

Extração de DNA por fervura como estratégia econômica para a detecção molecular de *Leishmania*

Bárbara Lopes da Silva, Atilio Cardoso dos Santos Junior, Gabriel Teixeira Guerra, Rayane Luiza de Carvalho, RAPHAEL DE SOUZA VASCONCELLOS, CHRISTIANE MARIOTINI MOURA VASCONCELLOS

ODS3 - Saúde e Bem-estar Categoria: Pesquisa

Introdução

As Leishmanioses são doenças infecciosas negligenciadas. No Brasil, houve 13 mil casos de leishmaniose tegumentar e quase 1.500 de leishmaniose visceral em 2023. A descontinuação do reagente de Montenegro, até então usado para detectar a infecção, criou uma lacuna que demanda o desenvolvimento de novos kits diagnósticos. Testes moleculares são promissores, mas o uso no Sistema Único de Saúde (SUS) depende de estratégias de redução de custos. Assim, métodos de extração de DNA mais baratos são atrativos para ampliar seu acesso pelo SUS.

Objetivos

Comparar a extração de DNA através do kit comercial com a extração por fervura e realizar a aplicação do material extraído em técnicas de biologia molecular.

Material e Métodos ou Metodologia

Foi utilizada a cepa PH8 de *Leishmania amazonensis*, mantida no Laboratório de Parasitologia, Epidemiologia e Virologia da Universidade Federal de Viçosa. O DNA foi extraído de duas formas: 1.com o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen; 2.fervura a 100°C variando o tempo de 5 a 30 min. A análise quantitativa do DNA foi realizada pelo NanoDrop™ e a integridade, avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para reduzir impurezas das amostras fervidas, testaram-se duas purificações:(a) centrifugação a 6000 rpm/30s e (b) tratamento com ácido tricloroacético (TCA). Os sobrenadantes foram coletados e quantificados. Para confirmação da extração, foi usada a técnica de LAMP-PCR.

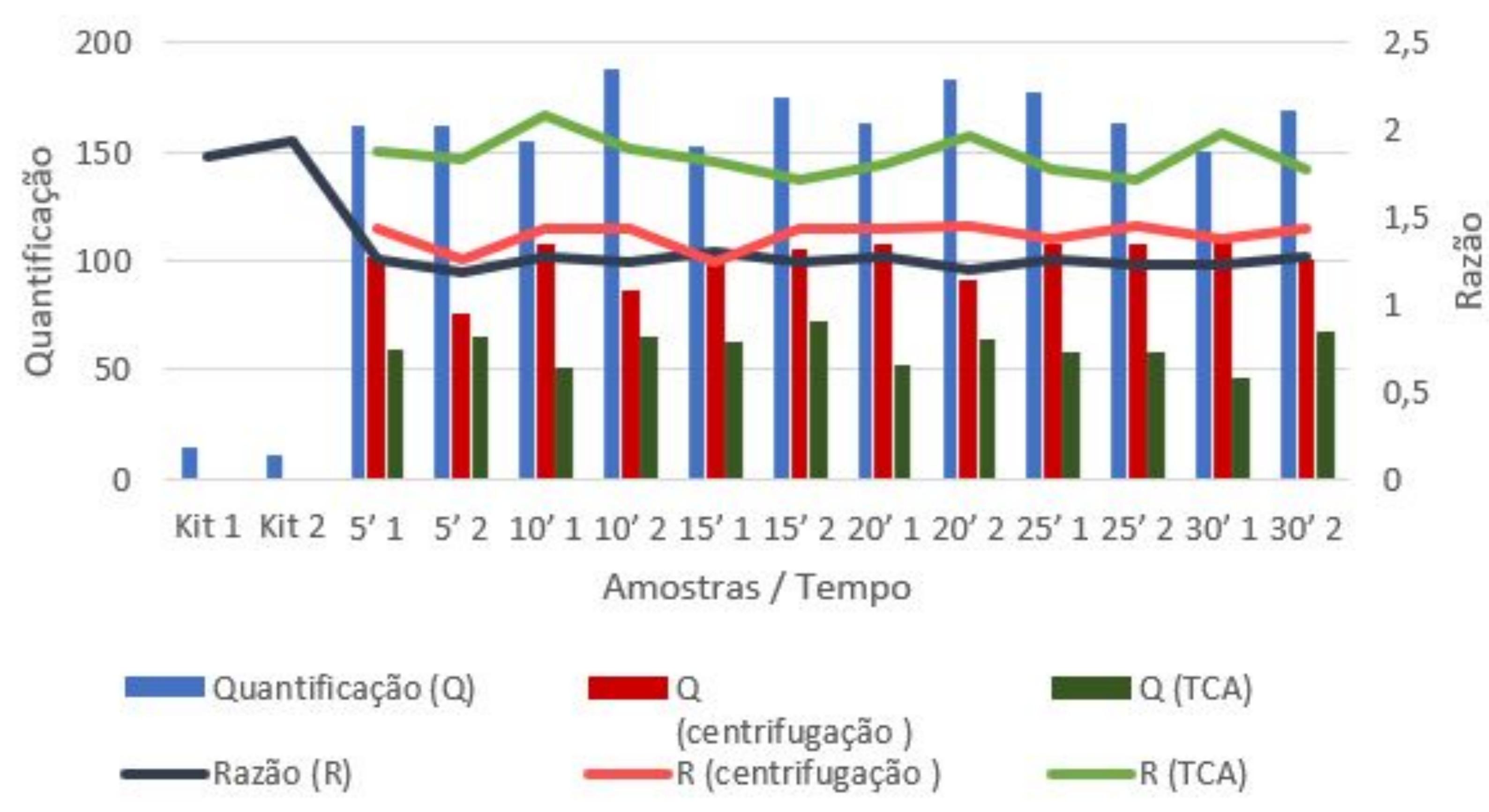
Resultados e/ou Ações Desenvolvidas

Os DNAs extraídos pelo kit tiveram quantificações 15,1 e 10,9 ng/µL e razões de 1,85 e 1,93; os extraídos por fervura variaram de 150,4 a 187,4 ng/µL, e razões variando de 1,18 a 1,31. Logo, a fervura extraiu maior quantidade de DNA, porém com menor pureza, algo esperado, pela presença de debríis celulares e proteínas. A variação do tempo de fervura não trouxe variações consideráveis. A amostra extraída foi centrifugada para concentrar os contaminantes no pellet e separar o DNA no sobrenadante, sem melhora na pureza. Na etapa de purificação com TCA as razões aumentaram, variando de 1,71 a 2,08, mantendo concentrações de DNA superiores às da extração com o kit.

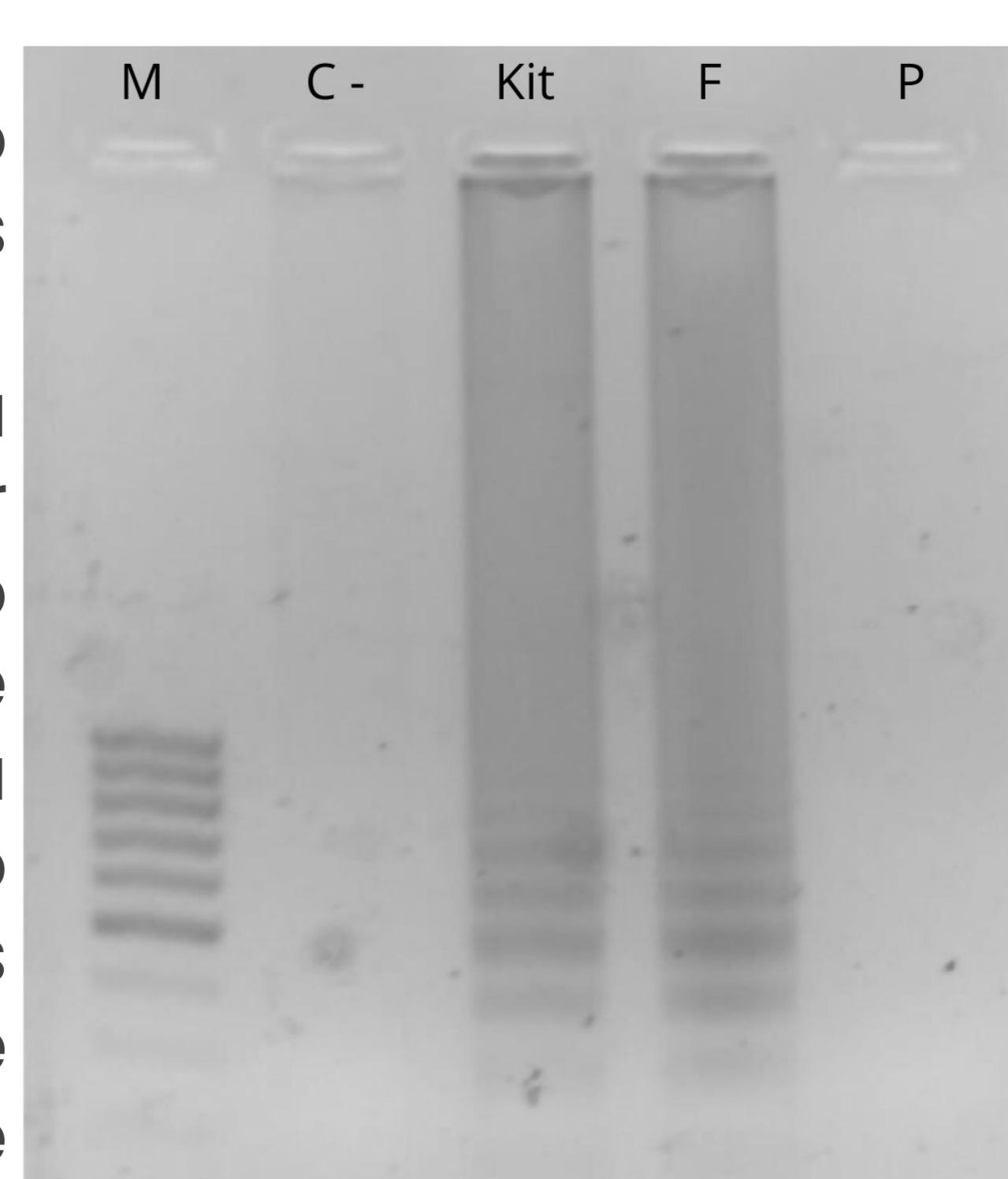
Apoio Financeiro



Gráfico 1. Comparação da quantificação (ng/µL) e razão nas amostras de DNA extraídas por kit e por fervura e submetidas à centrifugação e purificação com TCA



Na eletroforese, observaram-se bandas apenas nos DNAs extraídos com o uso do kit comercial, mas não nos obtidos por fervura. Nestes poços, o acúmulo de material nas canaletas sugere que contaminantes podem ter interferido na migração do DNA pelo gel. Por fim, para verificar se as amostras seriam úteis em técnicas de biologia molecular, foi feita uma Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), um método mais barato e rápido que a reação em cadeia de polimerase convencional (PCR), uma vez que dispensa o uso do termociclador e amplifica as amostras em até 30 minutos, mostrando-se uma ótima opção para o SUS. Houve amplificação nas amostras do kit e de fervura, mas não nas purificadas.



Conclusões

A extração por fervura reduz até 70% do custo por reação e, apesar das impurezas, o método mostrou-se eficaz para amplificação de DNA, tornando-se uma opção de bom custo-benefício para o SUS. A purificação com TCA melhorou a razão, mas interferiu na amplificação. Novos testes de purificação devem ser realizados.

Bibliografia

RUANG-AREERATE, T. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay using SYBR safe and gold-nanoparticle probe for detection of *Leishmania* in HIV patients. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 12152, 9 jun. 2021.

Ribeiro De Oliveira, Eduardo. ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES: DA PROTEÇÃO INTELECTUAL À DISPONIBILIDADE COMERCIAL. 2016.