisteína peptidase.

Os iniciadores foram desenhados da seguinte forma: o *primer* F (*Forward*): 5'GTGCGACAAAACGGACTCTG3' o *primer* R (*Reverse*): 5'CGACGCATAAGGGTAGCTGT3'.

Em três microtubos chamados de “Mix 1”, foram identificados como DNAZOL Mix 1, IN HOUSE Mix 1 e Negativo Mix 1:

- DNAZOL Mix 1: foi colocado 48 μL de mix e 2 μL de fragmentos do DNAZOL 1;
- IN HOUSE Mix 1: foi colocado 48 μL de mix e 2 μL de fragmentos do IN HOUSE 1A;
- Controle Negativo Mix 1: foi colocado 48 μL de mix e 2 μL de H_2O ;

O mesmo raciocínio seguiu para os tubos chamados de “Mix 2”, mas a composição dos mix nesta reação levou 27,75 μL de H_2O . Os três tubos foram identificados como DNAZOL Mix 2, *in house* Mix 2 e Negativo Mix 2:

- DNAZOL Mix 2: foi colocado 45 μL de Mix e 5 μL de fragmentos do DNAZOL 1;
- IN HOUSE Mix 2: foi colocado 45 μL de Mix e 5 μL de fragmentos do IN HOUSE 1A;
- Controle Negativo Mix 2: foi colocado 45 μL de Mix e 5 μL de H_2O .

Após o processo de reação, ambos os tubos foram levados para um termociclador durante 2 horas. A amplificação ocorreu obedecendo os ciclos do perfil térmico. Iniciando a desnaturação a 95° C por 2 min. Logo à amplificação ocorreu seguidos por 35 ciclos: 95° C por 30s, 58° C por 45s, 72° C por 45s, e finalizando a extensão a 72° C por 10 min seguido de 4° C de resfriamento.

3.6. ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os *amplicons* foram analisados em gel agarose 1,5% (g/v) preparado com 0,75 g de agarose e 50 mL de TBE 0,5X, e o procedimento foi o mesmo como descrito no item 3.4. Foi usado um marcador padrão de 100 pb para a análise, e em cada poço selecionado foram colocados 2 μL de tampão de amostra 6X e 10 μL de amostra. Para a eletroforese, foi aplicada uma voltagem constante de 85 Volts por cerca de 1 hora e 12 min. O gel foi corado em solução de GelRed® por 5 min e documentado em um fotodocumentador GelDoc EQ Universal Hood da BioRad (Figura 05).

Considerando a diferença do tamanho de poros e a melhor resolução de bandas, foi preparado um gel poliacrilamida 10,5% (p/v) (Apêndice 7) com intuito de comparar os resultados com a eletroforese dos *amplicons* em gel agarose 1,5%. O mesmo tampão de amostra e valor total foi usado em cada poço (2 μL de Tampão de amostra 6X e 10 μL de amostra). Para esta eletroforese,

utilizou dois padrões de 50 pb, um da ABGENE e o outro da Invitrogen. Após a corrida de 80 min na voltagem constante de 150V, o gel foi mantido em GelRed® por 10 min, e visualizado no fotodocumentador GelDoc EQ Universal Hood da BioRad (Figura 06).

3.7. CLONAGEM GÊNICA

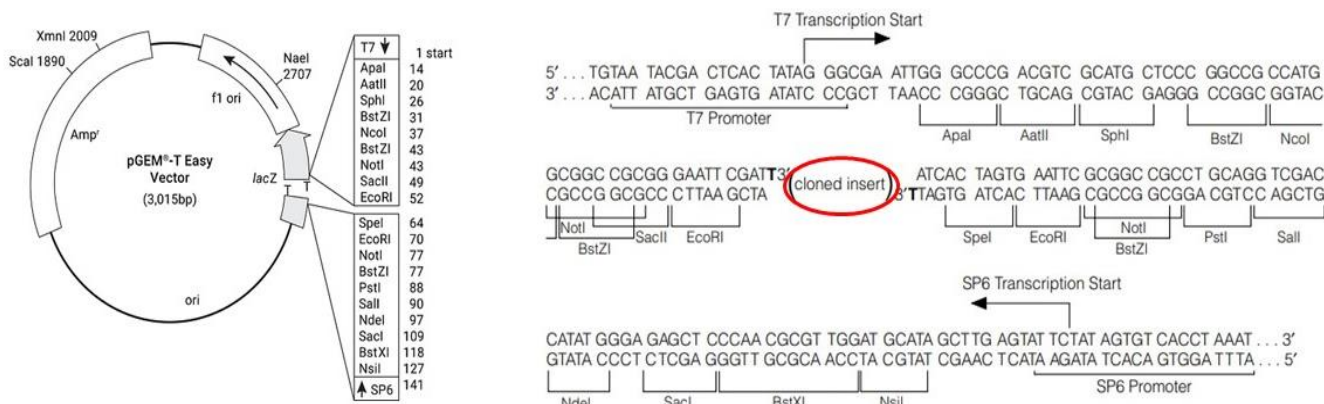
3.7.1 REAÇÃO DE LIGAÇÃO

Após a primeira etapa da clonagem gênica, foram selecionados os produtos de PCR do Mix 2 (DNAZOL 1 e IN HOUSE 1 A) para se realizar a reação de ligação *amplicons* com o vetor plasmídeo linearizado (Figura 3). Para tal, foi utilizado o Kit da Promega® *pGem – T Easy Vector System*, contendo além do vetor, o tampão de ligação, o controle e a Taq polimerase. A mistura de reagentes da reação está descrita a seguir:

- Para o Controle Positivo: em um microtubo misturou-se 5 µL tampão de ligação (Buffer 2X), 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL do vetor (pGEM – T easy vector), 2 µL do Controle e 1 µL de água.
- Para o DNZOL 1: em um microtubo misturou-se 5 µL tampão de ligação (Buffer 2X), 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL do vetor (pGEM – T easy vector), 2 µL do Produto de PCR (DNAZOL 1 do Mix2) e 1 µL de água.
- Para o IN HOUSE 1A: em um microtubo misturou-se 5 µL tampão de ligação (Buffer 2X), 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL do vetor (pGEM – T easy vector), 3 µL do Produto de PCR (IN HOUSE 1A do Mix2).

Na amostra “IN HOUSE 1 A” foi adicionado propositalmente mais volume de amostra para reação de ligação. Ambas as reações foram incubadas *overnight* por 4° C, e em seguida, armazenadas em congelador a cerca de -15° C ou até o seu uso imediato.

Figura 03 - Vetor plasmídeo (pGEM – T easy vector)



Legenda: Imagem representativa do vetor plasmídeo utilizado para o processo de ligação do vetor com a região gênica de cisteína peptidase. A área em destaque sinaliza o local em que o gene de interesse foi inserido no vetor.
Fonte: (www.promega.com/resources/vector-sequences/)

3.7.2. TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULA BACTERIANA

Esta etapa ocorreu dentro de um fluxo laminar previamente esterilizado em luz UV por 15 minutos. Foram aliqüotados 2 µL de reação de ligação em 4 tubos contendo 200 µL de células quimicamente competentes de *Escherichia coli* da cepa DH5α, ou seja, foram inseridos 2 µL dos plasmídeos híbridos da reação de ligação (DNAZOL 1 MIX 2) em dois micrótubos identificados como DNAZOL, e similarmente, foram aliqüotadas 2 µL dos plasmídeos híbridos da reação de ligação (IN HOUSE 1 A MIX 2) em dois micrótubos identificados como *In-house*. Ambos os tubos foram incubados em banho de gelo (4°C) por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para um banho-seco a 42°C por 1 minuto, e seguida novamente de incubação no gelo por 2 minutos. Após esse choque-térmico, 350 µL de meio LB líquido foi distribuído em cada tubo, e logo, ambos os tubos foram incubados a 37°C com agitação por 1 hora. Após etapa de crescimento das células, foi feito o plaqueamento com 150 µL de células no meio LB Ágar previamente preparado na placa de Petri (Apêndice 8). Após plaqueamento com auxílio de uma alça descartável em quatro placas identificadas, as células foram cultivadas a 37°C, *overnight* para o crescimento das colônias (Figura 07).

3.8. SELEÇÃO DAS COLÔNIAS E PCR COLÔNIA

Esta etapa ocorreu dentro de um fluxo laminar previamente esterilizado. As colônias das quatro placas de *petri* foram cuidadosamente (e indistintamente ou aleatoriamente) selecionadas com o auxílio de uma ponteira. Um total de 25 colônias foram coletadas separadamente em microtubos contendo água destilada. Em seguida, misturou-se cada amostra o Mix apar volume final de 40 μL (29 μL de H_2O , 5 μL de Tampão de PCR 10X, 1,5 μL MgCl_2 (50mM), 2 μL dNTP (5mM), 1 μL M13 F (10mM), 1 μL M13 R (10mM), 0,5 μL Taq).

As amostras foram homogeneizadas e levadas ao termociclador por 3 horas e 30 minutos, seguindo o perfil térmico de 40 ciclos: 95° C por 5 minutos, 95° C por 1 minuto, 55° C por 1:50 minutos, 72° C por 1 minuto, 72° C por 5 minutos, finalizando o processo em 4° C.

O resultado da PCR das 25 amostras amplificadas foi monitorado por eletroforese em dois géis de agarose 1,5% (p/v). Foi usado um marcador padrão de 50 pb (Invitrogen®). Para a preparação da amostra, foram misturados 10 μL de amostra com 2 μL de TA 6X. Para a eletroforese, aplicou-se voltagem constante de 90 volts em torno de 1 hora. Os dois géis foram corados em GelRed® por 10 min e documentados em fotodocumentador da BioRad.

RESULTADOS

4.1. CONTAGEM DAS CÉLULAS Dm28c

Para realizar contagem das células epimastigotas foi necessária uma câmara de Neubauer (capacidade do quadrante = 0,1 μL), uma placa de diluição e um microscópio óptico (foi usado as lentes oculares de 10X, 20X e 40X para a visualização). A contagem foi feita em cada quadrante de forma diagonal em direção ao centro da câmara, assim, não necessitando calcular a média total do número de parasitas na câmara. Para descobrir o valor de células por mL foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{Células/ mL} = (\text{número de parasitas na câmara}) \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Durante a confecção do meio de cultura de Dm28c, uma alíquota foi coletada para a contagem. Foi realizada a diluição seriada de 1:10 e 1:100 com PBS (90 μL de PBS e 10 μL da amostra) na câmara de Neubauer, porém, não foi possível observar a diluição 1:100 no microscópio. Então foi feito uma duplicata da diluição 1:10, totalizando em média:

Contagem 1: 191 células

Contagem 2: 249 células

Totalizando: 440 células

$$\begin{aligned} \text{Células/ mL} &= (440 \div 2) \times 10 \times 10^4 = \\ &2,2 \cdot 10^7 \text{ células/mL} \end{aligned}$$

Em 7 dias de incubação, antes de realizar o repique do meio de cultura para 200 mL, foi feita a contagem de células na diluição seriada de 1:100 obtendo-se:

Contagem: 73 células

$$\begin{aligned} \text{Células/ mL} &= (73) \times 100 \times 10^4 = \\ &7,3 \cdot 10^7 \text{ células/mL} \end{aligned}$$

Após 10 dias em incubação na estufa B.O.D, uma alíquota foi coletada do meio de cultura para a contagem de células na diluição de 1:100:

Contagem: 253 células

$$\text{Células/ mL} = (253) \times 100 \times 10^4 = \\ 2,53.10^8 \text{ células/mL}$$

4.2. QUANTIFICAÇÃO EM Qubit™ DOS DNAs EXTRAÍDOS (Dm28c)

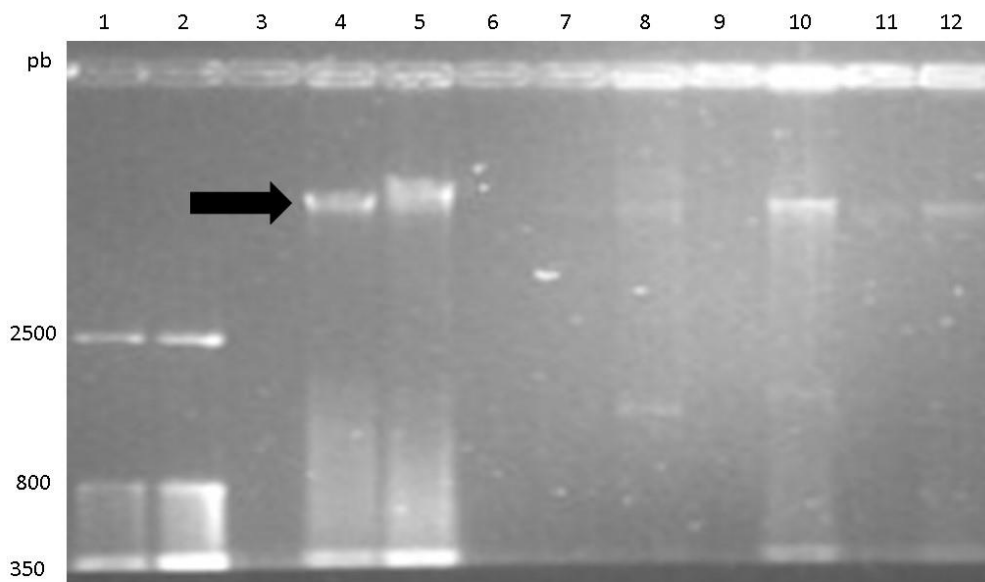
A quantificação foi realizada no equipamento Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen) calibrado com padrão de 0 ng/ µL (10µL) e padrão de 10ng/ µL (10µL). Foram quantificadas 7 amostras extraídas por *in-house* e por DNAzol (Tabela 1).

Tabela 01 – Quantificação do DNA total de *T.cruzi* cepa Dm28c extraídos por *In-house* e DNAZOL®

Metodologia	Amostras	Concentração (ng/ µL)
	1	492
<i>In house</i>	2	402
	3	368
	4	414
	1	998
DNAZOL®	2	720
	3	570

4.3. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS DNAs PREVIAMENTE EXTRAÍDOS DE CL-Brener

Figura 04 - Análise da eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total extraído de *T.cruzi* (cepa CL Brener).

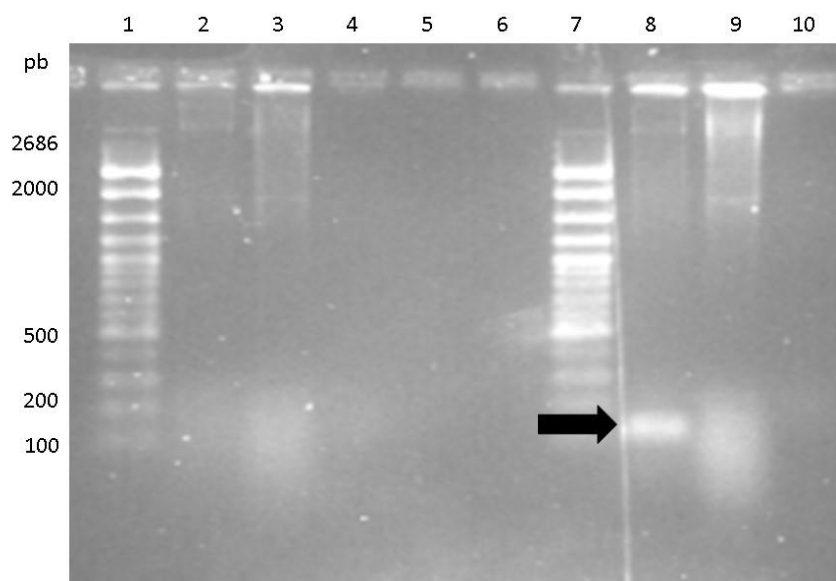


Legenda: As amostras foram extraídas por três métodos diferente: DNazol® (Thermo Fisher Scientific), Trizol® (Thermo Fisher Scientific) e protocolo “*in house*” (2005). Poço 1 e 2 - Marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen); Poço 3- sem aplicação de amostra; Poço 4- DNazol 1 (DNA extraído por método DNazol); Poço 5- DNazol 3 (DNA extraído por método DNazol); Poço 6- sem aplicação de amostra; Poço 7- TRIZOL 2 (DNA extraído por método Trizol); Poço 8- TRIZOL 3 (DNA extraído por método Trizol); Poço 9- sem aplicação de amostra; Poço 10- IN HOUSE 1A (DNA extraído segundo *Carme et al* (2005) ou “In-house”); Poço 11- sem aplicação de amostra; Poço 12- IN HOUSE 3A (DNA extraído segundo *Carme et al* (2005) ou “In-house”). A seta indica a região de migração das bandas correspondentes ao DNA total. Gel corado com GelRed™.

Observe que o Poço 4 (DNazol 1) e o Poço 10 (IN HOUSE 1 A) migrou-se melhor em comparação com os outros poços. Considerando a qualidade do perfil das bandas de fragmentos, o DNazol 1 e o IN HOUSE 1 A foram selecionados para os posteriores procedimentos da clonagem gênica, mais especificamente, para a amplificação da região gênica de cisteína peptidase.

4.4. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR EM GEL AGAROSE

Figura 05 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR

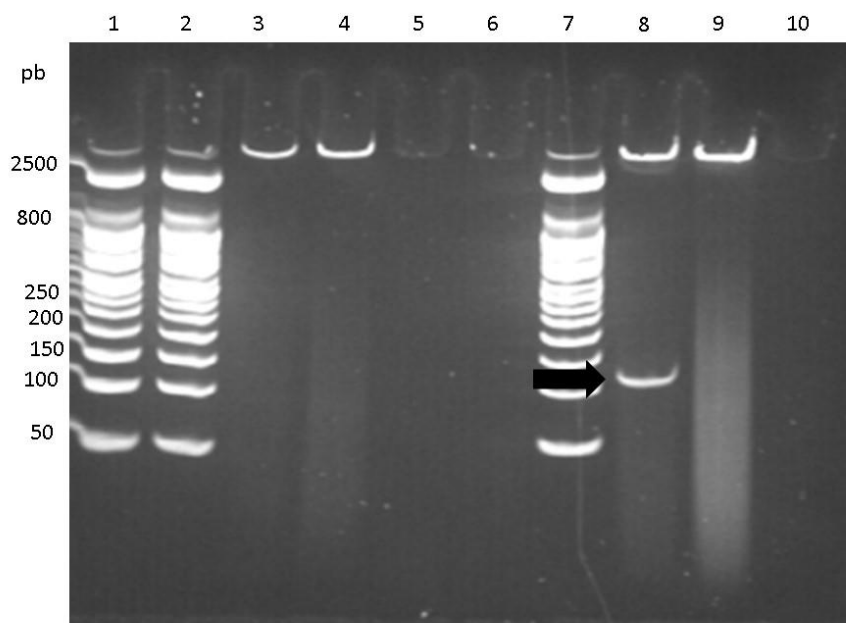


Legenda: Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do gene de cisteína peptidase amplificado a partir do DNA total extraído de *T. cruzi* (cepa CL Brener) por DNazol e *In-house*- Poço 1- Marcador de peso molecular de 100 pb usando tampão de amostra 6X da Invitrogen (corantes azul de bromofenol e xileno cianol); Poço 2- MIX 1 com DNazol 1 (DNA extraído por método DNazol); Poço 3- MIX 1 com IN HOUSE 1 A (DNA extraído pelo protocolo *In-house*); Poço 4- Controle Negativo do MIX 1; Poço 5- sem aplicação de amostra; Poço 6- sem aplicação de amostra; Poço 7- 10uL de padrão de DNA de 100 pb usando tampão de amostra 6X da Invitrogene (corantes azul de bromofenol e xileno cianol); Poço 8- MIX 2 com DNazol 1 (DNA extraído por método DNazol); Poço 9- MIX 2 com IN HOUSE 1A (DNA extraído pelo protocolo *In-house*); Poço 10- Controle Negativo do MIX 2. A seta indica a região de migração da banda correspondente ao produto amplificado de 115 pb. Gel corado com GelRed™ por 5 minutos. Para o MIX 1 se usou 48 uL de mix e 2 uL DNA. Para o MIX 2 se usou 45 µL de mix e 5 µL DNA.

Vale ressaltar que devido ao tempo relativamente longo entre o final da eletroforese e o início da coloração, pode ter ocorrido uma difusão do corante e das amostras para outras regiões gel. Isso pode explicar o fato de manchas difusas serem visualizadas principalmente no Poço 4 (Controle Negativo). Entretanto, no Poço 8, foi possível visualizar-se uma banda esperada de 115 pb bem definida correspondendo ao produto amplificado proveniente do DNazol 1 do MIX 2. Similarmente, observa-se no Poço 9, uma banda de mesmo tamanho de pares de base, porém mais difusa. Esse produto de PCR provém do IN HOUSE 1 A do MIX 2. Observou-se, portanto, que a amostra DNazol 1 apresentou qualidade superior comparada a do IN HOUSE 1 A.

4.5. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR EM GEL DE POLIACRILAMIDA

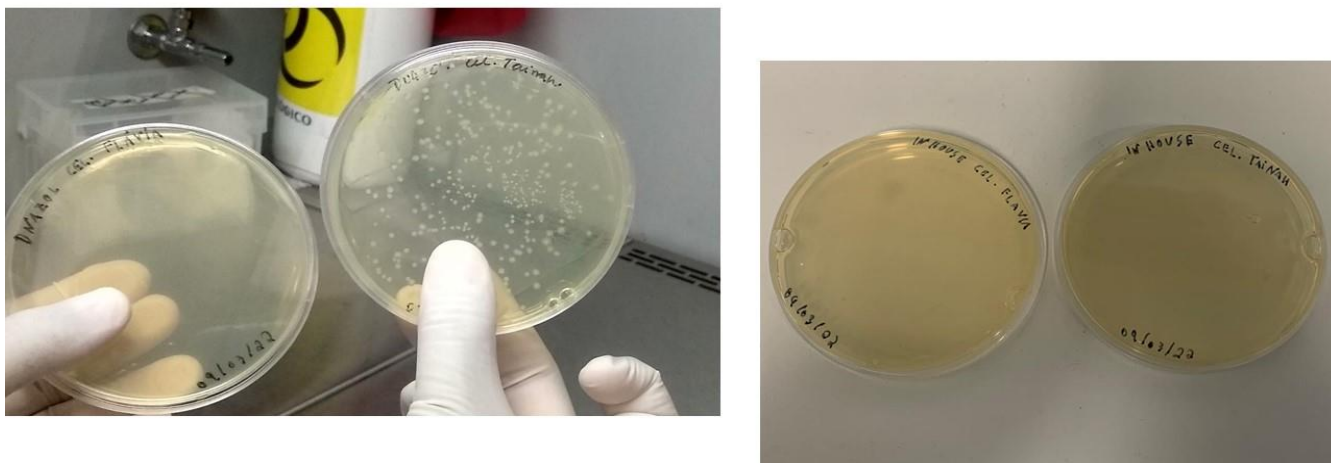
Figura 06 - Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% do produto de PCR



Legenda: Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% do produto de PCR do gene de cisteína peptidase amplificado a partir do DNA total extraído de *T. cruzi* (cepa CL Brener) por DNazol e “IN HOUSE”- Poço 1- Marcador de peso molecular de 50 pb usando tampão de amostra 6X da ABGENE (corantes azul de bromofenol e xileno cianol); Poço 2- Marcador de peso molecular de 50 pb usando tampão de amostra 6X da Invitrogen (corantes “orange e ciano”); Poço 3- MIX 1 com DNazol 1 (DNA extraído por método DNazol); Poço 4- MIX 1 com IN HOUSE 1A (DNA extraído segundo Carme et al (2005) ou *In-house*); Poço 5- Controle Negativo do MIX 1; Poço 6- sem aplicação de amostra; Poço 7- 10 μ L de padrão de DNA de 50 pb usando tampão de amostra 6X da Invitrogen (corantes “orange e ciano”); Poço 8- MIX 2 com DNazol 1 (DNA extraído por método DNazol); Poço 9- MIX 2 com IN HOUSE 1A (DNA extraído segundo Carme et al (2005) ou *In-house*); Poço 10- Controle Negativo do MIX 2. A seta indica a região de migração da banda correspondente ao produto amplificado de 115 pb. Gel corado com GelRed™ por 10 minutos. Para o MIX 1 se usou 48 μ L de mix e 2 μ L DNA. Para o MIX 2 se usou 45 μ L de mix e 5 μ L DNA.

Analisando o gel agarose, concluímos que os poços contendo DNazol 1 e IN HOUSE 1 realmente foram amplificados e possuem melhor qualidade para realizar o método de ligação do vetor. O DNazol 1 se localizou na banda esperada de 115 pb assim como no gel agarose.

4.6. CLONAGEM

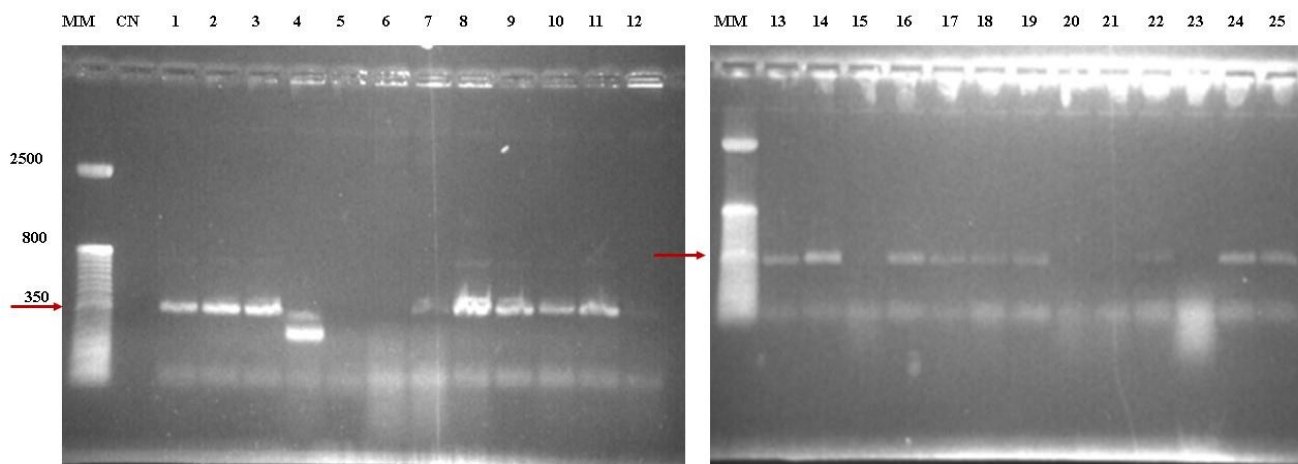
Figura 07: Clonagem das ligações em células de *E.coli*

Legenda: Clonagem das reações de ligações em células de *Escherichia coli* da cepa DH5 α em meio LB Ágar com ampicilina (Amplacilina®). A imagem da esquerda são os crescimentos de colônia das células competentes contendo a ligação do gene de cisteína peptidase extraída por DNAZOL com o vetor plasmídeo pGEM – T easy vector. Os pequenos círculos brancos -opacos representam as colônias bacterianas. A imagem da direita são o crescimento de células competentes contendo a ligação do gene de cisteína peptidase extraída pelo método *in house* com o vetor plasmídeo pGEM – T easy vector.

Observou-se que houve somente crescimento nas placas contendo as ligações com genes extraídos por DNAZOL, e nas placas contendo as ligações com genes extraídos por INHOUSE não houve formação de colônia. Esse fato é retificado nas eletroforeses dos produtos de PCR (Figura 5 e Figura 6), onde foi visto que o IN HOUSE 1 A possuía uma qualidade inferior comparado ao DNAZOL 1.

4.7. ANÁLISE QUALITATIVA DA ELETROFORESE DA PCR COLONIA EM GEL AGAROSE

Figura 08 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR colônia



Legenda - Análise em gel de agarose 1,5% da PCR colônia da clonagem de uma região do gene de cisteíno peptidase. MM: Marcador de peso molecular de 50 pb “DNA ladder” (Invitrogen); CN: Controle negativo da PCR colônia; Poços 1 a 25: Amostras de colônias coletadas e denominadas 1 a 25. Seta indica banda esperada de 347 Pb do inserto positivo. Gel corado com GelRed por 15 minutos. Tempo de corrida: 1 hora. Voltagem constante de 90 V.

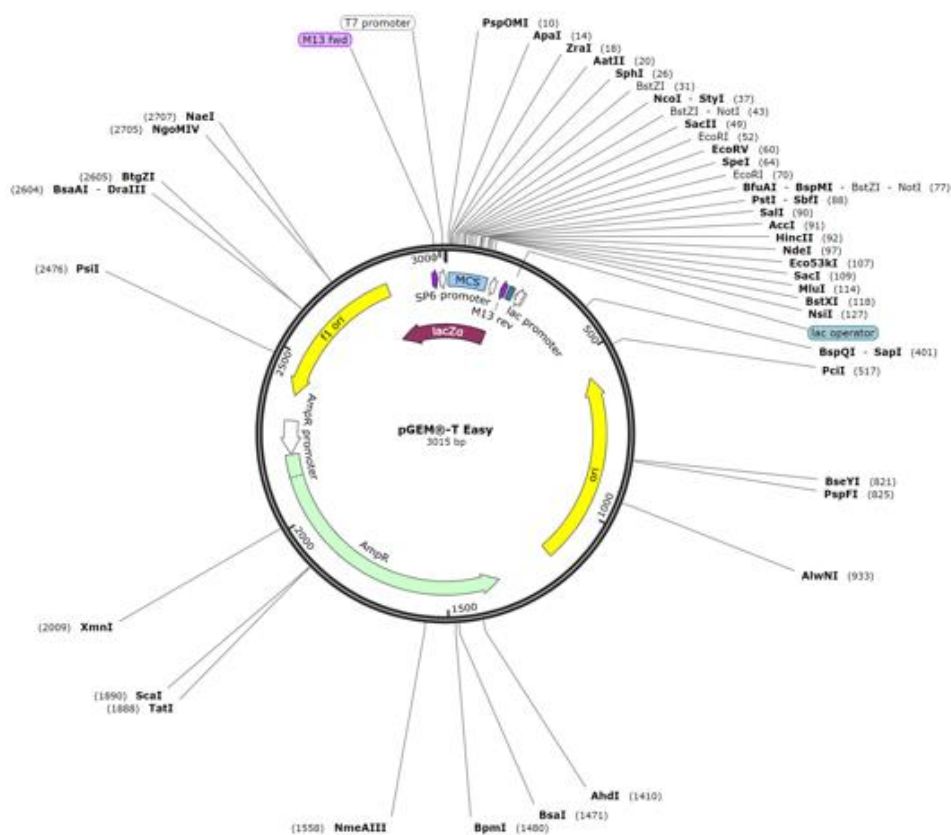
De acordo com a sequência do *T- easy vector*, o sítio de sequenciamento *Forward* anelado pelo *primer* M13 F foi estendido com 40 pb, e o sítio de sequenciamento *Reverse* anelado pelo *primer* M13 R foi estendido com 192 pb, totalizando a parte do plasmídeo a 232 pb. Teoricamente, somando subtotal do vetor (232pb) com inserto (115pb) é igual a 347 pb. Então todos os poços localizados nas bandas próximas a marca de 350 pb representam o inserto positivo, em outras palavras, a clonagem do fragmento de DNA de interesse. O poço 4 representa o inserto negativo, onde não houve clonagem do fragmento de DNA, e sim, os 232 pb do plasmídeo, de acordo com a figura 8. Ou ainda, a inserção inversa do produto de PCR no vetor.

Figura 09 – Mapa do vetor de clonagem pGEM – T- easy vector

1

75

CAATTTGCTGCGGCTC CTTAACATTATGCTGAGTGATAT...**INSERTO...**GGGCGAATTGGGCCCGACG
 TCGCATGCTCCCGGCCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATATCACTAGTGAATTCGGCGCCGCTGCAGGTCGA
 CCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTA
 ATCATG**GTCATAGCTGTTTCCTG** 3015



Legenda: A figura evidencia o local onde o inserto, com tamanho esperado de 115 pb, deve ser posicionado. O *primer Forward* com tamanho de 40 pb e o *primer reverso* com 192 pb. Logo, os fragmentos esperados após a PCR colônia era de 347 pb.

Fonte: https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pGEM-T_Easy

DISCUSSÃO

Devido a pandemia da Covid 19, a coordenação responsável pelos alunos da EPSJV adiou os prazos de iniciação dos estágios, diminuindo assim o tempo de trabalho. Por consequência, encurtou o período de desenvolvimento prático desta monografia (já que as metodologias do projeto estavam acopladas ao estágio). Com isso, não foi possível iniciar o projeto desde a cultura das formas epimastigotas por conta do tempo de crescimento. Pensando nisso, o projeto foi desenvolvido em paralelo, trabalhando com duas cepas de *T.cruzi*.

Para descrição da metodologia dos itens **3.1.** a **3.3.**, a cepa Dm28c foi trabalhada para aprendizagem do cultivo das células; para a extração e quantificação do material genético. As células epimastigotas de *T.cruzi* cepa Dm28c em meio LIT foram fornecidas gentilmente pelo doutor Otacílio da Cruz Moreira, coordenador da plataforma de PCR em tempo real no Pavilhão Helio Pereira e Peggy Pereira (HPP)/IOC.

Em paralelo ao cultivo de células, estava sendo feito a eletroforese e as etapas que antecedem a clonagem usando os materiais genéticos extraídos da cepa CL-Brener. Estas amostras foram extraídas pela ex-aluna Thaís Cordeiro em sua monografia para sua formação técnica de Análises Clínicas na EPSJV. Em seu trabalho, ela realizou a extração do material genético de *T.cruzi* cepa CL Brener em sua forma epimastigota. Os seguintes métodos realizados por ela foram: Método DNazol® (Thermo Fisher Scientific); Método TRIzol®; e método seguindo o protocolo *In-house* (Rotureau *et.al*, 2005). Utilizando estes materiais já extraídos, foi possível adiantar o desenvolvimento da clonagem da região gênica de cisteína peptidase.

CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias realizadas e resultados obtidos para alcançar os objetivos deste estudo, concluímos que:

- Utilizando amostras de DNA extraídas da cepa CL-Brener, para a região gênica de cisteína peptidase, a mesma foi selecionada e amplificada através da técnica de PCR servindo como base para as análises subsequentes;
- O DNA extraído pelo método DNAZOL® apresentou melhores resultados quando comparado aos que foram extraídos pelo método *In-house* através da PCR colônia.
- Os plasmídeos híbridos contidos nas colônias bacterianas foram amplificados através da PCR colônia e identificados no perfil de bandas do gel agarose 1,5% (g/v). Portanto, confirmando o sucesso da clonagem molecular da região genica de cisteína peptidase.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Sequenciar pela metodologia Sanger as amostras amplificadas pela PCR de colônia que apresentaram tamanho condizente com o esperado identificando, através de ferramentas básicas de Bioinformática, o perfil dessas sequências quando comparadas ao padrão de outras cisteínas peptidases de outras cepas de *Trypanosoma cruzi* previamente depositadas nos Bancos de curadoria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. F. M., A.S.C.; Abrel, C.D.R.; Freitas, N.R.; Teixeira, A.B.; Ferreira, E.S. Diagnostic methods of Chagas disease: an update. 2018.

AMENDOEIRA, M. R. R. M., D.P.B.G.; Carreira, J.C.A.; Silva, A.V.M.; Goulart, P.R.M. **Protozoologia**. 2012. 476 p. (CONCEITOS E MÉTODOS para formação de profissionais em laboratórios DE SAÚDE. 978-85-98768-41-0.

CAMPO, V. L. M.-T., Maristela Braga; CARVALHO, Ivone. **Trypanosoma cruzi invasion into host cells: a complex molecular targets interplay**. 2016.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1, p. 159–218, 1909.

CHAN, W. T.; VERMA, C. S.; LANE, D. P.; GAN, S. K. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Biosci Rep**, 33, n. 6, Dec 12 2013.

DEGRAVE, W. **O genoma do *Trypanosoma cruzi***. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/biologia-molecular/#>. Acesso em: 25/06.

DIAS, J. C. [Globalization, inequity and Chagas disease]. **Cad Saude Publica**, 23 Suppl 1, p. S13-22, 2007.

DIAS, J. V.; QUEIROZ, D. R.; DIOTAIUTI, L.; PIRES, H. H. Knowledge of triatomine insects and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. **Cien Saude Colet**, 21, n. 7, p. 2293-2304, Jun 2016.

FERREIRA, R. T. B.; CABRAL, M. L.; MARTINS, R. S.; ARAUJO, P. F. *et al.* Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from acai products commercialized in Rio de Janeiro and Para, Brazil. **Parasit Vectors**, 11, n. 1, p. 233, Apr 10 2018.

OBENRADER, S. **The Sanger method.** In **Sarah Obenrader: Molecular biology.**, 2003. Disponível em: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_metho_d_page.htm. Acesso em: 17/11.

SMITH, L. M.; SANDERS, J. Z.; KAISER, R. J.; HUGHES, P. *et al.* Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, 321, n. 6071, p. 674-679, Jun 12-18 1986.

UEHARA, L. A. **Determinação da relevância da cruzipaina na interação de *Trypanosoma cruzi* com *Rhodnius prolixus*.**, 2010. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/6238>. Acesso em: 25/07/2021.

Warren, L.G. (1960) Metabolism of *schizotrypanumcruzi* Chagas. 1. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *Journal of Parasitology*, 46, 529- 539.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

Zingales, B *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2009, v. 104, n. 7 [Accessed 29 March 2022] , pp. 1051-1054

APÊNDICES

1 - Tampão de lise

- 1 mL de Tris - HCL 10 mM pH 8, NaCl 200mM, EDTA 5m, Sulfato de dodecil sódio (SDS) 0,5%(v/v)
- 50 µL Protense K (100 µg/mL)

2 - Tampão de ressuspensão

– Tris-HCl 10mM, EDTA 0.1mM pH 7,5

3 - Qubit working solution

- 1990 μ L Qubit™ Buffer
- 10 μ L Qubit™ Reagent

4 - Solução-tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X

Solução-tampão tris-HCl 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8.3

- Preparo e materiais do tampão de eletroforese 1X TBE
- 10,8 g de base Tris [tris (hidroximetil) aminometano]
- 5,5 g de ácido bórico
- 0,75 g de EDTA, sal dissódico
- 1 Litro de água desionizada
- Ajustar o pH para 8,3 com HCl em um pHmetro

5- Tampão de amostra para eletroforese em géis de agarose (10 \times)

Azul de bromofenol 0,25% (p/v)

Xileno cianol FF 0,25% (p/v)

Glicerol 50% (v/v)

6 - Gel Red (200mL)

- 180 mL de GelRed® 3X in water (GelRed™ - Biotium)
- 20 mL NaCl 1M

7 - Gel poliacrilamida 10,5% (g/v)

- 3,5 mL de solução de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%
- 1 mL de TBE 10X
- 1,875 mL de Glicrol 80%
- 3,6 mL de H₂O
- 400 μ L de Persulfato de Amônio 1,6% (m/v)
- 4,5 μ L TEMED

8 - Meio LB Ágar

- 100 mL de Meio LB Ágar
- 5 μ L de ampicilina (Amplicilina®) (100 μ g/mL)
- 20 mL da solução Meio LB Ágar com ampicilina distribuídas em 4 placas de Petri