

Extração de DNA de *Trypanosoma cruzi* por fervura: alternativa simples e viável ao uso de kits comerciais para diagnóstico molecular de doença de Chagas no SUS

Atilio Cardoso dos Santos Junior, Bárbara Lopes da Silva, Sara Andrade Machado de Godoy, Rayane Luiza de Carvalho, RAPHAEL DE SOUZA
VASCONCELLOS, CHRISTIANE MARIOTINI MOURA VASCONCELLOS

ODS3 - Saúde e Bem-estar Categoria: Pesquisa

Introdução

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada e um desafio ao Sistema Único de Saúde (SUS) em regiões endêmicas do Brasil, país com 5,4 mil casos em 2024. A fase inicial da doença pode ser assintomática ou com sintomas leves, dificultando o diagnóstico. A padronização de um protocolo de extração de DNA é essencial para garantir a integridade das amostras, permitindo sua utilização em técnicas de biologia molecular que possibilitem diagnósticos sensíveis e específicos.

Objetivos

Comparar a eficiência entre dois métodos distintos de extração de DNA, visando a padronização de um protocolo barato e acessível para a aplicação em técnicas de biologia molecular e diagnóstico de doença de Chagas pelo SUS.

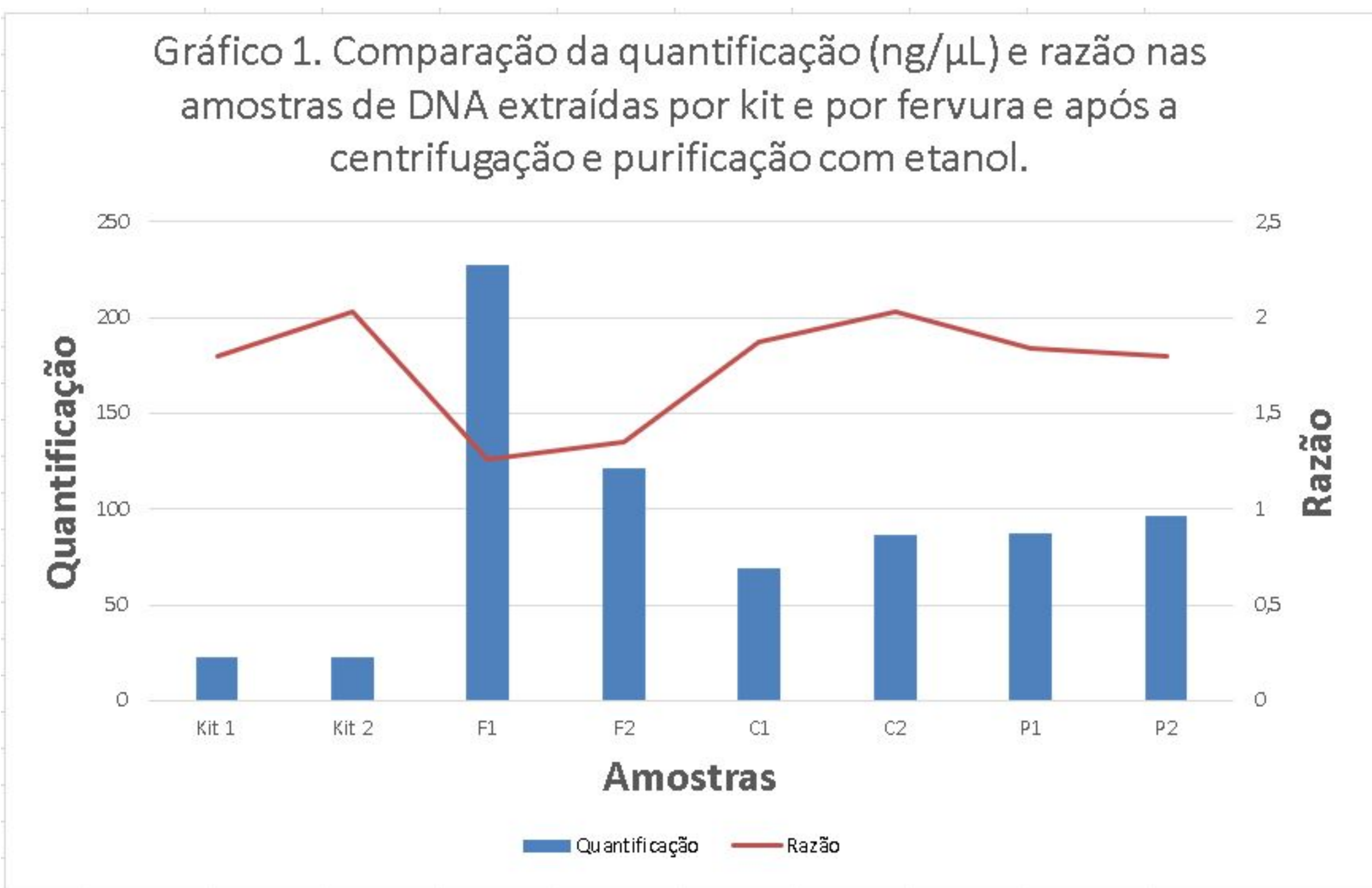
Material e Métodos ou Metodologia

Utilizou-se *T. cruzi*, cepa Y, cultivados em meio LIT no Laboratório de Parasitologia, Epidemiologia e Virologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram comparados dois métodos de extração de DNA: **1.** fervura da amostra a 100°C, variando o tempo de 5 a 30 min; **2.** utilizando o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen. A seguir, foram feitos dois testes de purificação do DNA fervido: **1.** etanol 96% para precipitação de proteínas; **2.** centrifugação a 6000 rpm por 30s. Os sobrenadantes foram coletados e quantificados. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e a concentração por NanoDrop, em ng/μL e razão A260/280, para avaliar pureza. A amplificação de sequência específica de *T. cruzi* por reação em cadeia de polimerase (PCR), confirmou as extrações.

Resultados e/ou Ações Desenvolvidas

As amostras de DNA obtidas pelo kit, tiveram concentrações de 22,8 a 23,2 ng/μL, e razões de 1,8 a 2,03. As pela fervura, em diferentes tempos, tiveram maior rendimento (70,3 a 166,5 ng/μL), mas pureza inferior (1,3 a 2,24). A eletroforese evidenciou bandas nas amostras extraídas com kit, mas não nas fervidas que, por terem debris celulares, ficam retidas nas canaletas.

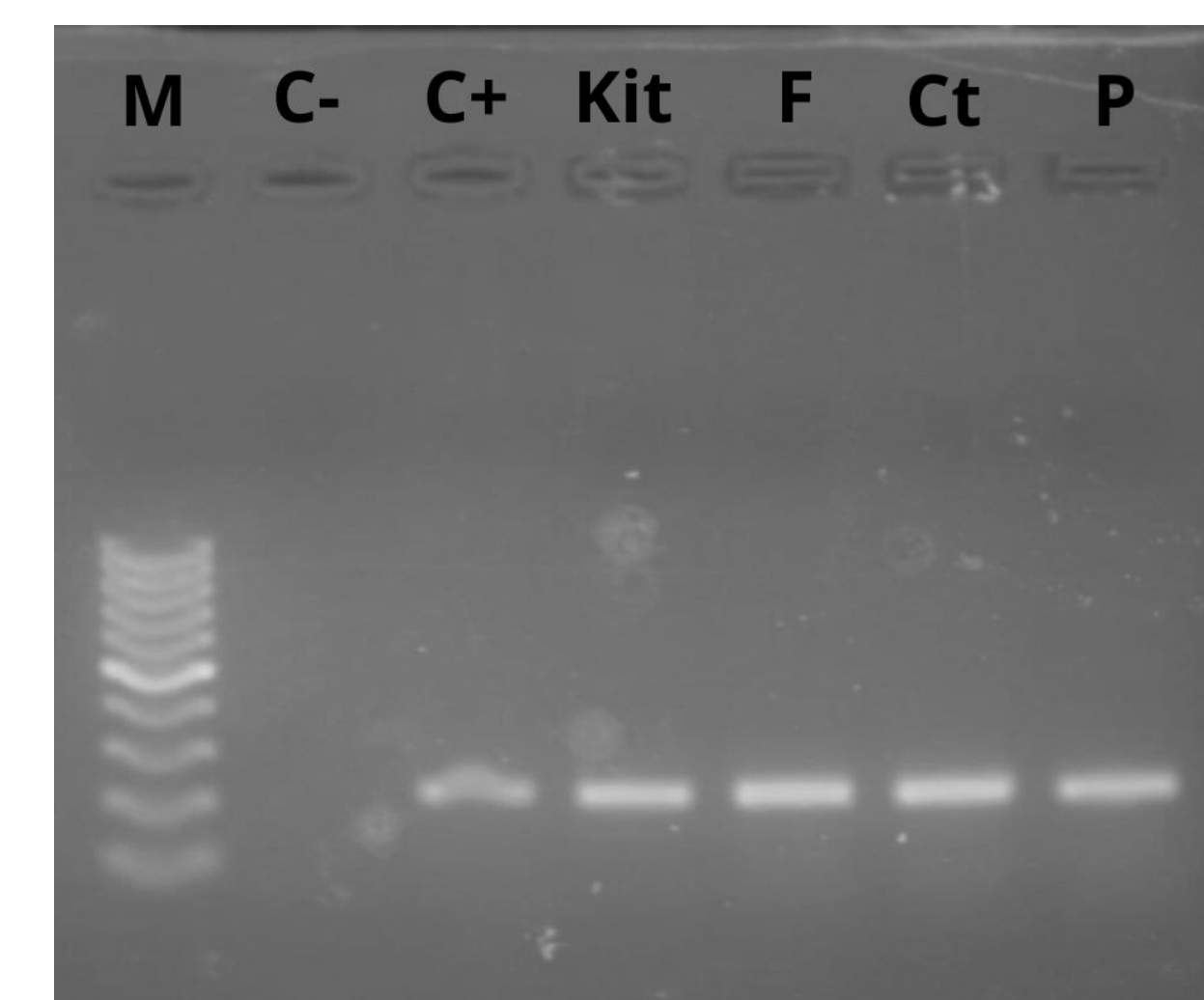
Apoio Financeiro



Na purificação por centrifugação, as concentrações variaram de 69,5 a 101,9 ng/μL, com razão entre 1,90 a 2,14.

E, com etanol: 87,7 a 96,7 ng/μL e razões 1,8 a 1,88.

Logo, confirma-se que os dois testes são úteis, melhorando a pureza, sem perda de DNA. Como não foi possível visualizar bandas definidas no gel, foi realizada uma PCR com todas as amostras, para confirmar as extrações pela amplificação do DNA, o que ocorreu em todas elas (kit, fervura e purificadas).



LEGENDA: Marcador | Controle negativo | Controle positivo | Kit | Fervura | Centrifugado | Purificado

Conclusões

A extração de DNA por fervura, associada à centrifugação ou precipitação com etanol, foram suficientes para o aumento da concentração de DNA em relação à extração por kit, com pureza equiparável, e foram satisfatórias para PCR. Assim, a fervura é econômica e útil para o uso do material genético em locais com baixos recursos, permitindo que haja ampla distribuição de métodos de diagnóstico molecular no sistema público.

Bibliografia

- RAMÍREZ, J. C. et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 17, n. 5, p. 605–615, set. 2015.
- AHMED, O. B.; DABLOOL, A. S. Quality Improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria. *International Journal of Bioassays*, v. 6, n. 04, p. 5347, 2 abr. 2017.