

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Thaís Cordeiro da Silva

**ESTUDO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA
EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Rio de Janeiro

2019

Thaís Cordeiro da Silva

**ESTUDO COMPARATIVO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA
EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

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

Orientador(a): Dra. Tainah Silva Galdino de Paula
Coorientador(a): Me. Fernanda de Oliveira Bottino

Rio de Janeiro

2019

*“Não sei porque você se foi
Quantas saudades eu senti
E de tristezas vou viver
E aquele adeus, não pude dar”
(Gostava Tanto de você / Tim Maia)*

*Dedico este trabalho ao meu avô Orlando Silva,
que mesmo sem estar presente me inspirou a
continuar, por um sonho meu e um sonho dele.*

AGRADECIMENTOS

“Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho” (Wave - Tom Jobim)

Agradeço primeiramente, a meu Deus e Pai, Jeová, por estar sempre ao meu lado a todos os momentos.

À Dra. Tainah Silva Galdino de Paula, por me fazer sentir capaz, me orientar e me capacitar a continuar na execução deste trabalho, pela confiança, pela amizade, pelos ensinamentos e conselhos – até mesmo os puxões de orelha e por todo o companheirismo dedicado a mim ao longo destes dois anos juntas. Acima de tudo por ter aberto as portas do laboratório e me apresentar o mundo da Biologia Molecular, mundo esse que faz parte da minha vida e vou levar para toda ela.

À Me. Fernanda de Oliveira Bottino, por toda atenção investida, pelo carinho, respeito e disposição em me ajudar. Agradeço por todos os ensinamentos – até mesmo aos de formatação, pelo exemplo de doçura, paciência e por todos os momentos de incentivo.

Ao Dr. Dário Eluan Kalume, profissional que tive a honra de conhecer e admirar o seu trabalho bem de pertinho, por todos os ensinamentos de Bioquímica e Biologia Molecular e pela grande oportunidade de dividir bancada e construir esse trabalho com extremo bom – humor e risadas. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório e me apresentado o universo da pesquisa, por ser meu “orientador adotivo” e pela amizade construída!

Aos colegas do LIPMED de hoje como a Sarah Aragão, Lohaine Mafra, entre outros companheiros.

Aos meus pais, por serem meu grande exemplo de força, honestidade e perseverança, por me tornarem forte de maneira real e sempre incentivarem meus sonhos. Amo vocês!

À Laís e Moana, por toda a companhia e alegria dada durante a construção deste trabalho, não me fazendo desistir.

Aos meus avós, por todas as ajudas prestadas.

À toda minha fraternidade e congregação, que Jeová me deu, pela imensa torcida e por me envolverem positivamente me fortalecendo e impulsionando rumo à finalização desse ciclo.

À família Thomaz, em especial Luiz Felipe, por cada gesto de carinho, cada momento que estivemos juntos. Agradeço por me acolherem, me apoiarem e pelo lindo laço que nos une. Amo muito vocês!

Aos meus amigos, por toda a torcida e auxílio, por entenderem minhas ausências e por todo amor construído. Paraphrasing Milton Nascimento: “Amigo é coisa para se guardar; No lado esquerdo do peito”.

À toda equipe do LATEC por todo suporte e companhia durante a execução deste projeto. Por me proporcionarem uma formação pessoal e profissional excepcional e por todas as amizades construídas no decorrer desses quatro anos de “Polí”.

À Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) pelo apoio institucional e suporte financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho;

Obrigada.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a doença de Chagas acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo e é considerada uma enfermidade negligenciada geralmente veiculada a pobreza. No entanto, há um crescimento de casos em países não endêmicos devido ao deslocamento de indivíduos infectados por meio das migrações internacionais. O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi* e, habitualmente, sua detecção em indivíduos acometidos por esta, pode ser realizada por meio de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Os métodos parasitológicos possibilitam uma identificação direta (microscopia) ou indireta (xenodiagnóstico e hemocultura) do parasita na amostra biológica infectada. Os métodos sorológicos têm como objetivo identificar anticorpos ou antígenos presentes no organismo do hospedeiro infectado (IgG, anti-*T.cruzi*), enquanto que as metodologias moleculares têm como intuito detectar o DNA do patógeno. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo central avaliar diferentes metodologias de extração de DNA, usando o *T. cruzi* como modelo biológico na fase epimastigota em dois ambientes distintos: laboratório de ensino e de pesquisa, a fim de averiguar a qualidade das aulas práticas ministradas em uma escola federal de ensino médio integrado ao técnico. O resultado mostrou que apesar do laboratório escolar não conter as especificações necessárias para práticas relacionadas à Biologia Molecular, as amostras em triplicata apresentaram razão indicadora de pureza com relação de absorbância A260/A280 dentro dos valores de referência (1,8 – 2,0) para as metodologias de extração de DNA com DNAzol e protocolo *in house*. No entanto, para a metodologia de extração de DNA pelo Trizol as amostras revelaram valores abaixo da referência. Para as análises das amostras em triplicata extraídas no laboratório de pesquisa, apenas duas replicatas relacionadas ao protocolo de extração *in house* ficaram um pouco abaixo do valor referência. Portanto, o uso de laboratórios veiculado às aulas práticas deve ser cada vez mais estimulado, principalmente durante a formação técnica, pois além de capacitar o profissional o faz com qualidade e eficiência.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Extração de DNA; Doença de Chagas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Triatomíneos vetores da doença de Chagas	14
Figura 2 - Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 3 – Xenodiagnóstico Natural	17
Figura 4 - Análise de Extração de DNA de <i>T.cruzi</i> na metodologia <i>in house</i> em gel de agarose <i>Low melting</i> 1 %	25
Figura 5 - Análise de Extração de DNA de <i>T.cruzi</i> nas metodologias DNazol [®] , Trizol [®] e <i>in house</i> em gel de agarose 1 %	26
Figura 6 - Análise de Produto de PCR Extração <i>in house</i> em gel de agarose 1,5%	27
Figura 7 - Análise de Produto de PCR Extração <i>in house</i> em Gel de poliacrilamida 10,5%	28
Figura 8 - Análise de Produto de PCR Extração de DNA por Trizol [®] em gel de agarose 1,5%	29
Figura 9 - Análise de Produto de PCR Extração de DNA por Trizol [®] em Gel de poliacrilamida 10,5%	30
Figura 10 - Análise de Produto de PCR Extração de DNA por DNazol [®] em gel de agarose 1,5% ...	31
Figura 11 - Análise de Produto de PCR Extração de DNA por DNazol [®] em Gel de poliacrilamida 10,5%	32
Figura 12 - Análise de Produto de PCR Extração de DNA por todas as metodologias (Trizol [®] , DNazol [®] e <i>in house</i>) em Gel de agarose 1,5%	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação por nanodrop [®] do DNA extraído pelas diferentes metodologias nos ambientes distintos	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>Biochemichal Oxigen Demand</i>)
COLPROT	Coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético (<i>Ethylenediamine-tetracetic acid</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Aceleração da gravidade
HCL	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
Kb	Kilobase
LIPMed	Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
seg	Segundo(s)
TBE	Tris - ácido bórico
T.A	Temperatura ambiente

UV	Ultravioleta
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μg	Microgramas
®	Marca registrada

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE SIGLAS	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. AGENTE ETIOLÓGICO	13
1.2. VETOR	13
1.3. CICLO BIOLÓGICO	14
1.4. FORMAS DE TRANSMISSÃO	16
1.5. DIAGNÓSTICO	16
1.6. JUSTIFICATIVA.....	18
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. CULTIVO CELULAR	20
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA – Método <i>in house</i>	20
3.2.1. ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO – Método <i>in house</i>	20
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA – Método DNazol [®] (Thermo Fisher Scientific)	21
3.3.1 ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO – Método DNazol [®]	21
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA – Método Trizol [®]	21
3.4.1. ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO – Método Trizol [®]	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 QUANTIFICAÇÃO POR NANODROP DO DNA EXTRAÍDO	23
4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO DNA EXTRAÍDO POR ELETROFORESE	24
4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA PCR POR ELETROFORESE	26
5. CONCLUSÕES	33
6. PERSPECTIVAS	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. APÊNDICES	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

No ano de 1909, em Lassance, região Norte do Estado de Minas Gerais, Carlos Chagas descreveu o protozoário flagelado pertencente à família *Trypanosomatidae*, de ordem *Kinoplastidae*, de gênero *Trypanosoma* denominado inicialmente como *Schizotrypanum cruzi*. Posteriormente, em homenagem a Oswaldo Cruz, o protozoário foi nomeado *Trypanosoma cruzi*, conhecido como o agente etiológico da doença de Chagas (Chagas, 1909). O mal de Chagas também é denominado como tripanossomíase americana devido à distribuição não homogênea de vetores resultando, dessa forma, em uma concentração primária da doença no continente americano (WHO, 2015).

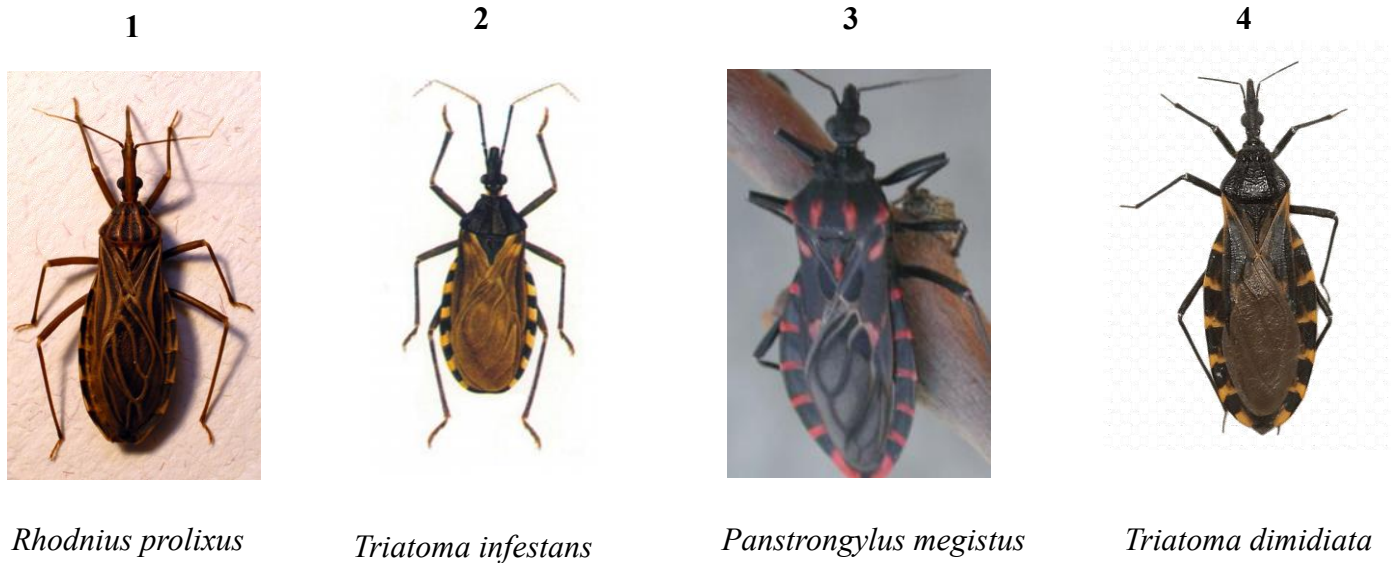
A principal característica desse protozoário é sua heterogeneidade em relação às propriedades biológicas, características bioquímicas, moleculares e manifestações clínicas o que motiva sua existência e permanência em diferentes áreas geográficas. Além disso, possui capacidade de se estabelecer nos tecidos no qual tem tropismo, gerando variações nas formas clínicas da doença que vão desde a ausência de sintomas até complicações no sistema cardíaco e gastrointestinal na fase crônica, podendo, também, levar ao aumento de órgãos, tais como: o megacólon, megaesôfago e a cardiomegalia (Devera et al, 2003; Nunes et al, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o mal de Chagas acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo e é considerada uma enfermidade negligenciada geralmente veiculada a pobreza (WHO, 2015). No entanto, há um crescimento de casos em países não endêmicos devido ao deslocamento de indivíduos infectados por meio das migrações internacionais (Requena-Mendez et al, 2015, Dias, 2016).

1.2. VETOR

No mesmo ano, em 1909, também foi descrito o inseto vetor hematófago (triatomíneo) da família *Reduviidae*, a qual possui quatro espécies consideradas relevantes no ciclo de transmissão da doença: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma dimidiata* (Chagas, 1909; González, 2010) (Figura1).

Figura 1 – Triatomíneos vetores da doença de Chagas



Legenda: Triatomíneos, também chamado de Barbeiros, principais portadores do *Trypanosoma cruzi*, o protozoário agente etiológico da doença Doença de Chagas, sendo: (1) *Rhodnius prolixus*; (2) *Triatoma infestans* (Horak et al, 2009); *Panstrongylus megistus*; (4) *Triatoma dimidiata* (Jurberg & Cordeiro, 2014).

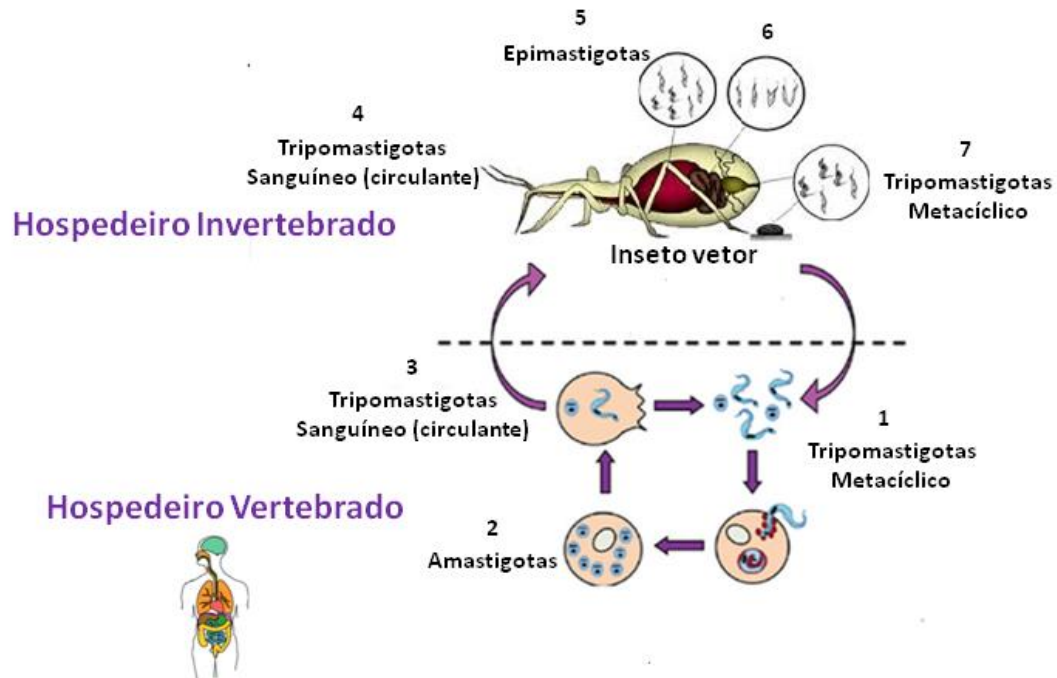
1.3. CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico do *T. cruzi* é caracterizado como complexo, do tipo heteróxico, tendo uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado mamífero e extracelular no inseto vetor, tendo como principal característica a ocorrência de modificações morfológicas em diferentes estágios: amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas sanguíneas e tripomastigotas metacíclicas (Nagajyothi et al, 2012).

O ciclo de vida natural do parasito inicia-se quando um triatomíneo faz a ingestão do *T. cruzi* em forma tripomastigota sanguínea através da sua alimentação. No início do tubo digestivo do vetor, parte da forma parasitária é lisada no estômago e os que resistem se submetem à morfogênese, adquirindo assim a forma replicativa, por divisão binária no intestino do vetor, denominada epimastigota. Cerca de 3-4 dias, chegando ao final do tubo digestório, na ampola retal do triatomíneo, as epimastigotas por meio da metaciclogênese se convertem na forma infectiva, tripomastigotas metacíclicas, as quais são eliminadas do organismo do inseto junto suas fezes e urina durante sua

alimentação (Nagajyothi et al, 2012) como mostra a figura 2.

Figura 2 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: (1) Inoculação das formas tripomastigotas metacíclicas, presente nas fezes do inseto vetor, na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado; (2) Transformação das tripomastigotas metacíclicas em amastigotas (Horak et al, 2009); As amastigotas se multiplicam por divisão binária simples no interior das células do hospedeiro; (4) Transformação das amastigotas em tripomastigotas sanguíneas; (5) Repasto sanguíneo do inseto vetor no hospedeiro vertebrado com ingestão das formas tripomastigotas sanguíneas; (6) Transformação de tripomastigotas sanguíneas em epimastigotas no trato digestório do inseto vetor; (7) Multiplicação das epimastigotas por divisão binária; (8) Transformação das epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, eliminadas junto às fezes e urinas do triatomíneo.

Fonte: Adaptado (Caradonna & Burleigh, 2011)

Uma vez que as formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas no organismo do hospedeiro vertebrado, elas interagem com os macrófagos, fibroblastos e células epiteliais e passam por uma modificação morfológica, invaginação do flagelo, transformando-se na forma replicativa, por divisão binária no hospedeiro vertebrado, designada amastigota.

Posteriormente, ocorre a transformação de amastigotas em tripomastigotas sanguíneas, nas quais são liberadas da célula humana após o rompimento da membrana celular, possibilitando que as mesmas entrem em contato direto com a corrente sanguínea, tecidos ou órgãos do hospedeiro. Dessa

forma, compreende-se o ciclo de transmissão clássico *T. cruzi* e sua relação parasito-hospedeiro (de Souza et al, 2010) (Figura 2).

1.4. FORMAS DE TRANSMISSÃO

Geralmente, a infecção das células hospedeiras está diretamente associada com a inoculação de tripomastigotas metacíclicos, através das mucosas e tecidas cutâneas lesionadas durante a alimentação do inseto vetor. No entanto, existem outros mecanismos de transmissão, tais como as transfusões sanguíneas, a via transplacentária e órgãos transplantados (Yoshida, 2009).

Nas últimas décadas a via de transmissão oral da doença de Chagas tem se mostrado de grande relevância médica após a Organização Pan-Americana de Saúde ter declarado a interrupção da transmissão através da via vetorial na região amazônica (Toso et al, 2011). A proporção de pacientes infectados nessa área pela via oral tem aumentado nos últimos anos: de 1968 a 2000 foi atribuído um aumento equivalente a 50% (Benchimol Barbosa, 2006) e de 2000 a 2010 um aumento de 70% (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

Pacientes infectados pela via oral apresentam uma mortalidade maior (8–35%) do que aos comparado pela infecção na via clássica (<5 – 10%) (Barreto-de-Albuquerque et al, 2015).

Estudos de Hoft e colaboradores (1996) mostraram que tripomastigotas metacíclicos derivados de insetos invadem a mucosa do epitélio gástrico onde os parasitas se replicam como os amastigotas (Hoft et al, 1996). As formas metacíclicas expressam glicoproteínas de superfície que aumentam a resistência contra a degradação proteolítica tornando-as mais aptas a sobrevivência em meio inóspito, tal como ocorre no estômago (Yoshida, 2009). Logo, as forma metacíclicas conseguem alcançar as células-alvo presentes na membrana da mucosa gástrica – única porta de entrada para infecção sistêmica. O contato com o suco gástrico não diminui a infectividade do parasita (Yoshida, 2006).

1.5. DIAGNÓSTICO

Habitualmente, a detecção de *T. cruzi* em indivíduos acometidos pela doença de Chagas, pode ser realizada por meio de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Os métodos parasitológicos possibilitam uma identificação direta (microscopia) ou indireta (xenodiagnóstico e hemocultura) do parasita na amostra biológica infectada. Os métodos sorológicos têm como objetivo

identificar anticorpos ou antígenos presentes no organismo do hospedeiro infectado (IgG anti-*T.cruzi*), enquanto que as metodologias moleculares têm como intuito detectar o DNA do patógeno (Barreto-de-Albuquerque, 2015).

Os métodos parasitológicos indiretos apesar de ainda serem considerados padrão ouro e serem amplamente utilizados no diagnóstico de certas doenças, apresentam baixa sensibilidade e são consideradas metodologias invasivas, no caso do xenodiagnóstico. O xenodiagnóstico consiste em alimentar barbeiros não infectados (criados em laboratórios) com sangue de pacientes com suspeita de infecção, seja diretamente no paciente (Xenodiagnóstico Natural) ou do sangue do indivíduo através de membranas apropriadas (Xenodiagnóstico Artificial) e, após 30 a 60 dias, verifica-se se há presença do parasito nas fezes do inseto vetor (Dias, 1940; Luquetti, 2000). Já a hemocultura consiste no cultivo de parasitas encontrados no sangue/líquor de indivíduos infectados, em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) ou em meio de cultura enriquecido, no qual é conservado a 28°C e examinado mensalmente até 120 dias (Luquetti, 2000).

Figura 3 – Xenodiagnóstico Natural



Legenda: Método parasitológico indireto denominado Xenodiagnóstico, no qual possui o objetivo de detectar presença do parasito no indivíduo com suspeita de infecção.

Fonte: MCGWIRE, 2015

Uma vez que a infecção do *T. cruzi* possui distintos níveis de parasitemia (fase aguda e crônica), as metodologias de diagnóstico devem ser correspondentes ao nível de sensibilidade da infecção presente no hospedeiro. Nesse caso, a utilização de metodologias moleculares, tais como a PCR (Reação da Polimerase em cadeia) e o Sequenciamento de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) vem sendo cada vez mais empregadas na detecção deste parasita, visto que permitem a identificação

do DNA em ambas as fases da infecção chagásica (Avila et al, 1993; Moser et al, 1989).

1.6. JUSTIFICATIVA

O uso de laboratório voltado para aulas práticas se faz de extrema importância na formação profissional, uma vez que o aluno sairá capacitado a desempenhar atividades técnicas bem como a consolidação das noções de Qualidade e Boas Práticas Laboratoriais. Além disso, o estímulo à pesquisa durante o ensino médio é essencial na construção dos saberes, visto que a escola objeto deste estudo está voltada para o desenvolvimento crítico do aluno tornando-o capaz de questionar e solucionar problemas.

Logo, a proposta deste trabalho foi desenvolver uma análise comparativa entre as práticas realizadas no laboratório de ensino de uma escola de Ensino Médio integrado ao Técnico e em um laboratório de pesquisa, ambos de um Instituto Federal, a fim de verificarmos a qualidade das técnicas desenvolvidas nestes dois ambientes distintos. Para isto, a metodologia de escolha foi à extração de DNA, uma vez que a pureza deste implica no sucesso das demais práticas na área da Biologia Molecular.

Sendo assim, selecionamos três metodologias de extração de DNA (DNAzol[®], Trizol[®] e um método *in house* baseado no artigo de Rotureau e colaboradores (2005) que foram realizadas nos dois ambientes descritos acima (Rotureau et al, 2005). Posteriormente, com o intuito de averiguarmos a quantidade e a qualidade do material obtido, realizamos testes que comprovassem a viabilidade entre essas amostras.

A realização deste trabalho se faz de suma importância na abordagem da qualidade das aulas práticas que estão sendo oferecidas nas disciplinas das habilitações técnicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes metodologias de extração de DNA, usando o *Trypanosoma cruzi* como modelo biológico na fase epimastigota, em dois ambientes distintos: laboratório de ensino e laboratório de pesquisa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar diferentes metodologias de extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* usando diferentes metodologias de extração de DNA comerciais e *in house*.
- 2) Analisar comparativamente a qualidade do DNA extraído levando em consideração seu grau de pureza, rendimento e praticidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR

Foram cultivadas células no estágio epimastigota de cepas de CL-Brener, proveniente da coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz (COLPROT). As células foram crescidas em uma estufa B.O.D. a 28°C usando meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) (Apêndice 1) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

As células de *T. cruzi* foram analisadas ao longo do crescimento por meio de contagem na câmara de Neubauer e acompanhamento por análise microscópica (microscopia óptica). No meio da fase logarítmica de cultivo, 10^7 células foram obtidas por centrifugação da cultura a 800 g durante 15 minutos, lavadas três vezes com PBS (tampão fosfato-salino) (Apêndice 2).

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA – Método *in house*

A metodologia utilizada foi baseada no artigo de Rotureau e colaboradores (2005) em triplicata experimental, na qual teve início a partir da obtenção de massa celular de *T. cruzi*, sendo a mesma de aproximadamente 10^7 células/ mL (Rotureau et al, 2005). Foi adicionado 200 µL de solução tampão de lise celular (Apêndice 3) com incubação de 30 minutos a 65°C sob agitação de 1000 rpm.

Posteriormente foi adicionado 2 volumes (400 µL) de etanol absoluto (100%) (Sigma-Aldrich®, EUA) à amostra. Após homogeneização, foi centrifugada durante 15 minutos, a 4°C e 14000 rpm, com descarte do sobrenadante. O *pellet* foi seco a 65°C por 15 minutos. Foi inserido 200 µL de tampão de ressuspensão (Apêndice 4).

3.2.1. ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO – Método *in house*

Algumas alterações foram necessárias para a realização do procedimento metodológico no laboratório de ensino, a fim de substituir equipamentos inexistentes no mesmo. Portanto, a incubação foi realizada sem agitação em Banho-Maria. Além disso, a centrifugação foi à temperatura ambiente.

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA – Método DNAzol® (Thermo Fisher Scientific)

Essa metodologia foi realizada em triplicata experimental. Após a obtenção da massa celular de *T. cruzi*, cerca de 10^7 células/ mL, foi iniciado o processo de lise celular no qual consistiu adição de 1 mL da solução de DNAzol® seguida de homogeneização por meio da inversão do tubo.

Posteriormente, o DNA foi precipitado em 500 µL de etanol absoluto (100%) (Sigma-Aldrich®, EUA) para cada 1 mL de DNAzol®. Após a inversão do tubo, cerca de 10 vezes, as amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente (T.A - 25°C). Feito esse processo, observou-se a formação de uma “nuvem” na qual constitui o DNA precipitado.

Em seguida, foi realizada a lavagem do DNA, na qual foi feita duas vezes, de forma homogênea, por inversão do tubo cerca de 10 vezes, utilizando 1 mL de etanol a 75% (v/v) (Apêndice 5). Após uma incubação de 5 minutos em agitação (1000 rpm) a T.A, o etanol a 75% foi removido cuidadosamente.

Por fim, foi feito o processo de solubilização do DNA, por meio da ressuspensão do DNA entre 100 - 300µL de NaOH 8 mM, de acordo com pellet formado, para posterior armazenamento a -20°C.

3.3.1. ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO – Método DNAzol®

No procedimento realizado no laboratório de ensino, na etapa de lavagem do DNA, não houve agitação uma vez que a instituição não possui agitador.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA – Método Trizol®

Todas as amostras foram feitas em triplicata experimental. Após obtenção da massa celular de *T. cruzi*, cerca de 10^7 células/ mL, foram realizadas duas lavagens com PBS antes da adição de 1 mL do reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific). Na etapa de lise celular, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich®, EUA) com incubação de 3 minutos, e posterior centrifugação por 15 minutos a 4°C e 12000g.

Centrifugada a amostra, observaram-se três fases da solução: a primeira, aquosa (incolor), contendo o RNA; a interfase branca e leitosa contendo principalmente DNA e a fase inferior rósea contendo proteínas. Em seguida, a fase aquosa (fase superior) foi transferida para outro tubo limpo,

para posterior extração de RNA. À fase orgânica (rosa), referente à fase do nosso interesse, foram adicionados 300 µL de etanol absoluto (100%) (Sigma-Aldrich[®], EUA), com posterior homogeneização por inversão do tubo.

As amostras foram incubadas durante 3 minutos em T.A e centrifugadas durante 5 minutos a 4°C e 2000g. O sobrenadante foi descartado após a centrifugação.

Em seguida, foi realizada a fase de lavagem do DNA (*pellet*), na qual foi feita com 1 mL de solução de citrato de sódio e etanol (0,1 m de citrato de sódio em 10% de etanol, pH 8,5), com posterior incubação de 30 minutos a T.A. Passado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 4°C com velocidade de 2000 g e, em seguida, tiveram o seu sobrenadante removido, para posteriormente ser realizada mais uma etapa de lavagem como a citada anteriormente.

Feita a lavagem, foi adicionado 1,5 mL de etanol 75% (Apêndice 5), homogeneizado por inversão e, em seguida, incubado durante 15 minutos a T.A e direcionado a centrifugação durante 5 minutos a 4°C sob velocidade de 2000 g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado com volume variando de 300-600 µL de NaOH 8mM (até que todo o material tenha sido homogeneizado), homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 4°C de velocidade de 12000 g. Finalmente, o sobrenadante foi armazenado a - 20°C.

3.4.1. ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO – Método Trizol[®]

No procedimento realizado no laboratório de ensino, a centrifugação refrigerada não pôde ser realizada uma vez que instituição não possui centrífuga que permite tal prática. Nesse caso, as amostras foram centrifugadas em T.A. Além disso, a prática de extração de Trizol deve ser executada no interior de uma capela de exaustão e, nesse caso, houve uma modificação no protocolo, uma vez que a capela disponível para uso na instituição não possui luz ultravioleta (UV) e funciona como armazenamento de reagentes de técnicas histológicas, fato de grande relevância quanto à possível contaminação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. QUANTIFICAÇÃO POR NANODROP DO DNA EXTRAÍDO

Após a extração do DNA total de CL-Brener no estágio epimastigota, tanto no laboratório de ensino, quanto no laboratório de pesquisa, nas metodologias descritas acima, foi realizada a quantificação do material e feita análise do grau de pureza através do espectrofotômetro nanodrop[®], uma vez que consiste em um método simples, rápido e preciso.

A relação de absorvância A260/A280 foi utilizada com intuito de verificar se no DNA extraído houve contaminação por proteínas. O valor referencial de um DNA puro apresenta valores de DO260/DO280 (densidade óptica) de 1,8 a 2,0. Razões inferiores a 1,8 indicam que houve contaminação por proteínas e as razões maiores que 2,0 indicam que houve contaminação por fenóis (Nicklas & Buel, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantificação por nanodrop[®] do DNA extraído pelas diferentes metodologias nos ambientes distintos

Laboratório de Ensino			
Metodologia	Amostra	ng/μL	260/280
Trizol [®]	1	98,3	1,58
	2	74,0	1,54
	3	96,7	1,32
DNAzol [®]	1	351,5	1,97
	2	308,6	1,98
	3	399,4	2,00
<i>In house</i>	1	462,9	1,92
	2	315,2	1,94
	3	377,8	1,90
Laboratório de Pesquisa			
Trizol [®]	1	73,7	1,83
	2	124,4	1,94
	3	1087,8	1,88
DNAzol [®]	1	554,2	1,80
	2	1410,5	1,94
	3	1316,3	1,84
<i>In house</i>	1	425,4	1,99
	2	364,0	1,60
	3	212,2	1,66

Fonte: Elaboração do autor

O protocolo de extração de DNA pelo Trizol feito no laboratório de ensino, nas triplicatas, apresentou a razão A260/280 menor do que o valor de referência. Possivelmente essa alteração foi decorrente de contaminação de proteínas durante a manipulação dos tubos, visto que o ambiente não é favorável para execução de tal técnica. No entanto, as amostras extraídas no laboratório de pesquisa apresentaram razão A260/280 dentro do limite imposto pelo valor referencial.

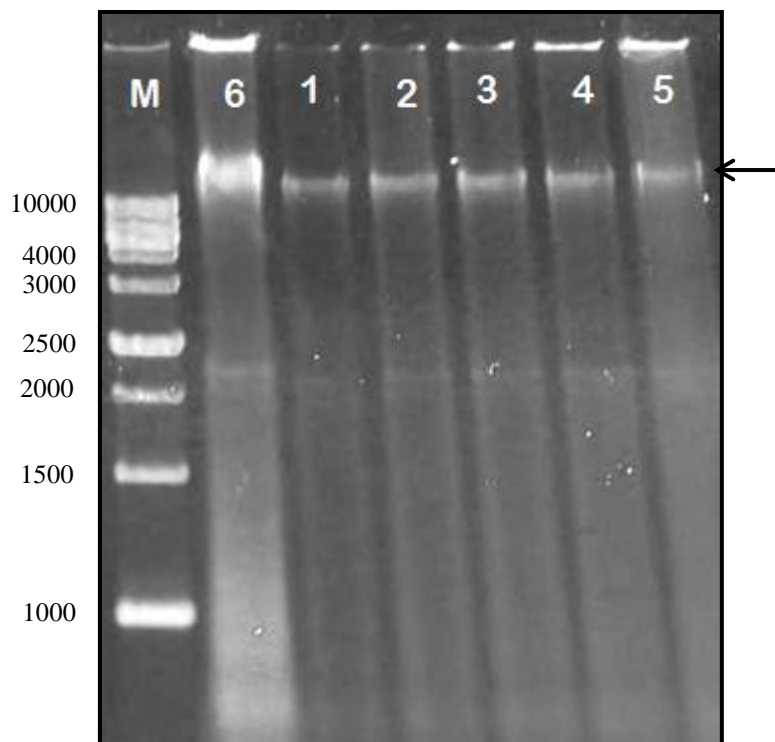
O método de extração pelo DNazol[®] nos dois locais de estudo apresentaram suas triplicatas dentro do limite imposto pelo valor referencial, o que indica que mesmo que haja diferenças entre os ambientes, o DNA se mostra puro.

O método de extração de DNA *in house* realizado no laboratório de pesquisa, em duas das triplicatas, apresentou a razão A260/280 menor do que o valor de referência e da extração feita no laboratório de ensino. Possivelmente, essa alteração foi decorrente de contaminação de proteínas durante a manipulação dos tubos. No entanto, apesar do ambiente não ser o ambiente específico para práticas relacionadas à Biologia molecular, a razão das triplicatas de amostras extraídas neste local apresentaram razão A260/280 dentro do limite imposto ao valor de referencial.

4.2. ANÁLISE QUALITATIVA DO DNA EXTRAÍDO POR ELETROFORESE

Posteriormente, um gel de agarose foi realizado com o intuito de estabelecer uma padronização da técnica de eletroforese, bem como identificar o nível de detecção visual através da variação, de 0,4 a 3 µg, de concentração de DNA (Figura 4).

Figura 4 - Análise de Extração de DNA de *T.cruzi* na metodologia *in house* em gel de agarose *Low melting* 1 %

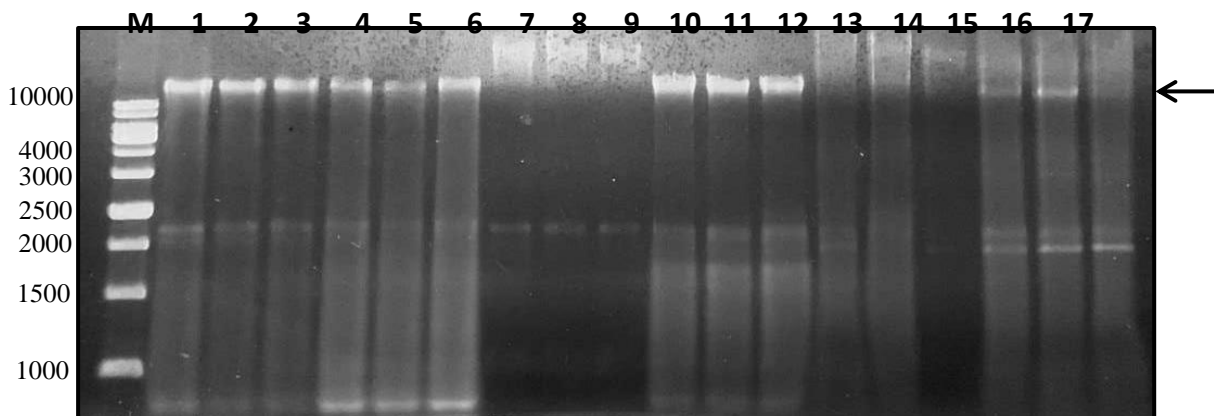


Legenda: Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) da extração de DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, os quais foram extraídos com a metodologia *in house*. Poço M - marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (1 kb – DNA Ladder Sinapse Inc). Poço 1 DNA correspondente a 439, 26 ng; Poço 2 a 649,33 ng; Poço 3 a 859, 41 ng; Poço 4 a 1088,58 ng; Poço 5 a 1623,33 ng; Poço 6 correspondente a 2998,40 ng. A seta indica a região das bandas correspondentes ao DNA genômico.

A análise desse gel, indicou que, apesar das concentrações 0,46 μg , 0,64 μg , 0,85 μg , 1,0 μg , 1,6 μg terem intensidades visuais próximas, a concentração de 1 μg foi escolhida, visto que lidamos com metodologias de maior e menor grau de concentração de DNA.

Após a padronização da técnica, foi realizado um novo gel contendo as extrações de DNA referente às três metodologias usadas nesse projeto, com a mesma concentração (1 μg) a fim de comparar a qualidade dos fragmentos extraídos (Figura 5).

Figura 5 – Análise de Extração de DNA de *T.cruzi* nas metodologias DNAzol[®], Trizol[®] e *in house* em gel de agarose 1 %



Legenda: Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) da extração de DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, os quais foram extraídos pelos métodos DNAzol[®], Trizol[®] e *in house*. O poço M corresponde ao marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (1 kb – DNA Ladder Sinapse Inc). Poço 1-3 Extração de DNA *in house* laboratório de pesquisa; Poço 4-6 Extração de DNA *in house* no laboratório de ensino; Poço 7-9 Extração de DNA por DNAzol[®] no laboratório de ensino; Poço 10-12 Extração de DNA por DNAzol[®] no laboratório de pesquisa; Poço 13-15 Extração de DNA por Trizol[®] no laboratório de pesquisa; Poço 16-18 Extração de DNA por Trizol[®] no laboratório de ensino. A seta indica a região das bandas correspondentes ao DNA genômico.

Feita a análise do gel, podemos observar que as amostras extraídas pelo protocolo *in house* tanto no laboratório de ensino, como no de pesquisa, se mostraram íntegras na detecção visual, no entanto, os fragmentos de DNA derivados do método de extração pelo DNAzol[®] realizados no primeiro ambiente não foram detectados em gel de agarose. Possivelmente, a concentração não foi suficiente para a detecção por essa metodologia.

O protocolo de extração de DNA por Trizol[®] manifestou que as triplicatas extraídas, em ambos os locais de estudo, apresentaram qualidade inferior. Esse resultado era esperado uma vez que no laboratório de ensino as amostras foram manipuladas em ambiente inadequado, ou seja, com o uso de capela de exaustão sem lâmpada UV e contendo resíduos de materiais de outras práticas.

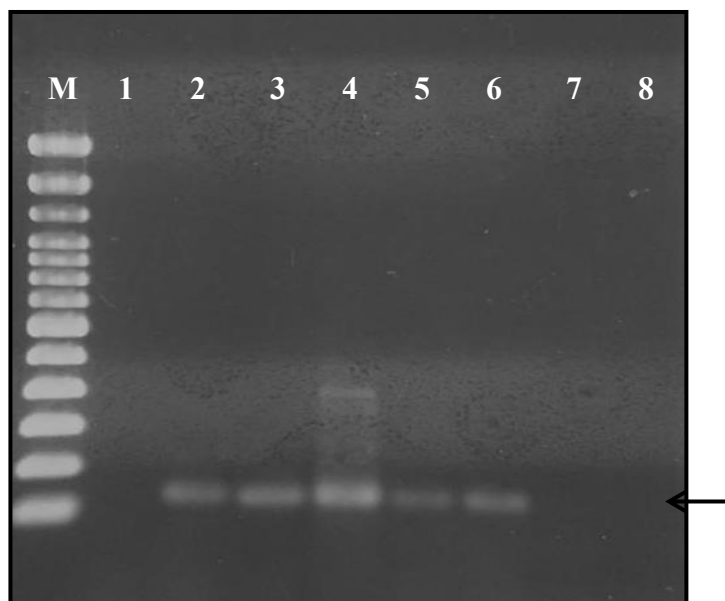
4.3. ANÁLISE QUALITATIVA DA PCR POR ELETROFORESE

Em seguida, a amplificação dos fragmentos de DNA genômico foi realizada pela técnica da

PCR para averiguarmos a viabilidade dessas moléculas extraídas por meio de todas as metodologias (Trizol[®], DNazol[®] e *in house*). A síntese foi feita com o iniciador (*primer*) da cisteíno-peptidase, uma enzima que possui um papel importante no fator de virulência dos tripanossomatídeos relacionada à interação com as células de mamíferos na relação parasito-hospedeiro (Mottram et al, 1998).

O produto obtido foi um fragmento de 115 pb. A figura 6 representa o conjunto de DNA extraído pela metodologia *in house* e amplificado com os iniciadores da cisteíno-peptidase.

Figura 6 – Análise de Produto de PCR Extração *in house* em gel de agarose 1,5%



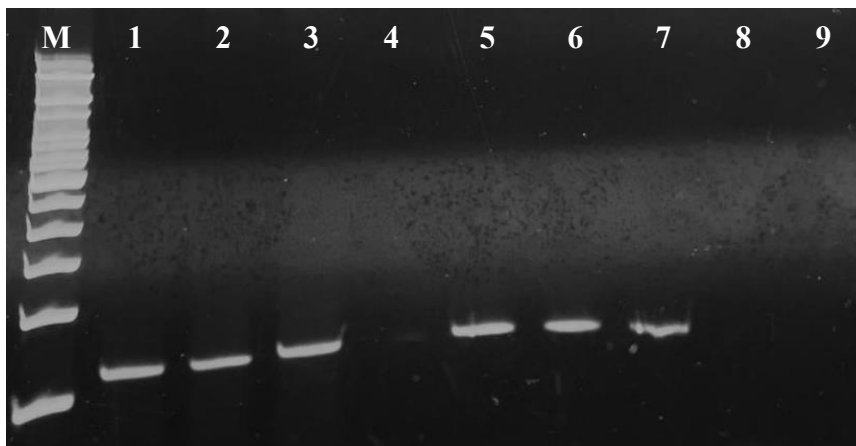
Legenda: Análise de Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos com a metodologia *in house*. Poço M - marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific) ; Poço 1-3 DNA's extraídos no laboratório de pesquisa; Poço 4-6 DNA's extraídos na ESPJV; Poço 7: Controle positivo (não apareceu); Poço 8: Controle negativo. A seta indica a posição da banda esperada de 115 pb.

Os géis de poliacrilamida são mais sensíveis à detecção dos fragmentos de DNA quando comparados aos géis de agarose. Pensando nessa diferença entre as técnicas, realizamos géis de poliacrilamida com o intuito de verificarmos se os produtos amplificados teriam o mesmo comportamento mediante as duas metodologias (figura 7). Em vista disso, podemos observar que uma das triplicatas que foram extraídas no laboratório de pesquisa (poço 1) não apareceu no gel de agarose, porém no gel de poliacrilamida houve detecção do fragmento relacionado ao não detectado (poço 1).

Além disso, pôde-se observar que o rastro presente na amostra localizada no poço 4 do gel de

agarose, não apareceu no gel de poliacrilamida, eliminando a ideia de uma possível contaminação ou excesso de DNA (figura 6 e 7).

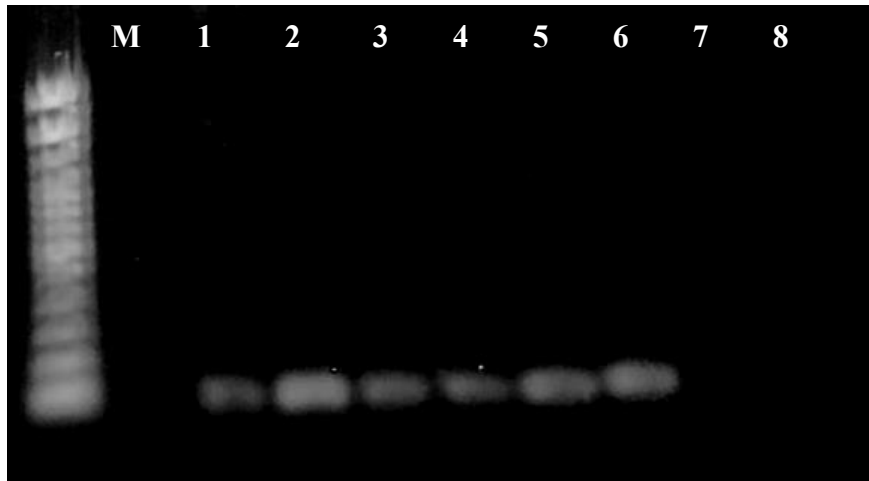
Figura 7 – Análise de Produto de PCR Extração *in house* em Gel de poliacrilamida 10,5%



Legenda: Análise de Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos com a metodologia *in house*. Poço M- marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific); Poço 1-3 DNA's extraídos no laboratório de pesquisa; Poço 4- Branco Poço 5-7 DNA's extraídos na ESPJV; Poço 8: Controle positivo (não detectado); Poço 9: Controle negativo. A banda esperada possui 115 pb.

Posteriormente, a análise da viabilidade da metodologia de Extração de DNA por Trizol[®] foi realizada a partir da amplificação (PCR) dos DNA's extraídos com os iniciadores da cisteíno-peptidase (Figura 8).

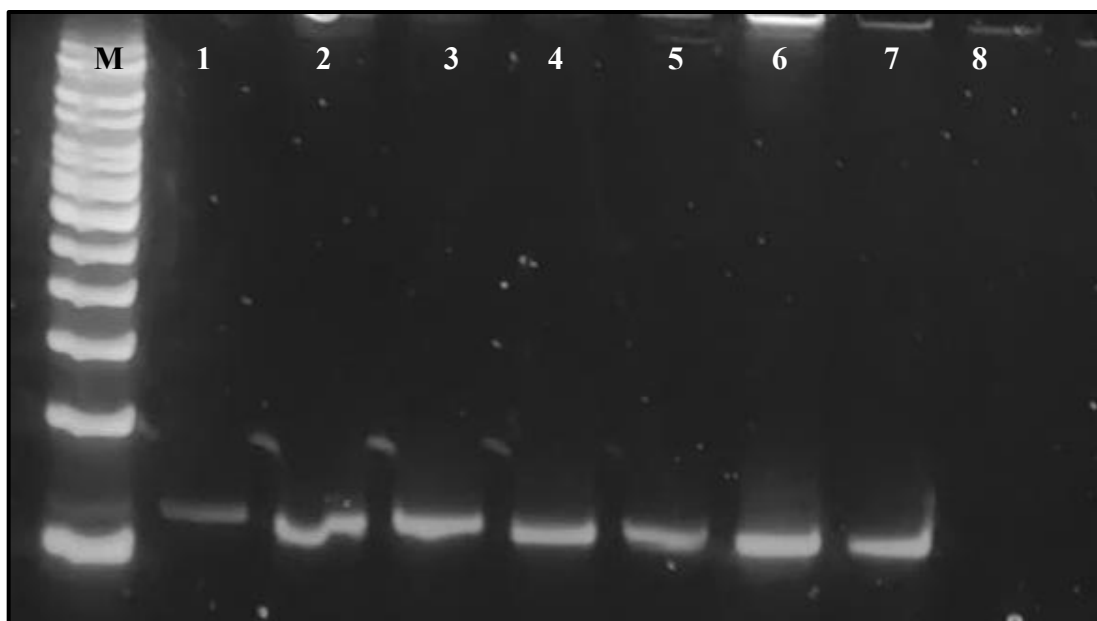
Figura 8 – Análise de Produto de PCR Extração de DNA por Trizol[®] em gel de agarose 1,5%



Legenda: Análise de Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos com a metodologia Trizol[®]. Poço M - marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific); Poço 1-3 DNA's extraídos no laboratório de pesquisa; Poço 4-6 DNA's extraídos na ESPJV; Poço 7: Controle positivo (não foi detectado); Poço 8: Controle negativo. A banda esperada possui 115 pb.

Com intuito de fazer uma comparação das metodologias de resultado (géis), foi realizado um gel de poliacrilamida a fim de gerar um resultado mais sensível. Com isso, podemos observar que uma das triplicatas que foram extraídas no laboratório de pesquisa (poço1) não foi detectada no gel de agarose, porém no gel de poliacrilamida se mostrou amplificada (poço 1). Além disso, pôde-se observar que todas as outras amostras foram corretamente amplificadas, incluindo o controle positivo, fato esse que comprova que as amostras estão viáveis para posteriores análises (Figura 8 e 9).

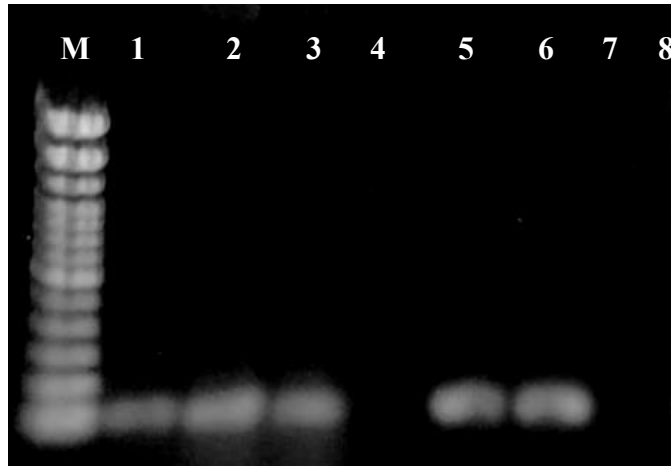
Figura 9 – Análise de Produto de PCR Extração de DNA por Trizol[®] em Gel de poliacrilamida 10,5%



Legenda: Análise de Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos com a metodologia Trizol[®]. Poço M - marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific); Poço 1-3 DNA's extraídos no laboratório de pesquisa; Poço 4-6 DNA's extraídos na ESPJV; Poço 7: Controle positivo; Poço 8: Controle negativo. A banda esperada possui 115 pb.

Por fim, foi feita análise da viabilidade dos produtos obtidos por amplificação com iniciadores da cisteíno-peptidase, das amostras extraídas pelo protocolo de extração de DNA por DNazol[®] (Figura 10).

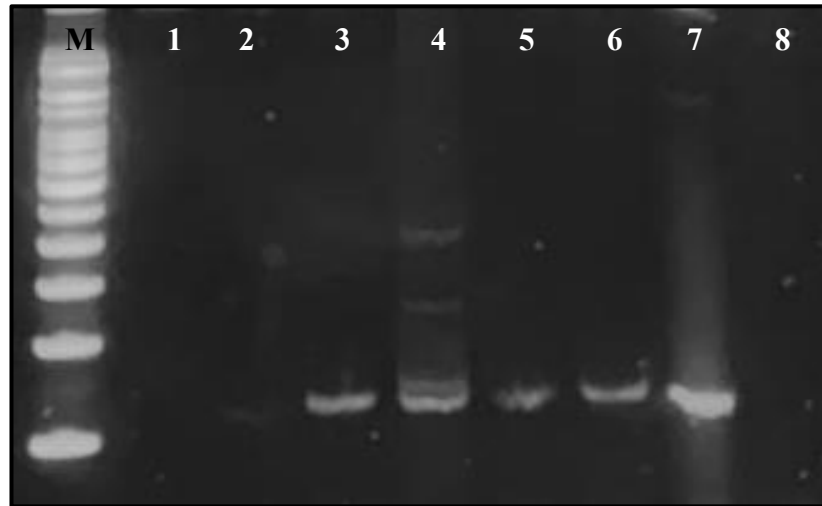
Figura 10 – Análise de Produto de PCR Extração de DNA por DNAzol[®] em gel de agarose 1,5%



Legenda: Análise de Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos com a metodologia DNAzol[®]. Poço Poço M - marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific); Poço 1-3 DNA's extraídos no laboratório de pesquisa; Poço 4-6 DNA's extraídos na ESPJV; Poço 7: Controle positivo; Poço 8: Controle negativo. A banda esperada possui 115 pb.

A mesma análise foi feita por meio de outra metodologia (gel de poliacrilamida) com intuito de verificar as mesmas amostras, mas em mais um substrato mais sensível. A partir disso, podemos observar que os produtos amplificados que foram detectados no gel de agarose, também foram detectados no de poliacrilamida, com exceção DNA de número 1 extraído no laboratório de ensino, na qual não foi aplicada por motivos de não possuir volume suficiente no momento em que foram feitos os géis. A amostra de número 2 extraída no laboratório da escola, não foi detectada no gel de agarose, porém no gel de poliacrilamida foi detectada de forma fraca, enquanto todas as outras amostras foram amplificadas, o que confirma a viabilidade das amostras em questão (Figuras 10 e 11).

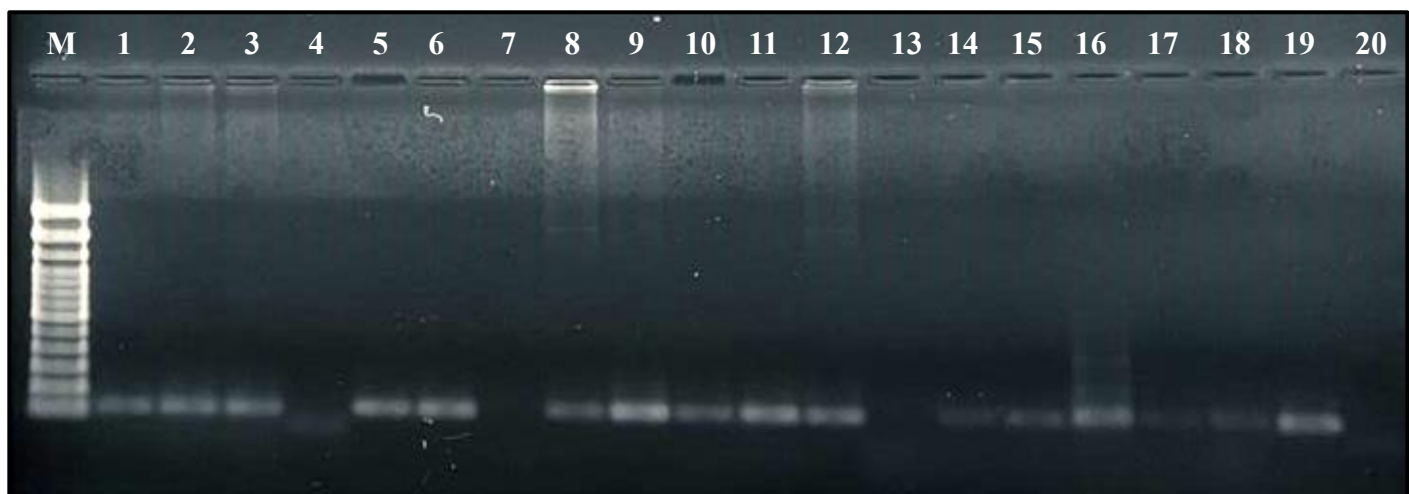
Figura 11 – Análise de Produto de PCR Extração de DNA por DNAzol® em Gel de poliacrilamida 10,5%



Legenda: de Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos com a metodologia DNAzol®. Poço M - marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific); Poço 1-3 DNA's extraídos no laboratório de ensino; Poço 4-6 DNA's extraídos no laboratório de pesquisa; Poço 7: Controle positivo; Poço 8: Controle negativo. A banda esperada possui 115 pb.

Com o intuito de fazer uma comparação entre a viabilidade do DNA extraído pelas distintas técnicas em questão (Trizol®, DNAzol® e *in house*), foi realizado um gel de agarose para tal comprovação (Figura12).

Figura 12 – Análise de Produto de PCR Extração de DNA por todas as metodologias (Trizol®, DNAzol® e *in house*) em Gel de agarose 1,5%



Legenda: Análise da Produto de PCR do gene cisteíno-peptidase por eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% (p/v). DNA's de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brener, foram extraídos pelos métodos DNAzol®, Trizol® e *in house*. Poço M -

marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific); Poço 1-3 Extração de DNA DNAzol[®] realizada no laboratório de pesquisa; Poço 4-6 Extração de DNA DNAzol[®] realizada no laboratório de ensino; Poço 7-9 Extração de DNA por Trizol[®] realizada no laboratório de ensino; Poço 10-12 Extração de DNA por Trizol[®] realizada no laboratório de pesquisa; Poço 13-15 Extração de DNA *in house* realizada no laboratório de pesquisa; Poço 16-18 Extração de DNA *in house* realizada no laboratório de ensino. Poço 19- Controle positivo; Poço 20 – Controle negativo. A banda esperada possui 115 pb.

Feita a análise do gel, podemos observar que houve amplificação, de modo geral, em todas as extrações em algumas das triplicatas, com exceção DNAzol (poço 4) e do Trizol (poço 7), no laboratório de ensino, respectivamente, por falta de volume e por baixa concentração de DNA e DNA *in house* (poço 13), no laboratório de pesquisa, por erro de manipulação ou baixa sensibilidade no gel de agarose. É importante atentar ao fato, de que esta última amostra (poço 13), embora não tenha sido visualizada no gel de agarose, foi visualizada com sucesso no gel de poliacrilamida (Figura 7).

5. CONCLUSÕES

- A partir dos resultados descritos, verificamos que todos os protocolos usados para extração de DNA de *T. cruzi* foram capazes de extrair o material em questão com qualidade, obedecendo aos parâmetros impostos para avaliação do grau de pureza (A260/A280);
- A concentração de DNA extraído em todos os protocolos foi suficiente para a realização de técnicas posteriores, tais como eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida, e amplificação da molécula através da PCR;
- Apesar do laboratório de ensino não haver área específica destinada à realização de técnicas sensíveis e minuciosas, como as de Biologia Molecular, o mesmo mostrou-se apto à realização de tais procedimentos voltados para a capacitação profissional, bem como para o estímulo à pesquisa ao aluno de médio;
- Portanto, o uso de laboratórios veiculado às aulas práticas deve ser cada vez mais estimulado, principalmente durante a formação técnica, pois além de capacitar o profissional o faz com qualidade e eficiência.

6. PERSPECTIVAS

- Cursar a Faculdade de Ciências Biológicas;
- Retornar ao Laboratório de Pesquisa onde realizou parte desse trabalho como Bolsista de Iniciação Científica;
- Avançar nos estudos iniciados nesse trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, Simpson L (1993) Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31: 2421-2426

Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Perez AR, Berbert LR, de Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, de Carvalho-Pinto CE, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, Savino W, de Meis J (2015) *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003849

Barreto-de-Albuquerque JS-d-S, D.; Perez, A.R.; Berbert, L.R.; de Santana-van-Vliet, E.; Farias-de-Oliveira, D.A.; Moreira, O.C.; Roggero, E.; de Carvalho-Pinto, C.E.; Jurberg, J.; Cotta-de-Almeida, V.; Bottasso, O.; Savino, W.; de Meis, J. (2015) *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? . *PLoS Negl Trop Dis* 9

Benchimol Barbosa PR (2006) The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol* 112: 132-133

Caradonna KL, Burleigh BA (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 76: 33-61

Chagas C (1909) Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218

de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010

Devera R, Fernandes O, Coura JR (2003) Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and

mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 1-12

Dias E (1940) Técnica de Xenodiagnóstico na Molestia de Chagas. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 35: 335-342

González IJM, M.A.; Perkins, M.D. (2010) Chagas disease (American trypanosomiasis). *Infectious Diseases (Third Edition)* 2: 1205-1212

Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D (1996) Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun* 64: 3800-3810

Horak FB, Dozza M, Peterka R, Chiari L, Wall C, 3rd (2009) Vibrotactile biofeedback improves tandem gait in patients with unilateral vestibular loss. *Ann N Y Acad Sci* 1164: 279-281

Jurberg JR, J.M.S.; Moreira, F. F. F. ; Dale, C.; , Cordeiro IRSL, V.D.J.; Galvão, C.; Rocha, D.S. (2014) Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas).

Luquetti AORAA, Z.A.; Barral-Neto, M. (2000) Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. 2 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 344-378

McGwire BS. (2015) Explainer: what is Chagas disease? The conversation. Disponível em: <https://theconversation.com/explainer-what-is-chagas-disease-40047> Acesso em: 05 de dez. de 2019

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482

Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH (1998) Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1: 455-460

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB (2012) Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* 14: 634-643

Nicklas JA, Buel E (2003) Quantification of DNA in forensic samples. *Anal Bioanal Chem* 376: 1160-1167

Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverria LE, Dutra WO, Gascon J, Morillo CA, Oliveira-Filho J, Ribeiro ALP, Marin-Neto JA (2018) Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 138: e169-e209

Requena-Mendez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DA, Gascon J, Munoz J (2015) Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003540

Rotureau B, Gego A, Carme B (2005) Trypanosomatid protozoa: a simplified DNA isolation procedure. *Exp Parasitol* 111: 207-209

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB (2012) Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 54: 845-852

Toso MA, Vial UF, Galanti N (2011) [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil* 139: 258-266

WHO (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 90: 33-44

Yoshida N (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78: 87-111

Yoshida N (2009) Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 101-107

8. APÊNDICES

1- Meio BHI (*Brain Heart Infusion*) – Warren modificado

- ✓ 37 g de BHI;
- ✓ Água para completar 1 L;
- ✓ Autoclavar;

2- PBS 1x (Phosphate Buffered Saline) - Sigma Aldrich®

- ✓ 8,0 g de NaCl (137 mM);
- ✓ 0,2 g de KCL (2.7 mM);
- ✓ 1,44 g de Na₂HPO₄ (10 mM);
- ✓ 0,24 g de KH₂PO₄ (1,8 mM);
- ✓ Dissolver em 800 mL de água destilada;
- ✓ Ajustar o pH para 7,4 com HCL;
- ✓ Avolumar até 1L;

3- Solução tampão de lise celular

- ✓ 0,12114g de Tris – HCL;
- ✓ 0,18617g de Acidotetracético etileno (EDTA);
- ✓ 0,5 ou 5mL de Sulfato (SDS);
- ✓ 5µL de Poteinase K (Sigma-Aldrich®, EUA);
- ✓ Acrescentar 80 mL de água destilada;
- ✓ Ajustar o pH para 8,0 com HCL;
- ✓ Avolumar até 100 mL;

4- Solução tampão de ressuspensão

- ✓ 0,12114g de Tris – HCL;
- ✓ 0,0037224g de Acidotetracético etileno (EDTA);
- ✓ Acrescentar 80 mL de água destilada;

- ✓ Ajustar o pH para 7,5 com HCL;
- ✓ Avolumar até 100 mL;

5- Etanol a 75%

- ✓ 750 mL Etanol Absoluto (Sigma-Aldrich[®], EUA)
- ✓ Avolumar até 1L