

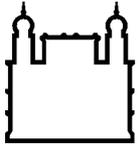
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA
EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
CHAGAS, 1909 POR PCR EM TRIATOMÍNEOS.**

VANESSA DA COSTA NEVES

**Rio de Janeiro
2010**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Vanessa da Costa Neves

Avaliação de Protocolos de Extração de DNA Empregados na Detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 por PCR em Triatomíneos.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Biologia Parasitária).

Orientadora: Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira

RIO DE JANEIRO
2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

N518

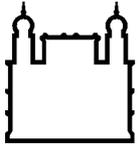
Neves, Vanessa da Costa

Avaliação de protocolos de extração de DNA empregados na
detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 por PCR em triatomíneos
/ Vanessa da Costa Neves. – Rio de Janeiro, 2010.
xvii, 162 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em
Biologia Parasitária, 2010.
Bibliografia: f. 114-132

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Extração de DNA. 3. PCR. 4. Triatomíneos.
I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Vanessa da Costa Neves

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EMPREGADOS NA
DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CHAGAS, 1909 POR PCR EM
TRIATOMÍNEOS.**

ORIENTADORA: Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira

Aprovada em: 21/ 06/ 2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adeilton Alves Brandão - **Presidente**

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz (Medicina Tropical/ Fundação Oswaldo Cruz), sob orientação da Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira (IOC/FIOCRUZ) e colaboração do Dr. Guilherme Loureiro Werneck (ENSP/FIOCRUZ e UERJ).

Dedico esta dissertação a meus pais,
por seus ensinamentos, amor, carinho e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir mais uma grande conquista em minha vida, sem nunca me desamparar.

A meus pais, por todos os ensinamentos, pelo carinho e amor incondicional.

À minha irmãzinha, Elaine, pelo carinho e apoio.

À minha orientadora, Dra. Angela Junqueira, com quem aprendi o verdadeiro valor da pesquisa. A ela sou muito grata pela paciência, ajuda, excelentes oportunidades e grandes ensinamentos, sejam profissionais ou pessoais. Obrigada por acreditar em mim!

Ao Dr. Guilherme Werneck pela grande colaboração durante o desenvolvimento desta dissertação, pelas idéias, pelas trocas de informações e pela amizade.

Ao Prof. José Rodrigues Coura, pela ajuda, pela paciência, pelos ensinamentos.

Ao Dr. Carlos José de Carvalho Moreira por gentilmente ceder seu laboratório para uso em diversos experimentos, pela ajuda com os cálculos e também pelos momentos de descontração.

À Dra. Martha Mutis pelas sugestões e auxílio em diversos momentos.

Ao Dr. Adeilton Brandão pela revisão desta dissertação e pela ajuda intelectual.

Ao Dr. Pedro Albajar por fornecer informações sempre atualizadas, pelo apoio, pelo carinho e que, por acreditar na importância deste estudo, sempre nos forneceu palavras de incentivo.

Ao Dr. Dario Eluan Kalume pelos esclarecimentos nos assuntos que deixaram dúvidas, pelas ponderações, pelos conselhos e todo o carinho sempre que precisamos.

Ao Dr. Octávio Fernandes na orientação dos laboratórios privados de medicina diagnóstica de maior destaque no Brasil.

A todas as pessoas maravilhosas que conheci no caminho, Laura Martins, Taliha Perez, Eric Vinaud, Renata Bortolasse, que me deram apoio em diferentes aspectos e em diferentes momentos desta jornada.

Aos colegas de turma com os quais estudei e me diverti nos churrascos na casa do Gentil, nos amigos-ocultos e em outros momentos, na Fiocruz ou não. Agradeço em especial à Nathália Motta, Ludmila Rocha, Carol Ganime, Daniel Motta, Gentil e Alice Helena.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Aline, Amanda, Deise, Celeste, Cristina e Felipe, sem os quais esta dissertação não teria sido possível.

Ao Elton Faria por sempre fazer o melhor para ajudar na solução de problemas e também pela amizade.

Aos queridos Samuel e Zezé, não só pelos triatomíneos cedidos, mas também pelo apoio e amizade.

À grande amiga Eli, que, mesmo sem entender do assunto, nunca hesitou em me ajudar, qualquer que fosse a circunstância. Apesar das paranóias, sabe que te adoro, né!

Ao Jeffinho e à Celle, que, apesar da distância, sempre que preciso estão prontos a me ajudar. Amo vocês!!!

Ao Márcio Pavan, doutorando da equipe do Dr. Fernando Monteiro, por ceder amostras de DNA extraídas de triatomíneos.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas pelas amostras extraídas de DNA total de *Trypanosoma cruzi* cedidas e pelos equipamentos emprestados.

À Dra. Verônica Marchon pelas informações sobre peso de simulídeos.

À coordenação da pós-graduação em Biologia Parasitária, em especial à Luciane Wandermurem por estar sempre pronta a solucionar problemas relacionados ao mestrado.

À Fundação Oswaldo Cruz pela infra-estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todas aquelas pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente, mas que por algum motivo não foram citadas aqui.

Vida

*Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis
e esquecer pessoas inesquecíveis.*

*Já fiz coisas por impulso,
já me decepcionei com pessoas
que eu nunca pensei que iriam me decepcionar,
mas também já decepcionei alguém.*

*Já abracei pra proteger,
já dei risada quando não podia,
fiz amigos eternos,
e amigos que eu nunca mais vi.*

*Amei e fui amado,
mas também já fui rejeitado,
fui amado e não amei.*

*Já gritei e pulei de tanta felicidade,
já vivi de amor e fiz juras eternas,
e quebrei a cara muitas vezes!*

*Já chorei ouvindo música e vendo fotos,
já liguei só para escutar uma voz,
me apaixonei por um sorriso,
já pensei que fosse morrer de tanta saudade
e tive medo de perder alguém especial (e acabei perdendo).*

*Mas vivi!
E ainda vivo!
Não passo pela vida.
E você também não deveria passar!*

Viva!!

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é "muito" para ser insignificante.*

(Augusto Branco)

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Protocolos de extração <i>in house</i>	33
Tabela 3.2: Protocolos empregando <i>kits</i> ou preparados comerciais de extração	34
Tabela 3.3a: Cálculo do volume de tampão-Peso	36
Tabela 3.3b: Cálculo do volume de tampão-Média dos pesos.....	36
Tabela 3.3c: Cálculo do volume de tampão-Frequência dos pesos.....	36
Tabela 3.3d: Cálculo do volume de tampão-Faixa de peso	36
Tabela 3.3e: Cálculo do volume de tampão-Volume empregado	37
Tabela 3.4: Programa para amplificação de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
Tabela 3.5: Programa para amplificação de citocromo b de triatomíneo	42
Tabela 4.1: Protocolos de extração <i>in house</i> selecionados para avaliação experimental	50
Tabela 4.2: Amostra e alvo de amplificação	52
Tabela 4.3: Artigos comuns às bases de dados.....	53
Tabela 4.4: Amostra biológica recomendada e fundamento de ação dos <i>kits</i> testados	57
Tabela 4.5: Protocolos do <i>kits</i> e preparado comercial selecionados para avaliação	58
Tabela 4.6: Análise da concentração de DNA.....	61
Tabela 4.7: Análise do grau de pureza do DNA.....	63
Tabela 4.8: Análise comparativa entre estádios evolutivos	65
Tabela 4.9: Número de amostras positivas.....	73
Tabela 4.10: Análise comparativa entre os protocolos 08 e 09.....	74
Tabela 4.11: Intensidade de bandas em amostras de ninfas.....	75
Tabela 4.12: Intensidade de bandas em amostras de adultos	76
Tabela 4.13: Análise da concentração de DNA da reprodutibilidade.....	81
Tabela 4.14: Análise do grau de pureza do DNA da reprodutibilidade.....	82
Tabela 4.15: Número de amostras positivas nos experimentos de reprodutibilidade.....	87
Tabela 4.16: Intensidade de bandas nos experimentos de reprodutibilidade	88
Tabela 4.17: Avaliação da praticidade dos protocolos	89
Tabela 4.18: Avaliação do custo dos protocolos	91
Tabela 4.19: Grau de escolaridade.....	92
Tabela 4.20: Área de atuação	92
Tabela 4.21: Tempo de experiência.....	93
Tabela 4.22: Método de extração utilizado	93
Tabela 4.23: Tipos de amostra biológica	93
Tabela 4.24: Parâmetros de avaliação.....	95
Tabela 4.25: Teste t-Student.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Desenho experimental.....	22
Figura 3.2: Hemocítômetro de Neubauer	25
Figura 3.3: Diluições completas	26
Figura 3.4: Esquema do experimento de reconstituição	28
Figura 3.5: Controles	30
Figura 3.6: Fluxograma de parâmetros.....	38
Figura 4.1: Estratégia de ação dos protocolos <i>in house</i>	51
Figura 4.2: Estratégia de ação dos <i>kits</i> e preparados comerciais	59
Figura 4.3: Gel de ninfas de <i>Rhodnius brethesi</i> do Protocolo 01	66
Figura 4.4: Gel de adultos de <i>Rhodnius brethesi</i> do Protocolo 01	67
Figura 4.5: Gel de ninfas de <i>Rhodnius brethesi</i> do Protocolo 08.....	68
Figura 4.6: Gel de adultos de <i>Rhodnius brethesi</i> do Protocolo 08.....	69
Figura 4.7: Gel de ninfas de <i>Rhodnius brethesi</i> do Protocolo 09.....	70
Figura 4.8: Gel de adultos de <i>Rhodnius brethesi</i> do Protocolo 09	71
Figura 4.9: Emprego de dois métodos de coloração distintos: brometo de etídeo e Gel Red®	72
Figura 4.10: Gel de citocromo b de amostras do Protocolo 01	78
Figura 4.11: Gel de citocromo b de amostras do Protocolo 08.....	79
Figura 4.12: Gel de citocromo b de amostras do Protocolo 09	80
Figura 4.13: Gel de reprodutibilidade de amostras do Protocolo 01	84
Figura 4.14: Gel de reprodutibilidade de amostras do Protocolo 08.....	85
Figura 4.15: Gel de reprodutibilidade de amostras do Protocolo 09.....	86

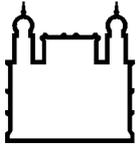
LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1: Artigos por base de dado e descritor	53
Gráfico 4.2: Fabricantes de kits mais citados em nosso levantamento bibliográfico	54
Gráfico 4.3: <i>Kits</i> mais citados segundo os três critérios de seleção	55
Gráfico 4.4: <i>DNAzol Reagent</i>	56
Gráfico 4.5: Parâmetros de avaliação	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
Σ	Somatório
μg	Microgramas
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>Biochemichal Oxigen Demand</i>)
CDC	<i>Center for Diseases Control</i>
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio (<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>)
dATP	Desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	Desoxicitosina-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-trifosfato
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
dTTP	Desoxitimidina-trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucléico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidade ótica
DTT	1,4-Dithiothreitol
DTU	<i>Discrete Typing Units</i>
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de sódio (<i>Ethylenediamine-tetracetic acid</i>)
ELISA	Enzimaimunoensaio (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Aceleração da gravidade
h	Hora
Hi	Amplitude de um intervalo de classe ou intervalo de classe
HAI	Hemaglutinização Indireta
HCl	Ácido hidrocloreídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquide Chromatography</i>)
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDNA	DNA do cinetoplasto

kg	Kilograma
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pmol	Picomol
QBC	<i>Quantitative Buff Coat</i>
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
seg	Segundo
TAU	<i>Triatomine Artificial Urine</i>
TBE	Tris - ácido bórico - EDTA (<i>Tris – Boric acid – EDTA</i>)
TESA	<i>Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	Vezes (com relação à objetiva do microscópio óptico)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

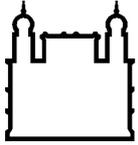
AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CHAGAS, 1909 POR PCR EM TRIATOMÍNEOS.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa da Costa Neves

A automatização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) abriu uma nova perspectiva no diagnóstico do *Trypanosoma cruzi* tanto em amostras clínicas humanas, como na identificação do parasita em seus vetores e reservatórios. Para a realização da PCR é necessária a realização da extração do DNA (pré-etape da amplificação), onde o ácido nucléico é liberado e purificado a partir da amostra biológica, tendo como condição ideal a obtenção de um DNA puro e em altas concentrações. Este trabalho visou avaliar o desempenho de protocolos de extração de DNA descritos na literatura científica, através dos seguintes parâmetros: concentração de DNA, grau de pureza, PCR (amplificação de uma seqüência de DNA específica), reprodutibilidade, praticidade e custo. Foram testados 12 protocolos, cujos critérios de seleção foram “métodos de extração de DNA *in house* de espécimes do Filo Arthropoda” e “kits e/ou preparados comerciais mais citados na literatura científica no período de janeiro de 2002 a julho de 2009”. A extração foi realizada em exemplares da espécie *Rhodnius brethesi* infectados através de experimentos de reconstituição (infecção artificial) com 3 concentrações distintas de *T. cruzi* (1, 10 e 100 parasitas por amostra extraída). Os melhores resultados nos parâmetros concentração de DNA, grau de pureza e PCR, foram apresentados pelos protocolos 08 (*in house*) e 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*, Marca Qiagen, nº de cat 51504), tendo o protocolo 08 mostrado maior concentração estimada de DNA total e um maior número de amostras com valores dentro da faixa de pureza, em relação ao protocolo 09 e a todos os outros protocolos testados. Atribuímos essa melhor performance a uma associação eficiente entre número de etapas de purificação e os componentes do tampão de lise. Em relação aos parâmetros custo e praticidade, o protocolo 09 (*kit*) revelou ser o mais econômico e demandar menos tempo na sua execução total, comparado ao protocolo 08. Dentro do questionário de opinião, que apontou grau de pureza como parâmetro mais importante, o protocolo mais indicado para extração de amostras a partir de triatomíneos foi o protocolo 08. Assim, dois protocolos podem ser indicados: o 08 e o 09. Dos seis parâmetros analisados, os valores de estimativa de concentração de DNA, obtidos com o método da espectrofotometria, apresentaram-se discrepantes; devido a isso não indicamos esse método para avaliar o parâmetro concentração.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF DNA EXTRACTION PROTOCOLS FOR THE PCR DETECTION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* CHAGAS, 1909 IN TRIATOMINES.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa da Costa Neves

The Polymerase Chain Reaction (PCR) enabled a new diagnosis of *Trypanosoma cruzi* in human vertebrate samples such as the parasite identification in its vectors and reservoirs. PCR demands a pure and high concentrated DNA; therefore DNA extraction is an important step that must be well performed. Considering this, we have evaluated specific parameters – concentration and purity of the DNA, PCR (specific DNA sequence amplification), reproducibility, practicality and cost – in order to assess the performance of extraction protocols. Twelve protocols were selected according to two criteria: 1-in house methods used to extract DNA from specimens belonging to the Phylum Arthropoda; 2-kits and/or commercial preparations most often cited in scientific papers from January 2002 to July 2009. Extraction was carried out on specimens of *Rhodnius brethesi* artificially infected with three different concentrations of *T. cruzi* (1, 10 and 100 parasites per sample extracted). Protocols 08 (in house CTAB based) and 09 (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Cat number 51504) revealed the best concentration and purity of the DNA results in addition to the higher number of amplified samples. Comparatively, protocol 08 was even better than 09 on these parameters, presumably for the efficient association between number of purification steps and components of the lysis buffer. On the other hand, protocol 09 was less costly than protocol 08, besides faster to execute. Participants of a survey designated DNA purity as the most important parameter regarding a DNA extraction protocol leading us to indicate protocol 08 for the extraction of samples taken from triatomine. Besides protocol 08, the kit represented by protocol 09 can also be indicated because of its lower cost and fastness. The discrepancy in the results obtained for DNA concentration lead us to discourage the use of spectrophotometry to estimate DNA concentration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Epidemiologia da doença de Chagas.....	02
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	03
1.3. Transmissão	04
1.4. Vetores.....	05
1.5. Diagnóstico	06
1.5.1. Métodos parasitológicos diretos.....	07
1.5.2. Métodos parasitológicos indiretos.....	08
1.5.3. Métodos sorológicos.....	09
1.5.4. Reação em cadeia da polimerase.....	10
1.6. Comparação entre métodos diagnósticos	11
1.7. PCR e <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.8. Extração de DNA.....	15
1.9. Justificativa	15
2. OBJETIVO	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Organismos	18
3.1.1. Camundongos	18
3.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
3.1.3. Triatomíneos	19
3.2. Desenho experimental de infecção dos triatomíneos	19
3.2.1. Infecção dos camundongos e dos exemplares de triatomíneos.....	20
3.2.2. Experimentos de reconstituição	23
3.2.2.1. Retirada do tubo digestivo	23
3.2.2.2. Quantificação das formas no tubo digestivo.....	23
3.2.3. Obtenção das alíquotas com 1, 10 e 100 parasitas	25
3.2.4. Infecção artificial dos exemplares de triatomíneos.....	26
3.2.5. Controles.....	29
3.2.5.1. Controle das extrações.....	29
3.2.5.1.1. Positivo	29
3.2.5.1.2. Negativo	29
3.2.5.2. Controle das PCRs.....	29
3.3. Protocolos de extração de DNA empregados	31

3.3.1. Levantamento dos protocolos de extração <i>in house</i>	31
3.3.2. Levantamento dos <i>kits</i> de extração.....	31
3.3.3. Adaptações dos protocolos selecionados.....	32
3.3.4. Procedimento para calcular o volume de tampão de lise	35
3.4. Performance dos protocolos de extração	37
3.4.1. Concentração de DNA.....	38
3.4.1.1. Diluições do material extraído	38
3.4.1.2. Quantificação do DNA extraído.....	39
3.4.2. Avaliação do grau de pureza.....	39
3.4.3. Reação em cadeia da polimerase.....	40
3.4.3.1. Alvos de amplificação	40
3.4.3.1.1. Amplificação do kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
3.4.3.1.2. Amplificação do citocromo b de triatomíneo	41
3.4.3.2. Controles da PCR	43
3.4.3.2.1. Positivo da reação.....	43
3.4.3.2.2. Negativo da reação	44
3.4.3.3. Revelação do produto amplificado.....	44
3.4.4. Reprodutibilidade	45
3.4.5. Praticidade	45
3.4.6. Custo.....	45
3.5. Questionário de opinião.....	46
3.6. Análise Estatística	46
3.7. Condições éticas.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Protocolos de extração de DNA empregados	48
4.1.1. Levantamento dos protocolos de extração <i>in house</i>	48
4.1.2. Levantamento dos <i>kits</i> de extração.....	52
4.2. Avaliação do desempenho dos protocolos de extração	59
4.2.1. Concentração de DNA.....	60
4.2.2. Grau de pureza	62
4.2.3. Reação em cadeia da polimerase.....	65
4.2.4. Reprodutibilidade.....	81
4.2.5. Praticidade	88
4.2.6. Custo.....	90
4.3. Questionário de opinião.....	92

5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÕES	112
7. REFERÊNCIAS.....	114
8. APÊNDICES	133

1. INTRODUÇÃO

Em 1909, Carlos Chagas descreveu um novo protozoário responsável por uma doença que acometia seres humanos em Lassance, no Norte do Estado de Minas Gerais. O protozoário foi designado inicialmente *Schizotrypanum cruzi*, e depois *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz (Chagas, 1909).

A doença causada por este protozoário flagelado ficou conhecida como Tripanossomíase Americana, e posteriormente doença de Chagas, em homenagem ao seu descobridor. Neste mesmo trabalho, Carlos Chagas (Chagas, 1909) descreve o inseto hematófago (triatomíneo) como o transmissor do parasita ao homem, designando-o inicialmente como *Conorrhinus megistus*, que mais tarde foi denominado *Panstrongylus megistus*.

Ao contrário do que ocorreu com as demais doenças parasitárias, a doença de Chagas, seu agente etiológico e o modo de transmissão foram descritos por um único pesquisador e no mesmo ano (Coutinho; Dias, 1999).

Historicamente, os flagelados do gênero *Trypanosoma* existem na natureza há milhões de anos. Inicialmente, estes protozoários eram encontrados em insetos não hematófagos, passando a circular no sangue de vertebrados após adaptação destes insetos à alimentação sanguínea e a diferentes hospedeiros (Hoare, 1972).

Esta adaptação levou ao surgimento de uma enzootia de animais silvestres, na qual triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) se alimentavam do sangue de pequenos mamíferos de grandes áreas do continente sul americano. Neste ciclo natural não havia interferência humana (Guhl *et al.*, 2000).

A entrada do homem nas áreas de circulação dos vetores permitiu seu contato com os focos naturais da infecção pelo *T. cruzi*, permitindo a transmissão acidental deste parasita ao vertebrado humano, caracterizando uma antropozoonose (Coura, 2007).

Os desmatamentos e as transformações ambientais promovidos pelo homem culminaram com a domiciliação dos triatomíneos infectados em habitações humanas e a utilização do homem como fonte alimentar por estes insetos (Guhl *et al.*, 2000; Coura, 2007).

Rothhammer *et al.* (1985) diagnosticaram a doença de Chagas através da observação de alterações anatômicas em múmias chilenas datadas de 470 anos antes de Cristo a 600 anos depois de Cristo. Em 1992, Forniciari *et al.* identificaram infecção por *T. cruzi* em tecido de múmia Inca do Peru usando técnicas de microscopia eletrônica e imunológica.

Além de microscopia e técnicas imunológicas, técnicas moleculares permitiram a identificação de ácidos nucleicos do *T. cruzi*, confirmando a infecção chagásica em tecidos de múmias com mais de quatro mil anos (Guhl *et al.*, 1999) e mais de nove mil anos (Aufderheide *et al.*, 2004).

1.1. Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas constitui um grande problema de saúde pública que atinge diversos países, principalmente na América Latina. Atualmente, estima-se que cerca de 15 a 16 milhões de pessoas desta região estejam infectadas e 75 a 90 milhões estejam expostas à doença (Coura; Dias, 2009; Coura; Albajar-Viñas, 2010).

Esta tripanossomíase gera impactos sociais graves, pois prejudica o desempenho dos trabalhadores afetados, principalmente no trabalho braçal (Dias, 2007). Nos países da América Latina um grande número de infectados desenvolve doença irreversível, gerando consideráveis taxas de morbidade e mortalidade (World Health Organization, 2002), fato que provoca orfandade em diversas famílias rurais (Teixeira, 2007).

Além da América Latina, países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, países da Europa, Ásia e Oceania, têm sido afetados devido à migração de indivíduos infectados. A transfusão de sangue e o transplante de órgãos de pacientes, realizados sem um monitoramento laboratorial eficaz, são os principais responsáveis pela entrada do *T. cruzi* em países onde a transmissão vetorial não ocorre (Schmunis, 2007).

A expansão dessa barreira geográfica da doença de Chagas e a sua emergência em áreas antes consideradas não endêmicas sugerem ser de extrema relevância o emprego de um método de diagnóstico que apresente resultados satisfatórios e de custo relativo baixo (Guhl; Lazdins-Helds, 2005).

Outra região afetada pela Tripanossomíase Americana é a Amazônia, antes considerada uma região não endêmica. Análises recentes demonstram a emergência da doença de Chagas nesta área (Coura *et al.*, 2002; Junqueira; Albajar; Coura, 2005). A presença de triatomíneos e reservatórios infectados com o *T. cruzi* nos focos silvestres aliada a fluxos migratórios na região amazônica podem explicar a transmissão da infecção, inclusive em surtos de transmissão oral por contaminação de alimentos com formas infectantes (Dias; Prata; Schofield, 2002; Pinto *et al.*, 2008).

A existência de um grande número de reservatórios animais e a falta de uma vacina ou de drogas eficientes para o tratamento de pacientes levou à conclusão de que o único controle efetivo da transmissão da doença de Chagas seria o “interrompimento” da sua transmissão no

domicílio humano, através do combate aos vetores domiciliares e peridomiciliares (Silveira, 2000). Através dessas ações de controle, foi possível notar uma redução na incidência da doença de Chagas com as iniciativas de controle da transmissão vetorial, principalmente no Cone Sul, onde Uruguai, Chile e Brasil eliminaram o *Triatoma infestans* em áreas endêmicas. Entretanto, com a expansão da transmissão para novas áreas, consideradas não endêmicas, outras estratégias de controle vem sendo consideradas. Independente das estratégias, é consenso que se mantenham programas de controle e vigilância eficientes, através das iniciativas como a do Cone Sul, da América Central, dos Países Andinos e Amazônicos, bem como aquelas que promovam ação extra Continente Americano (WHO, 2010).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado que pertence à ordem Kinetoplastida. Como característica desta ordem, este parasita possui uma mitocôndria diferenciada, o cinetoplasto, que apresenta DNA extranuclear condensado em seu interior (kDNA) (Hoare, 1964; Sturm; Teixeira, 2007).

O kDNA é composto por minicírculos e maxicírculos, moléculas circulares que diferem em tamanho e função. Os minicírculos apresentam-se como redes entrelaçadas, com cerca de 5-10 mil cópias, e são formadas por sequências altamente variáveis alternadas por 4 regiões conservadas. As moléculas maiores ou maxicírculos estão em número 40-50, tendo cada uma o tamanho de 22 a 28 kb. As moléculas maiores de kDNA correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos e as menores estão relacionadas ao processo de edição de mRNAs que codificam proteínas mitocondriais (Silveira, 2000; Sturm; Teixeira, 2007; Teixeira; Bartholomeu, 2010).

Sturm *et al.* (1989) demonstraram que é possível amplificar um fragmento específico de minicírculo do kDNA do *T. cruzi*, possibilitando uma detecção sensível e específica deste parasita, mesmo quando uma grande quantidade de células do hospedeiro está presente na amostra analisada. Este trabalho prova que a amplificação do fragmento de 330 pb dos minicírculos é a mais indicada, pois não apresenta sobreposição de sequências, como é o caso dos fragmentos de 83 e 122 pb, também amplificados do kDNA do *T. cruzi*.

Outra característica importante do *T. cruzi* é sua heterogeneidade. Em 2003, Devera *et al.* demonstraram que existem variações dentro da espécie baseadas no comportamento biológico das cepas em animais de laboratório e características bioquímicas e moleculares dos isolados. Também foi citado que o *T. cruzi* apresenta uma estrutura clonal de população que permite explicar o grande número de clones em diferentes áreas geográficas. A

heterogeneidade e a existência de diferentes clones determinam tropismos para diferentes tecidos levando a variações nas formas clínicas da doença (Devera; Fernandes; Coura, 2003).

Inicialmente, os isolados de *T. cruzi* foram divididos em dois grupos principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Anonymus, 1999). Uma nova classificação, baseada em um número maior de marcadores moleculares, foi divulgada em 2009, dividindo o *T. cruzi* em seis grupos de I a VI (Zingales *et al.*, 2009). A divisão dos seis grupos, segundo a nova nomenclatura, baseia-se na existência de seis distintas DTUs. Cada DTU consiste no agrupamento de populações similares geneticamente, as quais podem ser identificadas por marcadores comuns.

1.3. Transmissão

Diversos mecanismos de transmissão do *T. cruzi* já foram relatados, sendo a transmissão vetorial a mais frequente.

Na transmissão vetorial a infecção decorre da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas fezes/urina do inseto hematófago, na pele por solução de continuidade ou na mucosa íntegra do hospedeiro, no momento ou logo após o repasto sanguíneo do vetor (Ferreira; Avila, 2001; Dias, 2006).

Dentre os modos alternativos de transmissão, a transfusão de sangue e o transplante de órgãos são os mais importantes, principalmente por serem responsáveis pela expansão da barreira geográfica tradicional da doença e aumento do risco de contágio para milhões de pessoas em países não endêmicos (WHO, 2002).

O aumento de casos da doença de Chagas em países onde esta enfermidade não ocorre naturalmente deve-se à migrações de indivíduos infectados de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, além do sistema de triagem em bancos de sangue ser relativamente recente para esta tripanossomíase (Schmunis, 2007),

No caso dos transplantes de órgãos também é importante salientar que pode haver reativação em receptor previamente infectado, devido à redução de sua imunidade. Segundo Chieffi & Neto, o transplante deve ser descartado ou feito com extrema cautela somente em casos que se torna uma prática indispensável (Chieffi & Neto, 2000). Em 2006, o *Center for Diseases Control* (CDC) reportou dois casos concretos de transmissão de *T. cruzi* em pacientes transplantados nos EUA (Center for Diseases Control, 2006).

A transmissão vertical também tem grande importância para a epidemiologia da doença de Chagas. Ela pode ocorrer em qualquer fase da doença na mãe, mas é provável que haja um maior risco durante a fase aguda, ou inicial, quando a parasitemia é alta.

Considerando que a parasitemia decai com o aumento da idade, mães mais jovens devem transmitir a doença com maior frequência (Chieffi & Neto, 2000). O *T. cruzi* também pode ser transmitido da mãe ao recém-nascido através de leite contendo as formas infectantes ou sangue infectado que é liberado através de lesões nos mamilos (Bittencourt, 1992; Chieffi & Neto, 2000).

Atualmente, a transmissão oral, que tem estado mais em evidência, pode ser atribuída a diferentes fontes alimentares contendo formas infectantes de *T. cruzi*. Dados recentes mostram a ocorrência frequente de surtos focais associados a esta forma de transmissão, como as microepidemias ocorridas devido à ingestão de sucos de frutas nativas na Amazônia Brasileira (Rojas *et al.*, 2005) e o caldo de cana no nordeste e em Santa Catarina (Ministério da Saúde, 2007). Entretanto, outros alimentos contaminados com formas infectantes do *T. cruzi* podem causar a transmissão oral, como o leite materno, o sangue fresco de mamíferos (para fins medicinais) e a carne mal cozida de animais silvestres (Chieffi & Neto, 2000; Relatório Técnico, 2006).

Outras formas de transmissão menos frequentes consistem em acidentes laboratoriais, contato sexual e transmissão por vetores mecânicos não triatomíneos, como pulgas, mosquitos e carrapatos (Dias, 2006). Esses mecanismos não apresentam importância epidemiológica por serem eventos raros. As infecções acidentais consistem na exposição de pessoas que manipulam o *T. cruzi* ou seus vetores e hospedeiros contaminados (Hofflin *et al.*, 1987). A transmissão por via sexual foi conseguida experimentalmente em roedores e caninos e raros são os relatos ligados a essa transmissão na espécie humana (Chieffi & Neto, 2000).

1.4. Vetores

Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos hemípteros reduvídeos, conhecidos como triatomíneos. Estes insetos estão distribuídos pelas Américas e são responsáveis pela manutenção da doença no ciclo enzoótico que envolve mamíferos silvestres, no ciclo peridomiciliar e doméstico (Noireau *et al.*, 2005).

Todos os triatomíneos são suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*, bastando ingerir sangue de mamífero infectado ou ainda por coprofagia ou canibalismo em casos de jejum extremo do vetor. Dias (2000) cita que a maior parte destes insetos na natureza não se encontra infectada, pois a fonte alimentar com o parasita é escassa e alimentam-se primariamente de animais refratários ao parasita, como aves, répteis e anfíbios.

O parasita, ao ser ingerido pelo triatomíneo, se instala e evolui no tubo digestivo do inseto, onde são produzidas as formas infectantes (metacíclicas) ao hospedeiro vertebrado,

incluindo o homem, liberadas nas dejeções durante ou após a alimentação do vetor (Dias, 2000).

Noireau (2005) descreve que as espécies de triatomíneos podem ser divididas em primária e secundária, dependendo da sua associação com o homem. Espécies primárias colonizam permanentemente o domicílio humano e são altamente antropofílicas, como é o caso do *Rhodnius prolixus* e do *Triatoma infestans*. As espécies secundárias são capazes também de colonizar essas moradias, desde que não exista uma espécie primária. Em geral, espécies secundárias são encontradas no meio silvestre e no peridomicílio. Um exemplo disso é o *Panstrongylus megistus*, que em algumas regiões passou a ocupar o nicho do *T. infestans*.

O mesmo autor anterior, ainda classifica alguns gêneros importantes quanto ao local onde são encontrados na natureza. Em geral, espécies do gênero *Rhodnius* associam-se a palmeiras e os *Panstrongylus* habitam buracos e cavidades de árvores. No gênero *Triatoma*, algumas espécies são encontradas em tocas de roedores, enquanto outras são encontradas exclusivamente em buracos de árvores ou ninhos de pássaros. Espécimes de *P. megistus* distribuem-se por uma variedade de ecótopos (Noireau, 2005), enquanto *Rhodnius brethesi* mantém uma relação estreita com a espécie de piaçaba *Leopoldina piaçaba* (Junqueira, 2005).

Uma série de estudos sobre a capacidade de infecção de triatomíneos por *T. cruzi* indicaram a diferença na infectividade em diferentes espécies do vetor. Em 1987, os autores observaram que os vetores com maior capacidade de infecção foram os exclusivamente silvestres e os silvestres ainda em processo de domiciliação (dentre eles o *P. megistus*), enquanto as espécies domiciliadas, incluindo *T. infestans* e *R. prolixus*, apresentaram menor infectividade (Perlowagora-Szumlewicz; Muller, 1987). No ano seguinte, os autores comprovaram estes resultados ao realizar infecção com sete cepas diferentes de *T. cruzi* (Perlowagora-Szumlewicz; Muller; de Carvalho Moreira, 1988).

1.5. Diagnóstico

Classicamente, a detecção do *T. cruzi* em pacientes, vetores e reservatórios é feita através dos métodos parasitológicos, que consistem na identificação direta ou indireta do parasita na amostra biológica. Entretanto, outros métodos podem ser aplicados para este fim, como os sorológicos, para a identificação de anticorpos liberados pelo hospedeiro contra o *T. cruzi* ou antígenos do próprio protozoário, ou ainda pode ser feita a detecção do DNA do patógeno, através de métodos moleculares (Luquetti; Rassi, 2000).

A infecção do *T. cruzi* no homem apresenta duas fases distintas, caracterizadas pelos diferentes níveis de parasitemia. Na fase inicial, conhecida como fase aguda, o nível de

parasitas circulantes é alto, tornando o exame parasitológico direto no sangue possível (Dias, 2004). Em seguida, há uma redução na parasitemia devido a um equilíbrio que se estabelece entre infecção e resposta imune do hospedeiro, sendo esta uma fase intermediária (Ferreira; Avila, 2001). Por outro lado, a fase subsequente, fase crônica, caracteriza-se pelo baixo número de parasitas no sangue, além do alto nível de anticorpos anti-*T. cruzi* (Moser; Kirchoff; Donelson, 1989; Portela-Lindoso; Shikanai-Yasuda, 2003). O diagnóstico parasitológico não é recomendado nesta última fase, pois são menos sensíveis em desprezíveis parasitemias (Chiari, 1999; Gomes *et al.*, 1999).

O método de escolha para o diagnóstico da doença de Chagas crônica é o sorológico. Porém, devem ser realizados pelo menos dois testes sorológicos com princípios diferentes em conjunto, sendo um com alta sensibilidade associado a outro com alta especificidade (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

A PCR, por consistir na identificação do DNA do parasita, tem sido amplamente utilizada no diagnóstico do *T. cruzi* (Moser; Kirchoff; Donelson, 1989; Avila *et al.*, 1993). Esta técnica é recomendada como teste confirmatório em ambas as fases da infecção chagásica, associado a técnicas sorológicas, quando exames parasitológicos apresentam resultados negativos na fase aguda ou quando a sorologia é duvidosa na fase crônica (Galvão *et al.*, 2003; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005; Miyamoto *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009; Lana *et al.*, 2009).

1.5.1. Métodos parasitológicos diretos

Os métodos parasitológicos diretos baseiam-se na detecção das formas evolutivas de *T. cruzi* em diversos líquidos ou tecidos biológicos, como o sangue periférico, o líquido e a medula óssea. No exame à fresco, uma alíquota do material biológico é analisada diretamente em microscópio óptico ou após métodos de concentração. O resultado será positivo caso um ou mais parasitas sejam identificados na amostra examinada (Luquetti; Rassi, 2000; Ferreira; Ávila, 2001).

Dois técnicas que também podem ser usadas na observação direta em microscópio são a distensão em lâmina corada e a gota espessa. Na distensão em lâmina corada o material colocado em lâmina é submetido a corantes, enquanto na gota espessa o material examinado é disposto em lâmina em forma de um círculo cheio e este é lido, após sua secagem e coloração apropriada para desmoglobinação (ex.: solução hipotônica de azul de metileno). Este último, no entanto, pode modificar a morfologia do parasita e com isso dificultar a identificação (Luquetti; Rassi, 2000).

Outros exames diretos muito utilizados são aqueles que consistem em concentração prévia dos parasitas presentes no material com posterior observação em microscópio. Essa concentração é feita através de centrifugação, que varia de acordo com cada técnica. Algumas das técnicas mais utilizadas são o QBC, o micro-hematócrito, a técnica de concentração de Strout e a técnica de concentração de Ficoll-Hypaque (Luquetti; Rassi, 2000).

Considerando que nestes métodos há a observação direta do parasita no material, sua especificidade é alta, porém a sensibilidade varia de acordo com a fase da doença, sendo mais sensível na fase aguda e muito pouco sensível na fase crônica (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

1.5.2. Métodos parasitológicos indiretos

Quando a parasitemia é baixa surge a necessidade da “amplificação biológica” dos poucos parasitas circulantes. Os métodos indiretos são então utilizados para este fim. Entretanto, existem dois grandes problemas relacionados a eles: apresentam baixa sensibilidade, além de não serem de simples execução (Junqueira; Chiari; Wincker, 1996).

Inicialmente, aguarda-se um período de “incubação” para a multiplicação dos parasitas, seja em triatomíneos vetores (xenodiagnóstico), seja em cultura (hemocultura). Posteriormente, a procura de formas evolutivas de *T. cruzi* é feita através da observação do material biológico ao microscópio óptico (Luquetti; Rassi, 2000).

O xenodiagnóstico consiste na alimentação de ninfas do vetor com sangue de pessoa supostamente infectada. O triatomíneo pode alimentar-se diretamente no paciente (xenodiagnóstico natural) ou do sangue do indivíduo através de membranas apropriadas (xenodiagnóstico artificial). Após 30 e 60 dias, as fezes das ninfas são examinadas (Luquetti; Rassi, 2000).

O xenodiagnóstico é específico, mas sua sensibilidade varia de acordo com a fase da doença (Ferreira; Ávila, 2001). Sua sensibilidade também pode sofrer variação de acordo com a espécie vetora empregada e o número de espécimes utilizados (Perlowagora-Szumlewicz; Muller, 1987; Borges-Pereira *et al.*, 1996).

O diagnóstico pelo xenodiagnóstico também apresenta certas desvantagens como a necessidade de criação de triatomíneos não infectados em laboratório, demora no resultado, perda de insetos, entre outros (Junqueira; Chiari; Wincker, 1996; Portela-Lindoso; Shikanai-Yasuda, 2003).

Outro método indireto é a hemocultura, que consiste no cultivo, em meio de cultura apropriado, de parasitas encontrados no sangue/liquor de pacientes suspeito. O material é

cultivado em meio LIT ou em outro meio de cultura enriquecido e mantido a 28°C em estufa BOD. As culturas devem ser examinadas mensalmente até 120 dias (Luquetti; Rassi, 2000).

Assim como ocorre com o xenodiagnóstico, a hemocultura tem sensibilidade reduzida, especialmente se comparada à PCR. A necessidade de condições estéreis para a manipulação da amostra é outra dificuldade visto que a doença de Chagas é comum em áreas rurais pobres de difícil acesso ao diagnóstico específico (Junqueira; Chiari; Wincker, 1996), além das limitações para coleta e manutenção das amostras em ambiente estéril.

A inoculação em animais era muito utilizada no diagnóstico do *T. cruzi*, mas devido à necessidade da manutenção de um biotério, e à baixa sensibilidade da infecção em camundongos, essa técnica não é mais tão difundida. Este procedimento consiste na inoculação intraperitoneal de sangue heparinizado supostamente contendo parasitas em camundongos. Deve haver observação diária do sangue da cauda desses animais por cerca de 30 dias (Luquetti; Rassi, 2000).

Os métodos parasitológicos indiretos são mais utilizados em laboratórios de pesquisa. A positividade obtida nos resultados destes exames não caracteriza a fase aguda da doença de Chagas, pois são capazes de detectar o *T. cruzi* inclusive em pacientes na fase crônica (Dias, 2004).

1.5.3. Métodos sorológicos

A sorologia consiste no encontro de anticorpos produzidos pelo paciente que são dirigidos contra o parasita presente em seu organismo. Ao contrário do que ocorre com os exames parasitológicos, não há identificação do parasita em si (Chiari, 1999).

Em geral, os métodos sorológicos permitem a detecção dos anticorpos da classe IgG, encontrado durante a fase crônica da doença. Esses métodos podem também detectar anticorpos da classe IgM que são característicos da fase aguda, mas que podem aparecer de forma residual na fase crônica em alguns pacientes (Dias, 2004).

Diversos testes sorológicos foram idealizados, variando a sensibilidade e especificidade entre eles. A imunofluorescência indireta (IFI), a hemaglutinação indireta (HAI), o teste imunoenzimático (ELISA) são testes sorológicos convencionais (Gomes *et al.*, 1999).

A HAI consiste na reação de soro do paciente diluído com hemácias sensibilizadas (antígeno); na IFI é feita a leitura, em microscópio com luz UV, de soro do paciente incubado com epimastigotas de cultivo e com conjugado de anticorpo anti-IgG humano com isotiocianato de fluoresceína; a reação de ELISA é feita entre o soro do paciente e um

antígeno associado a anticorpo anti-IgG humano, porém com adição de uma enzima ao invés de substância fluorescente (Luquetti; Rassi, 2000).

Um outro princípio laboratorial empregado na detecção de anticorpos é o Imunoblot. O Imunoblot é um método sorológico que se baseia na detecção de proteínas do parasita que são desnaturadas e a seguir separadas de acordo com o seu peso molecular. Após a separação, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose e colocada em contato com a solução de anticorpos específicos para a fração protéica (Ex: soro). A utilização de um sistema revelador permitirá a visualização da ligação de anticorpos do soro à fração transferida (Sanchez, 2001).

Umezawa *et al.* (1996) descreveram o TESA blot no qual antígenos excretados/secretados de tripomastigotas de *T. cruzi* são utilizados no diagnóstico de doença de Chagas aguda e crônica, assim como da doença de Chagas congênita. Este teste tem sido utilizado como confirmatório da doença de Chagas, devido à baixa ocorrência de falsos positivos (Silveira-Lacerda *et al.*, 2004).

Além dos métodos sorológicos convencionais existem outros que consistem na identificação de antígenos ao invés de anticorpos. Estes antígenos podem ser detectados em soro e até mesmo em urina (Morgado *et al.*, 1989; Luquetti; Rassi, 2000).

Os testes sorológicos atuais demonstram alta sensibilidade e especificidade, podendo chegar a 100% virtualmente (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005). Porém, dependendo do antígeno empregado, a sensibilidade e a especificidade podem variar, pois já foram reportados casos falso negativos em pacientes com perfil clínico e epidemiológico para doença de Chagas, bem como reação cruzada com espécies de *Leishmania* e outros *Trypanosomas spp*, como o *T. rangeli* (Schmunis, 1991; Saldaña; Sousa, 1996).

Os métodos sorológicos apresentam limitações na avaliação do controle de cura já que a positividade persiste na maioria dos pacientes tratados, durante 10 a 20 anos, com baixa progressiva de títulos (Krettli; Cançado; Brener, 1984).

1.5.4. Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase é um dos procedimentos de biologia molecular mais empregados na atualidade, que se baseia na amplificação exponencial *in vitro* de pequenas cópias de ácidos nucléicos, cujo princípio foi inicialmente descrito por Kleppe *et al.* (1971).

Cada ciclo de PCR consiste em três etapas: desnaturação do DNA dupla fita, hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores às seqüências complementares alvo da

amplificação e extensão (pela enzima DNA polimerase) das seqüências a partir de onde hibridaram os oligonucleotídeos (Mullis *et al.*, 1986).

A descoberta da Taq polimerase, enzima termoestável isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, que vive a altas temperaturas, contribuiu para a automatização da amplificação *in vitro* (Saiki *et al.*, 1988). Como esta enzima não é desnaturada pelas altas temperaturas da PCR, não é necessário acrescentar polimerase a cada ciclo de amplificação, tornando a reação mais rápida.

A aplicação inicial da PCR na detecção de uma seqüência específica foi efetuada por um grupo de cientistas da CETUS CORPORATION. Neste trabalho, Saiki *et al.* amplificaram, *in vitro*, a seqüência genômica da β globina humana (Saiki *et al.*, 1985).

Com essa nova perspectiva de diagnóstico, foram iniciados experimentos utilizando a PCR para a detecção de DNA de diversos parasitas (Weiss, 1995; Deborggraeve *et al.*, 2008), assim como do *T. cruzi* em espécies de triatomíneos, invertebrados, (Breniere *et al.*, 1992; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1996; Marcet *et al.*, 2006) e em tecidos de mamíferos, vertebrados, (Moser; Kirchhoff; Donelson, 1989; Avila *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994; Alarcón *et al.*, 2009; Duffy *et al.*, 2009; Lana *et al.*, 2009).

A utilização crescente da PCR no diagnóstico de diversos agentes infecciosos pode ser explicada por sua alta sensibilidade aliada à sua especificidade (Erlich; Gelfand; Sninsky, 1991; Brasileiro Filho; Pena, 1992; Silber *et al.*, 1997).

1.6. Comparação entre métodos diagnósticos

Comparativamente, a PCR tem se mostrado mais sensível que os métodos parasitológicos tradicionais de diagnóstico da infecção chagásica. Avila *et al.* (1993) obtiveram positividade de 100% em amostras sorologicamente positivas com o uso da PCR, inclusive em amostras negativas pelo xenodiagnóstico. Breniere *et al.* reportaram maior sensibilidade da PCR em relação à microscopia ao analisar as fezes das espécies *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus* e *Triatoma sordida* com PCR positiva e microscopia negativa (Breniere *et al.*, 1995).

Também a PCR apresentou maior positividade que a observação microscópica direta em experimentos realizados por Russomando *et al.* com 84% das amostras positivas (Russomando *et al.*, 1996) e Shikanai-Yasuda *et al.* com positividade de 59% (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1996).

Junqueira, Chiari e Wincker (1996) compararam PCR, xenodiagnóstico e hemocultura, sendo a PCR (59,4%) a técnica com maior índice de positividade da infecção humana pelo *T. cruzi* em relação ao xenodiagnóstico (35,6%) e à hemocultura (25,7%).

Em 1999, Gomes *et al.* conseguiram amplificar DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com sorologia positiva (83,5%), negativa (47,6%) e inconclusiva (46,2%).

Estes resultados comprovam a maior sensibilidade da PCR em relação aos métodos clássicos de diagnóstico da infecção chagásica. Além disso, evidencia que a técnica molecular pode ser associada à sorologia para confirmação de casos de infecção.

1.7. PCR e *Trypanosoma cruzi*

O emprego da técnica de PCR permitiu grande avanço no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*. Diversos pesquisadores passaram a realizar experimentos laboratoriais para atestar sua sensibilidade e especificidade, assim como para demais fins.

Os primeiros trabalhos que empregaram o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* por PCR visaram à amplificação de seqüências repetitivas do DNA nuclear do parasita. Um exemplo é o trabalho de Moser, Kirchhoff e Donelson (1989) no qual os autores amplificaram uma sequência de 185 pb de quatro clones de *T. cruzi* (Moser; Kirchhoff; Donelson, 1989).

Entretanto, a grande quantidade de cópias de minicírculos do kDNA (DNA do cinetoplasto) possibilita a maior sensibilidade no diagnóstico específico do *T. cruzi* por PCR, levando autores, como Sturm *et al.*, a realizarem a amplificação do fragmento de 330 pb resultante dos minicírculos do kDNA do parasita (Sturm *et al.*, 1989).

Estudos subsequentes empregaram a técnica de PCR no diagnóstico do *T. cruzi* em diferentes amostras biológicas. Breniere *et al.* caracterizaram diferentes clones de *T. cruzi* presentes em conteúdo fecal de vetores triatomíneos e em sangue de mamíferos. Neste estudo atestaram a sensibilidade do método obtendo 24% de amostras positivas (Breniere *et al.* 1992).

Em 1996, Russomando *et al.* realizaram dois experimentos para atestar a sensibilidade da PCR na detecção do *T. cruzi*. Primeiramente, conseguiram detectar a presença do parasita em fezes de triatomíneos alimentados em macacos com baixa parasitemia. Tendo atestado a funcionalidade do método, os pesquisadores utilizaram a PCR em amostras fecais de novos triatomíneos alimentados em um segundo grupo de macacos com parasitemia abaixo da detecção por microscopia. A PCR gerou resultados positivos, o que não seria possível em observação por microscópio, com grau de positividade maior que o obtido em xenodiagnóstico (Russomando *et al.*, 1996).

Outro estudo demonstrou a sensibilidade da PCR quando aplicada em fezes de triatomíneos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1996). Ninfas de *T. infestans* foram alimentadas em pacientes que apresentavam a doença de Chagas. Metade dos grupos de triatomíneos foi analisada por microscopia e nos grupos restantes foi aplicada a PCR. O ensaio de PCR foi positivo em 32 dos 54 grupos (59%), mas apenas sete grupos dentre os outros 54 grupos foram positivos ao serem examinados por microscopia (13%), concluindo-se que o primeiro método foi o mais sensível na detecção de *T. cruzi* em vetores triatomíneos.

Silber *et al.* publicaram um trabalho de detecção por PCR de DNA de *T. cruzi* em fezes de triatomíneos experimentalmente infectados e em amostras de sangue humano infectados, usando os oligonucleotídeos BP1 e BP2 como iniciadores para a amplificação de um fragmento de 692 pb do DNA nuclear do parasita. A sensibilidade da PCR foi comprovada, pois estes autores conseguiram detectar 10 fento gramas de DNA do parasita nas amostras quando utilizaram 45 ciclos na PCR. Mais de 45 ciclos não alterou o mínimo possível de DNA a ser detectado pelo método (Silber *et al.*, 1997).

Posteriormente, a identificação do *T. cruzi* por PCR em vetores foi realizada em infecções mistas com *T. rangeli* através da amplificação dos minicírculos de kDNA destes parasitas. Vallejo *et al.* obtiveram resultados da PCR positivos em amostras de tecidos de *Rhodnius prolixus* infectados com essas duas espécies, individualmente ou com ambos. Os fragmentos de 330 pb do *T. cruzi* ficaram muito próximos dos fragmentos de aproximadamente 300 pb do *T. rangeli*, dificultando um diagnóstico específico em infecções mistas. A eletroforese em gel de agarose teve resultado pouco claro nas infecções mistas, porém em gel de poliacrilamida os fragmentos de 330 pb do *T. cruzi* e os fragmentos de 300-450 pb do *T. rangeli* foram reveladas (Vallejo *et al.*, 1999).

Já Machado *et al.* identificaram a presença de ambos os parasitas por PCR (*T. rangeli* em fezes e hemolinfa e *T. cruzi* em fezes) de 15 até 110 dias após infecção dos triatomíneos, através da extração de fezes coletadas em papel de filtro estéril, secas a temperatura ambiente e conservadas a -20°C até o uso (Machado *et al.*, 2000).

Pinto *et al.* (2000) produziram infecções em exemplares de *T. infestans* com clones distintos de *T. cruzi*. Comparando-se os resultados obtidos por PCR e análise microscópica, a eficiência do método molecular pôde ser novamente comprovada (respectivamente: 94,4% e 72,2%).

O diagnóstico por PCR também foi utilizado com sucesso em vetores coletados em campo na identificação de *T. cruzi* em fezes frescas e conservadas (Hamano *et al.*, 2001). Os autores constataram também que o DNA pôde ser obtido de fezes expostas ao ambiente tanto

natural como artificial. A PCR foi positiva em fezes conservadas a 25°C por 26 semanas e a 40°C por quatro semanas. Esses dados comprovaram a aplicabilidade da PCR no campo.

Também utilizando insetos provenientes do campo, Botto-Mahan *et al.* (2005) aplicaram a PCR em conteúdo intestinal fresco de ninfas de *Mepraia spinolai*. A técnica molecular apresentou positividade em 46,15% das ninfas, contrastando com a positividade em apenas 9,89% das amostras analisadas por observação microscópica direta. Os resultados demonstraram que a técnica pode ser aplicada em amostras coletadas em campo.

Em artigo publicado por Marcet *et al.*, linhagens de *T. cruzi* foram identificadas através da PCR diretamente de amostras fecais em *T. infestans*, *T. guasayana* e *T. garciabesi*. O material utilizado foi obtido de ninfas e triatomíneos adultos vivos e mortos coletados em campo. A PCR forneceu resultados positivos em amostras que haviam se apresentado negativas em observação microscópica, confirmando a sensibilidade da técnica (Marcet *et al.*, 2006).

Além da detecção de DNA de *T. cruzi* em triatomíneos, diversos autores fizeram uso da PCR em amostras biológicas coletadas de mamíferos infectados com espécies do gênero *Trypanosoma*, seja em sangue total (Marcon *et al.*, 2002; Virreira *et al.*, 2003; Marcet *et al.*, 2006) em lâmina corada de sangue (Deborggraeve *et al.*, 2008), entre outros.

A PCR também vem sendo utilizada no diagnóstico de outros parasitas em vetores diversos com alta sensibilidade. Isto ficou demonstrado no experimento descrito por Oskam *et al.* (1996), no qual os autores detectaram a presença de *Onchocerca volvulus* em simulídeos alimentados em pacientes infectados com o parasita. Alguns insetos foram imediatamente preservados em etanol 100%, enquanto outros foram mantidos vivos em tubos individuais, à temperatura ambiente, até serem mortos 24 e 72 horas após a alimentação. Um grupo destes insetos foi submetido à PCR sem quantificação prévia do nº de larvas. A PCR foi capaz de atestar positividade em cada exemplar de simulídeo de todos os grupos analisados, indicando que este método é funcional mesmo quando a amostra não é fresca.

Com a finalidade de testar o limite de detecção pela PCR, Oskam *et al.* (1996) misturaram simulídeos positivos (alimentados em paciente infectado) com insetos não infectados. Os autores relataram que a técnica molecular foi capaz de identificar infecção em todos os *pools*, inclusive naquele que consistia de um inseto positivo misturado a 79 insetos negativos. Em um terceiro experimento, foi possível confirmar a sensibilidade da PCR, pois esta demonstrou resultados positivos em amostras de simulídeos contendo apenas um *O. volvulus*.

Entretanto, o sucesso da PCR depende em grande parte do método de extração que será empregado para obtenção de um DNA puro e em grande quantidade. Isso tem se mostrado de suma importância, quando o DNA alvo encontra-se em pequenas quantidades e em amostras com grande quantidade de inibidores de PCR (Bueno, 2004; Mahittikorn; Wickert; Sukthana, 2005; Dokanehiifard; Bidmeshkipour, 2010; Santos *et al.*, 2010).

1.8. Extração de DNA

Os trabalhos anteriormente relatados, bem como outros citados na literatura científica, consolidaram o emprego da técnica de PCR como método nas pesquisas clínicas e epidemiológicas do *T. cruzi* e de outros parasitas. Apesar disso, verificamos que não existe uma uniformidade dos protocolos para as quatro etapas laboratoriais básicas do método, que compreendem a extração do DNA, a escolha dos iniciadores específicos da sequência alvo, a amplificação propriamente dita e a revelação do produto amplificado. Do mesmo modo, no que se refere ao diagnóstico do *T. cruzi*, segundo o grupo de trabalho científico da Organização Mundial de Saúde, se verifica a necessidade da standardização da PCR para sua aplicação no diagnóstico de pacientes chagásicos (Guhl; Lazdins-Helds, 2005).

A obtenção de um DNA com menos impurezas (proteínas, lipídeos, reagentes de extração, etc.) e em maior concentração é recomendada para a utilização de técnicas de PCR e suas variações (Kalia; Rattan; Chopra, 1999). Neste sentido, a escolha do protocolo de extração a ser empregado deve considerar as diferenças na composição dos microorganismos ou tecidos de vertebrados, como ocorre com bactérias que apresentam diferenças na membrana celular (Veloso *et al.*, 2000).

Considerando a necessidade de obtenção de DNA em grande quantidade e de boa qualidade, Aljanabi & Martinez (1997) desenvolveram um método simples de extração de DNA utilizando proteinase k. Esta extração foi realizada em organismos de complexidades gênicas diferentes e o DNA obtido pode ser utilizado como fonte para amplificação de sequências alvo.

A extração de DNA também pode ser realizada por meio de *kits* comerciais, seja em sangue humano (Fafi-Kremer *et al.*, 2008), seja em tecido de invertebrados (Desloire *et al.*, 2006), e até pelo emprego de resinas (Bereczky *et al.*, 2005).

1.9. Justificativa

A revisão da literatura demonstra a existência de protocolos que utilizam diferentes estratégias de extração de DNA. Considerando que a extração é uma importante etapa na

obtenção de DNA puro e em grande quantidade, verifica-se a necessidade emergente de uma avaliação desses protocolos. Investigar parâmetros relacionados à concentração e ao grau de pureza do DNA, bem como características de praticidade, reprodutibilidade e custo, nos permitiria aferir qual o protocolo que apresenta melhor desempenho e com isso adotá-lo na rotina de diagnóstico laboratorial por PCR.

Com a emergência da doença de Chagas em áreas consideradas não endêmicas, como a Amazônia, bem como em áreas endêmicas da América Latina, e até mesmo em países da Europa, Estados Unidos, Ásia e Oceania, o emprego de um método de diagnóstico que apresente resultados satisfatórios e de baixo custo é de extrema relevância (Coura, 2002; Guhl; Lazdins-Helds, 2005; Schmunis, 2007). A distribuição dos vetores em países onde não há ocorrência natural também evidencia a necessidade de identificar a presença de *T. cruzi* nessas regiões, uma vez que já foram identificadas inclusive infestações de domicílios (Kjos; Snowden; Olson, 2009; Schofield; Grijalva; Diotaiuti, 2009), além de áreas onde ao controle vetorial não foi efetivo, como é o caso da região do Gran Chaco (Gürtler *et al.*, 2007; Gürtler, 2009).

Como a PCR vem sendo empregada como um dos métodos de diagnóstico na detecção do *T. cruzi* em espécies de triatomíneos (invertebrados) e em sangue de mamíferos reservatórios (vertebrados), bem como de pacientes, a avaliação de protocolos de extração de DNA será de grande contribuição para o diagnóstico (Guhl; Lazdins-Helds, 2005), e estes resultados servirão, inclusive, de aporte para avaliação da PCR no diagnóstico de outras protozooses de importância humana, como por exemplo as Leishmanioses (Werneck; Costa; Costa, 2003) e a Malária (Suarez-Mutis *et al.*, 2007), também transmitidas por vetores.

2. OBJETIVO

Avaliar protocolos de extração de DNA em relação aos seguintes parâmetros: concentração, grau de pureza e amplificação do DNA extraído, reprodutibilidade, praticidade e custo, visando indicar o protocolo de escolha no diagnóstico do *Trypanosoma cruzi* por PCR na rotina laboratorial e nas investigações epidemiológicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Organismos

3.1.1. Camundongos

Foram empregados camundongos albinos (*Swiss webster*), não isogênicos, sadios, machos, com peso variando entre oito e doze gramas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas com livre acesso à água e alimentação, no Biotério do Pavilhão Arthur Neiva do IOC/FIOCRUZ.

Todos os procedimentos de manejo e manutenção dos animais seguiram o critério estabelecido pelos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991).

3.1.2. *Trypanosoma cruzi*

Todas as infecções experimentais foram efetuadas com a cepa Y. Esta cepa foi isolada de um caso humano de doença de Chagas e mantida, a partir de agosto de 1950, no laboratório de isolamento em São Paulo, por repiques sucessivos, em camundongo branco (Silva; Nussenzweig, 1953), sendo, após algum tempo, cedida para vários laboratórios de pesquisa. Pelo seu perfil biológico, tropismo tissular e lesões histopatológicas em animais experimentais, a cepa Y foi designada como pertencente ao Biodema I, inicialmente denominado como Tipo I (Andrade, 1974; Andrade; Magalhães, 1997). A cepa Y foi caracterizada pelo gene de Mini-exon como *T. cruzi* II (TcII) e denominada no novo consenso como TcIIa (Fernandes *et al.*, 2001; Zingales *et al.*, 2009).

Além da cepa Y, nossa proposta inicial era empregarmos mais outras duas cepas de linhagens distintas, conforme tipagem efetuada pelo gene de Mini-exon: *Tcruzi* I (cepa ms 1523) e *Tcruzi* Z3 (cepa R.bre VIII), isoladas respectivamente de mamífero silvestre e triatomíneo da Microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. Devido à dificuldade em obtermos parasitemia patente nos camundongos sobre os quais seriam efetuadas as alimentações infectantes dos triatomíneos, optamos por realizar todo o estudo apenas com a cepa Y. Essa decisão só foi tomada após o insucesso na obtenção de formas metacíclicas, apesar das várias estratégias executadas na tentativa de se obter formas infectantes para inoculação e conseqüentemente parasitemia patente. Entre as estratégias empregadas estavam: cultivo celular; cultivo em meio TAU; inóculo em camundongos imunossuprimidos (5 mg/kg/dia de dexametasona via intraperitonal) e repasto sanguíneo *in vitro* de triatomíneos

com parasitas provenientes de cultura (“xenodiagnóstico indireto”) (Contreras *et al.* 1985; Araújo-Jorge *et al.*, 1989; Lallo; Santos; Bondan, 2002; Castro; Santos; Silveira, 2004). O cultivo celular foi realizado em colaboração com a equipe da Dra. Mirian Cláudia S. Pereira do Laboratório de Ultra-Estrutura Celular do IOC/FIOCRUZ.

3.1.3. Triatomíneos

Os resultados que serão apresentados foram obtidos a partir de experimentos realizados com a espécie *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Matta, 1919). A espécie *R. brethesi* pertence a um dos 3 principais gêneros de importância no Continente Americano e tem papel importante na transmissão do *T. cruzi* entre a população humana com atividade laboral do extrativismo da fibra da palmeira *Leopodinia piassaba* na Microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. (Junqueira; Viñas Albajar; Coura, 2005). Todos os espécimes empregados foram fornecidos pelo insetário do Laboratório de Doenças Parasitárias-Medicina Tropical-IOC/FIOCRUZ, cuja colônia de *R. brethesi* teve início em 1995, com “exemplares matrizes” coletados na Microrregião do Rio Negro pela equipe do referido laboratório.

Optamos por empregar, em todos os experimentos, exemplares no 4º estágio ninfal e na fase adulta. A escolha por estágios distintos se deve à quantidade diferencial de componentes celulares encontrados em ambos, e por supor que isto poderia vir a alterar a eficiência do processo de extração. O peso de ambas as fases será detalhado no item 3.3.4.

Padronizamos também empregar triatomíneos em jejum de 15 a 21 dias, pois existem estudos que mostram a influência do repasto nos resultados de extrações com distintos protocolos. O sangue ingerido conteria inibidores, que reduziriam a eficiência da reação de amplificação (Schwartz *et al.*, 1997; Halos *et al.*, 2004; Desloire *et al.*, 2006).

Além do *R. brethesi*, seguindo o delineamento original do projeto, mais outras duas espécies estão sendo testadas, *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 e *Triatoma infestans* Klug, 1834, ambas de importância epidemiológica na dinâmica de transmissão do *T. cruzi* (Schofield; Galvão, 2009). Os experimentos ainda não foram concluídos, em parte pelo não fornecimento, em tempo, do material necessário para finalizá-los.

3.2. Desenho experimental de infecção dos triatomíneos

Na avaliação dos protocolos de extração de DNA foi concebido um desenho experimental para obtenção de material biológico constituído por macerado de triatomíneo infectado com *T. cruzi*. Para obtenção desse material várias etapas foram realizadas, iniciando-se com a infecção de camundongos e concluindo com a infecção artificial ou

experimento de reconstituição dos triatomíneos. O detalhamento dessas etapas está discriminado nesta página e nas seguintes. Paralelamente, grupos controles foram constituídos com objetivo de monitorar os experimentos.

3.2.1. Infecção dos camundongos e dos exemplares de triatomíneos

Uma amostra de sangue infectada com a cepa Y, mantida em nitrogênio líquido, após descongelamento, foi inoculada, via intraperitoneal, em cinco camundongos. O inóculo, por camundongo, consistia em 0,2 mL de sangue contendo aproximadamente 10^5 tripomastigotas sanguíneos. Passada uma semana de inoculação, o sangue periférico desses e de todos os outros camundongos inoculados nos experimentos seguintes, foi examinado, em dias alternados, pelo método parasitológico direto, para constatação da presença de parasitas. A parasitemia era acompanhada retirando-se uma alíquota de 5 μ L de sangue e quantificando as formas tripomastigotas sanguíneas existente neste volume pelo método de Pizzi e Prager (1952) modificado por Brener (1962). O método foi padronizado empregando-se lâmina 25 x 75 mm e lamínula 22 x 22 mm e quantificando o número de parasitas encontrados em 50 campos microscópios com aumento de 400 vezes (ocular de 10 x e objetiva de 40 x).

Assim que os primeiros camundongos apresentaram parasitemia patente, dois deles foram separados para infecção de um grupo de triatomíneos (Alimentação infectante) e os outros três para passagem do sangue infectado para um novo grupo de animais não infectados (1^o Passagem) (Figura 3.1). A 1^o passagem, assim como as passagens seguintes, foram efetuadas via intraperitoneal, sempre para um grupo de 3 animais, inoculando-se 0,2 mL de sangue contendo entre 10^3 a 10^4 formas tripomastigotas sanguíneas por camundongo. Estes novos camundongos infectados, assim que apresentaram parasitemia patente, foram empregados para alimentar 5 exemplares da espécie *R. brethesi* e a seguir efetuar a 2^o passagem. Novas passagens e alimentações infectantes sucessivas foram executadas com objetivo de realizar todos os experimentos de reconstituição (Figura 3.1).

A cada passagem o camundongo era anestesiado, inicialmente com Zoletil® 50 (marca Virbac, fórmula Cloridrato de tiletamina e Cloridrato de zolazepan), via intraperitoneal, na dosagem de 50 mg/kg/dose, conforme recomendado pelo fabricante. Seguindo a recomendação da Comissão de Ética, o Zoletil® 50 foi substituído por um anestésico composto de cloridrato de Quetamina 10% (Dopalen na dosagem 115 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina 2% (Virbaxil na dosagem de 10 mg/kg), ambos via intramuscular. Quando não apresentava resposta a estímulos dolorosos, foi realizada a punção cardíaca, utilizando-se uma agulha descartável, de ponta fina e curta de 13 x 4 mm (marca Precision) com 0,2 mL de

heparina (Liquemine®, marca Roche), acoplada a uma seringa também estéril e descartável de 1 mL, puncionando-se o terceiro espaço intercostal e aspirando o sangue lentamente, segundo o Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz, 2008).

Antes da passagem procedeu-se à alimentação infectante dos triatomíneos. Quando não reagiam aos estímulos dolorosos, certificando a ação anestésica, cada camundongo era transferido para um frasco de vidro de boca larga (15 cm de altura e 10 cm de diâmetro) e sobre eles alimentados no mínimo 4 exemplares de 4º estágio de *R. brethesi*; a exposição às picadas ocorria durante o período de uma hora. A comissão de ética permitiu a alimentação de até 12 exemplares de triatomíneos por camundongo. Realizada a alimentação e a passagem, os camundongos foram sacrificados com inalação prolongada de CO₂, conforme indicação da comissão de Ética.

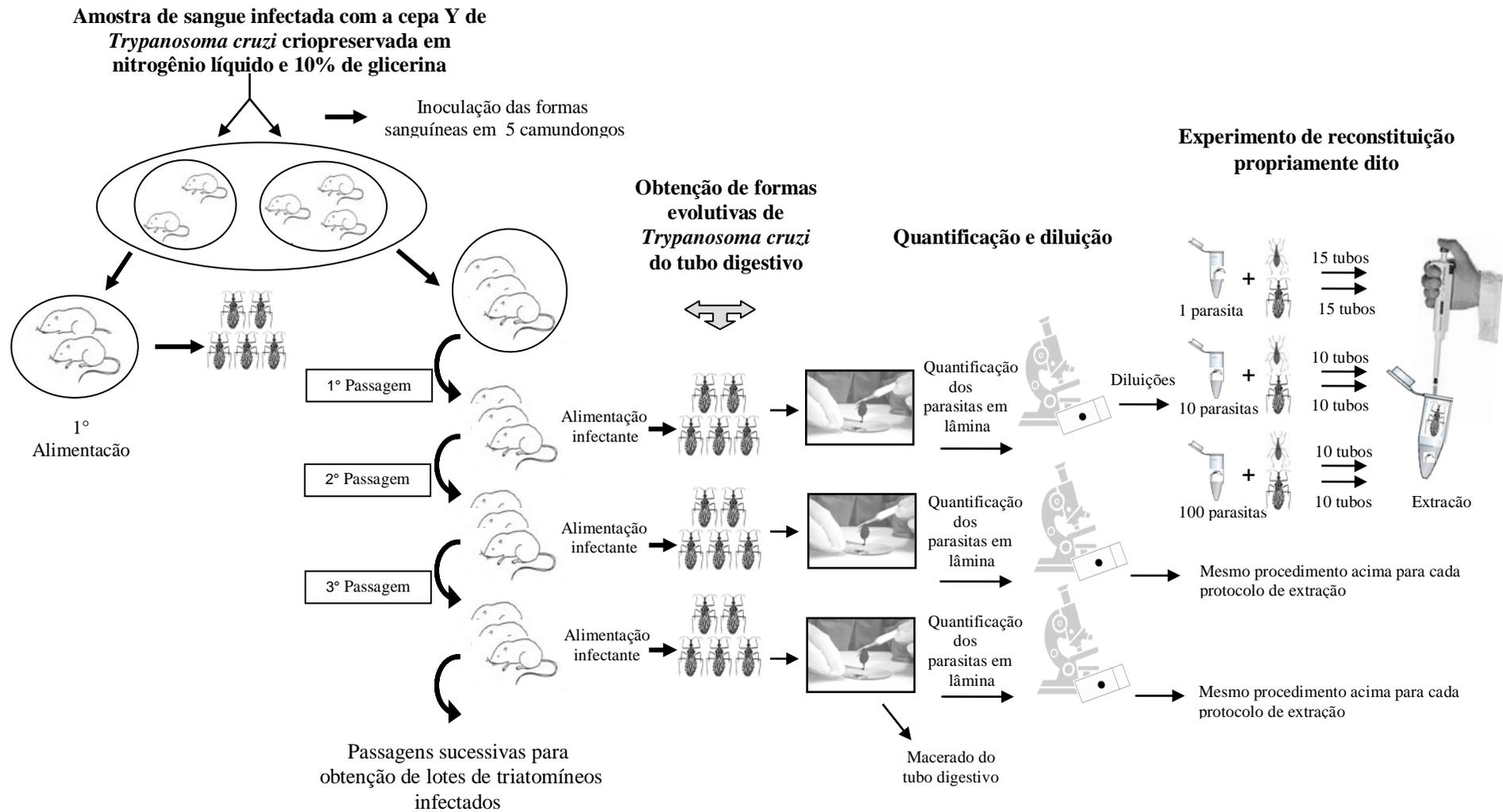


Figura 3.1: Desenho experimental. Esquema dos experimentos de infecção de camundongos, obtenção de tubo digestivo de triatomíneo infectado, quantificação e diluição e experimento de reconstituição. Onde lê-se 1, 10 e 100 parasitas, ler 1, 10 e 100 células de *Trypanosoma cruzi*, respectivamente.

3.2.2. Experimentos de reconstituição

3.2.2.1. Retirada do tubo digestivo

Cerca de quinze dias após a alimentação infectante, uma gota de fezes de cada triatomíneo foi observada entre lâmina e lamínula em microscópio óptico binocular (modelo: não especificado, marca: Carl Zeiss), no aumento de 400 vezes (ocular de 10 x e objetiva de 40 x), com objetivo de constatar a infecção. Comprovada a presença do parasita, seguiu-se à retirada do tubo digestivo dos espécimes positivos.

Os espécimes positivos foram acondicionados em placa de Petri com algodão embebido em clorofórmio até que ficassem adormecidos, para, a seguir, serem transferidos para uma capela de segurança biológica onde passaram por um processo de lavagem para desinfecção (remoção de microorganismos externos). A lavagem consistiu em mergulhar cada triatomíneo uma vez em cloreto de benzalcônio (fungicida e bactericida) e duas vezes em água destilada autoclavada. O cloreto de benzalcônio é um composto de amônio quaternário que atua aumentando a permeabilidade da membrana celular dos microrganismos, tendo como consequência final a morte da célula, sendo por isso empregado como antisséptico de superfícies (Huber, 1983; Xavier *et al.* 2007). Após a lavagem, os insetos eram transferidos para outra placa de Petri até completa secagem. Quando secos, a porção final do abdômen foi cortada com auxílio de uma tesoura autoclavada e o tubo digestivo puxado com auxílio de uma pinça também autoclavada. Aplicamos rotineiramente essa lavagem nos triatomíneos coletados no campo (Amazônia), quando além de efetuar o diagnóstico parasitológico, desejamos realizar o isolamento do *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* em cultura.

Com o auxílio de uma pinça, cada tubo digestivo era transferido individualmente para um vidro de relógio contendo solução salina estéril. A proporção de salina era diretamente proporcional ao volume do tubo retirado, ou seja, uma parte de tubo digestivo para igual parte de salina (diluição D1 ou tubo mãe). A seguir, com auxílio de um bastão de vidro, procedeu-se a maceração. Do material macerado retirou-se uma alíquota, com objetivo de quantificar as formas evolutivas de *T. cruzi* existentes.

3.2.2.2. Quantificação das formas no tubo digestivo

Uma alíquota de 5 µL foi coletada de cada macerado e observada ao microscópio óptico para uma avaliação inicial do número de parasitas existentes. Devido ao número elevado de parasitas encontrados em alguns tubos digestivos e da presença constante de muitos componentes fecais, que dificultavam a leitura, efetuamos uma segunda diluição (Dc = diluição para contagem) de 1:20 em salina estéril. A partir desta diluição, três alíquotas foram

transferidas para dois hemocitômetros de Neubauer com objetivo de proceder à quantificação exata. Optamos pela contagem padronizada por Hoff (1974) no hemocitômetro de Neubauer, por ser mais precisa que a contagem pelo método de Pizzi e Prager (1952) modificado por Brener (1962), empregado inicialmente na avaliação da parasitemia dos camundongos.

Cada hemocitômetro é composto por dois quadrados maiores que correspondem a duas câmaras: uma superior e outra inferior. O quadrado maior é composto por quatro quadrantes, que por sua vez apresenta 16 quadrados menores ou sub-quadrantes (Souza, 2000) (Figura 3.2). Com objetivo de ter o valor mais próximo do real, três contagens, por macerado, foram realizadas: uma no quadrado maior superior do primeiro hemocitômetro, a outra no quadrado maior inferior do mesmo hemocitômetro e a terceira no quadrado maior superior de um segundo hemocitômetro (Figura 3.2). A partir dessas contagens calculávamos a média das três quantificações, conforme será detalhado a seguir.

Antes de efetuarmos a leitura ao microscópio óptico binocular (modelo: não especificado, marca: Carl Zeiss), o hemocitômetro era deixado, por cerca de 2 minutos, sobre uma superfície plana, para “acomodação dos parasitas”. Passados os 2 minutos, prosseguiu-se à quantificação contando-se o número de parasitas existentes nos 16 quadrados menores ou sub-quadrantes dos quatro quadrantes de cada um dos 3 quadrados maiores (Figura 3.2). Não foi efetuada a contagem dos parasitas sobre as linhas extremas dos quadrantes e a contagem foi repetida quando a distribuição dos parasitas não se encontrava homogênea. A repetição era feita a partir de uma nova “pipetagem”.

A leitura de um quadrante correspondeu ao número de parasitas contidos em 0,1 μL , considerando sua capacidade volumétrica (0,1 mm^3). Para sabermos o número de parasitas calculamos a média da leitura, ou seja, somamos o n° de parasitas encontrados nos 12 quadrantes e dividimos por doze. O valor calculado correspondeu ao número de parasitas em 0,1 μL (Figura 3.2).

Posteriormente, o valor da média foi multiplicado por 10^4 para sabermos o número de parasitas em 1 mL. Esta quantificação correspondeu à amostra diluída a 1:20 (Dc = diluição para contagem), portanto, o resultado em 1 mL foi multiplicado por 20, fator de diluição, descobrindo-se, assim, o número de células de *T. cruzi* contidos em 1 mL do tubo macerado mãe (D1).

Capacidade volumétrica de cada um dos doze quadrantes :
 Comprimento: 1 mm
 Largura: 1 mm
 Altura: 0,1 mm
 Capacidade: 1mm x 1mm x 0,1 mm = 0,1 mm³ = 0,1 μL

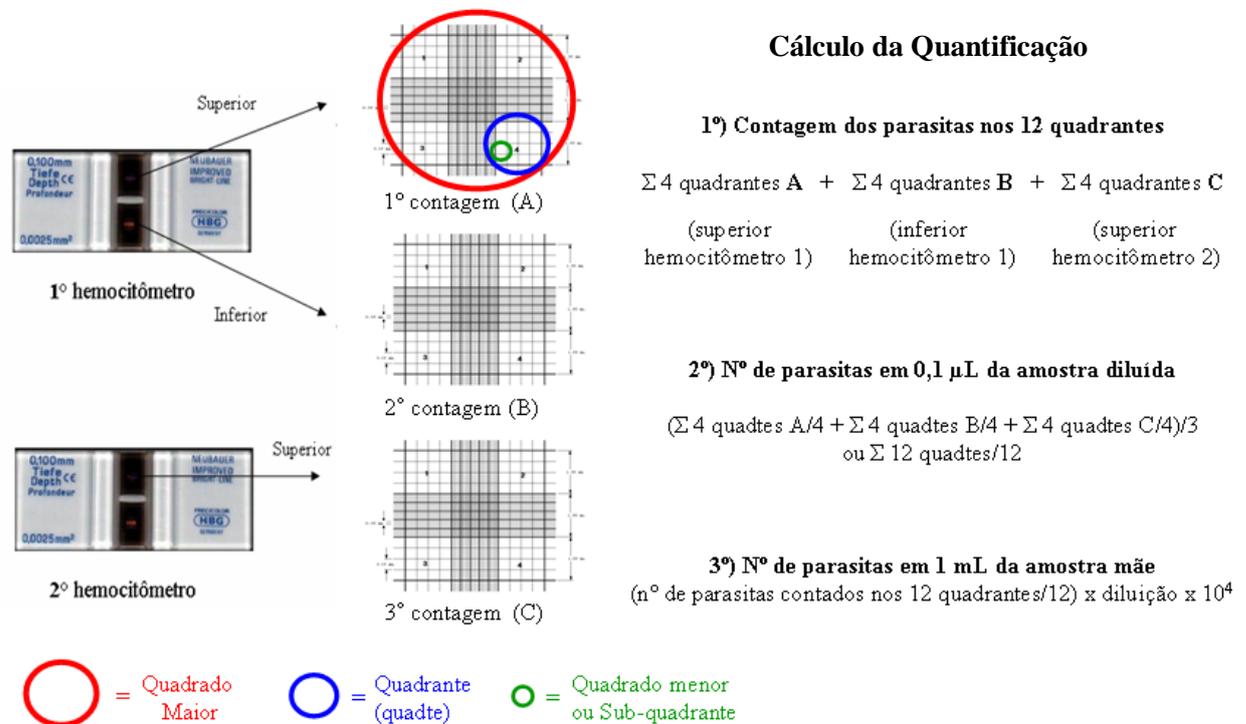


Figura 3.2: Hemocitômetro de Neubauer. Quantificação das formas evolutivas de *T. cruzi* obtidas a partir de diluições do macerado do tubo digestivo.

3.2.3 Obtenção das alíquotas com 1, 10 e 100 parasitas

Efetuada o cálculo para saber o número de parasitas no macerado do tubo digestivo, foram realizadas diluições seriadas, partindo do tubo mãe (D1), com o objetivo de obtermos alíquotas contendo 1, 10 e 100 parasitas, ou seja, 1, 10 e 100 células de *T. cruzi*. Foi realizada uma diluição de 1/100 (tubo D2) a partir do tubo mãe (tubo D1), e do tubo D2 foi feita uma segunda diluição de 1/10 (tubo D3), de onde foram retiradas a alíquotas contendo 10 e 100 parasitas. A concentração de 1 parasita foi alcançada através de uma nova diluição a 1/10 a partir de D3 (tubo D4).

Após as diluições aplicávamos a fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ para calcular o volume necessário a ser retirado do tubo D3 (alíquotas com 100 e 10 parasitas) e D4 (alíquotas com 1 parasita), considerando sempre um volume final de 30 μL (0,03 mL) para cada infecção artificial ou experimento de reconstituição. Volumes iniciais menores que 30 μL foram completados com salina estéril (Figura 3.3).

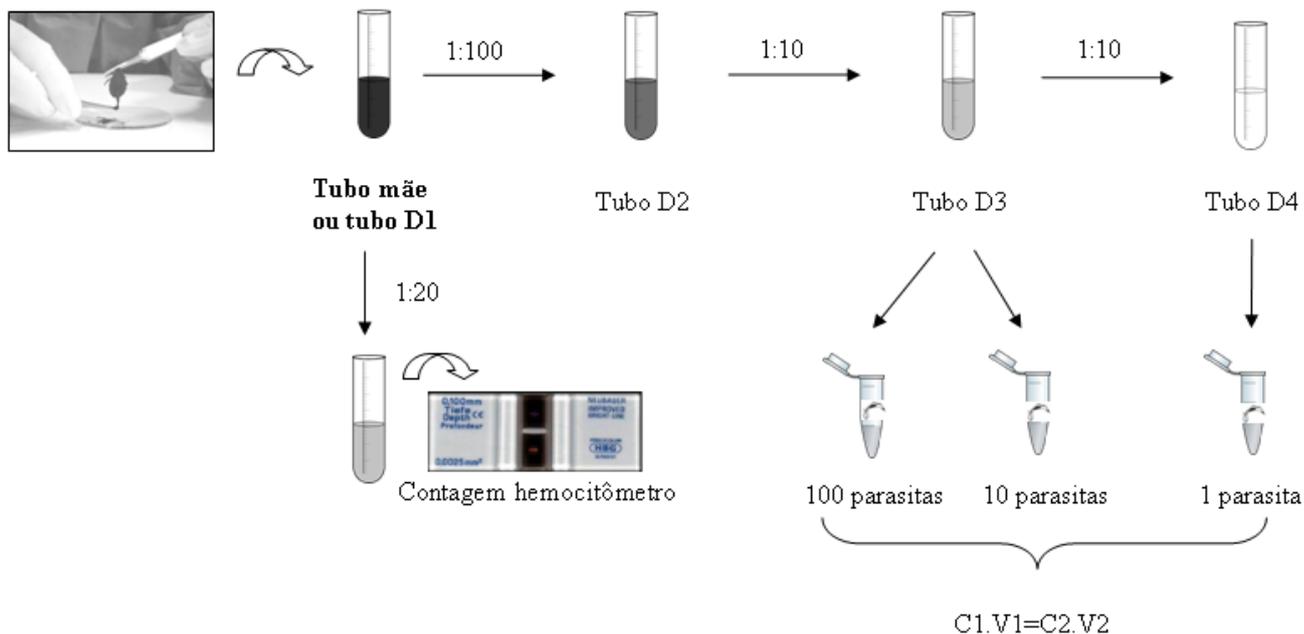


Figura 3.3: Diluições completas. Diluições seriadas realizadas a partir do tubo mãe para obtenção de 1, 10 e 100 parasitas em 30 µL, onde C1=concentração inicial; C2=concentração desejada; V1=incógnita; V2=volume desejado. Onde lê-se 1, 10 e 100 parasitas, ler 1, 10 e 100 células de *T. cruzi*, respectivamente.

Exemplo do cálculo realizado para a diluição de 1 parasita:

$$10 \times V_1 = 1 \times 0,03$$

$$V_1 = 0,003 \text{ mL} = \mathbf{3 \mu\text{L}}$$

Adicionar 27 µL de salina a 3 µL da amostra da diluição para um volume final de 30 µL.

3.2.4. Infecção artificial dos exemplares de triatomíneos

A infecção artificial ou experimento de reconstituição propriamente dito consistiu na adição de 30 µL de salina estéril contendo formas evolutivas de *T. cruzi*, procedentes do macerado do tubo digestivo, nas 3 concentrações anteriormente descritas, a um tubo tipo *ependorf* de 2 mL ou tipo *falcon* de 15 mL e a seguir introduzimos um exemplar íntegro de triatomíneo não infectado.

Nos experimentos de reconstituição empregamos 35 exemplares de cada um dos 2 estágios evolutivos testados, num total de 70 exemplares de triatomíneos por protocolo. Destes 70, nós empregamos 30, 20 e 20 para os experimentos com 1, 10 e 100 parasitas/

células de *T. cruzi*, respectivamente (Figura 3.4).

A estratégia de triatomíneos reconstituídos com formas evolutivas de *T. cruzi* provindas de tubo digestivo permitiu monitorar a concentração de células de *T. cruzi* presentes em cada amostra e com isso avaliar a sensibilidade dos métodos de extração de DNA testados.

Foram empregados 50% a mais de triatomíneos na concentração de 1 célula de *T. cruzi*, 5 exemplares a mais em relação às outras duas concentrações. Esse número adicional foi empregado para compensar os tubos dos experimentos de reconstituição que por acaso não viessem a receber parasita. Essa situação ocorre na prática, quando se realiza diluições seriadas tendo como concentração final 1 parasita por tubo (dados não publicados).

Como controle negativo, por protocolo, utilizamos mais 2 exemplares de triatomíneos, que não foram infectados artificialmente. O inverso, ou seja, 3 alíquotas de 30 µL de salina estéril, contendo formas evolutivas de *T. cruzi* com 1, 10 e 100 parasitas, sem adição de triatomíneos, foram empregadas como controles positivos. Os detalhes sobre os controles estão no próximo item (3.2.5. Controles).

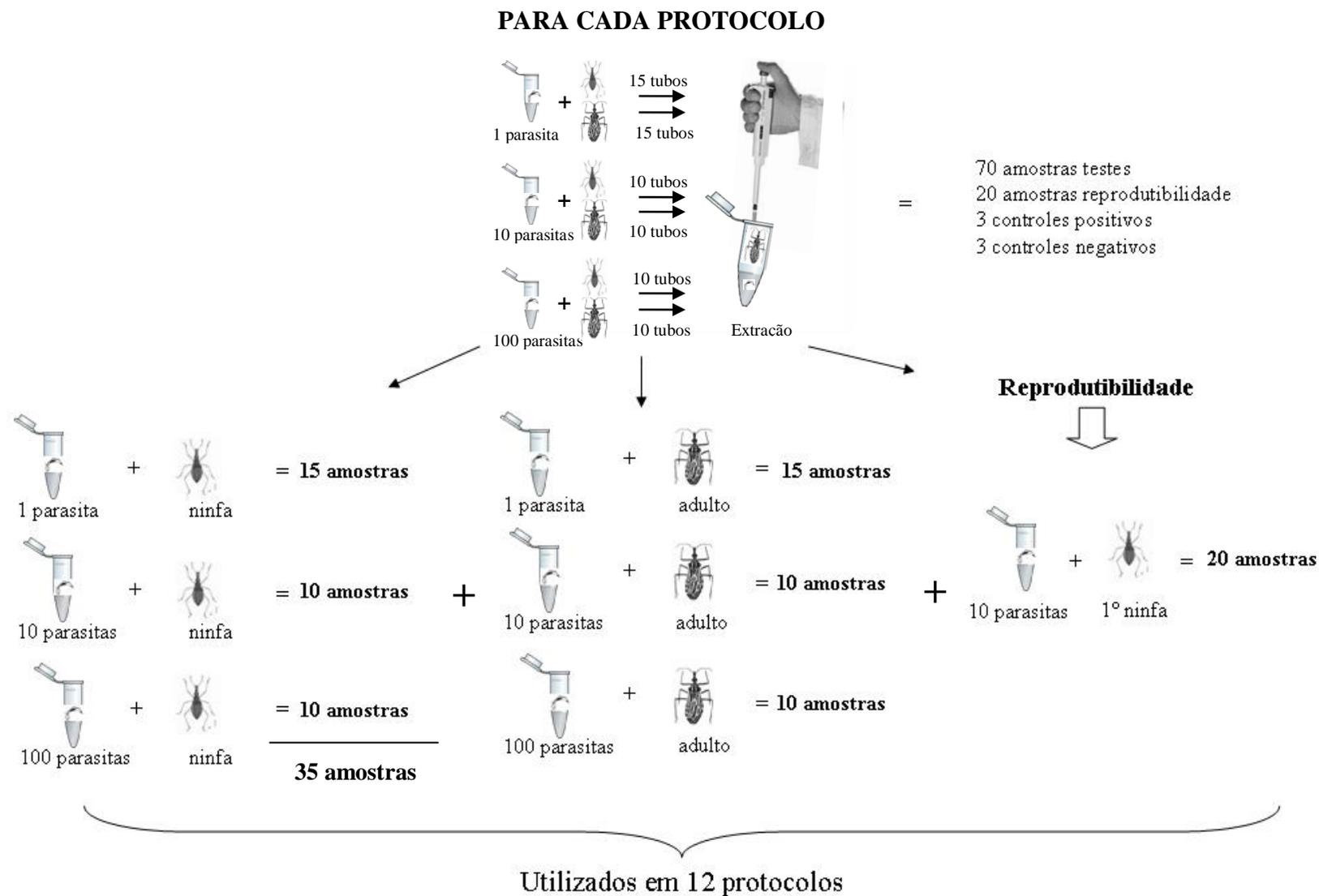


Figura 3.4: Esquema do experimento de reconstituição. Número de triatomíneos para cada diluição, de acordo com os dois estágios evolutivos empregados na avaliação dos métodos de extração testados. Onde lê-se 1, 10 e 100 parasitas, ler 1, 10 e 100 células de *Trypanosoma cruzi*, respectivamente.

3.2.5. Controles

Na avaliação laboratorial foram empregados distintos controles (Figura 3.5).

3.2.5.1 Controle das extrações

3.2.5.1.1 Positivo

A partir da cultura da cepa Y, em meio LIT, mantida no LDP (IOC/FIOCRUZ), foram preparadas alíquotas contendo parasitas nas mesmas concentrações empregadas nos experimentos de reconstituição: 1, 10 e 100 células de *T. cruzi*. Também para alcançar esse nº de parasitas desejados, uma série de diluições foi efetuada em solução salina estéril e o procedimento para a quantificação foi o mesmo utilizado nos experimentos de reconstituição.

Esse controle, composto de formas evolutivas de *T. cruzi* mais o diluente (solução fisiológica estéril) sem triatomíneo, possibilitou avaliar a amplificação de DNA extraído a partir de um diluente que não contém os componentes celulares do vetor, e, conseqüentemente, monitorar a presença de inibidores oriundos deste.

3.2.5.1.2 Negativo

Para o controle negativo, alíquotas de 30 µL de salina estéril foram adicionadas a um exemplar de triatomíneo de cada estágio utilizado (ninfas de 4º estágio e adulto) em jejum e não infectado, proveniente também da colônia do Laboratório de Doenças Parasitárias. A partir dessa etapa, os procedimentos efetuados, foram os mesmos conduzidos com as amostras dos experimentos de reconstituição; tendo como diferencial a ausência de formas de *T. cruzi* provenientes do tubo digestivo de triatomíneo.

Esse controle negativo teve como objetivo monitorar a presença de contaminação do material extraído com DNA exógeno e, conseqüentemente, reações falsas positivas.

3.2.5.2 Controle das PCRs

O funcionamento dos reagentes da PCR e do termociclador foram monitorados através da utilização de DNA extraído e purificado de *T. cruzi* e de triatomíneo na reação de amplificação (controles positivos). Esses DNAs foram quantificados e distribuídos, na mesma concentração, em alíquotas separadas, para evitar congelamento e descongelamento.

Paralelamente, com o objetivo de monitorar a presença de contaminação nos reagentes de amplificação, um tubo contendo apenas os componentes da reação da amplificação foi submetido às etapas de amplificação concomitantemente.

Os detalhes desses controles estão no item 3.4.3.2.

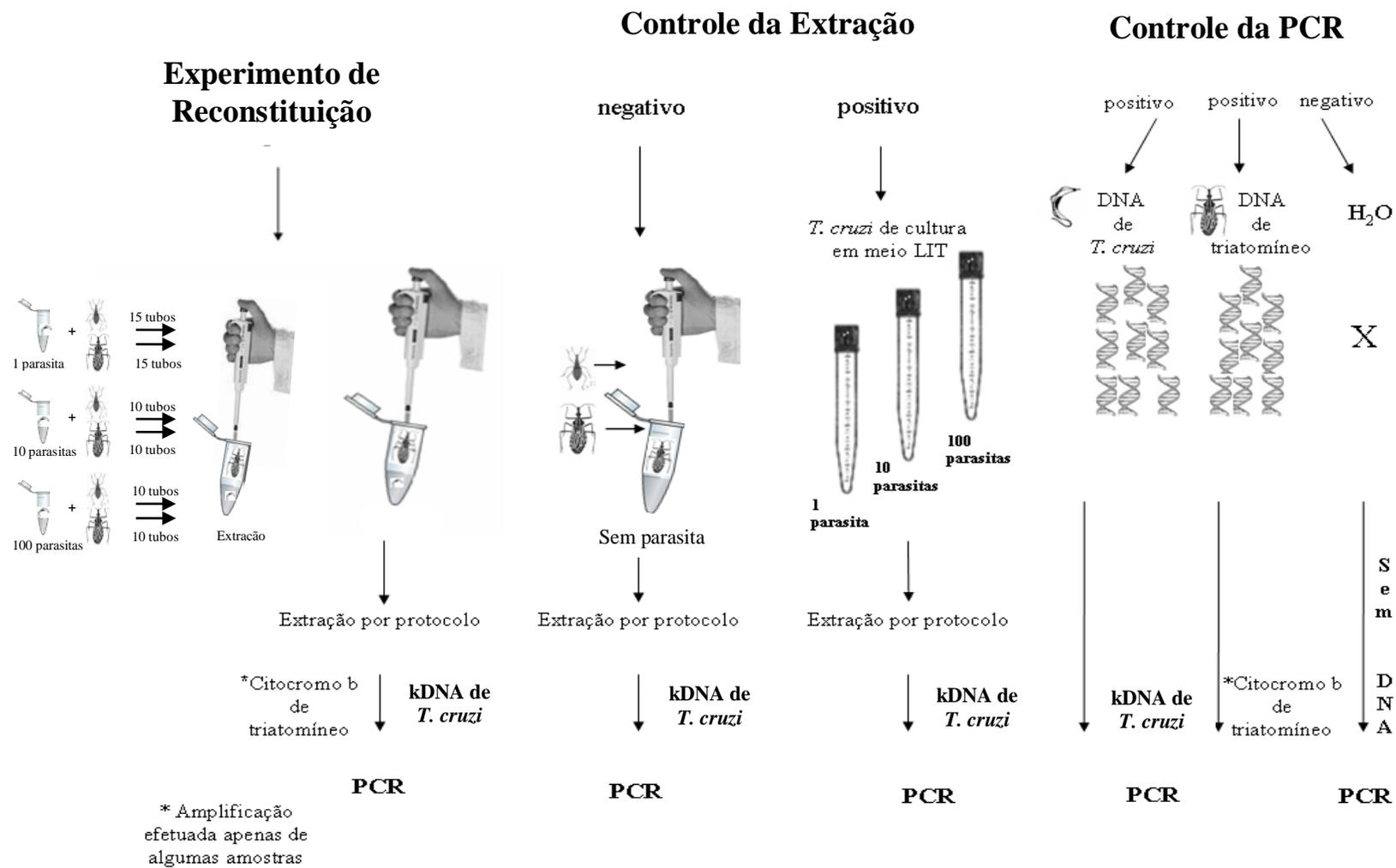


Figura 3.5: Controles. Esquema dos controles positivos e negativos empregados na avaliação laboratorial.

3.3. Protocolos de extração de DNA empregados

Foram testados neste estudo 12 protocolos, cujos critérios de seleção serão detalhados a seguir.

3.3.1. Levantamento dos protocolos de extração *in house*

Inicialmente, realizamos um levantamento nos sites de busca PubMed e Scielo dos protocolos *in house* empregados na extração de DNA de espécimes da classe Insecta. Como verificamos um número muito pequeno de artigos, nossa busca passou a ser direcionada para artrópodes em geral, independente da classe, cujo constituinte principal do exoesqueleto é a quitina. Como a quitina é um amino polissacarídeo com solubilidade diferente conforme o reagente, julgamos que esta característica poderia influenciar no processo de extração do DNA (Merzendorfer, 2006). Cada protocolo foi escolhido de acordo com diferentes princípios de ação no processo de extração, com etapas distintas ou complementares. Os oito protocolos *in house* testados foram organizados por ordem cronológica de publicação e numerados para fim de simplificação na sua identificação (Tabela 3.1).

Não complementamos nossa busca na base de dados LILACS, pois durante a avaliação do levantamento dos *kits* de extração, verificamos que esta praticamente não acrescentou novos artigos ao tema pesquisado, além dos listados na busca no PubMed e no Scielo.

3.3.2. Levantamento dos *kits* de extração

Para a escolha dos *kits*, efetuamos o levantamento dos artigos publicados entre jan/02 e jun/09, tempo que calculamos ser suficiente para incluirmos uma ou duas gerações de *kits*, de tecnologias recentes, que foram lançados no mercado e testados nas publicações científicas.

Assim como nos métodos *in house*, realizamos o levantamento dos *kits* comerciais nas bases de dados PubMed e Scielo. Além dessas duas, incluímos o LILACS na procura dos artigos que empregaram *kits* na extração de DNA. A busca foi realizada empregando os termos “kit DNA extraction”, “DNA extraction kit”, “*Trypanosoma cruzi* PCR extraction” e “*Trypanosoma cruzi* PCR”. Inicialmente, utilizaríamos apenas o primeiro descritor, sem inverter a ordem das palavras, pois a inversão não deveria alterar o resultado. Entretanto, averiguamos que a alteração não produziu resultados totalmente idênticos. Com relação aos outros dois termos (“*Trypanosoma cruzi* PCR extraction” e “*Trypanosoma cruzi* PCR”), resolvemos verificar se ao incluirmos *T. cruzi* e PCR poderíamos complementar/ampliar os

primeiros resultados do levantamento, bem como dos protocolos *in house*.

Três critérios de seleção foram aplicados na escolha dos *kits* a serem empregados: 1º-*kit* mais citado, 2º-*kit* mais empregado comparando métodos de extração e 3º-*kit* mais utilizado na extração a partir de artrópodes. Listamos os *kits* em uma planilha e contabilizamos o número de citações. Caso o mesmo *kit* fosse o mais citado em mais de um critério, a opção seria pelo *kit* seguinte mais citado, tendo como principal critério de escolha *kits* de estratégias de extração distintas (Tabela 3.2).

Além dos oito protocolos *in house* e dos três *kits* comerciais selecionados, testamos um preparado comercial que também é utilizado com frequências nas extrações de DNA: *DNAzol Reagent* (Chomczynski *et al.*, 1997) (Tabela 3.2).

No apêndice 1 estão detalhadas as etapas dos protocolos empregados.

3.3.3. Adaptações dos protocolos selecionados

Em todos os protocolos foi adotada a maceração dos exemplares de triatomíneos, visto que a liberação do DNA torna-se mais difícil pela presença do exoesqueleto destes insetos. Esta maceração consistiu no uso de ponteira e pipeta para o rompimento mecânico dos tecidos do triatomíneo, através de repetidos choques mecânicos contra a amostra. Um equipamento de maceração automática (*Pellet Pestle*) foi utilizado em um estudo-piloto, porém não apresentou resultados satisfatórios, pois não foi capaz de romper o tecido externo rígido dos triatomíneos (dados não mostrados).

Outra modificação empregada nos protocolos 10 e 11 foi a fervura das amostras por 15 minutos para a liberação dos minicírculos concatenados do kDNA do parasito, além de permitir uma distribuição homogênea das sequências na amostra (Britto *et al.*, 1993).

Tabela 3.1 - Protocolos de extração *in house*. Resumo de execução de cada protocolo.

Protocolo	Extração do DNA
1. Breniere <i>et al.</i> 1992	Diluição em água ultra-pura; fervura (10 min); centrifugação (8.000 g/10 min); conservação do sobrenadante.
2. Shikanai-Yasuda <i>et al.</i> 1996	Homogeneização em tampão de lise (Triton-X 100 1%, sacarose 0,32M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl ₂ 5 mM); digestão enzimática com proteinase K; inativação da enzima (95°C/10 min); purificação com fenol-clorofórmio (2X); precipitação com 2 volumes de etanol absoluto (com acetato de sódio e glicogênio); lavagem do precipitado com etanol 70%; ressuspensão em água ultra-pura.
3. Oskam <i>et al.</i> 1996	Homogeneização em tampão de lise 1 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 10 mM pH 8.0, Triton X-100 1%, DTT 10 mM); 4 ciclos de resfriamento em nitrogênio líquido e liquefação em água (60°C); incubação com tampão de lise 2 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 10 mM pH 8,0, Proteinase k 200 µg/mL, Triton X-100 1%) a 60°C/1h; centrifugação (12.000 g/10 min); conservação do sobrenadante.
4. Silber <i>et al.</i> 1997	Fervura (15 min); purificação com fenol-clorofórmio e clorofórmio; precipitação com etanol absoluto e acetato de sódio; ressuspensão em água ultra-pura.
5. Aljanabi & Martinez 1997	Homogeneização em tampão de lise (NaCl 0,4 M, Tris-HCL 10 mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0); adição de SDS 20%; digestão enzimática com proteinase K; incubação (<i>overnight</i>); adição de NaCl; centrifugação (10.000 g/30 min); transferência do sobrenadante para tubo novo; adição de isopropanol; Incubação (-20°C/1 h); centrifugação (10.000 g/4°C/20 min); lavagem com etanol 70%; secagem; ressuspensão em água ultra-pura.
6. Vallejo <i>et al.</i> 1999	Diluição em guanidina-EDTA; fervura (15 min); purificação com fenol-clorofórmio e clorofórmio; precipitação com acetato de sódio e etanol; centrifugação; ressuspensão em água ultra-pura.
7. Hamano <i>et al.</i> 2001	Homogeneização em tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%); digestão enzimática com proteinase K; incubação(37°C/2 h); purificação com fenol-clorofórmio; precipitação com etanol absoluto e ácido acético; ressuspensão em água ultra-pura.
8. Desloire <i>et al.</i> 2006	Homogeneização em tampão de lise (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0,2%) incubação (65°C/1 h); purificação com clorofórmio/álcool isoamílico; precipitação com isopropanol; armazenamento a -20°C por 2-3h; centrifugação (18.000 g /30 min); lavagem com etanol 70%; secagem (50°C/15 min); ressuspensão em água ultra-pura.

Tabela 3.2: Protocolos empregando kits ou preparados comerciais de extração. Resumo de execução de cada protocolo.

Protocolo	Extração do DNA
9. <i>QIAamp DNA Stool Mini Kit</i> Marca Qiagen Cat. 51504	Homogeneização em tampão de lise (ATL); aquecimento (70°C/5 min); adição de <i>InhibitEX</i> (adsorção de inibidores); centrifugação (12.000 rpm/4 min); digestão enzimática com proteinase K e tampão AL; incubação (70°C/10 min); precipitação com etanol absoluto; transferência para coluna de sílica; centrifugação (14.000 rpm/1 min); lavagem com tampão AW1; centrifugação (14.000 rpm/1 min); lavagem com tampão AW2; centrifugação (14.000 rpm/3 min); eluição do DNA com tampão AE.
10. <i>QIAamp DNA Mini Kit</i> Marca Qiagen Cat. 51306	Homogeneização em PBS; fervura (10 min); adição de tampão ATL; digestão enzimática com proteinase K (56°C/3 h); adição de tampão AL; incubação (70°C/10 min); precipitação com etanol absoluto; transferência para coluna de sílica; centrifugação (6.000 g/1 min); lavagem com tampão AW1; centrifugação (6.000 g/1 min); lavagem com tampão AW2; centrifugação (14.000 rpm/3 min); eluição do DNA com água ultra-pura (6.000 g/1 min).
11. <i>InstaGene Matrix*</i> Marca BIO-RAD Cat. 732-6030	Homogeneização em PBS; fervura (10 min); adição de <i>InstaGene Matrix</i> ; incubação (56°C/25 min); fervura (8 min); centrifugação (14.000 rpm/3 min); conservação do sobrenadante.
12. <i>DNAzol Reagent</i> Marca Invitrogen Cat. 10503-27	Homogeneização em <i>DNAzol</i> ; centrifugação (10.000 g/10 min); precipitação com etanol absoluto; centrifugação (4.000 g/2 min); lavagem com etanol 75%; reserva da amostra por 2 min; 2ª lavagem com etanol 75%; reserva da amostra por 1 min; secagem; ressuspensão em NaOH 8 mM.

* Utilizado em substituição ao *Quantum Prep Aquapure Genomic DNA Isolation Kit* (Marca BIO-RAD, cat. 732-6340), uma vez que este foi descontinuado. O próprio fabricante sugeriu o emprego do *InstaGene Matrix* em substituição ao *kit* descontinuado.

3.3.4. Procedimento para calcular o volume de tampão de lise

A quantidade de tampão de lise empregada em cada extração foi estabelecida através do cálculo do ponto médio de peso por estágio evolutivo e espécie de triatomíneo estudada (Shiguti & Shiguti, 2006).

Para efetuarmos este cálculo, antes de iniciarmos a série de extrações, pesamos 6 exemplares adultos (3 machos e 3 fêmeas) e 3 exemplares de 4º estágio de cada uma das três distintas espécies que pensávamos em empregar inicialmente nesta avaliação, com o mesmo tempo de jejum (Tabela 3.3a). A partir desses valores, realizamos o cálculo da média para estabelecermos uma faixa de peso entre os espécimes analisados (Tabela 3.3b).

Após calcularmos as médias, estabelecemos a frequências dos pesos, ordenando de forma crescente todos os valores em gramas (Tabela 3.3c). De acordo com as frequências estabelecidas, calculamos a amplitude total (0,21) e a seguir a amplitude de classe (0,07) (vide cálculos a seguir).

Cálculos utilizados para estabelecer o intervalo entre os valores:

Amplitude total (At) = o último valor – o primeiro valor da frequências

$$At = 0,24 - 0,03 = 0,21$$

Amplitude de intervalo de classe (Hi) = amplitude total / nº de espécies utilizadas

$$Hi = 0,21/3 = 0,07$$

Do valor de Hi estabelecemos quatro faixas de peso e a partir dessas faixas efetuamos o cálculo do ponto médio (PM). Onde o PM é igual ao maior valor somado ao menor valor das faixas definidas, dividido por dois ($PM = \text{maior } n + \text{menor } n / 2$) (Tabela 3.3d). Calculado o ponto médio partimos para correlacionar o peso em gramas com o volume estabelecido em mL, conforme exemplo do protocolo 4 citado após a Tabela 3.3d.

De acordo com a faixa definida pela amplitude de classe, verificamos que todas as ninfas, independente da espécie, enquadram-se na faixa de 0,01 – 0,07 gramas. Nos adultos há uma diferença nos pesos conforme a espécie; no qual espécimes de *R. brethesi* pesam entre 0,08 – 0,14 gramas, enquanto *P. megistus* e *T. infestans* pesam entre 0,15 – 0,21 gramas.

Tabela 3.3a: Cálculo do volume de tampão-Peso. Peso dos exemplares de triatomíneos em gramas (g).

Espécie	Machos			Fêmeas			4° estágio		
	1°(g)*	2°(g)*	3°(g)*	1°(g)*	2°(g)*	3°(g)*	1°(g)*	2°(g)*	3°(g)*
<i>Panstrongylus megistus</i>	0,18	0,18	0,16	0,21	0,24	0,22	0,05	0,05	0,04
<i>Triatoma infestans</i>	0,21	0,24	0,17	0,16	0,13	0,14	0,05	0,06	0,06
<i>Rhodnius brethesi</i>	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,03	0,03	0,03

*Ordem de pesagem dos espécimes.

Tabela 3.3b: Cálculo do volume de tampão-Média dos pesos. Médias dos pesos (em gramas) de ninfas e adultos de triatomíneos.

Espécie	Machos	Média*	
		Fêmeas	Ninfas
<i>Panstrongylus megistus</i>	0,17	0,22	0,04
<i>Triatoma infestans</i>	0,20	0,14	0,05
<i>Rhodnius brethesi</i>	0,06	0,07	0,03

*Média = Σ dos pesos / pelo n° de espécimes analisados.

Tabela 3.3c: Cálculo do volume de tampão – Frequência dos pesos. Frequências dos pesos em gramas.

Frequências dos pesos			
0,03	0,03	0,03	0,04
0,05	0,05	0,05	0,06
0,06	0,06	0,07	0,07
0,07	0,08	0,08	0,13
0,14	0,16	0,16	0,17
0,18	0,18	0,21	0,21
0,22	0,24	0,24	

Tabela 3.3d: Cálculo do volume de tampão-Faixa de peso. Faixa definida para cálculo da diluição.

Espécies	Faixa definida (g)		Peso (Ponto) Médio
Ninfas de 4° estágio das três espécies	0,01	0,07	0,04
<i>R. brethesi</i> (adulto)	0,08	0,14	0,11
<i>P. megistus</i> e <i>T. infestans</i> (adulto)	0,15	0,21	0,18

Exemplo: Protocolo 04 - Adicionar água ultra-pura de acordo com o peso dos triatomíneos (pesar o triatomíneo e, considerando que 1 g corresponde a 1 ml, fazer uma regra de três para achar o volume sugerido). Os valores encontram-se descritos na tabela abaixo (Tabela 3.3e):

Tabela 3.3e: Cálculo do volume de tampão-Volume empregado. Volume de água ultra-pura empregado no protocolo 4.

Faixa definida (g)		Peso Médio	Espécie	Volume de água ultra-pura
0,01	0,07	0,04g (40 mg)	Ninfa 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Ti</i> , <i>Pm</i>)	0,40 mL (400 µL)
0,08	0,14	0,11g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	1,10 mL (1100 µL)
0,15	0,21	0,18g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	1,80 mL (1800 µL)

Considerando que $1\text{ g} \approx 1\text{ mL}$, temos:

Ninfas de *R.brethesi*: $0,04\text{ g} = 0,04\text{ ml}$

$$1\text{ g} - 1\text{ mL}$$

$$0,04\text{ g} - x \quad x = \mathbf{0,04\text{ mL} = 40\ \mu\text{L}}$$

$$10\text{ volumes} = 0,04 \times 10 = \mathbf{0,4\text{ mL} = 400\ \mu\text{L}}$$

Adultos de *R. brethesi*: $0,11\text{ g} = 0,11\text{ ml}$

$$1\text{ g} - 1\text{ mL}$$

$$0,11\text{ g} - x \quad x = \mathbf{0,11\text{ mL} = 110\ \mu\text{L}}$$

$$10\text{ volumes} = 0,11 \times 10 = \mathbf{1,1\text{ mL} = 1100\ \mu\text{L}}$$

Porém, decidimos aumentar o volume da solução de modo que cada espécime ficasse totalmente coberto pelo tampão.

3.4. Avaliação da performance dos protocolos de extração

A performance dos protocolos de extração testados foi avaliada através dos seguintes parâmetros (Figura 3.6):

3.4.1. Concentração de DNA

3.4.2. Grau de pureza

3.4.3. Reação em cadeia da polimerase

3.4.4. Reprodutibilidade

3.4.5. Praticidade

3.4.6. Custo

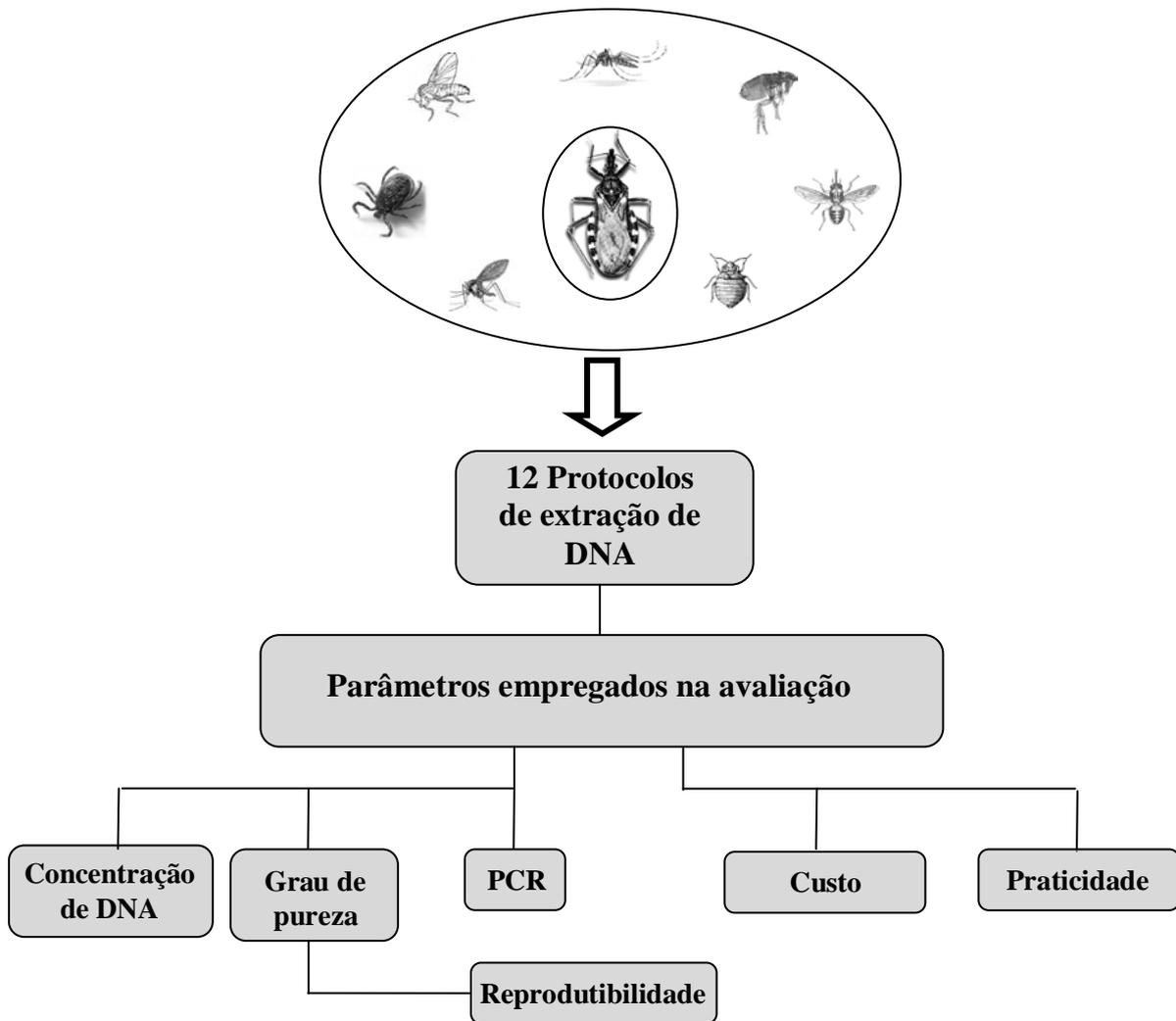


Figura 3.6: Fluxograma de parâmetros. Parâmetros analisados nos 12 protocolos de extração testados.

3.4.1. Concentração do DNA

3.4.1.1. Diluições do material extraído

Inicialmente as quantificações foram efetuadas na razão de 1/100 de cada material extraído (dados não mostrados) (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989). Como nessa diluição inicial não conseguimos leitura ou os resultados foram negativos, fomos orientados pelo representante do aparelho empregado na quantificação a concentrarmos mais as amostras, realizando novas diluições de 1/50 e 1/25 do estoque. Também conforme recomendado pelo representante, homogeneizamos todas as amostras diluídas passando pelo *vortex* (gradação fraca) e empregamos uma cubeta de volume menor (100 µl) diferente do procedimento inicial, onde, respectivamente, utilizávamos a pipeta para homogeneização e empregávamos uma cubeta de 300 µl.

3.4.1.2. Quantificação do DNA extraído

A estimativa da concentração de DNA das amostras extraídas foi efetuada empregando um espectrofotômetro (modelo: Biomate 3, marca: Thermo Electron Corporation) a uma absorvância de 260 nm (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989; Yamada *et al.*, 2002). Essa quantificação foi rigorosamente efetuada antes de realizarmos a PCR (item 3.4.3. - Reação em Cadeia da Polimerase), sendo o equipamento calibrado pelo representante através da verificação dos seguintes parâmetros: exatidão do comprimento de onda, exatidão fotométrica, ruído fotométrico e luz espúria.

A fórmula para calcular a concentração de DNA é: $[DNA] = 50\mu\text{g/ml} \times D \times A_{260}$, onde D é o fator de diluição usado para fazer a leitura espectrofotométrica e A_{260} é a leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm (Romano; Brasileiro, 1999).

A nossa outra opção seria a fluorometria, onde o DNA é tratado com um corante específico para DNA dupla fita, e esse corante é excitado a um comprimento de onda (365 nm) e com emissão de 460 nm proporcional à concentração de DNA. Neste método o RNA e as proteínas não interferem na leitura. Além desses existem outros métodos que empregam a característica da fluorescência em ultravioleta induzida pela intercalação de brometo de etídeo na dupla fita de DNA. A fluorescência é proporcional à concentração de DNA, e pode-se determinar a quantidade de DNA em uma amostra por padrões conhecidos em gel de agarose. A comparação de fluorescência pode ser feita em um mini-gel, que permite também a separação de DNA do RNA (Ciampi; Azevedo; Silva, 2003).

Optamos pela espectrofotometria por consistir em um método simples, rápido e com certa precisão; apesar de depender da qualidade e da quantidade de amostra a ser quantificada. Já é sabido que o alto nível de contaminação por proteínas, fenóis, polissacarídeos, álcool, ou outros ácidos nucleicos, não permite uma determinação acurada da concentração de DNA através da quantificação por espectrofotometria.

3.4.2. Avaliação do grau de pureza

A relação de absorvância A_{260}/A_{280} foi determinada para verificar a contaminação por proteínas. Amostras puras de DNA apresentam valores de DO_{260}/DO_{280} de 1,8 a 2,0. Se existe contaminação por fenóis ou proteínas, a relação DO será muito menor, e a precisão na quantificação será baixa. (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989; Nicklas; Buel, 2003)

Razões entre 1,8 e 2,0 indicam um DNA puro, enquanto razões menores indicam contaminação por proteínas e maiores indicam contaminação por fenóis (Nicklas; Buel, 2003; Chiari; Valle; Resende, 2009).

3.4.3 Reação em cadeia da polimerase

A PCR teve como objetivo complementar os dois parâmetros anteriores, pois mesmo quando as medidas espectrofotométricas não revelam presença de DNA, tem se verificado amplificação bem sucedida do fragmento esperado (Barea; Pardini; Gushiken, 2004).

De todos os 12 protocolos testados foi efetuada amplificação de uma seqüência de DNA alvo, cujo produto de amplificação foi comprovado através da presença de banda em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo (PCR qualitativa) (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989; Beroldingen *et al.*, 1989)

De algumas amostras foi efetuada a corrida em dois géis de agarose distintos. Um foi corado pelo brometo e outro pelo Gel Red[®] (Gel Red[®] Nucleic Acid Gel Stain, número de catálogo (*cat number*): 41001, marca Biotium). Os resultados foram comparados empregando os dois métodos de coloração, mas apenas o resultado da coloração pelo método do brometo foi empregado na avaliação das bandas dos DNAs extraídos dos 12 protocolos, visto que os primeiros experimentos haviam sido realizados com este corante, além do custo mais elevado do Gel Red[®].

As etapas da PCR do DNA extraído foram realizadas em salas previamente descontaminadas e independentes das demais, sendo uma para preparação dos reagentes, uma segunda para extração e uma terceira para visualização de produtos amplificados (Sarkar; Sommer, 1990; Kitchin & Bootman, 1993).

3.4.3.1 Alvos de amplificação

3.4.3.1.1 Amplificação do kDNA do *Trypanosoma cruzi*

Dos triatomíneos infectados experimentalmente, empregamos oligonucleotídeos para amplificar a seqüência de 330 pb da região variável dos minicírculos de kDNA de *T. cruzi* de todos os DNAs extraídos, empregando os 12 protocolos testados. A mesma amplificação foi realizada das amostras de DNA extraído de triatomíneos livres de infecção (triatomíneo sem “adição” de *T. cruzi* – controle negativo) e das culturas nas 3 diluições (*T. cruzi* sem “adição” de triatomíneo – controle positivo).

Para cada reação de PCR foi preparado um *mix* nos seguintes volumes e respectivas concentrações iniciais: 10 µL de *Gene Amp 10X PCR buffer II* 10X, 12 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL de cada dNTP (0,5 µL de dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 10 mM, 5 µL de cada um dos iniciadores [121 (5'-AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA 3') e 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA 3')] ambos na concentração de 100ng, 0,75

μL de AmpliTaq® Gold DNA polimerase ($5\text{U}/\mu\text{L}$), $7,5\mu\text{l}$ da solução de DNA ($\approx 10\text{-}30\text{ng}$) e água ultra-pura para completar $100\mu\text{l}$ de solução final (Wincker *et al.*,1994).

Todos os reagentes empregados no *mix* foram da marca Applied Biosystems (Brasil), com exceção dos oligonucleotídeos. Empregamos oligonucleotídeos purificados por HPLC sintetizados pela Empresa Invitrogen (Brasil).

Os tubos contendo as misturas de reação e os controles foram colocados em aparelho termociclador GeneAmp PCR System (modelo: 9600, marca: Perkin-Elmer®) que executou o programa conforme descrito na Tabela 3.4. Este equipamento foi submetido a um diagnóstico preventivo antes de sua utilização neste projeto.

Tabela 3.4: Programa para amplificação de kDNA de *Trypanosoma cruzi*. Descrição do programa executado para amplificação de um fragmento de 330 pb da região variável dos minicírculos do kDNA do *Trypanosoma cruzi* (Wincker *et al.*,1994).

Programa	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Ciclos
1	95	12	1*
2	98	1	2
	64	1	
3	94	1	33
	65	1	
4	72	10	1
5	4	60	1

* Recomendado pelo fabricante da enzima Taq Gold® (Applied Biosystems).

3.4.3.1.2 Amplificação do citocromo b de triatomíneo

A amplificação de um fragmento de 682 pb do gene mitocondrial citocromo b de triatomíneos foi realizada em 3 protocolos dos 12 testados: no protocolo de melhor rendimento, no de pior rendimento e naquele que apresentou rendimento intermediário, tendo como referência para essa gradação o número de bandas amplificadas da sequência alvo de *T. cruzi*. Isso permitiria verificar se alvos em concentrações diferentes, acarretaria em resultados semelhantes ou distintos de amplificação, uma vez que, em cada amostra extraída dos 12 protocolos, o número de parasitas é muito menor do que das células de triatomíneos.

Os mesmos controles da extração utilizados na amplificação do kDNA foram utilizados na amplificação do citocromo b, sendo que as amostras de DNA extraído de triatomíneos livres de infecção (triatomíneo sem adição de *T. cruzi*) e das culturas nas 3 diluições (*T. cruzi* sem adição de triatomíneo) foram respectivamente positivo e negativo.

Para cada reação de PCR foi preparado um *mix* nos seguintes volumes e respectivas concentrações iniciais: 5 µL de *Gene Amp 10X PCR buffer II* 10X, 6 µL de MgCl₂ 25mM, 5 µL de dNTPs (1,25 µL dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 2,5mM, 5 µL de cada um dos iniciadores [CYTB7432F (5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC) e CYTB7433R (5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA)] ambos na concentração de 20 pmol, 0,5 µL de AmpliTaq® Gold DNA polimerase (5U/µL), 3 µL da solução de DNA (≈ 10-30ng) e água ultra-pura para completar 50µl de solução final (Monteiro *et al.*, 2003; Pavan, 2009).

Assim como no PCR para kDNA, todos os reagentes empregados no *mix* foram da marca Applied Biosystems, com exceção dos oligonucleotídeos. Empregamos oligonucleotídeos purificados por HPLC sintetizados pela Empresa Invitrogen.

Os tubos contendo as misturas de reação e os controles foram colocados em aparelho termociclador GeneAmp PCR System (modelo: 9600, marca: Perkin-Elmer®) que executou o programa conforme descrito na Tabela 3.5. Antes do início de todos os experimentos, este aparelho sofreu uma revisão preventiva, que permitiu checar as temperaturas na placa de aquecimento e os tempos correspondentes no *display*.

Tabela 3.5: Programa para amplificação de citocromo b de triatomíneo. Descrição do programa executado para amplificação de um fragmento de 682 pb do gene mitocondrial citocromo b de triatomíneo (Pavan, 2009).

Programa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
1	95	12	1*
2	94	5 min	1
	94	45 seg	
3	48	30 seg	35
	72	45 seg	
4	72	10 min	1
5	4	60 min	1

* Recomendado pelo fabricante da enzima Taq Gold® (Applied Biosystems).

3.4.3.2 Controles da PCR

O funcionamento dos componentes da mistura da PCR e do termociclador foram monitorados através da utilização de DNA extraído e purificado de *T. cruzi* e DNA extraído e purificado de triatomíneos (controles positivos da reação). Esses DNAs foram quantificados e distribuídos em alíquotas para serem empregadas na mesma concentração em todas as reações de amplificação (100ng/mL).

O aparecimento das bandas de 330 pb (alvo DNA de *T. cruzi*) e 682 pb (alvo DNA de triatomíneo) em gel de agarose confirmaria que a amplificação ocorreu como esperada, tanto pelo funcionamento dos reagentes da reação, quanto pelo funcionamento do termociclador.

Para monitorar a contaminação da reação de PCR, foi utilizado um tubo contendo o mix da reação sem DNA extraído, cujo volume referente foi substituído pelo uso de água ultra pura (negativo da reação).

3.4.3.2.1. Positivo da reação

- **kDNA de *T. cruzi***

Uma alíquota de DNA total extraído e purificado de *T. cruzi*, fornecida pela equipe do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas-IOC/FIOCRUZ, foi empregada como controle de funcionamento da PCR.

Para cada série de reação de amplificação, efetuada em todos os protocolos, uma alíquota de 7,5 µL de DNA total de *T. cruzi* foi amplificada juntamente com as demais amostras reconstituídas; fazendo uso do mesmo programa para a sequência alvo de kDNA e com os mesmos reagentes empregados na reação de amplificação.

- **Citocromo b**

Um segundo controle positivo foi utilizado na reação de PCR, desta vez, uma alíquota de DNA extraído e purificado de triatomíneo. Quando o produto amplificado, após corrida em gel de agarose, mostrasse um fragmento de 682 pb do gene mitocondrial citocromo b, significaria também, neste caso, que a reação teria ocorrido como esperada. Esse DNA foi gentilmente cedido pelo Márcio Pavan, aluno de doutorado da equipe do Dr. Fernando Monteiro (LDP-IOC/FIOCRUZ).

Para cada série de reação de amplificação, empregando oligonucleotídeos para a sequência alvo de triatomíneo, uma alíquota de 3µL de DNA total do vetor foi amplificada juntamente com as demais amostras reconstituídas. Nesses PCRs foram empregados os mesmos reagentes do *mix* e o programa para a sequência alvo de citocromo b (Pavan, 2009).

3.4.3.2. Negativo da reação

Para certificar que não houve contaminação durante o preparo da mistura (*mix*) de PCR, a cada série de amplificações foi feito um controle negativo da reação, que consistia na mistura de PCR mais 7,5 µl e 3 µl de água ultra-pura, o correspondente ao mesmo volume empregado de DNA extraído nas PCRs de kDNA e citocromo b, respectivamente.

3.4.3.3. Revelação do produto amplificado

Todos os tubos contendo DNAs extraídos dos experimentos de reconstituição e seus controles, que passaram pela etapa de amplificação, e mais os DNAs purificados (controle da reação de PCR) foram aplicados em gel de agarose 1000 a 2% (UltraPure™ Agarose 1000®, cat 10975035, marca Invitrogen). Assim que houve solidificação da agarose, o gel foi coberto com tampão de eletroforese TBE 1X (tris, marca Gibco BRL, USA /ácido bórico Ultra-Pure, marca Gibco BRL, USA /EDTA Dehydrate, marca Sigma Chemical Company, USA) e em cada *slot* aplicado 7,5 µl de produto amplificado. Foi utilizado marcador de peso molecular ØX174 HaeIII (cat 15611015, marca Invitrogen). Empregamos uma cuba grande (Modelo EC 330, marca Thermo EC Midicell Primo™) e utilizamos um pente que permitiu aplicar 40 amostras em cada corrida. As concentrações das soluções tampão utilizadas na eletroforese encontram-se descritas no Apêndice 2.

O tempo aproximado de corrida foi de 1 hora e 30 minutos a 75 V. Após esse tempo, o gel foi transferido para uma nova cuba contendo 5µg/ml de brometo de etídio diluído em tampão TBE 1X e corado por 15 minutos sobre um misturador (Rocker Platform, modelo: RP-50, marca: Elmeco, USA). Passado o tempo de coloração, o gel foi descorado por 30 minutos e logo a seguir, visualizado em transluminador com fonte de luz ultravioleta. O gel foi fotografado, para futura análise, empregando o aparelho ImageQuant 100 acoplado a uma câmera fotográfica (modelo SP 500 UZ, marca Olympus Ed lens) e a um computador processador Intel empregando o programa ImageQuant 100 versão 1.01.

Conforme relatado anteriormente, alguns géis foram feitos em duplicata e corados pelo Gel Red® Nucleic Acid Gel Stain, 3X em água, que, segundo o fabricante, apresenta uma resolução abaixo de 50ng, sendo por isso mais sensível que a coloração pelo brometo. O protocolo de coloração está descrito no *Product Information* que vem com o produto.

A visualização de uma única banda de peso molecular 330pb indicou a presença de kDNA de *T. cruzi* amplificado, neste caso PCR positiva (Sturm *et al.*, 1989). Devido à presença de bandas com intensidade distintas em relação ao controle positivo, estabelecemos um padrão empregando o programa ImageJ versão 1.43, onde bandas com intensidade igual ou

inferior 43367 *mean* (média de intensidade) foram caracterizadas como fracas. Esses dados serão importantes em resultados de protocolos distintos que apresentem o mesmo número de bandas amplificadas, porém com intensidades diferentes.

3.4.4. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade reflete a propriedade de um teste de gerar resultados iguais (consistentes) quando repetidos nas mesmas amostras ou quando repetidos em amostras diferentes, desde que estas sejam similares em termos do produto a ser identificado.

Devido à impossibilidade de realizar a extração das mesmas amostras, uma vez que o inseto foi completamente macerado e a extração realizada de todo este material, a reprodutibilidade de cada um dos 12 protocolos foi testada através das amostras de *R. brethesi* (4º estágio ninfal com concentrações de 10 *T. cruzi*) inicialmente extraídas somadas a 20 novas amostras de espécimes de *R. brethesi* no 4º estágio ninfal, macerados com concentrações de 10 células, obtidas pelo mesmo procedimento da infecção artificial (experimentos de reconstituição).

A princípio a reprodutibilidade seria calculada nos parâmetros concentração de DNA e grau de pureza, estimando-se o coeficiente de variação (Rosner, 1994) das 30 amostras descritas acima. Entretanto, esta análise só foi possível para o parâmetro concentração de DNA.

3.4.5. Praticidade

Neste parâmetro construímos uma tabela e ponderamos os seguintes itens:

- Número de etapas;
- Tempo despendido na execução de todo o processo de extração;
- Tempo gasto na preparação dos reagentes;
- Número de equipamentos necessários.

3.4.6. Custo

Neste parâmetro construímos uma segunda tabela e ponderamos os seguintes itens:

- Custo por reação: preço dos reagentes, ponteiros e tubos;
- Custo com profissional: com relação ao cálculo dos gastos com recursos humanos, ele teve como base um profissional de nível superior com especialização e o tempo despendido na execução de todo o processo de extração. No tempo despendido não foram contabilizados intervalos superiores a 10 minutos, pois consideramos que em

intervalos superiores o profissional poderia exercer outra atividade. Exemplo: No protocolo 06 Vallejo *et al.* (1999) não consideramos o intervalo em que o material é deixado na Guanidina-EDTA;

- Custo final: soma dos 2 itens anteriores.

Na avaliação do custo de cada protocolo, os valores foram contabilizados em dólar, cujo cambio estava em US\$ 0,5590 (cotação em 04-03-2010).

3.5. Questionário de opinião

Foi elaborado e aplicado um questionário de opinião semi-aberto (Apêndice 3), junto com o Dr. Guilherme Loureiro Werneck, Professor da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), colaborador na análise quantitativa deste projeto, com o objetivo de estabelecer o grau de importância de características básicas avaliadas quando da escolha de um método de extração de DNA a partir de diferentes amostras biológicas.

O questionário foi enviado de forma aleatória a dois grupos de profissionais. Um grupo foi composto de profissionais, de instituições científicas nacionais e internacionais, que publicaram artigos em revistas indexadas, entre janeiro de 2002 e junho de 2009. O outro grupo constituiu-se de profissionais com atividades nos laboratórios privados de medicina diagnóstica de maior destaque no Brasil. Era pré-requisito que o profissional tivesse trabalhado com protocolos de extração de DNA, independente da amostra biológica de procedência deste DNA e da seqüência alvo de amplificação. Para a informação dos dez laboratórios de maior destaque no Brasil, consultamos um diretor técnico de um laboratório privado e membro da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (Apêndice 4).

3.6. Análise Estatística

Os dados foram armazenados e processados preliminarmente em Epi Info 6.04 (Dean *et al.*, 2000). O desempenho dos protocolos testados foram avaliados em termos de médias, medianas e proporções referentes a cada um dos parâmetros analisados (p.ex., concentração média de DNA extraído, grau de pureza médio, proporção de resultados adequados etc). Para as médias e proporções estimaram-se intervalos de confiança de 95% para avaliar a precisão das estimativas.

O teste exato de Fisher (Callegari-Jacques, 2003) foi aplicado nos resultados de amplificação dos dois protocolos de melhor desempenho, a fim de avaliar a correlação entre o número de bandas amplificada por cada um deles. Segundo este teste estatístico, p-valores menores que 0,05 indicam diferença estatística significativa na identificação de amostras

positivas pelos protocolos analisados. O teste exato de Fisher foi utilizado por ser mais indicado na análise de poucos dados, diferente do qui-quadrado.

Para verificar a presença de diferença estatística na extração de DNA de ninfas e adultos, empregamos o teste de diferença de médias. Neste teste, a média aritmética obtida pelos valores de grau de pureza de cada estágio foi comparada, resultando em um p-valor. Diferenças foram caracterizadas por p-valores menores que 0,05. Este cálculo foi realizado em cada um dos 12 protocolos.

A reprodutibilidade foi avaliada por meio do coeficiente de variação. Valores desejáveis seriam aqueles <0.2 ; acima de 0.3 definitivamente indicam má reprodutibilidade e valores entre 0.2 e 0.3 são considerados limítrofes.

3.7. Condições éticas

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), sob a licença LW-13/09 (Apêndice 5), e está de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Os profissionais que participaram de sua execução se comprometeram a obedecer rigorosamente às diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, estabelecidas no regimento interno da CEUA.

4. RESULTADOS

4.1. Protocolos de extração de DNA empregados

Doze distintos protocolos de extração foram selecionados para avaliação comparativa na presente dissertação. Os protocolos testados dividiram-se em duas categorias: métodos *in house* e *kits* e/ou preparados comerciais. O resultado desta seleção é apresentado nos dois itens seguintes.

4.1.1. Levantamento dos protocolos de extração *in house*

Através do levantamento bibliográfico, realizado nos sites de busca PubMed e Scielo, foram escolhidos oito protocolos *in house*. Utilizamos como critério de busca “extração de DNA de espécimes de classes do filo Arthropoda” por considerar que a presença de polissacarídeos, na composição estrutural dos triatomíneos, artrópodes empregados como modelo neste estudo, resultaria na seleção de protocolos direcionados para extração de amostras que apresentassem esse componente celular.

Conforme detalhado na Tabela 4.1, os 8 protocolos utilizaram estratégias distintas para a extração do DNA e foram empregados em amostra biológica de algum espécime do filo Arthropoda. Nenhum deles ressaltou o critério de escolha do método de extração utilizado.

Além dos oito protocolos *in house* selecionados para nosso estudo, mais outros foram encontrados nessa busca. Entre eles estão os empregados nos artigos de Breniere *et al.*, 1995; Russomando *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 2000; Botto-Mahan *et al.*, 2005 e Marcet *et al.*, 2006, porém por executarem etapas comuns ou semelhantes com algum protocolo deste estudo, eles foram excluídos da avaliação. Outro critério de exclusão da avaliação foram protocolos que realizaram as extrações de amostras coletadas em papel de filtro, uma vez que fogem do delineamento da nossa avaliação.

Dos 8 protocolos *in house*, 4 (protocolos 02, 05, 07 e 08) utilizam tampão de extração para realizar a lise celular, enquanto apenas 2 (protocolos 01 e 04) fazem a ruptura por método físico do calor. Os 2 protocolos restantes, 03 e 06, associam a lise celular química com a lise celular física (resfriamento e/ou aquecimento). Dos protocolos testados apenas os n^{os} 03, 05 e 08, efetuam a extração do espécime inteiro ou de partes da sua estrutura corporal, que pode ser descrita como outra pré-etapa de lise celular, no caso, física (mecânica) por maceração das amostras reconstituídas, com o intuito de aprimorar a liberação do DNA. Esse mesmo procedimento nós adaptamos a todos os demais protocolos para ser realizado nos nossos experimentos.

Alguns reagentes só estiveram presentes em um ou dois dos 8 protocolos *in house*. O detergente aniônico SDS, foi empregado nos protocolos 05 e 07, porém não associado ao acetato de potássio em altas concentrações, que juntos promovem a precipitação simultânea das proteínas e polissacarídeos. A guanidina, que age na lise celular e, quando associada ao EDTA, como conservante, só fez parte do protocolo 05. O β -mercaptoetanol e o CTAB, que atuam na desnaturação das proteínas por redução das pontes dissulfeto e nos polissacarídeos respectivamente, só estiveram presentes no tampão de lise do protocolo 08. A associação do CTAB a outros reagentes é comum para potencializar a liberação dos componentes celulares por lise da membrana do DNA vegetal e por isso é muito empregado nas extrações do DNA de planta, onde a composição de polissacarídeos é significativa. O DTT, que atua também rompendo as pontes dissulfeto, foi empregado apenas em um dos protocolos, em associação com outros reagentes do tampão de lise.

Os protocolos 02, 05 e 07 realizam uma etapa de digestão enzimática de proteínas pela incubação das amostras com proteinase K.

O Tris-HCl esteve presente em todos os tampões de lise (protocolos 02, 03, 05, 06, 07, e 08) e o EDTA em quase todos (exceção do protocolo 02). Tendo o primeiro papel de tampão e o outro de quelante de metais pesados.

A maioria dos protocolos (02, 04, 05, 06, 07 e 08) realiza a purificação das amostras, por meio da remoção de proteínas, por algum solvente orgânico (fenol-clorofórmio ou clorofórmio-álcool isoamílico) e/ou com sal (NaCl).

Nenhum protocolo utiliza a purificação da amostra biológica fazendo uso do gradiente de cloreto de cério (CsCl) ou precipitação com acetato de amônio, que são empregados para solucionar a contaminação com polissacarídeos.

A precipitação foi feita através da centrifugação e/ou adição de reagentes como o etanol absoluto, isopropanol, acetato de sódio ou glicogênio na grande maioria dos protocolos. Uma lavagem do precipitado com etanol 70% é empregada pelos protocolos 02, 05 e 08. O protocolo 06 utiliza uma etapa adicional de centrifugação com clorofórmio saturado em água.

Tabela 4.1: Protocolos de extração *in house* selecionados para avaliação experimental. Referência do artigo de origem dos 08 protocolos *in house* selecionados e uma breve descrição da estratégia utilizada para a extração de DNA por cada protocolo.

Protocolo	Referência do artigo de origem	Estratégia de extração
01	Breniere <i>et al.</i> 1992	Lise celular física (térmica) por aquecimento a 100°C; precipitação por centrifugação.
02	Shikanai-Yasuda <i>et al.</i> 1996	Lise celular química pela ação de tampão de lise (Triton X 100 1%, sacarose 0,32 molar, Tris HCl 10 mM pH 7.5, MgCl ₂ 5 Mm); digestão enzimática de proteínas com proteinase K; remoção de proteínas com solvente orgânico (fenol-clorofórmio); precipitação do DNA em solução com etanol absoluto, acetato de sódio e glicogênio; lavagem com etanol 70% para remoção do excesso de sal.
03	Oskam <i>et al.</i> 1996	Lise celular química pela ação de tampão de lise I (Triton X 100 1%, NaCl 50 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 10 Mm pH 8.0, DTT 10mM); lise celular física pelo resfriamento, tampão de lise II (Triton X 100 1%, NaCl 50 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 10 Mm pH 8.0, proteinase K 200 mg/ml); precipitação por centrifugação.
04	Silber <i>et al.</i> 1997	Lise celular física (térmica) por aquecimento a 100°C; remoção de proteínas com solvente orgânico (fenol-clorofórmio); precipitação do DNA em solução com etanol absoluto.
05	Aljanabi & Martinez 1997	Lise celular química pela ação de tampão de lise (NaCl 0,4 M, Tris HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 2 Mm pH 8.0); detergente (SDS 20%); digestão enzimática de proteínas com proteinase K; remoção de proteínas com sal (NaCl); precipitação do DNA em solução com isopropanol; lavagem com etanol 70% para remoção do excesso de sal.
06	Vallejo <i>et al.</i> 1999	Lise celular química pela ação de guanidina (guanidina- HCl 6M/EDTA 0,2 M pH 8,0, tamponada com Tris-HCl); lise celular física (térmica) por aquecimento a 100°C; remoção de proteínas com solvente orgânico (fenol-clorofórmio); remoção do excesso de solvente orgânico com clorofórmio; precipitação do DNA em solução com etanol absoluto e acetato de sódio.
07	Hamano <i>et al.</i> 2001	Lise celular química pela ação de tampão de lise (NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, SDS 0,1%) digestão enzimática de proteínas com proteinase K; remoção de proteínas com solvente orgânico (fenol-clorofórmio); precipitação do DNA em solução com etanol absoluto e ácido acético.
08	Desloire <i>et al.</i> 2006	Lise celular química pela ação de tampão de lise (NaCl 1,4 M, Tris HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, CTAB 2%, β-mercaptoetanol 0,2%) remoção de proteínas com solvente orgânico (clorofórmio/álcool isoamílico); precipitação do DNA em solução com isopropanol; lavagem com etanol 70% para remoção do excesso de sal.

A figura 4.1 resume esquematicamente as etapas de extração dos 8 protocolos *in house*.

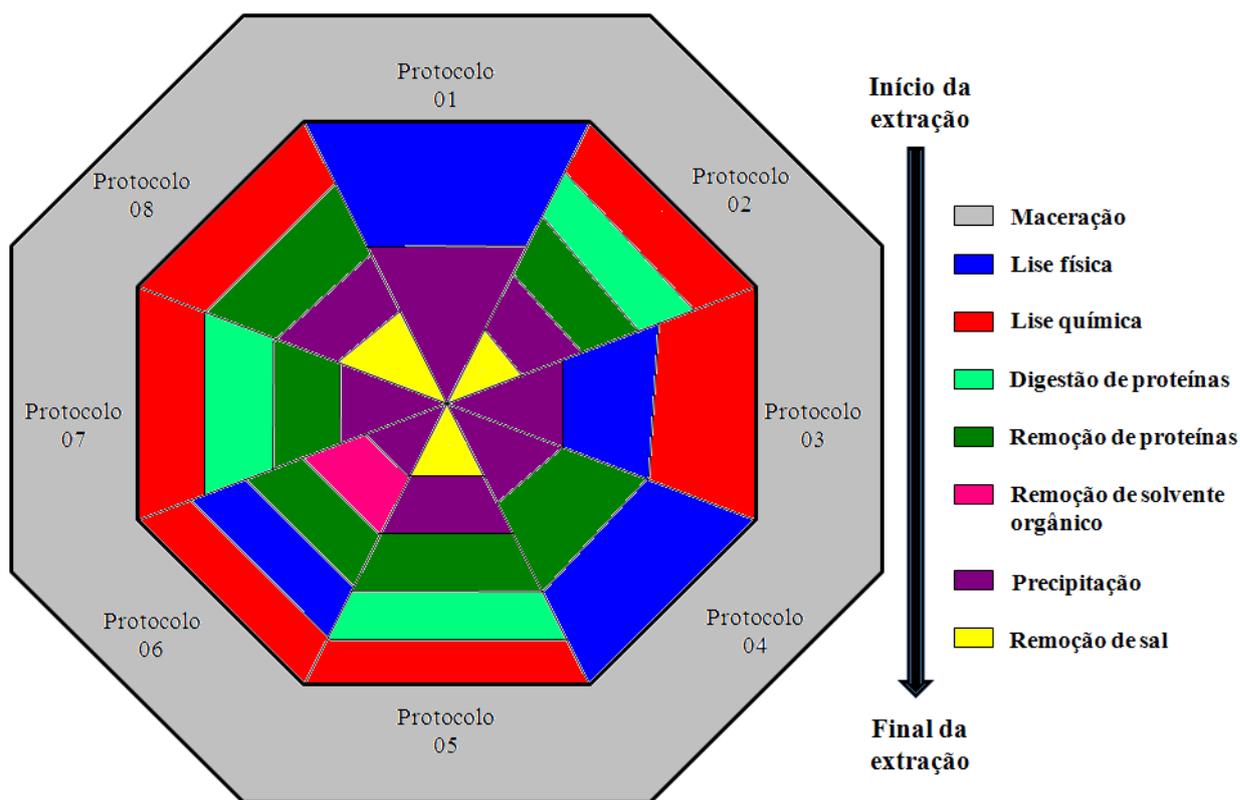


Figura 4.1: Estratégia de ação dos protocolos *in house*. Ordem do procedimento técnico seguido para a extração de DNA segundo os 8 protocolos *in house* selecionados.

Cinco dos 8 protocolos *in house* tinham como alvo de amplificação o DNA do *T. cruzi*, sendo que em 3 deles o alvo de amplificação foi uma seqüência de kDNA e nos outros 2 o DNA nuclear. Em todos os casos, a amostra biológica utilizada na extração consistiu em fezes de triatomíneos (Tabela 4.2).

Assim como no presente estudo, os protocolos 03 e 08 realizaram extração a partir de espécimes de artrópodes, respectivamente simulídeo e ácaro. Entretanto, o alvo de amplificação não foi o mesmo. Enquanto o protocolo 03 amplificou DNA de *Onchocerca volvulus*, no protocolo 08 o alvo de amplificação foi gene mitocondrial de *Dermanyssus gallinae*.

Diferentemente dos outros protocolos, o DNA extraído pelo protocolo desenvolvido por Aljanabi & Martinez (protocolo 05) não foi empregado na PCR. A extração foi realizada em amostras de planta, micélio, camarão e gafanhoto e o DNA extraído foi diretamente aplicado em gel de agarose para atestar a funcionalidade do método.

Tabela 4.2: Amostra e alvo de amplificação. O artigo científico de origem, a amostra biológica utilizada no processo de extração e o respectivo alvo de amplificação empregado originalmente em cada protocolo *in house* selecionado.

Protocolo	Amostra extraída	Alvo de amplificação
1. Breniere <i>et al.</i> 1992	Fezes de <i>Triatoma infestans</i> e sangue humano	Minicírculo do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>
2. Shikanai-Yasuda <i>et al.</i> 1996	Fezes de <i>Triatoma infestans</i>	DNA nuclear de <i>Trypanosoma cruzi</i>
3. Oskam <i>et al.</i> 1996	Espécimes de <i>Simulium ochraceum</i> e <i>Simulium metallicum</i>	DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>
4. Silber <i>et al.</i> 1997	Fezes de triatomíneo e sangue humano	DNA nuclear de <i>Trypanosoma cruzi</i>
5. Aljanabi & Martinez 1997	Folha de planta, micélio, músculo de camarão e músculo de gafanhoto	*
6. Vallejo <i>et al.</i> 1999	Material fecal e hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> e sangue de camundongo	Minicírculo do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>
7. Hamano <i>et al.</i> 2001	Fezes de <i>Triatoma infestans</i>	Minicírculo do kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>
8. Desloire <i>et al.</i> 2006	Espécimes de ácaros de aves	Gene mitocondrial 16S rRNA de <i>Dermanyssus gallinae</i>

*Não foi realizada amplificação das amostras no protocolo de Aljanabi & Martinez (1997). Os autores aplicaram as amostras extraídas diretamente em gel de agarose para verificar a funcionalidade do método de extração.

4.1.2. Levantamento dos kits de extração

Um segundo levantamento bibliográfico foi realizado, desta vez para a escolha de três diferentes kits comerciais.

Este novo levantamento consistiu na busca de artigos científicos publicados entre janeiro de 2002 e junho de 2009, nas três bases de dados utilizadas – PubMed, Lilacs e Scielo. O levantamento forneceu 1185 artigos para análise (Gráfico 4.1). PubMed foi a base de dados que forneceu o maior número de artigos no levantamento geral (993 artigos) e o descritor com o maior número de publicações foi o “*Trypanosoma cruzi* PCR” (509 artigos).

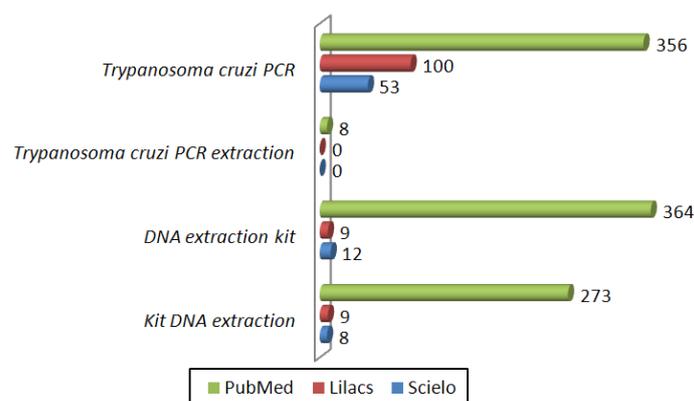


Gráfico 4.1: Artigos por base de dado e descritor. Quantidade de artigos obtidos em cada base de dados utilizada segundo cada um dos quatro descritores empregados.

Deste total de 1185 artigos, uma parte não foi analisada, pois o tema não se relacionava diretamente com a nossa abordagem de extração, como, por exemplo, artigos que utilizam tecido parafinado como amostra biológica, trabalham com RNA, utilizam somente métodos de extração *in house*, etc.

A partir da análise dos artigos relevantes ao tema almejado, verificamos um grande número de repetições dos artigos quando diferentes bases de dados eram usadas, ou mesmo quando descritores distintos foram aplicados (Tabela 4.3).

Todos os artigos obtidos na primeira busca (Base de dados: PubMed; descritor: *kit DNA extraction*) foram analisados, com exceção dos descartados. Na segunda busca (Base de dados: PubMed; descritor: *DNA extraction kit*) somente foram analisados os artigos que fossem relevantes e que não fossem comuns à busca anterior. Este procedimento foi realizado nas buscas subsequentes, com o intuito de descartar artigos já analisados nas buscas anteriores.

Tabela 4.3: Artigos comuns às bases de dados. Número de artigos analisados, comuns às buscas realizadas e de artigos não repetidos em cada busca.

Busca	Base de dado	Descritor	Total de artigos analisados	Artigos comuns às buscas anteriores	Total de artigos não repetidos
1 ^a	PubMed	<i>kit DNA extraction</i>	186	-	-
2 ^a	PubMed	<i>DNA extraction kit</i>	205	196	9
3 ^a	PubMed	<i>Trypanosoma cruzi PCR extraction</i>	3	2	1
4 ^a	PubMed	<i>Trypanosoma cruzi PCR</i>	53	1	52
5 ^a	Scielo	<i>kit DNA extraction</i>	9	9	0
6 ^a	Scielo	<i>DNA extraction kit</i>	9	9	0
7 ^a	Scielo	<i>Trypanosoma cruzi PCR extraction</i>	1	0	1
8 ^a	Scielo	<i>Trypanosoma cruzi PCR</i>	8	6	2
9 ^a	Lilacs	<i>kit DNA extraction</i>	8	2	6
10 ^a	Lilacs	<i>DNA extraction kit</i>	8	8	0
11 ^a	Lilacs	<i>Trypanosoma cruzi PCR extraction</i>	0	0	0
12 ^a	Lilacs	<i>Trypanosoma cruzi PCR</i>	8	8	0

Dentre um total de 63 fabricantes, os *kits* da empresa Qiagen foram os mais citados em todo o levantamento, totalizando 45% das citações (Gráfico 4.2); sendo também o referido fabricante com o maior número de *kits* comercializados (45 *kits*) que são utilizados pelos autores dos artigos resultantes do levantamento.

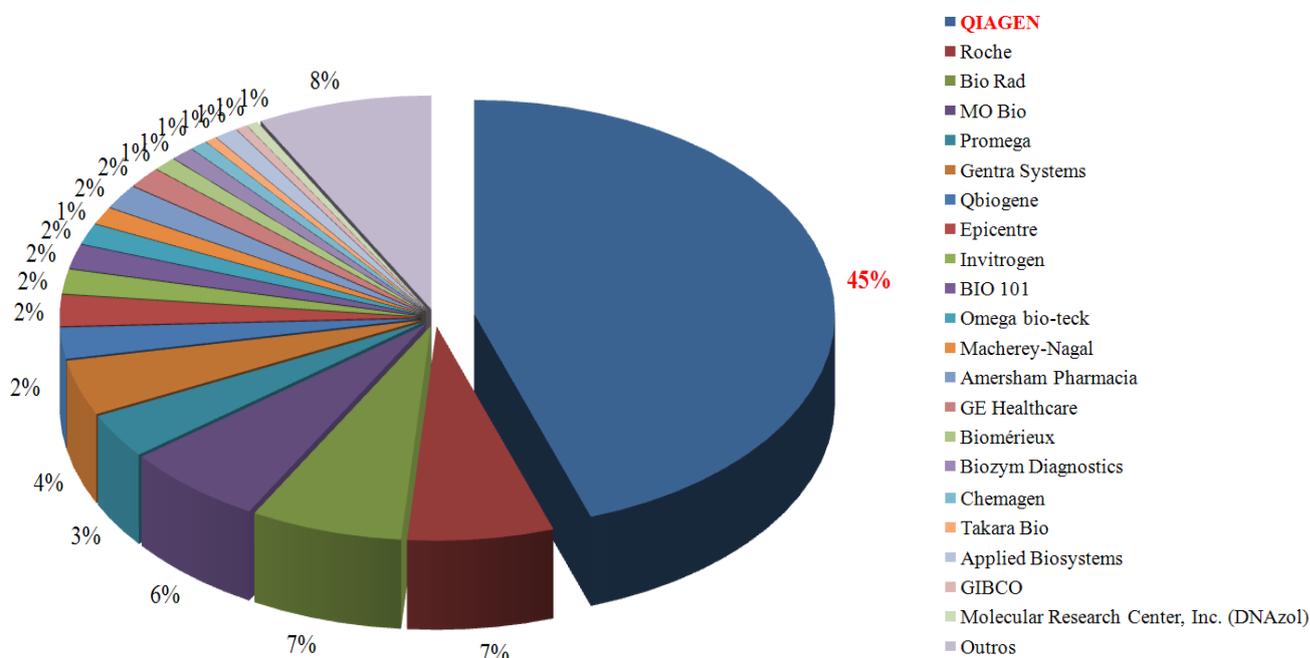


Gráfico 4.2: Fabricantes de kits mais citados em nosso levantamento bibliográfico. Representação gráfica das empresas fabricantes de kits comerciais de extração de DNA mais citadas no levantamento bibliográfico e suas respectivas porcentagens de utilização pelos autores dos artigos analisados.

Através de uma análise sistemática, verificamos que o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) foi o *kit* significativamente mais empregado nos dois primeiros critérios de seleção (1º- *kit* mais citado; 2º- *kit* mais empregado em comparação de métodos de extração), sendo o segundo mais citado no terceiro critério, “*kit* mais utilizado na extração a partir de artrópodes” (Gráfico 4.3). Por ter sido o mais citado foi selecionado pelo primeiro critério.

Para o critério “*kit* mais empregado em comparação de métodos de extração”, partimos para o segundo *kit* mais citado, após o *QIAamp DNA Mini Kit*, que foi o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*, também da Qiagen.

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) foi o *kit* com mais citações para o terceiro critério (“*kit* mais utilizado na extração a partir de artrópodes”). Entretanto, *DNeasy Blood*

and *Tissue Kit* utiliza a mesma tecnologia de extração que *QIAamp DNA Mini Kit*, diferenciando apenas pelo tipo de amostra para o qual cada *kit* é sugerido. Assim, optamos pelo terceiro *kit* mais citado, o *Quantum Prep Aquapure Genomic DNA Isolation Kit* (BioRad), visto que o segundo foi o *QIAamp DNA Mini Kit*, já selecionado pelo primeiro critério. Porém, o *kit Quantum Prep Aquapure Genomic DNA Isolation Kit* foi descontinuado. Por sugestão do fabricante, substituímos o mesmo por *Instagene Matrix* (Bio-Rad).

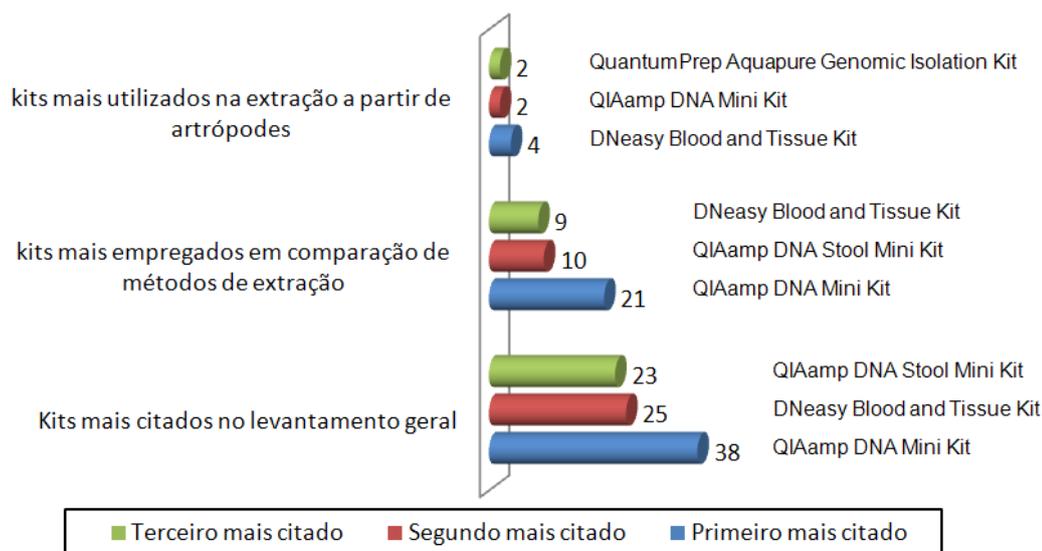
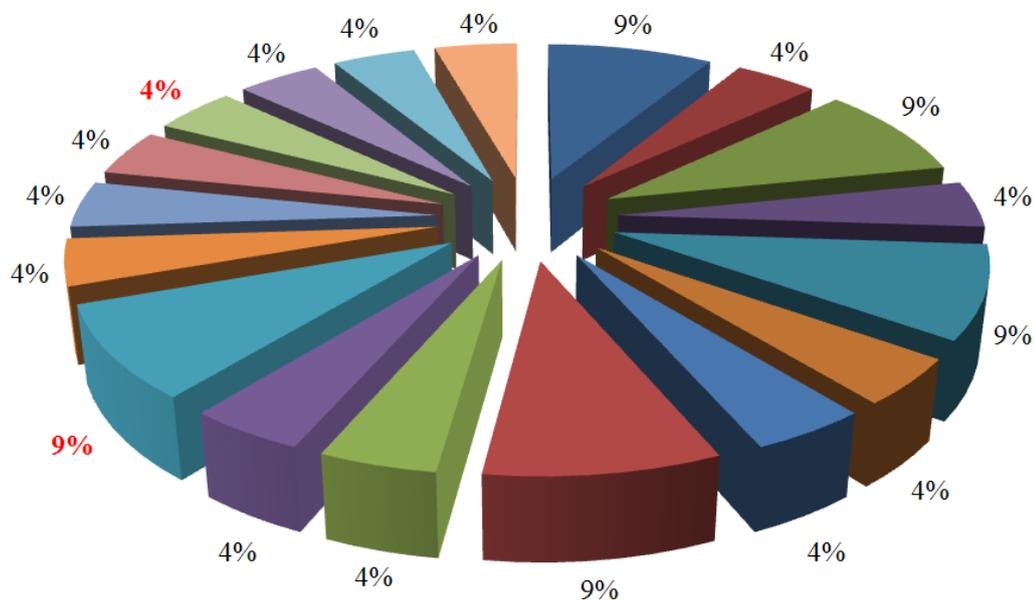


Gráfico 4.3: Kits mais citados segundo os três critérios de seleção. Organização dos 03 *kits* mais empregados dentro de cada critério de seleção, discriminando o número de artigos em que cada *kit* foi utilizado.

Após todas as considerações, selecionamos 03 *kits* comerciais a serem testados, segundo cada critério de seleção empregado, sendo eles: *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) para o 1º critério (levantamento geral), *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) para o 2º critério (artigos de comparação de métodos de extração) e *Instagene Matrix* (Bio-Rad) para o 3º critério (artigos que realizam extração a partir de artrópodes). A Tabela 4.4 descreve o princípio de ação e os tipos de amostras que são recomendadas para cada *kit*.

O *DNAzol Reagent* foi 12º protocolo escolhido. Este preparado comercial é muito utilizado em extrações de DNA de protozoários e também obteve um bom número de citações no critério 3, extração a partir de artrópodes, sendo este comercializado por 02 fabricantes distintos (Gráfico 4.4).



- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- QIAamp DNA Extraction Kit (Qiagen)
- DNeasy kit (Qiagen)
- Nucleon DNA Extraction (Amersham Pharmacia)
- Chelex-100 (Bio-Rad)
- **DNazol Reagent (Gibco)**
- NucleoSpin blood QuickPure Kit (Macherey-Nagal)
- **DNazol (Invitrogen)**
- PrepGEM (ZyGEM)
- DNeasy Tissue Kit (Qiagen)
- Dneasy Purification System kit (Qiagen)
- Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems)
- Quantum Prep Aquapure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad)
- EZNA Kit (Omega Bioteck)
- NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagal)
- Charge-Switch gDNA Tissue Kit (Invitrogen)
- Gentra PuregeneTM tissue kit (Biozym Diagnostics)
- Maestro Genomic Kit (Eurobio-Labtek)

Gráfico 4.4: DNazol Reagent. Porcentagem de citações do preparado comercial *DNazol Reagent*, segundo o critério de seleção “*kit* mais utilizado na extração a partir de artrópodes”.

Tabela 4.4: Amostra biológica recomendada e fundamento de ação dos kits testados. Descrição dos tipos de amostras recomendadas para emprego de cada um dos 03 kits selecionados e do modo de funcionamento dos mesmos na obtenção do DNA.

Tipo de amostra	Kit de extração		
	<i>QIAamp DNA Stool Mini Kit</i> (Qiagen)*	<i>QIAamp DNA Mini Kit</i> (Qiagen)**	<i>Instagene Matrix</i> (BioRad)***
Sangue total			
Plasma			
Soro			
Leucócito			
Linfócito			
Mancha de sangue seco			
Fluidos corporais			
Swabs			
Tecido			
Células de cultura			
Tecido animal			
Bactéria			
Fezes (Detecção de patógenos)			
Fezes (Análise de DNA humano)			

 Tipo de amostra recomendada pelo fabricante para extração com o kit

*Utiliza tampão de lise que promove a ruptura da membrana e expõe o ácido nucléico. Este se ligará à membrana da coluna por afinidade, promovendo uma separação dos componentes, fundamento da cromatografia. A remoção dos contaminantes é feita empregando tampões de lavagem, sendo o DNA obtido através da utilização de tampão para eluição. Adicionalmente, o *Stool Mini Kit* emprega o *InhibitEX Tablets*, que tem como finalidade remover inibidores da PCR e substâncias que comprometem a integridade do DNA.

**Assim como o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*, este kit também utiliza tampão de lise para ruptura da membrana e exposição do ácido nucléico, que também se ligará à membrana da coluna por afinidade, promovendo uma separação dos componentes, fundamento da cromatografia. A lavagem com tampão é também empregada para a remoção dos contaminantes e o DNA é obtido por eluição com tampão. A diferença é que o *Stool Mini Kit* emprega o *InhibitEX Tablets*, componente ausente nas extrações com o *QIAamp DNA Mini Kit*.

***O *InstaGene Matrix* consiste em uma solução com esferas microscópicas às quais os cátions divalentes, que atuam como catalizadores de enzimas na degradação da sequência do DNA, ligam-se. A ruptura da membrana celular é promovida por uma simples etapa de fervura na presença da matriz. O produto da lise, que interfere no processo de amplificação pela PCR, é adsorvido pelas esferas. Diferente da membrana, as esferas apresentam maior área de superfície, possibilitando a ligação de um maior número de moléculas.

As referências e as estratégias utilizadas pelos 03 *kits* selecionados e pelo *DNAzol Reagent* podem ser visualizados na Tabela 4.5.

Assim como os protocolos *in house*, os *kits* e o *DNAzol Reagent* foram testados com as amostras reconstituídas de triatomíneo com macerado de tubo digestivo. Estes resultados também foram avaliados segundo parâmetros previamente estabelecidos.

Tabela 4.5: Protocolos dos kits e preparado comercial selecionados para avaliação. Referência dos *kits* e do *DNAzol Reagent* e uma breve descrição da estratégia utilizada para a extração de DNA por cada protocolo.

Protocolo	Referência do kit/preparado comercial	Estratégia de extração
09	<i>QIAamp DNA Stool Mini Kit</i> Marca Qiagen Cat. 51504	Lise celular química pela ação de tampão de lise; remoção de inibidores pela adsorção em matriz de <i>InhibitEX</i> ; digestão enzimática de proteínas com proteinase K e tampão AL; precipitação do DNA em solução com etanol absoluto; ligação do DNA em coluna de sílica; remoção de inibidores pela lavagem com tampões AW1 e AW2, eluição do DNA ligado à coluna com tampão AE.
10	<i>QIAamp DNA Mini Kit</i> Marca Qiagen Cat. 51306	Lise celular química pela ação de tampão de lise e tampão ATL; digestão enzimática de proteínas com proteinase K e tampão AL; precipitação do DNA em solução com etanol absoluto; ligação do DNA em coluna de sílica; remoção de inibidores pela lavagem com tampões AW1 e AW2, eluição do DNA ligado à coluna com água ultra-pura.
11*	<i>InstaGene Matrix</i> Marca Bio-Rad Cat. 732-6030	Lise celular química pela ação de PBS; lise celular física (térmica) por aquecimento a 100°C; ligação dos inibidores à resina formada pelo <i>InstaGene Matrix</i> ; inativação térmica de enzimas que degradam DNA; precipitação da matriz ligada a inibidores por centrifugação.
12	<i>DNAzol Reagent</i> Marca Invitrogen Cat. 10503-27	Lise celular química pela ação de <i>DNAzol</i> ; precipitação do DNA em solução com etanol absoluto; lavagem com etanol 75% para remoção do excesso de sal.

* Utilizado em substituição ao *Quantum Prep Aquapure Genomic DNA Isolation Kit* (Marca BIO-RAD, cat. 732-6340), uma vez que este foi descontinuado. O próprio fabricante sugeriu o emprego do *InstaGene Matrix* em substituição ao *kit* descontinuado.

A figura 4.2 resume esquematicamente as etapas de extração dos *kits* e preparado comerciais.

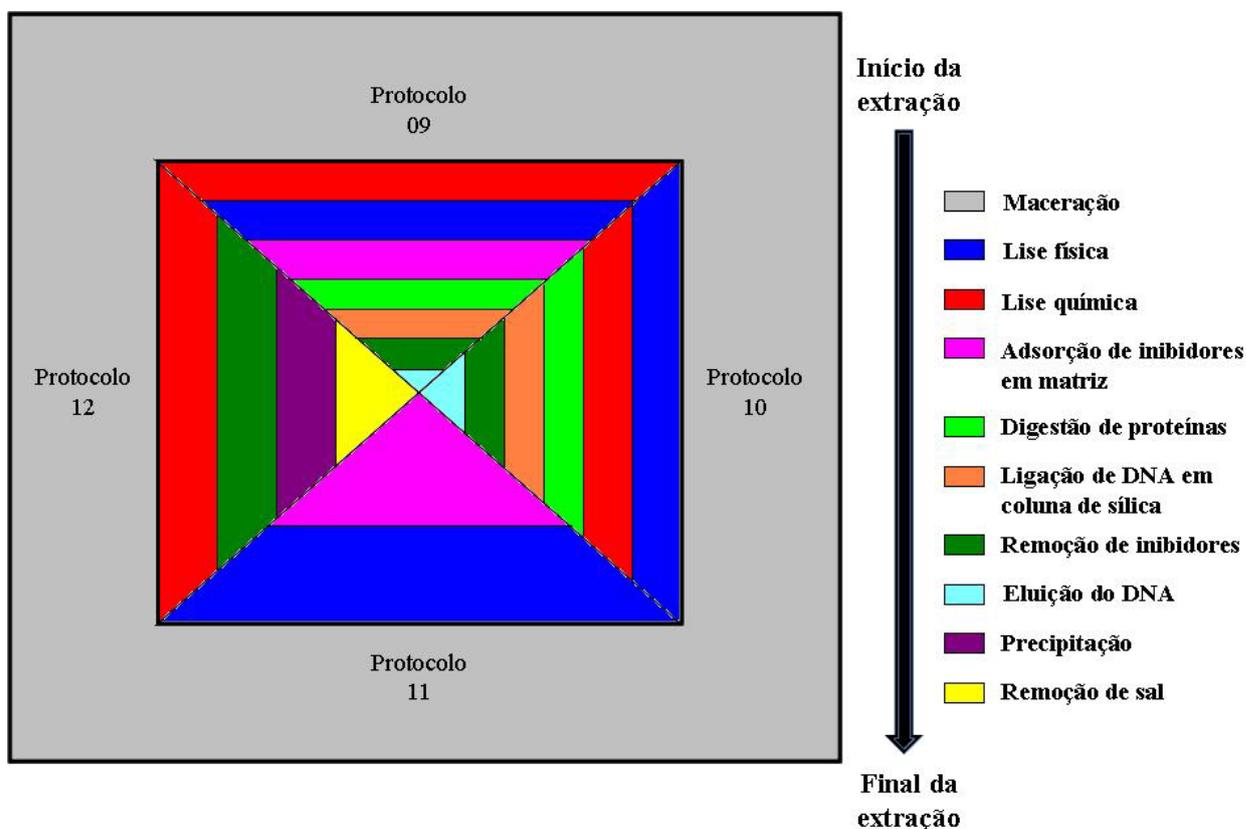


Figura 4.2: Estratégia de ação dos *kits* e preparado comerciais. Ordem do procedimento técnico seguido para a extração de DNA segundo os *kits* e preparado comerciais.

4.2. Avaliação do desempenho dos protocolos de extração

A avaliação da performance de cada um dos 12 protocolos testados foi realizada através da análise de parâmetros previamente definidos. Cada parâmetro teve por finalidade analisar características intrínsecas ao método, evidenciando a eficiência segundo cada item.

Os parâmetros avaliados foram estabelecidos de acordo com as características de maior importância na escolha de um método de extração, de modo que os resultados obtidos sejam satisfatórios, confiáveis e reprodutíveis.

Concentração de DNA extraído, grau de pureza do DNA obtido e amplificação da região variável do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* pela PCR, reprodutibilidade, praticidade e custo foram avaliados, dentro de cada protocolo testado, com o intuito de identificar o método de extração mais eficiente na busca do DNA de um protozoário em amostras de seu vetor de transmissão. A obtenção de um DNA de qualidade (puro e recuperado na sua

totalidade) deveria ser a meta principal de todo protocolo de extração elaborado, pois, independente dos estudos moleculares, essa etapa tem importância no que diz respeito à capacidade de um método de biologia molecular em identificar amostras positivas, sem a ocorrência de resultados falso-positivos.

4.2.1. Concentração de DNA

Para avaliar a concentração de DNA obtido pela extração dos protocolos testados, foi realizada a quantificação, através de espectrofotômetro, de cada amostra extraída.

A Tabela 4.6 apresenta a média de concentração resultante das amostras extraídas por cada protocolo (em exemplares de ninfas de 4º estágio e adultos), de acordo com as diluições de 1, 10 e 100 células de *T. cruzi*.

Além da média aritmética, valores de mediana e intervalo de confiança de 95% (IC95%) também são relatados.

A média foi calculada entre as 15, 10 e 10 amostras testadas para as diluições de 1, 10 e 100 células de *T. cruzi*, respectivamente, com a finalidade de representar o valor médio de concentração de DNA obtido em cada protocolo.

Tabela 4.6: Análise da concentração de DNA. Média, mediana e intervalo de confiança 95% (IC95%) obtidos a partir da estimativa, em espectrofotômetro, da concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$).

Estágio evolutivo	Diluição	Análise	Protocolos											
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1 parasita (15 amostras)	Mediana		-46,43	0,41	0,37	0,22	1,95	2,45	1,35	10,93	0,35	0,28	0,28	0,41
	Média		-53,32	0,40	1,82	0,22	3,03	6,05	1,04	11,93	0,47	0,32	4,76	0,46
	IC95%*		27,60-102,57	0,32-0,49	0,04-3,60	0,22-0,66	1,56-4,51	2,10-10,00	0,79-1,77	6,41-17,45	0,17-0,77	0,23-0,41	-7,49-22,24	0,33-0,60
Ninfa 4º estágio	10 parasitas (10 amostras)	Mediana	-31,24	0,27	0,28	0,12	2,00	4,89	0,79	5,47	0,29	0,20	0,07	0,46
	Média		-56,00	0,31	0,52	0,27	2,03	5,68	0,84	7,17	0,29	0,25	0,31	0,80
	IC95%		-0,36-111,86	0,16-0,47	0,16-0,81	-0,07-0,67	1,34-2,72	3,12-8,24	0,61-1,79	3,03-11,31	0,23-0,35	0,10-0,39	-0,04-0,84	0,25-1,35
100 parasitas (10 amostras)	Mediana		-154,68	0,50	0,83	0,13	0,54	1,27	1,24	10,38	0,41	0,28	-0,32	0,39
	Média		-158,15	0,61	1,38	0,12	1,10	2,85	0,69	12,40	0,54	0,33	-0,35	0,45
	IC95%		-455,23-646,52	0,22-1,00	0,07-3,01	0,08-0,32	0,10-2,11	0,36-5,34	0,96-1,91	4,18-20,61	0,30-0,78	0,18-0,48	0,02-0,51	0,30-0,61
1 parasita (15 amostras)	Mediana		93,13	49,35	0,35	1,47	8,18	3,63	2,61	24,31	0,84	0,31	0,02	0,36
	Média		4,77	37,99	0,56	2,29	7,60	5,08	1,99	28,33	1,02	0,33	1,46	0,48
	IC95%		90,42-268,20	37,80-72,21	0,02-1,52	1,23-3,35	5,77-11,93	2,52-7,65	1,87-7,03	18,91-37,75	0,67-1,36	0,25-0,40	0,11-8,02	0,30-0,66
Adulto	10 parasitas (10 amostras)	Mediana	-1,03	25,36	0,21	2,30	8,48	7,98	3,02	27,17	1,26	0,39	0,63	0,42
	Média		-1,03	25,36	0,21	2,30	8,48	7,98	3,02	27,17	1,26	0,39	0,63	0,42
	IC95%		36,59-374,68	13,78-65,08	-0,48-2,29	1,36-5,91	6,97-12,96	5,24-13,39	2,16-4,81	13,57-51,63	0,82-1,77	0,12-1,10	0,43-1,13	0,21-1,09
100 parasitas (10 amostras)	Mediana		-60,96	28,27	0,27	1,14	11,10	3,22	0,92	29,96	1,27	0,40	-0,90	0,61
	Média		-112,27	43,74	1,12	1,45	8,77	3,77	-2,11	39,54	1,44	0,35	-0,41	-0,97
	IC95%		73,89-245,14	7,57-79,90	-1,01-3,55	0,81-2,09	6,57-19,81	2,19-5,34	0,88-5,27	22,00-57,08	0,87-1,99	0,25-0,46	-28,34-33,85	0,44-1,25

*Intervalo de confiança de 95% (IC95%) - faixa de variação dos valores esperados num experimento com um determinado protocolo e diluição.

Para completar a análise, calculamos a mediana, segundo o mesmo procedimento adotado para a média. A vantagem da mediana em relação à média é que aquela não é tão sensível aos dados. Enquanto os valores de média podem variar muito entre os protocolos, dependendo do intervalo entre o menor e o maior valor, a mediana não é influenciada pelos valores extremos, já que considera o valor central.

Quando os valores de média aproximam-se da mediana constata-se uma distribuição de dados simétrica, o que indica que a variação entre os dados obtidos é mínima. Este caso pode ser observado em quase todos os protocolos, indicando que a extração não teve grande variação entre as amostras.

A maioria dos protocolos apresentou média maior que a mediana, ou seja, apresentam valores que são muito maiores que os restantes. O protocolo 07, entretanto, apresenta um maior número de médias mais baixas que a mediana (observações muito menores que as restantes).

Os valores de média e mediana obtidos nas extrações de 10 parasitas em amostras de adultos são idênticos, mostrando que há uma distribuição simétrica entre os dados de concentração.

O intervalo de confiança de 95% indica que a maior parte dos resultados encontra-se dentro da faixa esperada, com exceção do protocolo 01, no qual apenas os valores da concentração de 1 célula de *T. cruzi* nas amostras de adultos correspondem à faixa de variação desta diluição.

4.2.2. Grau de pureza

O grau de pureza das amostras foi estimado por uma medida espectrofotométrica, que consistiu no cálculo da relação entre os valores obtidos para DNA (filtro de 260 nm) e proteína (filtro de 280 nm). Neste caso, amostras cujos valores encontram-se entre 1,8 e 2,0 foram consideradas puras.

A média, a mediana e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) são apresentados na Tabela 4.7. Além dos valores citados anteriormente, para este parâmetro foi calculada a porcentagem de valores entre 1,8 e 2,0.

Tabela 4.7: Análise do grau de pureza do DNA. Porcentagem dos valores entre 1,8 e 2,0, média, mediana e intervalo de confiança 95% (IC95%) obtidos a partir da estimativa, em espectrofotômetro, da relação de pureza do DNA.

Estágio evolutivo	Diluição	Análise	Protocolos											
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1 parasita (15 amostras)		% 1,8-2,0*	0	13%	0	0	0	7%	0	27%	13%	0	0	0
		Mediana	0,51	1,40	0,69	1,00	1,57	1,45	1,07	1,68	1,50	1,14	0,51	1,18
		Média	0,59	1,47	0,75	1,21	1,56	1,52	1,02	1,63	1,46	1,15	0,56	1,23
		IC95%**	0,51-0,66	1,31-1,63	0,68-0,82	0,66-1,77	1,52-1,61	1,41-1,62	0,86-1,18	1,46-1,80	1,29-1,62	1,08-1,22	0,47-0,65	1,13-1,33
Ninfa 4º estádio	10 parasitas (10 amostras)	% 1,8-2,0	0	10%	0	7%	0	10%	0	30%	10%	0	0	0
		Mediana	0,53	1,39	0,68	0,99	1,34	1,58	0,83	1,56	1,37	1,20	0,64	1,09
		Média	0,56	1,46	0,71	1,00	1,35	1,59	0,92	1,56	1,47	1,19	0,64	1,11
		IC95%	0,48-0,64	1,30-1,62	0,65-0,77	0,61-1,39	1,29-1,40	1,49-1,69	0,67-1,17	1,27-1,85	1,31-1,64	1,10-1,28	0,57-0,72	1,05-1,16
100 parasitas (10 amostras)		% 1,8-2,0	0	0	0	10%	0	0	0	30%	10%	7%	0	0
		Mediana	0,48	1,37	0,76	1,25	1,21	1,44	1,12	1,57	1,34	1,19	0,50	1,14
		Média	0,52	1,35	0,77	1,48	1,29	1,37	1,03	1,49	1,41	1,27	0,57	1,15
		IC95%	0,44-0,59	1,20-1,50	0,66-0,87	0,89-2,06	1,10-1,47	1,19-1,54	0,73-1,33	1,16-1,81	1,23-1,58	1,07-1,48	0,46-0,69	1,09-1,21
1 parasita (15 amostras)		% 1,8-2,0	0	0	0	0	7%	7%	0	27%	20%	0	0	0
		Mediana	0,64	1,16	0,66	1,38	1,59	1,66	1,19	2,04	1,50	1,20	0,55	1,09
		Média	0,66	1,00	0,65	1,32	1,41	1,59	1,23	1,95	1,53	1,25	0,64	1,11
		IC95%	0,56-0,76	0,85-1,15	0,60-0,70	1,21-1,44	1,16-1,65	1,49-1,70	0,71-1,75	1,84-2,07	1,36-1,66	1,17-1,34	0,52-0,75	1,07-1,16
Adulto	10 parasitas (10 amostras)	% 1,8-2,0	0	20%	0	10%	20%	20%	0	20%	20%	0	0	0
		Mediana	0,55	1,13	0,63	1,37	1,60	1,75	0,84	1,85	1,58	1,22	0,67	1,17
		Média	0,64	1,32	0,65	1,29	1,52	1,70	0,86	1,77	1,60	1,24	0,73	1,28
		IC95%	0,49-0,80	1,04-1,59	0,58-0,73	1,01-1,56	1,32-1,71	1,57-1,83	0,61-1,11	1,55-1,99	1,45-1,75	1,11-1,38	0,58-0,87	1,05-1,50
100 parasitas (10 amostras)		% 1,8-2,0	0	0	0	0	50%	10%	0	30%	20%	10%	0	0
		Mediana	0,54	1,27	0,67	1,31	1,81	1,67	0,69	1,88	1,76	1,20	0,51	1,12
		Média	0,58	1,27	0,69	1,27	1,57	1,61	0,85	1,75	1,66	1,25	0,55	1,04
		IC95%	0,49-0,68	1,11-1,42	0,61-0,77	1,17-1,37	1,16-1,99	1,49-1,75	0,44-1,25	1,48-2,01	1,49-1,83	1,05-1,45	0,42-0,69	0,77-1,31

*Porcentagem relativa ao número de amostras que apresentaram resultados dentro da faixa ideal de pureza estabelecida como entre 1,8 e 2,0.

**Intervalo de confiança de 95% (IC95%) - faixa de variação dos valores esperados num experimento com um determinado protocolo e diluição.

Verificamos que o protocolo 08 apresenta as maiores porcentagens de valores entre 1,8 e 2,0, indicando ser o protocolo que gera um maior número de amostras livres de proteínas, em relação aos demais 11 protocolos testados. O protocolo 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*) foi o segundo protocolo com as maiores porcentagens de valores entre 1,8 e 2,0. Apesar das porcentagens deste *kit* corresponderem a valores de 20% ou menos, amostras puras foram obtidas em ambos os estádios empregados, assim como nas três diluições de parasitas.

Por outro lado, os protocolos 01, 03, 07, 11 e 12 foram os que obtiveram os piores desempenhos, visto que nenhuma amostra extraída por eles apresentou valor dentro da relação desejada.

Os demais protocolos (02, 04, 05, 06 e 10) tiveram resultados intermediários, com valores de porcentagem de 20% ou menos, porém com nenhuma amostra pura em algumas diluições.

A análise comparativa entre os valores de média e mediana do grau de pureza indica uma distribuição simétrica, tanto nos diferentes estádios, quanto nas 03 diluições.

De acordo com o IC95% calculado, é possível notar que apenas 03 ocorrências englobam os valores desejados: protocolo 04 (ninfas; diluição de 100 parasitas) e protocolo 08 (adulto; diluições de 1 e 100 parasitas).

Os demais resultados de IC95% não compreendem a faixa de grau de pureza desejada. Entretanto, o protocolo 08 é o que mais se aproxima desses resultados, nas diluições de 1, 10 e 100 parasitas em ninfas e 10 parasitas em adultos.

O p-valor foi calculado para demonstrar se houve diferença significativa no grau de pureza obtido na extração entre os dois estádios evolutivos. Essa diferença pode ser observada nos protocolos 01, 02, 03, 06, 08 e 09 (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Análise comparativa entre estádios evolutivos. Teste de diferença de médias para verificar diferenças estatisticamente significativas entre ninfa e adultos, desconsiderando a diluição.

Protocolo	Média de ninfas	Média de adultos	p-valor*
01	0,56	0,64	0,04
02	1,43	1,17	<0.01
03	0,74	0,66	<0.01
04	1,23	1,30	0,63
05	1,42	1,48	0,43
06	1,50	1,63	<0.01
07	1,00	1,02	0,88
08	1,57	1,84	<0.01
09	1,45	1,58	0,03
10	1,20	1,25	0,26
11	0,59	0,64	0,25
12	1,17	1,14	0,51

*p-valor <0.05 indica os protocolos em que a diferença entre amostras de ninfas e adultos foi significativa do ponto de vista estatístico.

4.2.3. Reação em cadeia da polimerase

Outro parâmetro de sensibilidade avaliado foi a capacidade de um protocolo em amplificar uma sequência de 330 pb da região variável do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*. A referida amplificação foi obtida pela técnica da PCR, após extração segundo os 12 protocolos testados.

Como resultado desta avaliação, as amostras extraídas e amplificadas foram aplicadas em géis de agarose, para verificação da presença/ausência de bandas.

Cada gel foi composto por um marcador de peso molecular seguido do controle da reação, controle negativo de triatomíneo, controles positivos de 1, 10 e 100 parasitas, 13 amostras da diluição de 1 parasita, 10 amostras da diluição de 10 e 10 amostras da diluição de 100. No último *slot* foi aplicado o controle positivo de DNA purificado de *T. cruzi*.

Devido ao tamanho do gel, apenas 13 amostras da diluição de 1 parasita foram aplicadas nos géis. As amostras 14 e 15 foram aplicadas em um gel a parte, para verificação da presença/ausência de bandas.

As fotografias dos géis contendo os perfis eletroforéticos dos protocolos de pior e melhor rendimento, além daquele com rendimento intermediário, podem ser visualizadas nas Figuras 4.3 a 4.9.

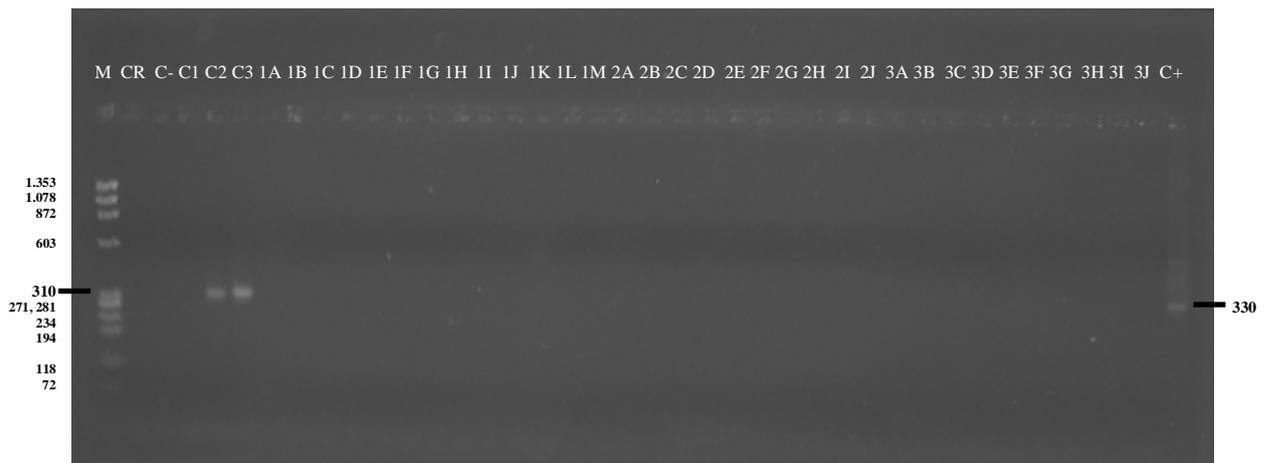


Figura 4.3: Gel de ninfas de *Rhodnius brethesi* do Protocolo 01. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 01 (modificado de Breniere *et al.*, 1992), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*.

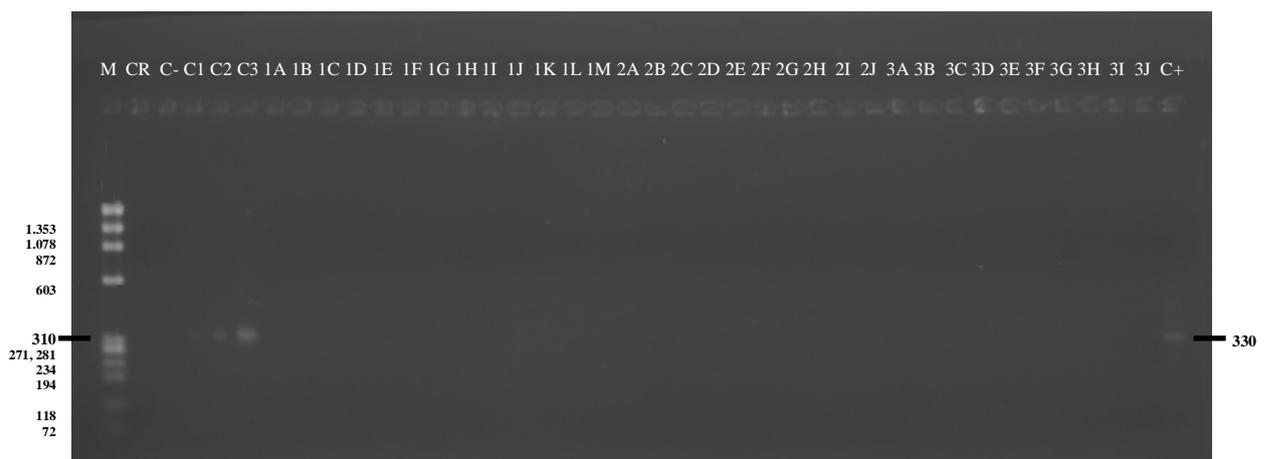


Figura 4.4: Gel de adultos de *Rhodnius brethesi* do Protocolo 01. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de adultos de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 01 (modificado de Breniere *et al.*, 1992), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*.

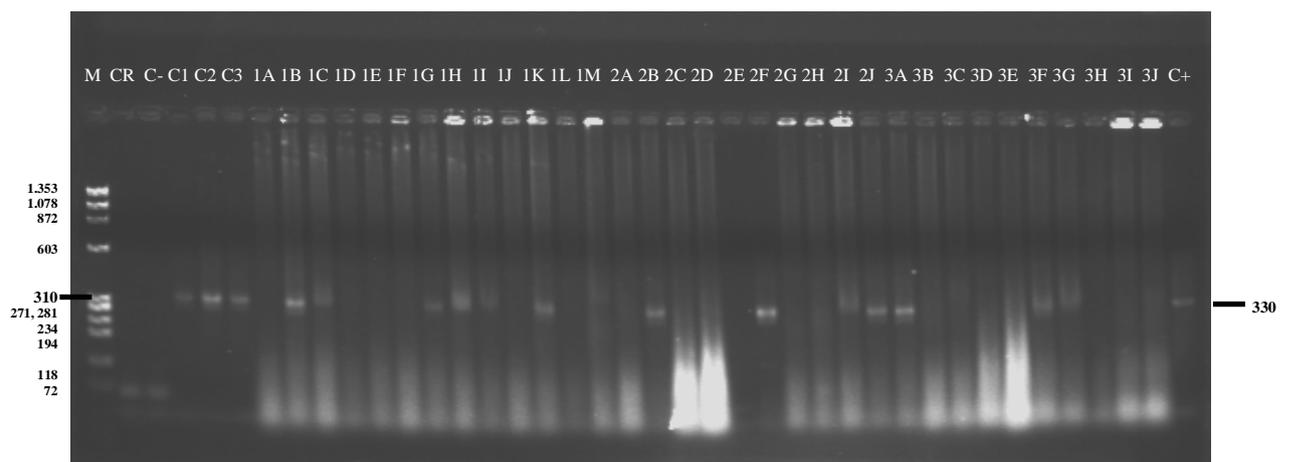


Figura 4.5: Gel de ninfas de *Rhodnius brethesi* do Protocolo 08. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 01 (modificado de Desloire *et al.*, 2006), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*.

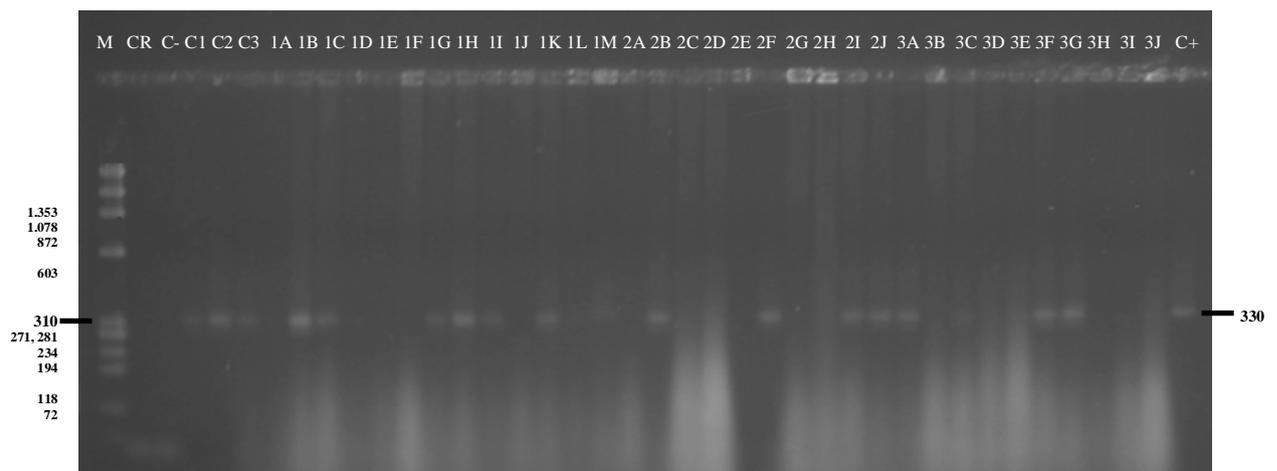


Figura 4.6: Gel de adultos de *Rhodnius brethesi* do Protocolo 08. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de adultos de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 08 (modificado de Desloire *et al.*, 2006), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*.

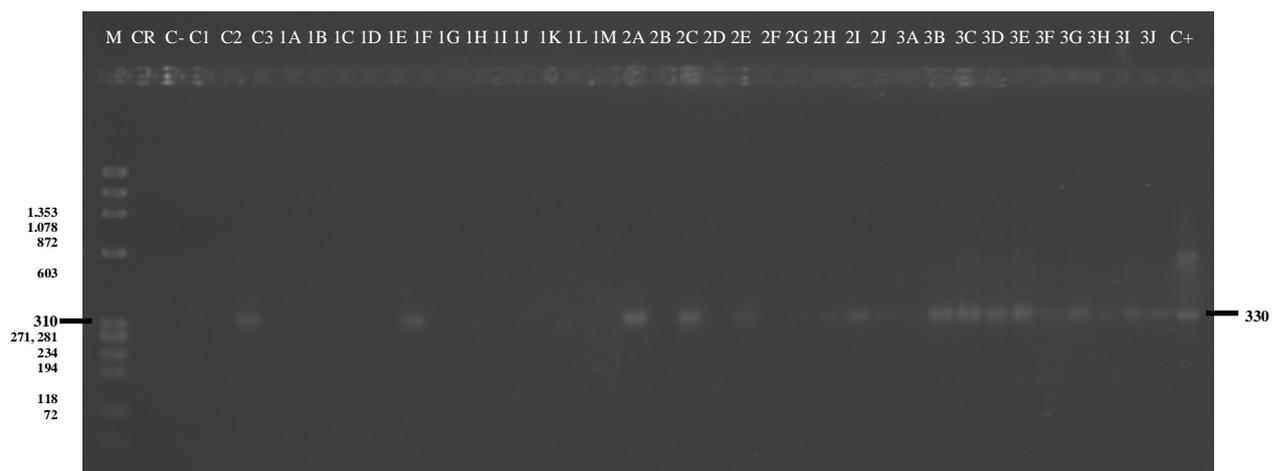


Figura 4.7: Gel de ninfas de *Rhodnius brethesi* do Protocolo 09. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit* - Qiagen), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*.

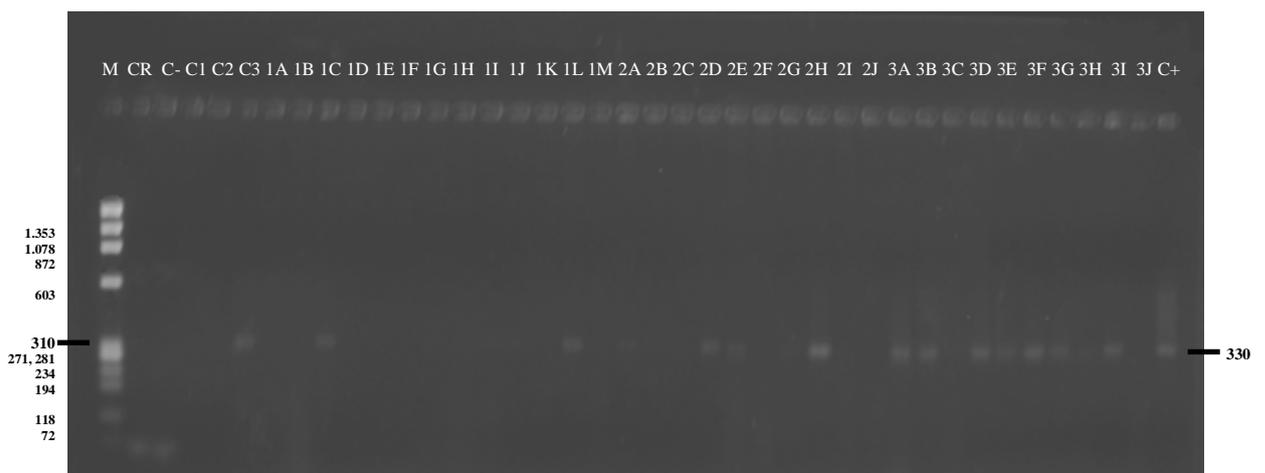


Figura 4.8: Gel de adultos de *Rhodnius brethesi* do Protocolo 09. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de adultos de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit* - Qiagen), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*.

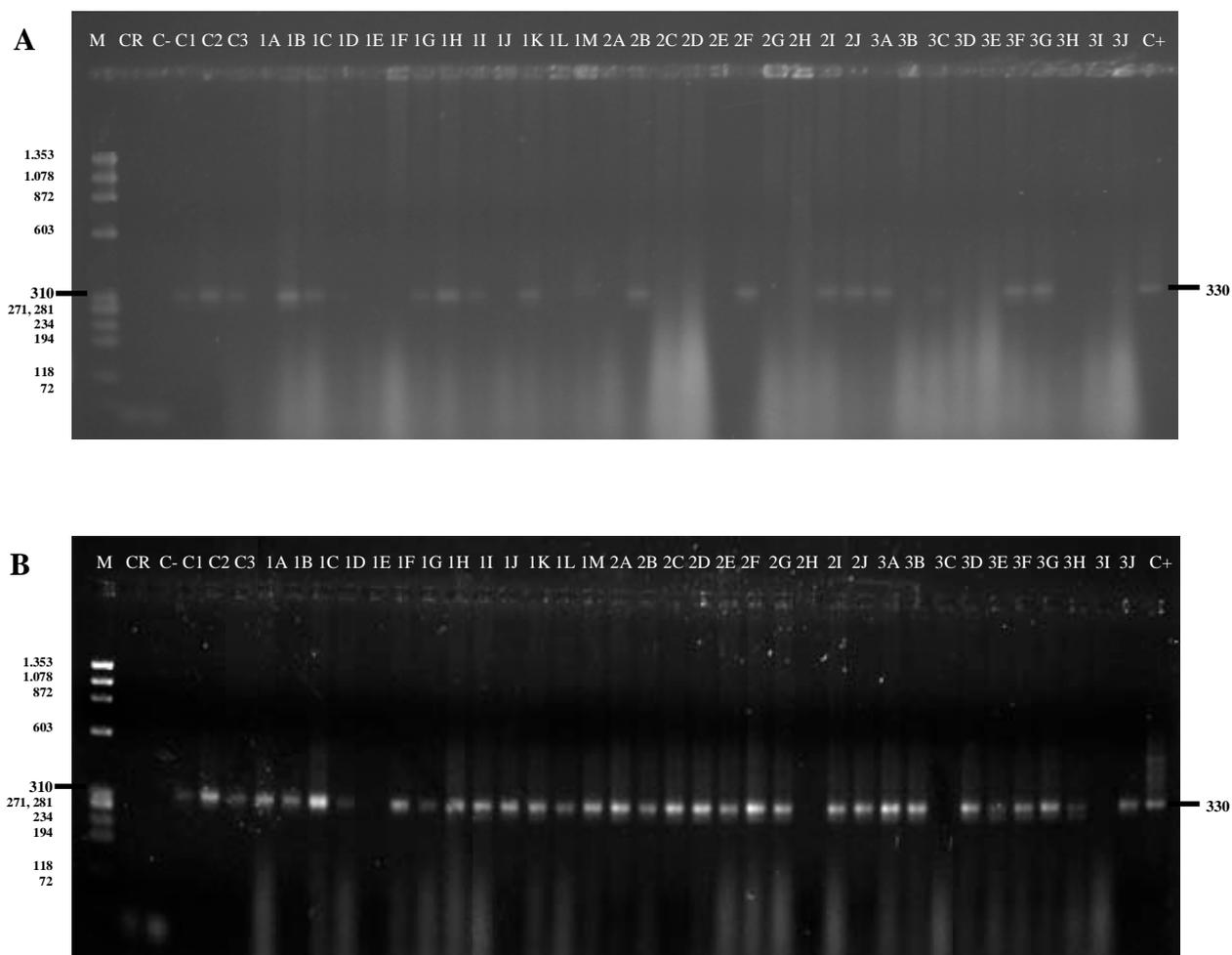


Figura 4.9: Emprego de dois métodos de coloração distintos: brometo de etídeo e Gel Red®.

Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*, obtidos após extração de amostras de adultos de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 08 (modificado de Desloire *et al.*, 2006), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C1: Controle positivo de cultura de 1 parasita; C2: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; C3: Controle positivo de cultura de 100 parasitas; 1A-1M: Amostras de 1 parasita (13 amostras); 2A-2J: Amostras de 10 parasitas (10 amostras); 3A-3J: Amostras de 100 parasitas (10 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*. **A:** Gel corado em brometo de etídeo. **B:** Gel corado em Gel Red®.

A figura 4.9 evidencia dois géis corados em diferentes corantes. É possível notar que há diferença na percepção do número de amostras positivas, sendo este maior quando a coloração empregada era o Gel Red®. As amostras aplicadas em ambos os géis foram as mesmas, tornando possível a comparação entre os corantes.

A revelação de bandas de 330 pb foi possível em todos os protocolos, exceto no protocolo 01, tanto nas amostras de ninfas quanto nas de adultos, nas três diluições realizadas: 1, 10 e 100 parasitas.

Como resultado das fotografias apresentadas, foi possível analisar o número de amostras positivas (Tabela 4.9) nos 12 protocolos.

Tabela 4.9: Número de amostras positivas. Número de amostras positivas obtidas nas diluições de 1, 10 e 100 parasitas em amostras de ninfas e adultos, após amplificação, visualizadas em gel de agarose.

Protocolo	1 parasita		10 parasitas		100 parasitas	
	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto
01	0/15	0/15	0/10	0/10	0/10	0/10
02	2/15	0/15	1/10	0/10	5/10	1/10
03	1/15	1/15	5/10	2/10	7/10	2/10
04	0/15	0/15	3/10	0/10	10/10	0/10
05	0/15	0/15	7/10	0/10	6/10	1/10
06	0/15	0/15	2/10	1/10	5/10	5/10
07	1/15	0/15	2/10	0/10	6/10	3/10
08	7/15	6/15	4/10	4/10	3/10	4/10
09	2/15	6/15	6/10	6/10	10/10	8/10
10	0/15	0/15	0/10	0/10	0/10	3/10
11	1/15	0/15	2/10	0/10	8/10	0/10
12	4/15	3/15	4/10	7/10	6/10	10/10

Os melhores resultados de amplificação foram obtidos pelos protocolos 09, 12 e 08, com 54% (38/70), 49% (34/70) e 40% (28/70) de amostras positivas, respectivamente, desconsiderando o estágio evolutivo e a diluição de *T. cruzi*.

Considerando apenas os estádios evolutivos, o total de amostras que amplificaram bandas de 330 pb, extraídas pelos 12 protocolos, foi maior para ninfas, com 31,7% (133/420) de amostras positivas, enquanto apenas 17,4% (73/420) das amostras de adultos foram amplificadas.

Em relação às diluições, amostras com 100 parasitas, independente do estágio do triatomíneo, tiveram a maior porcentagem de positividade com 43% (103/240), seguidas das

diluições de 10, com 24% (56/240), e 1 parasita, com 10% (34/360) de amostras amplificadas.

Para verificar a existência de diferença estatística significativa nos resultados dos protocolos 08 e 09 foi calculado o p-valor através do teste exato de Fisher (Tabela 4.10). Devido ao pequeno número amostral o teste exato de Fisher foi empregado em substituição ao teste de qui-quadrado.

Tabela 4.10: Análise comparativa entre os protocolos 08 e 09. Teste exato de Fisher para verificar diferenças estatisticamente significativas entre o número de amostras amplificadas pelos protocolos de melhor desempenho.

Protocolo	1 parasita		10 parasitas		100 parasitas	
	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos
08	7	6	4	4	3	4
09	2	6	6	6	10	8
p-valor*	0,109	1.000,000	0,656	0,656	0,003	0,170

*p-valor <0,05 indica que há diferença significativa, do ponto de vista estatístico, na identificação de amostras positivas pelos protocolos 08 e 09.

O p-valor calculado com o Teste exato de Fisher demonstra que não há diferença estatística significativa na identificação e amplificação de amostras positivas, de macerados de triatomíneos com *T. cruzi*, extraídas pelos dois protocolos de melhor desempenho (08 e 09).

Entretanto, o p-valor de ninfas reconstituídas com 100 *T. cruzi* indicou uma diferença, indicando o protocolo 09 como o de melhor desempenho neste estágio, com esta diluição específica.

A intensidade das bandas presentes nos géis foram analisadas, através do programa Image J, e descrita nas tabelas 4.11 e 4.12.

Tabela 4.11: Intensidade de bandas em amostras de ninfas. Intensidade das bandas de 330 pares de bases do kDNA do *Trypanosoma cruzi* obtidas por eletroforese em gel de agarose. A intensidade foi classificada em fraca (F) e forte (+); (-) indica ausência.

Estágio evolutivo	Diluição	Amostra	Protocolo												
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	
1 parasita		01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		02	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
		03	-	F	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
		04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		07	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
		08	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
		09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	F	
		11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
		12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		13	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	
		14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
		15	-	-	F	-	-	-	-	-	+	F	-	-	
Ninfa 4º estádio	10 parasitas	01	-	-	F	-	F	-	F	-	+	-	-	-	
		02	-	-	F	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
		03	-	-	F	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		04	-	-	F	F	F	-	-	-	-	-	-	F	
		05	-	-	-	-	F	-	-	-	-	F	-	-	
		06	-	F	+	-	F	F	-	+	-	-	-	F	
		07	-	-	-	F	F	-	F	-	-	-	-	-	
		08	-	-	-	-	-	F	-	-	-	F	-	-	F
		09	-	-	-	F	F	-	-	+	F	-	+	F	
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	F	-	+	-
100 parasitas		01	-	-	F	+	F	+	-	+	F	-	-	F	
		02	-	-	F	F	F	F	F	-	+	-	F	-	
		03	-	-	F	F	F	-	+	-	+	-	-	+	
		04	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	
		05	-	+	-	+	-	+	F	-	+	-	+	-	
		06	-	-	F	F	-	+	-	+	F	-	+	F	
		07	-	+	F	F	F	-	-	+	+	-	+	+	
		08	-	+	F	F	F	-	-	-	F	-	F	+	
		09	-	+	F	F	-	-	F	-	+	-	+	-	
		10	-	+	-	F	F	-	F	-	+	-	+	-	

Tabela 4.12: Intensidade de bandas em amostras de adultos. Intensidade das bandas de 330 pares de bases do kDNA do *Trypanosoma cruzi* obtidas por eletroforese em gel de agarose. A intensidade foi classificada em fraca (F) e forte (+); (-) indica ausência.

Estágio evolutivo	Diluição	Amostra	Protocolo											
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1 parasita		01	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		03	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		07	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-
		08	-	-	-	-	-	-	-	-	+	F	-	-
		09	-	-	-	-	-	-	-	-	F	F	-	-
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	F
		11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	F
		12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F
		13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-
Adulto	10 parasitas	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	+
		02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
		03	-	-	F	-	-	-	-	-	-	F	-	+
		04	-	-	F	-	-	-	-	-	-	+	-	F
		05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	F
		06	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	F
		07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	F
		08	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
		09	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	F
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
100 parasitas		01	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	F	
		02	-	-	-	-	-	F	F	-	+	-	F	
		03	-	-	F	-	-	-	+	F	-	-	F	
		04	-	-	-	-	+	+	-	-	+	F	F	
		05	-	-	-	-	-	+	-	-	F	-	F	
		06	-	-	-	-	-	+	F	+	+	-	F	
		07	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	F	
		08	-	-	F	-	-	-	-	-	-	F	-	F
		09	-	F	-	-	-	-	-	-	+	-	F	
		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	

É possível verificar que a maioria das bandas positivas foram fracas, sendo 105 (12,5%) em 840 amostras de ninfas e adultos, desconsiderando a diluição, enquanto apenas 85 (10,1%) foram fortes. O restante das amostras (77,4%) corresponde aos resultados negativos. Resultados similares podem ser observados quando analisamos amostras de ninfas em comparação com adultos, com bandas fracas em maior proporção (15,2% e 10%, respectivamente) que bandas fortes (13,3% e 7%, respectivamente) de um total de 420 amostras para cada estágio.

Nas diluições de 10 e 100 parasitas, a maioria das bandas de amplificação foram classificadas como fracas, com 37 resultados fracos para 10 parasitas e 52 para 100 parasitas. 17 bandas foram fortes para a diluição de 10 e 49, para a de 100. A diluição de 1 parasita, ao contrário do visto até o momento, teve mais amostras com bandas fortes (18 amostras) que fracas (16 amostras).

Para monitorar o funcionamento das extrações, uma nova amplificação de amostras extraídas pelos protocolos 01, 08 e 09 foi realizada. Desta vez, porém, tínhamos como alvo de amplificação um fragmento de 682 pb do gene mitocondrial citocromo b de triatomíneos.

Após a amplificação, também pelo uso da PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 2% para constatar a presença de DNA do vetor triatomíneo.

Além do marcador de peso molecular, foram aplicados o controle da reação, um controle positivo de *T. cruzi* (diluição de 10 parasitas), 15 amostras extraídas de ninfas (5 amostras de 1 parasita, 5 de 10 e 5 de 100), 15 amostras extraídas de adultos (5 amostras de 1 parasita, 5 de 10 e 5 de 100) e um controle positivo de DNA extraído e purificado de triatomíneo (Figuras 4.10 a 4.12).

Também na pesquisa do citocromo b de triatomíneos, o protocolo 01 não amplificou banda de 682 pb em nenhuma amostra. Por outro lado, os protocolos 08 e 09 permitiram uma amplificação satisfatória. O protocolo 08 foi positivo para 24 das 30 amostras (80%) e o protocolo 09 mostrou-se positivos para todas as 30 amostras (100%), independente do estágio e da diluição.

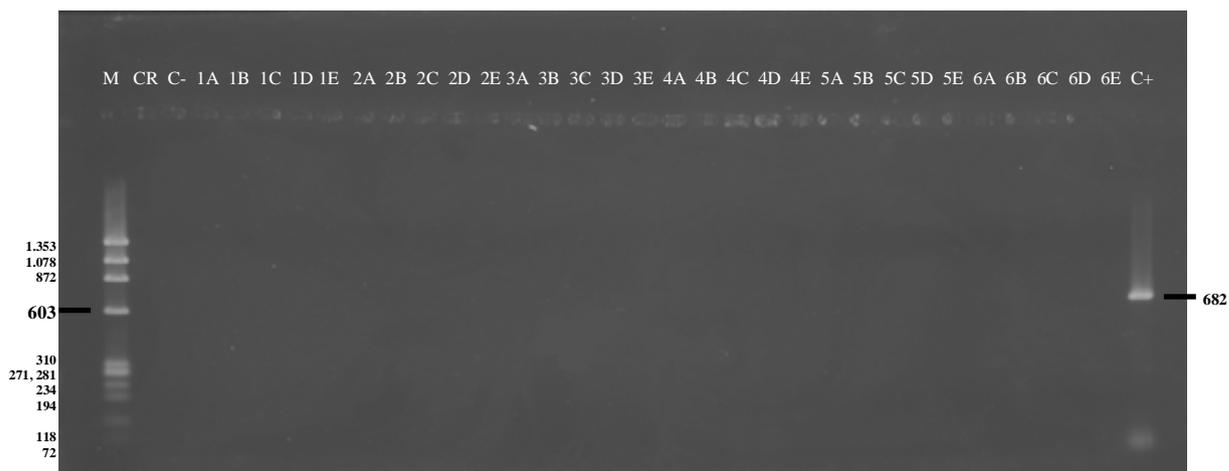


Figura 4.10: Gel de citocromo b de amostras do Protocolo 01. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 682 pares de bases do gene mitocondrial citocromo b de triatomíneos, obtido após extração das amostras reconstituídas de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 01 (modificado de Breniere *et al.*, 1992), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo (controle positivo de cultura de 10 parasitas); 1, 2 e 3: Amostras de ninfas de 4º estágio; 1A-1E: Diluição de 1 parasita (5 amostras); 2A-2E: Diluição de 10 parasitas (5 amostras); 3A-3E: Diluição de 100 parasitas (5 amostras); 4, 5 e 6: Amostras de adultos; 4A-4E: Diluição de 1 parasita (5 amostras); 5A-5E: Diluição de 10 parasitas (5 amostras); 6A-6E: Diluição de 100 parasitas (5 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de triatomíneo.

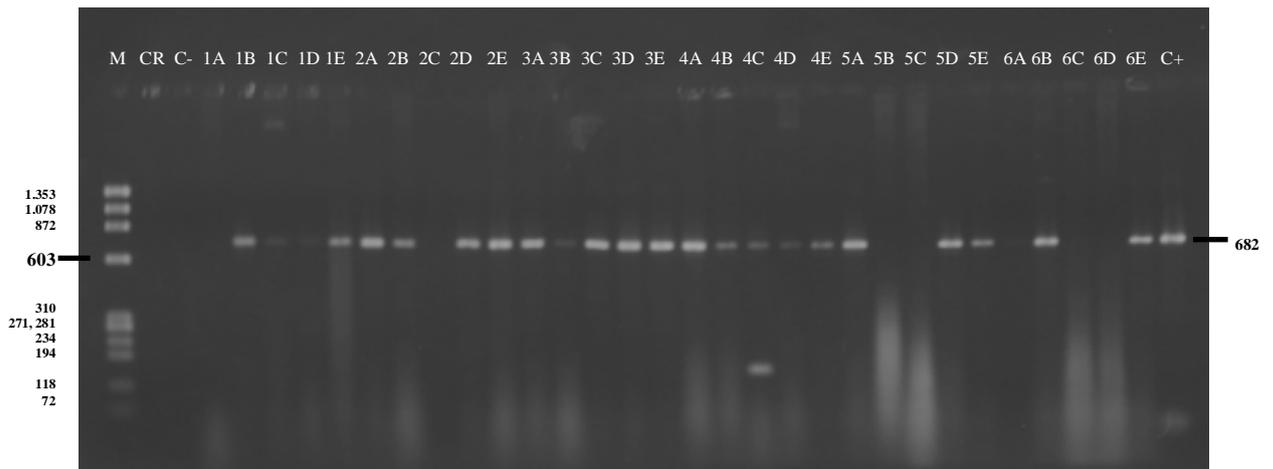


Figura 4.11: Gel de citocromo b de amostras do Protocolo 08. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 682 pares de bases do gene mitocondrial citocromo b de triatomíneos, obtido após extração das amostras reconstituídas de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 08 (modificado de Desloire *et al.*, 2006), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo (controle positivo de cultura de 10 parasitas); 1, 2 e 3: Amostras de ninfas de 4º estágio; 1A-1E: Diluição de 1 parasita (5 amostras); 2A-2E: Diluição de 10 parasitas (5 amostras); 3A-3E: Diluição de 100 parasitas (5 amostras); 4, 5 e 6: Amostras de adultos; 4A-4E: Diluição de 1 parasita (5 amostras); 5A-5E: Diluição de 10 parasitas (5 amostras); 6A-6E: Diluição de 100 parasitas (5 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de triatomíneo.

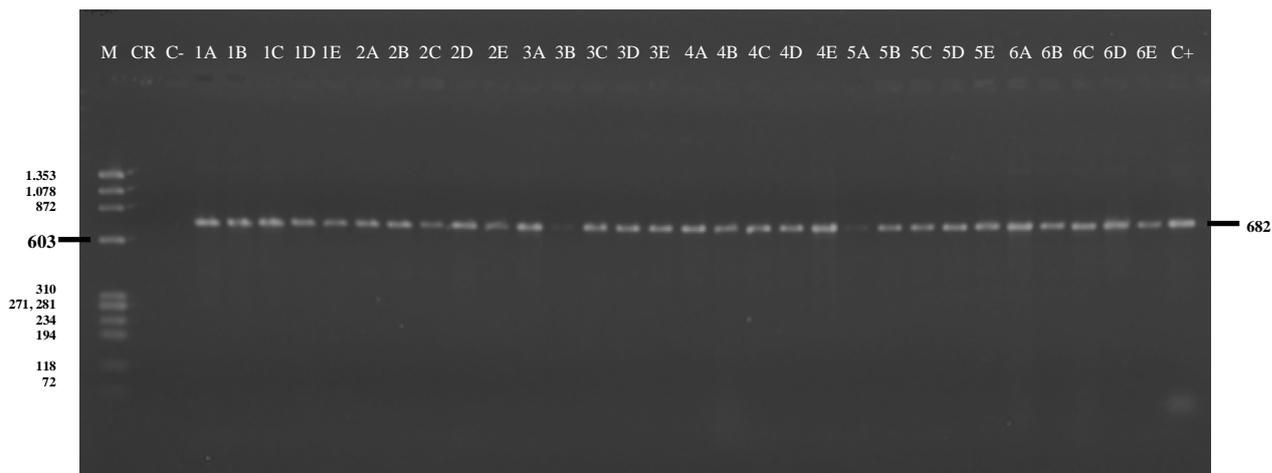


Figura 4.12: Gel de citocromo b de amostras do Protocolo 09. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 682 pares de bases do gene mitocondrial citocromo b de triatomíneos, obtido após extração das amostras reconstituídas de *Rhodnius brethesi* pelo Protocolo 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit* - Qiagen), amplificação pela PCR e corrida eletroforética. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo (controle positivo de cultura de 10 parasitas); 1, 2 e 3: Amostras de ninfas de 4º estágio; 1A-1E: Diluição de 1 parasita (5 amostras); 2A-2E: Diluição de 10 parasitas (5 amostras); 3A-3E: Diluição de 100 parasitas (5 amostras); 4, 5 e 6: Amostras de adultos; 4A-4E: Diluição de 1 parasita (5 amostras); 5A-5E: Diluição de 10 parasitas (5 amostras); 6A-6E: Diluição de 100 parasitas (5 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de triatomíneo.

4.2.4. Reprodutibilidade

A avaliação deste parâmetro, assim como nas amostras anteriores, consistiu na estimativa da concentração de DNA e no grau de pureza do DNA obtido, além da visualização de bandas de 330 pb em gel de agarose, após amplificação pela PCR.

A Tabela 4.13 apresenta os valores de média e mediana calculados para a concentração de DNA, enquanto para o grau de pureza são apresentados valores de média, mediana e CV (Tabela 4.14).

Também para a reprodutibilidade, calculamos a frequência de resultados que apresentaram valores entre 1,8 e 2,0 da relação 260/280, que demonstra o grau de pureza das amostras.

Tabela 4.13: Análise da concentração de DNA da reprodutibilidade. Média e mediana calculados a partir de valores estimados da concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$), obtida por espectrofotometria, das 30 amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi* com a diluição de 10 parasitas.

Protocolo	Mediana	Média
01	-7,19	-22,50
02	0,26	0,38
03	21,67	43,24
04	0,29	0,49
05	101,80	530,87
06	34,76	77,96
07	2.222,50	2.421,79
08	88,47	500,20
09	77,23	77,73
10	0,20	998,27
11	0,32	2.195,87
12	21,05	-219,88

Tabela 4.14: Análise do grau de pureza do DNA da reprodutibilidade. Porcentagem dos valores entre 1,8 e 2,0, média, mediana e coeficiente de variação (CV), calculados a partir de valores estimados do grau de pureza do DNA, obtido por espectrofotometria, das 30 amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi* com a diluição de 10 parasitas.

Protocolo	% 1,8 – 2,0*	Mediana	Média	Coeficiente de Variação**
01	0	0,47	0,50	0,17
02	3%	1,36	1,43	0,24
03	0	0,75	0,78	0,29
04	7%	1,08	1,10	0,42
05	23%	1,34	1,35	0,35
06	13%	1,42	1,42	0,27
07	13%	1,43	1,19	0,46
08	13%	1,35	1,31	0,38
09	7%	1,10	1,23	0,19
10	0	1,00	1,03	0,16
11	0	0,59	0,64	0,33
12	0	1,05	1,05	0,21

*Porcentagem relativa ao número de amostras que apresentaram resultados dentro da faixa ideal de pureza estabelecida como entre 1,8 e 2,0.

**Coeficiente de variação (CV) - mede o grau de reprodutibilidade. Valores desejáveis seriam aqueles menores que 0.2; acima de 0.3 indicam má reprodutibilidade.

Assim como nos experimentos de extração de ninfas e adultos com as 03 diluições de parasitas, na reprodutibilidade alguns valores de média e mediana também foram negativos.

A média e a mediana dos protocolos 01, 03, 05, 06, 08, 10, 11 e 12 nos resultados de concentração de DNA apresentaram valores divergentes, indicando uma variação entre as concentrações de DNA obtidas nas amostras extraídas. Como a média dos 08 protocolos citados foi maior que sua respectiva mediana, podemos concluir que os valores extremos são muito maiores que os outros.

Nos demais protocolos, a distribuição foi simétrica, com valores de média e mediana aproximados.

Sete dos protocolos (02, 04, 05, 06, 07, 08 e 09) testados nos experimentos de reprodutibilidade apresentaram resultados de relação 260/280 entre 1,8 e 2,0. Porém, nenhum deles demonstrou este resultado em mais de 50% das amostras.

Ao contrário do observado para a concentração de DNA, a distribuição dos valores do

grau de pureza foi simétrica em todos os protocolos, evidenciado pela proximidade dos valores de média e mediana.

Os protocolos 01, 09 e 10 evidenciaram boa reprodutibilidade com valores de coeficiente de variação abaixo de 0,2. Valores relacionados à má reprodutibilidade ($CV > 0,3$) podem ser visualizados nos protocolos 04, 05, 07, 08 e 11.

Em alguns protocolos, a maioria dos valores obtidos pela medida espectrofotométrica da concentração de DNA das amostras da reprodutibilidade apresentou-se negativa, impossibilitando o cálculo do coeficiente de variação. Resultados de CV negativos não permitem a interpretação dos resultados; assim a reprodutibilidade foi analisada unicamente através do CV do parâmetro grau de pureza.

A presença/ausência de banda foi avaliada através da corrida eletroforética dos produtos de amplificação da sequência de 330 pb da região variável do minicírculo de kDNA de *T. cruzi* após as extrações.

Neste parâmetro, os géis foram compostos por marcador de peso molecular, controle da reação, controle negativo de triatomíneo, controle positivo de 10 parasitas, 20 amostras de ninfas com a diluição de 10 parasitas e controle positivo de DNA purificado de *T. cruzi*, respectivamente.

O marcador e os controles foram aplicados alternadamente, intercalados por *slots* vazios, assim como entre o controle positivo e a 1ª amostra e entre a 20ª amostra e o controle positivo purificado. Entretanto, as amostras extraídas foram aplicadas continuamente.

As fotografias dos géis de reprodutibilidade, de cujos protocolos foram selecionados como de pior e melhor rendimentos (através de perfis eletroforéticos), além daquele com rendimento intermediário, podem ser visualizadas nas Figuras 4.13 a 4.15.



Figura 4.13: Gel de reprodutibilidade de amostras do Protocolo 01. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*. Os referidos produtos foram obtidos após extração de amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi*, com diluição de 10 parasitas, pelo Protocolo 01 (modificado de Breniere *et al.*, 1992) e amplificação pela PCR. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C10: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; 1-20: Amostras de 10 parasitas (20 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*; V: *slot* vazio.

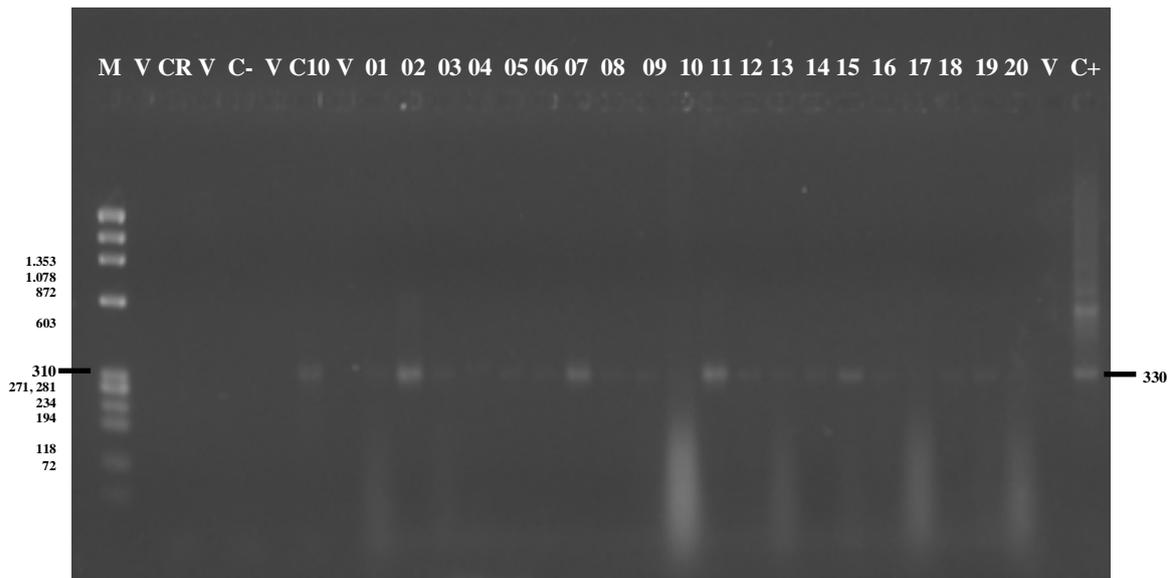


Figura 4.14: Gel de reprodutibilidade de amostras do Protocolo 08. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*. Os referidos produtos foram obtidos após extração de amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi*, com diluição de 10 parasitas, pelo Protocolo 08 (modificado de Desloire *et al.*, 2006) e amplificação pela PCR. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C10: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; 1-20: Amostras de 10 parasitas (20 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*; V: *slot* vazio.



Figura 4.15: Gel de reprodutibilidade de amostras do Protocolo 09. Perfil eletroforético em gel de agarose 1000 2% dos produtos da PCR de um fragmento de 330 pares de bases da região variável do kDNA do *Trypanosoma cruzi*. Os referidos produtos foram obtidos após extração de amostras de ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi*, com diluição de 10 parasitas, pelo Protocolo 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit* - Qiagen) e amplificação pela PCR. M: Marcador de peso molecular ØX174 HaeIII; CR: Controle da reação; C-: Controle negativo; C10: Controle positivo de cultura de 10 parasitas; 1-20: Amostras de 10 parasitas (20 amostras); C+: Controle positivo de DNA total extraído de *Trypanosoma cruzi*; V: slot vazio.

O protocolo 01, assim como nos experimentos com os 2 estádios evolutivos e as 3 diluições, não amplificou nenhuma banda de 330 pb na reprodutibilidade. Outros 3 protocolos (02, 05 e 12) também demonstraram ausência total de bandas.

Amostras positivas foram evidenciadas nos 8 protocolos restantes, como pode ser visto na Tabela 4.15. Os protocolos 9, 10 e 11 tiveram poucas amostras positivas, enquanto 03, 04, 06 e 08 apresentaram 50% ou mais amostras positivas.

A intensidade de cada amostra positiva obtida na reprodutibilidade pode ser vista na Tabela 4.16.

Tabela 4.15: Número de amostras positivas nos experimentos de reprodutibilidade. Número de amostras positivas obtidas nas amostras de ninfas de *Rhodnius brethesi*, diluição de 10 parasitas, após amplificação e visualizadas em gel de agarose, para avaliação da reprodutibilidade.

Protocolo	Ninfas / 10 parasitas
01	0/20
02	0/20
03	11/20
04	10/20
05	0/20
06	13/20
07	4/20
08	18/20
09	3/20
10	1/20
11	1/20
12	0/20

Tabela 4.16: Intensidade de bandas nos experimentos de reprodutibilidade. Intensidade das bandas de 330 pares de bases de kDNA de *Trypanosoma cruzi*, obtidas por eletroforese em gel de agarose. A intensidade foi classificada em fraca (F) e forte (+); ausência de banda como (-).

Amostra	Protocolo											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
01	-	-	-	-	-	F	-	F	-	-	-	-
02	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
03	-	-	-	+	-	+	+	F	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	F	-	F	-	-	-	-
05	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	-	-
06	-	-	-	+	-	F	-	F	-	-	-	-
07	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
08	-	-	+	-	-	-	-	F	F	-	-	-
09	-	-	+	-	-	-	F	F	-	-	-	-
10	-	-	+	+	-	F	F	-	+	-	F	-
11	-	-	+	F	-	-	-	+	-	-	-	-
12	-	-	F	-	-	-	-	F	-	-	-	-
13	-	-	F	F	-	F	+	F	-	+	-	-
14	-	-	F	-	-	-	-	F	-	-	-	-
15	-	-	F	-	-	-	-	+	+	-	-	-
16	-	-	F	F	-	F	-	F	-	-	-	-
17	-	-	F	-	-	F	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	F	-	+	-	F	-	-	-	-
19	-	-	-	F	-	+	-	F	-	-	-	-
20	-	-	-	F	-	+	-	F	-	-	-	-

Também para a reprodutibilidade, as bandas positivas com intensidade fraca superaram as fortes em número, sendo que 37 (61%) das bandas positivas tinham baixa intensidade, enquanto 24 (39%) tinham intensidade forte.

4.2.5. Praticidade

A praticidade de cada método foi avaliada por meio dos seguintes itens: número de etapas, tempo despendido na execução de todo o processo de extração, tempo gasto na preparação dos reagentes, número de equipamentos necessários (Tabela 4.17).

Os equipamentos exigidos para a realização do processo de extração, em cada protocolo, foram listados, com o objetivo de atribuir o nível de complexidade de manuseio. Consideramos que os equipamentos centrífuga, banho-maria, vortex, agitador magnético e placa de aquecimento são de fácil manuseio, pois exigem um conhecimento mínimo de execução, sendo de uso convencional em qualquer laboratório clínico ou de pesquisa. Além disso, são equipamentos com tecnologia simples. Dentro deste grupo também enquadramos o balão de nitrogênio que exige somente o conhecimento de normas de biossegurança.

Tabela 4.17: Avaliação da praticidade dos protocolos. Descrição do número de etapas, tempo despendido na execução de todo o processo de extração, tempo gasto na preparação dos reagentes, número de equipamentos necessários, segundo cada protocolo, para avaliação da praticidade de cada processo de extração.

	Protocolo											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
N° de etapas para execução do protocolo	7	22	18	38	20	25	22	17	39	38	13	19
Tempo despendido na execução do processo de extração	20min 30seg	2h 51min 30seg	4h 35min 30seg	1h 50min	16h 56min 30seg	8 dias 1h 26min 30seg	3h 1min 30seg	3h 53min	47min 45seg	3h 37min	45min 54seg	17min 45seg
Tempo gasto na preparação dos reagentes	0	9h 8min 30seg	2h 3min	22min	1h 8min 30seg	8h 32 min	56 min	1h 8min	1min	44min	43min	12min
N° de equipamentos necessários	2	4	4	4	4	4	3	4	4	4	5	1
Especificar o equipamento	· Centrífuga · Placa de aquecimento	· Banho-maria · Centrífuga · Freezer · Vortex	· Banho-maria · Balão de nitrogênio · Centrífuga · Placa de aquecimento	· Centrífuga · Freezer · Placa de aquecimento · Vortex	· Banho-maria · Centrífuga · Freezer · Vortex	· Centrífuga · Freezer · Placa de aquecimento · Vortex	· Centrífuga · Freezer · Vortex	· Banho-maria · Centrífuga · Freezer · Vortex	· Centrífuga · Freezer · Placa de aquecimento · Vortex	· Banho-maria · Centrífuga · Placa de aquecimento · Vortex	· Agitador magnético · Banho-maria · Centrífuga · Placa de aquecimento · Vortex	· Centrífuga
Equipamento de fácil manuseio	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim

O protocolo que é processado com o menor número de etapas é o 01, que é realizado em apenas 7 etapas. Por outro lado, o protocolo 9 é o que tem mais manipulação da amostra, sendo realizado em 39 etapas.

No item tempo despendido na execução de todo o processo de extração, aquele que demora menos tempo do início ao final da extração é o 12 (17min 45seg) enquanto 8 dias 1h 26min 30seg é o tempo mais longo dentre os protocolos testados, que corresponde ao 06. Esse tempo deve-se ao longo período de incubação da amostra na solução de guanidina-EDTA.

O tempo gasto na maceração dos espécimes variou entre 20 e 40 segundos. Para fins de cálculo, empregamos a média, que no caso foi de 30 segundos.

O preparo de reagentes é outro item que deve ser considerado na avaliação da praticidade de um protocolo de extração. Protocolos que utilizam diversos reagentes, ou reagentes que demoram a ser preparados, como o tamponamento do fenol, ficam em desvantagem em relação àqueles que utilizam reagentes prontos ou que só necessitem de diluição, como é o caso dos *kits*. No caso de protocolos que utilizam fenol, o emprego deste reagente já tamponado reduz o tempo de execução da extração. Entretanto, o custo do método seria aumentado, uma vez que o fenol tamponado é mais caro que o não tamponado.

Nesse sentido, o protocolo 01 é o melhor, visto que utiliza somente água como diluente. Em contrapartida, o protocolo que mais exige tempo para preparo de reagente é o 02 que, além de necessitar do tamponamento do fenol (processo que demora cerca de 8 horas), requer o preparo de 2 tampões de extração distintos.

A centrífuga é utilizada em todos os protocolos testados. A placa de aquecimento é o segundo equipamento mais utilizado nas extrações, seguido do aparelho de banho-maria.

4.2.6. Custo

Os valores de custo por reação de extração (resultado da soma dos valores gastos com reagentes, ponteiros e tubos), custo total de trabalho (valor pago a um profissional de nível superior com especialização pelo total de tempo gasto em cada protocolo) e o custo final (soma dos dois itens anteriores) são descritos na Tabela 4.18.

O protocolo 01 apresentou o melhor custo final, pois apresentou os menores valores de custo por reação de extração e custo total de trabalho.

O maior custo por reação de extração é relatado para o protocolo 12, enquanto o 02 demanda o maior gasto com profissional para a realização de todo o processo de extração. Apesar de maior gasto com o material necessário à extração no protocolo 12, o pior custo final equivale ao do protocolo 02.

Tabela 4.18: Avaliação do custo dos protocolos. Descrição dos valores de custo por reação de extração, custo total de trabalho e o custo final, gastos em cada protocolo, para avaliação do custo total de cada processo de extração. Todos os valores foram calculados em dólar, ou convertidos para esta moeda.

	Protocolo											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Custo por reação de extração* (reagentes, ponteiras e tubos)	\$0,43	\$1,35	\$1,52	\$1,22	\$0,94	\$1,24	\$1,07	\$0,82	\$4,72	\$3,33	\$0,91	\$5,08
Custo total de trabalho** (profissional de nível superior com especialização)	\$9,99	\$284,99	\$77,22	\$42,38	\$36,54	\$269,65	\$42,63	\$58,95	\$23,75	\$39,46	\$31,13	\$14,49
Custo final (soma dos dois itens anteriores)	\$10,42	\$286,34	\$78,74	\$43,60	\$37,48	\$270,89	\$43,70	\$59,77	\$28,47	\$42,79	\$32,04	\$19,57

*Custo calculado para amostras de adultos de *Rhodnius brethesi*.

**Custo de hora de trabalho calculado a partir de salário + encargos sociais pago pela União a um tecnólogo de nível 1 com especialização da Fundação Oswaldo Cruz: R\$ 52,29 = US\$ 29,23 (Cotação em 04-03-10: R\$ 1,00 = US\$ 0,5590) (Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2010).

4.3. Questionário de opinião

O questionário de opinião, desenvolvido em colaboração com o Dr. Guilherme Werneck, foi aplicado, aleatoriamente, a profissionais de instituições científicas nacionais e internacionais e laboratórios privados de medicina diagnóstica de maior destaque no Brasil.

Enviamos um total de 148 questionários e obtivemos retorno de 38 (26%) profissionais, os quais emitiram 83 avaliações sobre diferentes amostras. De 10 dos 38 questionários respondidos, as informações foram obtidas por entrevista pessoal, enquanto a maioria (28), via e-mail. Os dados fornecidos auxiliaram no estabelecimento do grau de importância dos parâmetros utilizados na escolha de um método de extração de DNA, independente do tipo de amostra.

Todas as avaliações obtidas a partir dos questionários podem ser visualizadas nas Tabelas 4.19 a 4.23.

Tabela 4.19: Grau de escolaridade. Grau de escolaridade dos profissionais que participaram da pesquisa de opinião.

Escolaridade	Frequência	%
Superior completo	2	5,26
Mestrado cursando	2	5,26
Mestrado completo	5	13,16
Doutorado cursando	4	10,53
Doutorado completo	25	65,79
TOTAL	38	100

Tabela 4.20: Área de atuação. Área na qual os profissionais que participaram da pesquisa de opinião atuam.

Área de atuação	Frequência	%
Pesquisa	27	71,05
Medicina diagnóstica	2	5,26
Ambas	9	23,68
TOTAL	38	100

Tabela 4.21: Tempo de experiência. Tempo que os profissionais que participaram da pesquisa de opinião têm de experiência em sua área de atuação.

Tempo de experiência (anos)	Frequência	%
<5	2	5,41
5-9	10	27,02
10-14	7	18,92
15-19	9	24,33
>20	9	24,33
TOTAL	37	100

Tabela 4.22: Método de extração utilizado. Método de extração empregado pelos participantes.

Método de extração	Frequência	%
<i>Kit comercial</i>	10	26,32
Método <i>in house</i>	9	23,68
Ambos	19	50
TOTAL	38	100

Tabela 4.23: Tipos de amostra biológica. Amostras biológicas utilizadas para extração pelos participantes.

Amostra	Frequência	%	Frequência acumulada
Sangue	24	28,92	28,92
Bactéria	4	4,82	33,73
Protozoário	4	4,82	38,55
Simulídeo	1	1,2	39,76
Tecido	17	20,48	60,24
Flebotomíneo	2	2,41	62,65
Fezes	5	6,02	68,67
Plasma	3	3,61	72,29
LCR	2	2,41	74,7
Urina	1	1,2	75,9
Líquido amniótico	2	2,41	78,31
Helmineto	1	1,2	79,52
Insetos	2	2,41	81,93
Triatomíneo	1	1,2	83,13
Escarro	1	1,2	84,34
Fluidos corporais	5	6,02	90,36
Cultura	5	6,02	96,39
Células	1	1,2	97,59
DNA	2	2,41	100
TOTAL	83	100	

A maioria dos profissionais que participaram da avaliação possui doutorado completo, seguidos por aqueles com mestrado completo. Cerca de 10% são apenas graduados, ou com mestrado em andamento.

A área de atuação mais freqüente é a pesquisa. Poucos são os profissionais que trabalham com medicina diagnóstica em paralelo e, somente 5% trabalha exclusivamente com medicina diagnóstica.

Cinco intervalos de tempo de atuação foram observados. Três faixas englobam mais de 20% dos entrevistados: 5-9 (27%), 15-19 (24,3%) e >20 anos (24%). Em seguida, a faixa de 10-18 anos engloba 18,9% dos profissionais. O menor número de entrevistados (5,4%) concentra-se na faixa de <5 anos de atuação na área..

O *kit* comercial é mais empregado em extração de DNA que os métodos *in house*. Entretanto, 50% dos entrevistados afirmam fazer uso de ambos os métodos.

Foram listadas 19 diferentes amostras biológicas utilizadas como fonte de DNA alvo. Dentre as amostras citadas podemos verificar uma grande variedade, sendo utilizados, fluidos corporais humanos diversos, tecidos, células, cultura e microorganismos, além diferentes espécies de artrópodes.

Sangue representa o material mais utilizado nas extrações de DNA, seguido de tecidos em geral. Fezes, fluidos corporais e cultura também são utilizados e cada um corresponde a cerca de 6% das ocorrências. Microorganismos correspondem a aproximadamente 10 % das citações, enquanto os demais materiais aparecem menos de 5%, cada.

Apesar de pouco utilizados ($\approx 7\%$), artrópodes também servem como fonte de DNA, seja para obtenção de material do próprio invertebrado ou para detecção de parasitos quando aquele funciona como vetor.

No que diz respeito aos parâmetros relativos à escolha de um método de extração de DNA, as tabelas 4.24 e 4.25 e o gráfico 4.5 evidenciam a relevância de cada critério.

Cada profissional participante atribuiu um valor de importância para cada um dos 5 parâmetros avaliados no momento da escolha de um protocolo de extração de DNA: concentração do DNA extraído, grau de pureza do DNA obtido, reprodutibilidade, praticidade e custo do método empregado.

Na tabela 4.24 os valores máximo e mínimo atribuídos pelos entrevistados aos diferentes parâmetros analisados foram 5 e 100, respectivamente.

Tabela 4.24: Parâmetros de avaliação. Média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo dos escores das 5 variáveis avaliadas.

Variável	Observações	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Concentração	80	87,01	13,95	31	100
Pureza	79	91,38	10,74	35	100
Reprodutibilidade	83	89,43	10,95	39	100
Praticidade	83	76,86	21,32	5	100
Custo	83	68,61	21,77	17	100

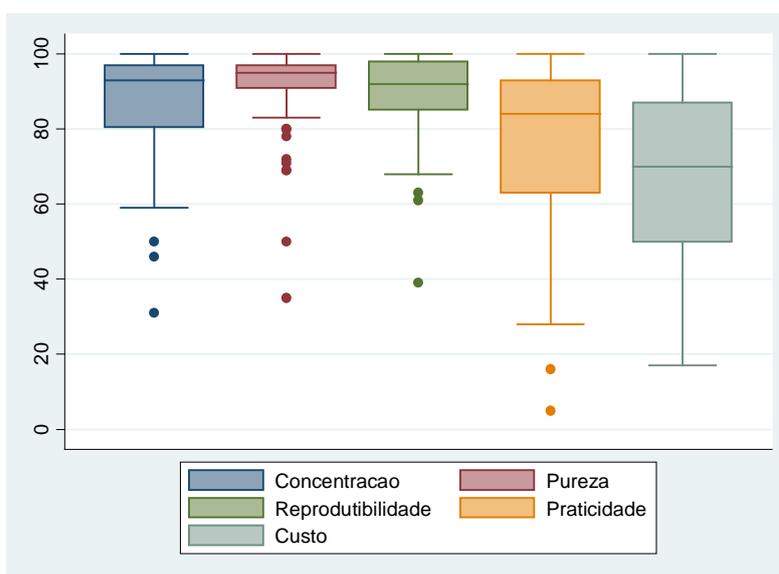


Gráfico 4.5: Parâmetros de avaliação. Média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo dos escores das 5 variáveis avaliadas.

Tabela 4.25: Teste t-Student. P-valores referentes ao teste t-Student de comparação entre as médias dos escores das 5 variáveis avaliadas. Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) estão em negrito valores estatisticamente significantes –)

	Pureza	Reprodutibilidade	Praticidade	Custo
Concentração	0,0284	0,2209	0,0004	<0,0001
Pureza		0,2553	<0,0001	<0,0001
Reprodutibilidade			<0,0001	<0,0001
Praticidade				0,0148

De acordo com as Tabelas 4.24 e 4.25 e o gráfico 4.5, podemos verificar que os escores médios atribuídos à concentração, pureza e reprodutibilidade são significativamente mais altos do que os atribuídos à praticidade e custo, sendo que o escore médio de praticidade é significativamente mais alto que o atribuído a custo.

Apesar de concentração e pureza terem sido sinalizados com os parâmetros de maior importância, os escores médios de pureza são significativamente mais altos que os de concentração. Os escores de reprodutibilidade, entretanto, não diferem do ponto de vista estatístico, em relação aos de concentração e pureza.

Em resumo, os profissionais elencam a pureza como a característica de maior importância, seguida pela reprodutibilidade e concentração (na mesma condição). A praticidade tem importância menor que os três parâmetros anteriores, porém foi considerado mais importante que o custo, sendo este o menos considerado na escolha de um protocolo a ser empregado.

5. DISCUSSÃO

A estratégia de amplificação *in vitro*, introduzida pela PCR, vem sendo bastante utilizada em experimentos diversos, principalmente em casos de diagnóstico. Esta técnica é empregada especialmente quando o DNA almejado encontra-se em baixas concentrações na amostra biológica, como ocorre em casos de detecção de patógenos em seus vetores (Lardeux *et al.*, 2008).

No caso específico do *T. cruzi*, registros de sua detecção pelo uso da PCR datam da década de 90. Sangue de pacientes infectados (Wincker *et al.*, 1994; Junqueira; Chiari; Wincker, 1996) e outros mamíferos (Vallejo *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2007), conteúdo digestivo de triatomíneo (Breniere *et al.*, 1995; Russomando *et al.*, 1996; Marcet *et al.*, 2006; Pizarro *et al.*, 2007) e fragmentos de coração e tecidos não sangüíneos (Valadares *et al.*, 2008) são algumas das amostras biológicas empregadas para o diagnóstico deste protozoário.

Estudos comparativos entre métodos de detecção parasitológicos diretos e indiretos demonstrados na literatura (Breniere *et al.*, 1995; Coronado *et al.*, 2006; Russomando *et al.*, 1996; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1996; Pizarro *et al.*, 2007; Zulantay *et al.*, 2007) comprovam que a PCR promove resultados satisfatórios de amplificação de DNA do *T. cruzi*, apoiando a escolha desta técnica molecular na detecção do referido patógeno.

Para a realização da PCR, bem como de qualquer outra análise molecular, o ideal é que o DNA seja puro, íntegro e em grandes concentrações, porém essas 3 características nem sempre são alcançadas simultaneamente. Para obtenção do DNA nas condições almeçadas, a amostra biológica terá que passar por um processo laboratorial denominado extração e purificação do DNA, que dependendo dos reagentes empregados e das etapas realizadas nesse processo, resultados de qualidade distinta poderão ser alcançados. Quando um protocolo de extração é testado, o que se almeja é um DNA de boa qualidade, ou seja, com as 3 características descritas inicialmente.

Tem sido comprovado que em material clínico, uma das maiores limitações em obter resultados confiáveis na PCR é a presença de substâncias inibidoras no material extraído, que promovem a inibição da *Taq* polimerase (Panaccio; Lew, 1991; Bergallo, 2006), gerando resultados falso-negativos. Com isso, alguns trabalhos, como o apresentado nesta dissertação, dedicaram-se à avaliação comparativa de métodos de extração, cujos princípios de ação diferem entre si (Trochimchuk *et al.*, 2003; Desloire *et al.*, 2006; Lardeux *et al.*, 2008).

Para a extração do DNA, algumas etapas básicas devem ser executadas. A primeira delas é o rompimento da membrana plasmática para liberação dos constituintes celulares,

entre eles o DNA (Hatefi; Hanstein, 1969; Chirgwin *et al.*, 1979; Vogelstein; Gillespie, 1979; Firestein; Gardner; Roeder, 1987), que pode ser conseguido por ação química ou física sobre a célula íntegra. No que se refere à ação física, alguns protocolos empregam o aquecimento ou o resfriamento para o rompimento da célula.

Um dos problemas relativos à eficiência de um método de extração relaciona-se com esta lise inicial, visto que nas amostras em que o DNA está protegido por muitas estruturas biológicas, há dificuldade na liberação de grandes quantidades deste material. Nestas amostras, a quebra deve ser feita mais vigorosamente, como é o caso de espécimes de artrópodes.

Estruturas presentes nos artrópodes podem interferir no processo de extração. Uma destas estruturas é a cutícula, que apresenta uma composição complexa e é composta de polissacarídeos (quitina), lipídeos e proteínas (Andersen; Hojrup; Roepstorff, 1995), potenciais inibidores da PCR. Visto isso, verifica-se que o exoesqueleto quitinoso exige que seja realizada uma técnica mais aprimorada de lise, visando uma ruptura satisfatória dessa estrutura para a liberação do DNA. Por este motivo, resolvemos adotar uma pré-etapa de lise celular física através da maceração dos espécimes de triatomíneos em todos os protocolos, independente da utilização desta etapa no protocolo de origem.

Entre os agentes químicos podemos citar os detergentes, entre eles o SDS, o CTAB, o sarcosil entre outros. Outra etapa importante é impedir que as DNAses exógenas degradem o DNA, o que é alcançado empregando tampões de extração em torno do pH 8.0, pois o pH ideal para ação dessas enzimas é cerca de 7.0. Outra opção tem sido adicionar, na solução tampão, quelantes de cátions divalentes como o EDTA. O EDTA age como quelante de cátions bivalentes, Mg^{+2} e Ca^{+2} , que são co-fatores das DNAses (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989).

A etapa que se segue, após a liberação dos constituintes celulares, é a separação do DNA dos componentes celulares liberados. No caso do maior componente da célula animal, as proteínas, a separação é realizada por vários procedimentos; entre o mais difundidos está o emprego do fenol/clorofórmio. O fenol desnatura as proteínas tornando-as insolúveis na camada aquosa, onde ficam os ácidos nucléicos extraídos. No entanto, recomenda-se a adição de agentes antioxidantes como o polivinilpirrolidona (PVA) ou polivinilpolipirrolidona (PVPP), β -mercaptoetanol entre outros, ao tampão de extração, para evitar o efeito oxidativo dos resíduos dos polifenóis, que possam vir a ficar na mesma camada de DNA.

Além das proteínas, os DNAs devem ser separados dos polissacarídeos e de compostos secundários que estejam presentes na amostra biológica, pois eles podem inibir a

atividade da *Taq* polimerase. Com relação aos polissacarídeos, é recomendado o uso do detergente CTAB, uma vez que os ácidos nucléicos e os polissacarídeos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente (Romano; Brasileiro, 1999).

Após a separação dos ácidos nucléicos, dos constituintes celulares, a etapa final de todo o processo de extração se constitui na precipitação do DNA liberado. A precipitação é efetuada adicionando-se álcool etílico e/ou isopropanol ao sobrenadante final com DNA. Esses alcoóis agem desidratando o DNA, e na presença de sais e de glicogênio (carreador de ácidos nucléicos) a precipitação é potencializada. Adicionalmente, a centrifugação pode ser associada a estes reagentes, a fim de acelerar o processo de precipitação (Lodish *et al.*, 2005).

Seguindo essas etapas básicas e outras complementares, que promovam a extração do DNA de uma amostra biológica, vários protocolos *in house* estão disponíveis na literatura científica. Fica claro, porém que o emprego do protocolo não segue um critério de escolha claramente definido ou que parâmetros tenham sido avaliados que justifiquem a sua escolha na prática laboratorial. De um modo geral isso se repete na elaboração de novos protocolos ou na modificação dos já existentes. No entanto, esse perfil é parcialmente distinto no que se refere aos *kits* comercializados, onde na maioria das vezes o fabricante fornece indicações da amostra biológica para o qual ele é recomendado, porém ficando em aberto as amostras provenientes de artrópodes na maioria das vezes; faz exceção *DNeasy Blood and Tissue Kit*.

Os 8 protocolos testados realizam lise do material como etapa inicial do procedimento. Dois tipos diferentes de lise celular foram empregados: físico e químico. Diferentemente da maceração adotada em nossos experimentos, a lise celular física dos protocolos 01 e 04 consistiu na fervura (aquecimento a 100°C) das amostras para desestabilização das membranas e sua consequente ruptura.

A lise celular química foi utilizada nos demais protocolos. O protocolo 06 emprega a guanidina-EDTA para a lise celular (Avila *et al.*, 1991). Além de romper membranas, este reagente funciona como conservante quando associado ao EDTA, por destruir qualquer microorganismo que porventura tenha contato com a amostra. Esta é uma grande vantagem, quando a amostra é coletada em campo, onde as condições de trabalho são precárias, e demanda tempo até processamento em laboratório.

O tampão de lise, utilizado pelos demais protocolos (02, 03, 05, 07 e 08), consiste na mistura de diferentes reagentes, cada um com uma atividade específica. O componente comum aos 5 protocolos é o Tris, agente tamponante que mantém o pH da solução levemente básico ($\approx 8,0$), mantendo o DNA desprotonado e solúvel em água. Este reagente provoca

alteração na permeabilidade da membrana celular, permitindo a saída do DNA (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989).

Outro componente bastante empregado é o EDTA, estando ausente apenas no tampão do protocolo 02. Este composto inibe a ação das DNAses, enzimas que clivam o DNA, pois quelam metais utilizados como cofatores por estas enzimas, como o Mg^{+2} e o Ca^{+2} (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989). O EDTA também atua na membrana celular de microorganismos danificando-a através do aumento da sua permeabilidade (Ribeiro *et al.*, 2004). Este reagente foi um dos mais empregados nos métodos selecionados para esta avaliação.

Detergentes também são adicionados a muitos tampões de lise por atuarem no rompimento das membranas celulares e ajudarem na liberação do DNA. Dois detergentes podem ser encontrados nos protocolos selecionados, o Triton X-100 nos protocolos 02 e 03 e o SDS no protocolo 07 (Borém; Vieira, 2005).

Além dos reagentes citados anteriormente, o protocolo 02 faz uso da sacarose para lise celular. O processo de ruptura promovido pela sacarose consiste na plasmólise das células. A concentração do meio externo (solução com adição de sacarose) fica hipertônica em relação ao interior das células. Com isso, a água do interior das células vai para o meio externo, levando à ruptura celular.

O NaCl também é utilizado nos tampões de extração (protocolos 03, 05, 07 e 08). Apesar de não atuar no rompimento de membranas, este sal dissocia as proteínas ligadas aos ácidos nucleicos, neutraliza e estabiliza o DNA (Sambrook; Manniatis; Fritsch, 1989).

Outros dois reagentes utilizados desnaturam proteínas através da redução das pontes dissulfeto. No protocolo 03 é utilizado o DTT, enquanto o β -mercaptoetanol faz parte do tampão do protocolo 08 (Vieira *et al.*, 2006). A associação destes reagentes com o NaCl nos tampões de extração auxiliam na purificação da amostra.

Um diferencial do protocolo 08 é a utilização de CTAB, composto que é muito utilizado em extrações de plantas. A extração de DNA de vegetais com CTAB foi realizada por Stange, Prehn e Arce-Johnson (1998), com obtenção de quantidade satisfatória de DNA para análise por RAPD. Em 2008, Palomera-Avalos, Castro-Félix e Villalobos-Arámula compararam dois métodos de extração, um com CTAB e outro com SDS. O CTAB apresentou melhores resultados de concentração de DNA em relação ao SDS. Além disso, o grau de pureza das amostras extraídas pelo reagente em questão (CTAB) apresentou-se dentro da faixa ideal.

Assim como ocorre em amostras vegetais, os triatomíneos, por serem artrópodes, são constituídos de polissacarídeos (quitina), sendo vantajoso o CTAB na extração destas amostras (Lo *et al.*, 1996). Rampelotti *et al.* (2008) confirmam esta hipótese, uma vez que obtiveram sucesso na extração de DNA de espécimes de *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) quando utilizaram protocolos com CTAB.

Alguns métodos de extração combinam a lise celular física com a química, para maior eficiência da lise celular (Halos *et al.*, 2004). Esta associação permite a obtenção de uma maior quantidade de DNA, visto que cada lise exerce ação sobre o mesmo alvo, porém de maneiras diferentes e complementares.

Devido à importância da referida associação, para se obter maior superfície de contato, maximizando-se a área de reação entre a amostra e os reagentes do tampão, fez-se necessária uma pré-ruptura das estruturas quitinosas. Assim sendo, para efetivar a proposta de pesquisa apresentada na presente dissertação, empregou-se como pré-etapa uma lise celular física feita pela maceração das amostras de triatomíneos. Através de pipeta e ponteira, com processos repetitivos de choque mecânico, foi promovida a lise das paredes quitinosas comprimidas contra as paredes do tubo de *eppendorf*. Esse processo como etapa preliminar de extração é efetivamente mais eficaz, visto que o aumento do contato possibilita melhor performance do protocolo utilizado e maior aproveitamento na obtenção do DNA que é retirado da amostra. (Halos *et al.*, 2004)

A utilização de ambas as lises celulares física e química é observada nos protocolos 03 e 06. No protocolo 06 a alta temperatura desnatura proteínas e promove o rompimento da membrana celular e com isso a liberação do DNA, além da desnaturação parcial de proteínas acima de 60°C, inclusive DNAses.

Já o protocolo 03 faz um processo de resfriamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 60°C. Este estresse leva ao rompimento da membrana da célula que é potencializado pela presença de tampão de lise durante este processo.

É possível que a não visualização de bandas de 330 pb em gel de agarose nos protocolos que não realizam uma etapa de fervura tenha relação com a pouca disponibilidade de alvos para amplificação devido à não desconcatenação da rede de minicírculos do kDNA do *T. cruzi* promovida pela fervura. Entretanto, a fervura pode não ser o único fator de desconcatenação dos minicírculos, uma vez que um dos protocolos com os melhores resultados não possui um etapa de fervura.

Reagentes desnaturantes podem ser utilizados para purificar a amostra. Como descrito anteriormente, NaCl, DTT, β-mercaptoetanol e proteinase K desnaturam proteínas, impedindo

que estas danifiquem o DNA em solução. Porém, as proteínas continuam em solução junto com o DNA.

Classicamente, a associação fenol-clorofórmio é utilizada para purificar amostras de DNA. Essa purificação também se baseia na desnaturação as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos. O fenol é um forte desnaturante de proteínas (remoção por insolubilidade) que arrasta restos de tecido e proteínas digeridas para o fundo do tubo, separando-os do DNA desejado. Para haver esta separação, o pH deve ser 7,0 ou maior (Alberts *et al.*, 2004). Outro desnaturador de proteínas é o clorofórmio. Porém, a combinação fenol-clorofórmio é mais eficiente do que a utilização de somente um deles.

Apesar de ser um dos reagentes mais econômicos e mais usados nos protocolos de extração, o fenol é um composto altamente tóxico. Resíduos fenólicos inibem a *Taq* DNA Polimerase e o fenol-clorofórmio é vulnerável à oxidação (calor e luz). Outro problema do fenol consiste em seu tamponamento quando este tem que ser feito no laboratório, que é uma etapa demorada e exige uso de uma capela de exaustão tomando os cuidados necessários.

Os protocolos 02, 04, 06, 07 e 08 empregam o fenol-clorofórmio para separar as proteínas do DNA, com o intuito de promover uma amostra pura, livre de inibidores. É importante notar que resíduos fenólicos inibem a *Taq* Polimerase, tornando-se necessária uma etapa adicional de remoção destes resíduos, que pode ser feita pela lavagem com clorofórmio, como ocorre com o protocolo 06.

A proteinase K também é muito utilizada como procedimento adicional de digestão enzimática de proteínas. Assim como o EDTA, a proteinase K inativa DNases. No entanto, sua ação consiste na digestão completa das proteínas, impedindo a reativação destas (Ebeling *et al.*, 1974). Nos protocolos 02, 03, 05 e 07 ela é usada em associação com o tampão de lise, ficando incubada com a amostra por um período de 1 a 15 horas (protocolos 02 e 05, respectivamente).

Em todos os 12 protocolos, optamos por utilizar o espécime inteiro, pois quando da sua aplicação com amostras do campo, seria possível verificar o índice de positividade de parasitas que tem uma parte do seu ciclo evolutivo fora do tubo digestivo, como na hemolinfa e glândula salivar. Também em condições onde o espécime se encontra longo tempo em jejum, já tendo início o processo de autofagia (Junqueira, 2008, comunicação pessoal), é de suma relevância que o inseto não seja desmembrado, pois fica praticamente impossível fazer as separações de estruturas internas para análise pela PCR, como, por exemplo, o tubo digestivo.

Considerando que a associação de etapas em um determinado protocolo é

imprescindível para a obtenção de um DNA de qualidade, Breniere *et al.*, em 1992, foram capazes de amplificar DNA de *T. cruzi* em fezes de triatomíneos utilizando um protocolo que aplicava apenas lise celular física e separação de proteínas por centrifugação. Entretanto, esses resultados não foram alcançados em nossos experimentos, sugerindo que a associação de lise celular física e química e processos mais apurados de purificação são necessários para extração de amostras de artrópodes.

Por outro lado, a utilização de CTAB mostrou-se eficiente na extração em amostras com altas concentrações de polissacarídeos, como ocorre com artrópodes, corroborando com resultados demonstrados por Desloire *et al.* (2006).

O baixo desempenho do protocolo 01, assim como de outros protocolos com resultados não satisfatórios, pode ser explicado pelo balanço entre a baixa concentração de DNA e a alta concentração de proteínas, onde protocolos pouco eficientes apresentam concentrações de proteínas mais altas que a concentração de DNA (dados não mostrados). Estes resultados podem estar relacionados com a ineficiência da etapa de purificação, explicando os resultados discordantes nas amostras extraídas pelo protocolo 01 obtidos por Breniere *et al.* (1992) e no presente estudo.

A provável ineficiente purificação no protocolo 01, promovendo a ocorrência de altas concentrações de proteínas, pode explicar a discordância entre os valores de concentração de DNA obtidos e a faixa esperada indicada pelo intervalo de confiança de 95%.

Na escolha de um protocolo de extração, além das características intrínsecas da ação dos reagentes empregados no processo de extração do DNA, também devem ser consideradas outras peculiaridades, como praticidade e custo. Protocolos ideais não são apenas aqueles que têm como resultante DNA puro, íntegro e em grandes concentrações, mas que apresentem menor número de etapas, menor tempo de execução e na preparação dos reagentes (praticidade), bem como custo baixo para a realização de todo o processo de extração (Grutzmacher *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2003). O menor número de etapas, tempo de execução e preparação dos reagentes, são particularidades importantes, principalmente quando este DNA extraído for empregado no diagnóstico por PCR. Quanto menor o número de etapas, menor será a chance de contaminação da amostra extraída com DNAs exógenos e, consequentemente, menor possibilidade de resultados falsos positivos.

Ainda em relação à praticidade e ao custo, estes parâmetros devem ser ponderados na dinâmica laboratorial, pois eles permitem avaliar a capacidade de um laboratório em responder a demanda de procedimentos moleculares, seja ele de pesquisa ou de diagnóstico laboratorial de rotina.

Em relação especificamente ao custo, este dependerá dos recursos de determinado laboratório, sendo estes limitantes na escolha do método de extração a ser empregado. Deve ser ressaltado que o custo com mão-de-obra para o preparo de solução para uma amostra será o mesmo gasto no preparo para várias amostras, sendo importante considerar este fato no momento da análise do custo total.

O protocolo com os melhores resultados de concentração, pureza e amplificação (protocolo 08) apresentou um baixo número de etapas de execução e os tempos despendidos na execução da extração e no preparo de reagentes foi intermediário. Entretanto, o protocolo *in house* com os melhores resultados de praticidade foi o que obteve o pior rendimento (protocolo 01).

O mesmo resultado pode ser verificado na avaliação do custo, onde o protocolo 08 é intermediário, enquanto o 01 demonstra o menor custo final.

Em relação ao levantamento efetuado, os dados obtidos demonstraram que existem inúmeros *kits* no mercado e que muitas vezes uma única empresa fabricante é responsável pela comercialização de mais de um tipo, tornando difícil a escolha daquele a ser empregado na amostra estudada.

Através da análise sistemática, verificamos que o *QIAamp DNA Mini Kit* foi significativamente mais empregado que os outros dois nos dois primeiros critérios de seleção, sendo o segundo mais citado no terceiro critério. Como os *kits QIAamp DNA Mini kit* e *DNeasy Blood and Tissue Kit* utilizam a mesma tecnologia de extração de DNA, optamos pelo *kit* com o segundo maior número de citações para extração a partir de artrópodes: o *Quantum Prep Aquapure Genomic DNA isolation kit* - BioRad (2 citações), porém este *kit* foi descontinuado, sendo substituído por *Instagene Matrix* – BioRad (Santos; Neves; Junqueira, 2010). Observamos que os poucos artigos na literatura, no período analisado, que compararam métodos de extração mostraram diferenças na eficiência de cada método testado. Entretanto, a falta de uniformidade nos parâmetros para avaliar esta eficiência comprova a necessidade de um estudo comparativo entre os métodos empregando parâmetros claramente definidos e abrangentes.

Nossos resultados com o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* mostraram maior eficiência que os outros dois *kits* e o reagente comercial. Isso pode ser atribuído, em parte, pela utilização da associação da membrana de sílica com o *InhibitEX Tablets* (tablete - matriz), devido à ligação do DNA à membrana e à adsorção dos inibidores à matriz (Qiagen). Dados inversos foram demonstrados na extração com o *QIAamp DNA Mini Kit*, o que pode ser explicado pela incompleta remoção de inibidores devido à não utilização da matriz. Além disso, o grande

número de células presentes em amostras de artrópodes leva à saturação das membranas, dificultando a remoção dos inibidores (Bextine *et al.*, 2004).

Deve ser ressaltado que uma das restrições do emprego dos *kits* que possuem a membrana de sílica é que existe um limite máximo de peso a ser utilizado para a extração, o que pode ser compensando pelo uso de mais de uma coluna. Porém, isso acarretaria em um aumento de custo.

No que se refere à praticidade, o DNazol apresentou menos tempo em relação aos três *kits*; porém, o número de etapas para realização do protocolo foi menor empregando o *InstaGene Matrix*.

O *kit* que foi o mais citado na literatura, o *QIAamp DNA Mini Kit*, demonstrou baixa performance na extração a partir de artrópodes, não sendo possível extrapolar estes resultados para outras amostras, visto que bons resultados foram obtidos por Brinkman *et al.* (2004) e Lee *et al.* (2009).

Quando comparado com os protocolos *in house*, o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* apresentou uma performance geral abaixo do protocolo 08, mesmo apresentando menores tempos despendidos na execução do processo de extração e na preparação dos reagentes. Resultados semelhantes foram verificados por outros autores (Desloire *et al.*, 2006; Lardeux *et al.*, 2008).

Também foi demonstrado por Desloire *et al.* (2006) que *kits* que empregam coluna de filtração, como o *kit* do protocolo 09, assim como o CTAB (presente no protocolo 08), apresentaram os melhores resultados de extração com amostras de artrópodes. O outro *kit* comparado por este autor, um *kit* baseado no uso de resina (*InstaGene Matrix*) mostrou baixa eficiência na análise comparativa, resultados também obtidos em nossos experimentos com o mesmo *kit*.

Uma hipótese é que o material extraído pelo protocolo 11 (*InstaGene Matrix*) deve ser passado pela matrix mais de uma vez, pois a presença de uma grande quantidade de inibidores (polissacarídeos) extrapola a capacidade de ligação desses componentes às esferas da matriz nas quais eles se ligam.

Apesar da similaridade entre métodos *in house*, assim como entre *kits* comerciais, resultados divergentes são relatados quando diferentes protocolos são comparados, pois o sucesso da extração depende de fatores como a amostra biológica, o DNA alvo da extração e a presença de inibidores nesta amostra (Trochimchuk *et al.*, 2003; Bextine *et al.*, 2004; Funada, 2009).

Os resultados demonstram que, em geral, protocolos com menos etapas apresentam

menores porcentagens de amostras com grau de pureza ideal, podendo haver uma relação direta quanto à maior remoção de inibidores em protocolos que empregam um maior número de etapas.

Verificamos uma diferença conforme o protocolo do modelo ninfal ou adulto para grau de pureza, onde metade dos protocolos mostrou resultados distintos quando ambos os estádios foram comparados. Esta diferença pode ocorrer devido à diferença na eficiência da associação das etapas de cada protocolo, resultando em menor lise e/ou purificação em amostras com mais células (adultos).

O mesmo raciocínio é válido para os resultados de número de bandas amplificadas. Desconsiderando a concentração de parasitas empregada, a maior positividade foi relatada nas amostras de ninfas, indicando que o menor número de componentes celulares neste estágio, em comparação aos adultos, promove menor interferência na amplificação do fragmento de DNA analisado.

Costa-Neves (2008) evidenciou que o protocolo 05 foi o mais eficiente na extração de concentrações distintas de *T. cruzi* em amostras de artrópodes. Assim como observado por Costa-Neves, também em nossas extrações foi possível amplificar bandas em amostras de ninfas, confirmando a funcionalidade do método em artrópodes. Entretanto, este resultado não pode ser extrapolado para espécimes adultos, não utilizados neste estudo de 2008.

Em nossos resultados de amplificação, independente do protocolo, no qual todas as amostras apresentavam inicialmente concentrações distintas de parasitas, não foi obtida amplificação em sua totalidade, o que confirma a importância da qualidade do DNA para o diagnóstico por PCR. Algumas hipóteses sobre as diferenças nessas amplificações podem ser levantadas, entre elas inibição da PCR e recuperação de DNA (Halos *et al.*, 2004; Costa-Neves, 2008).

Através da espectrofotometria, os resultados de concentração não apresentam, na maioria dos resultados, uniformidade, inclusive com valores negativos (Romano; Brasileiro, 1999). Além de inibidores liberados pela lise celular, a presença de uma grande quantidade de material em suspensão nas amostras pode contribuir para a interferência na leitura espectrofotométrica, resultando em uma medição imprecisa. A fim de testar esta hipótese, realizamos diluições mais altas de amostras negativas provenientes da extração pelo protocolo 01, porém este resultado foi mantido em diluições até 1:1000, impossibilitando a estimativa da concentração de DNA (dados não mostrados). Por esta falta de uniformidade, não indicamos a espectrofotometria para estimativa da concentração de DNA de amostras com baixo grau de pureza, uma vez que os controles provenientes de cultura, que a princípio

apresentam menos impurezas que o macerado de tubo digestivo, não apresentaram valores negativos. Ramos *et al.* (2006) relatam que o nível elevado de impurezas associadas ao DNA isolado a partir de sementes, colaborou para a redução na concentração de DNA extraído. Eles verificaram que substâncias de reserva dificultam o isolamento do DNA, exigindo maior número de lavagens com solvente orgânico (clorofórmio-álcool isolamílico), durante as etapas de extração.

A interferência na quantificação de DNA, através da medida espectrofotométrica, foi demonstrada em um trabalho de comparação de métodos de estocagem de DNA e de métodos de extração. Neste estudo, Coelho *et al.* (2004) relatam que as amostras de DNA de sêmem apresentaram os maiores índices de contaminação. De acordo com os autores, esta contaminação ocorreu devido à alta concentração de proteínas presentes nas amostras, derivadas da gema de ovo empregada na conservação do sêmem. Estes dados corroboram nossos resultados de quantificação, devido à presença de proteínas do vetro triatomíneo nas amostras extraídas

Uma recomendação para avaliar a funcionalidade da espectrofotometria nos protocolos com resultados negativos seria realizar diferentes diluições do material extraído para avaliação da manutenção desta uniformidade, ou mesmo realizar a leitura em NanoDrop. Inicialmente, as medidas espectrofotométricas foram repetidas, em alguns protocolos até 3 vezes, nas mesmas concentrações inicialmente testadas, tendo o resultado negativo mantido. Após termos feito isso não tínhamos mais amostras para avaliar novas diluições, seja em espectrofotômetro ou em outro equipamento, como o sugerido NanoDrop, apesar deste necessitar de quantidade pequena de amostra.

Em relação ao grau de pureza, a medida espectrofotométrica apresentou resultados mais uniformes que os obtidos nas estimativas de concentração. Neste caso, a estimativa da pureza pelo espectrofotômetro poderia ser mantida. Entretanto, faz-se necessário que os tampões sigam uma proporção direta com o peso da amostra utilizada, a fim de possibilitar maior remoção de impurezas.

Além dos bons resultados de praticidade e custo, o protocolo 09 demonstrou resultados de coeficiente de variação relacionados a uma boa reprodutibilidade, ao contrário do protocolo 08 e de 6 protocolos *in house*. A não realização de extrações a partir da mesma amostra, visto que todo o triatomíneo foi macerado e extraído, pode ter influenciado no resultado final de reprodutibilidade.

Uma sugestão para este problema seria que as amostras dos experimentos de reconstituição fossem feitas com o dobro de triatomíneo e de concentração de *T. cruzi*, o que

permitiria a divisão da amostra em duas e possibilitaria a extração da mesma amostras em dois momentos diferentes.

A análise dos questionários de opinião aplicados indica que a maioria dos profissionais entrevistados possui doutorado completo, atua na área de pesquisa e tem período de atuação de 5 a 9 anos na área. A maioria dos entrevistados utiliza *kits* comerciais, entretanto 50% afirma fazer uso de ambos os métodos (*kit* e *in house*) e as amostras de sangue são as mais frequentemente empregadas.

Em relação aos parâmetros de avaliação, os escores médios atribuídos à concentração, pureza e reprodutibilidade não diferiram entre si do ponto de vista estatístico. Por outro lado, os escores médios destas variáveis foram significativamente mais altos do que os atribuídos à praticidade e custo, sendo que na praticidade esses escores foram significativamente mais altos que no custo. Assim, verificamos que concentração, pureza e reprodutibilidade tem grande importância quando da escolha de um método de extração, independente do tipo de amostra empregada, enquanto, praticidade e custo revelaram-se parâmetros de relevância reduzida, quando comparados aos 3 anteriores. Isso ficou claro em nossos resultados pela constatação de que a extração pelo protocolo 01 revelou alto grau de impurezas, não sendo capaz de amplificar DNA do *T. cruzi* em nenhuma das amostras e, com isso, validando o protocolo 08 como ideal, uma vez que apresentou os melhores índices de pureza (91, 38%).

Em relação ao custo, deve ser enfatizado que análise da importância deste parâmetro foi realizada pelos executores da extração, não sendo estes necessariamente os responsáveis pela racionalização dos gastos da empresa/instituição. O grau de importância atribuído ao parâmetro custo poderia ser diferente caso a análise tivesse sido realizada pelos avaliadores de custo da empresa/instituição. Devido a isso, ponderamos a necessidade de se estimar o custo benefício de cada protocolo testado e a relação entre eles, complementando a avaliação.

Ao analisar os parâmetros de amplificação, duas características devem ser analisadas em paralelo: número e intensidade de bandas. Alguns protocolos amplificam semelhantes números de amostras, porém a intensidade das bandas obtidas pode variar. Assim, é possível afirmar que o protocolo que demonstra bandas mais intensas é capaz de detectar concentrações mais baixas de parasita. Isto ocorreu em nossos experimentos com a amplificação das amostras extraídas com os protocolos 08 e 09, onde bandas mais intensas foram registradas no método *in house*.

O reagente de coloração do gel pode ter relação com a observação de amostras positivas. O brometo de etídeo é o corante comumente empregado em protocolos de eletroforese em gel de agarose. Sua toxicidade, entretanto, é uma desvantagem no seu uso

como corante. O Gel Red® é também um corante para géis de agarose, o qual destaca-se por não apresentar características nocivas ao manipulador. Além disso, sua alta sensibilidade de detecção (<50ng de DNA) possibilita a observação de bandas amplificadas cuja visualização não é possível com a utilização do brometo, como observamos em alguns de nossos experimentos, aqui representado nas amostras de adultos extraídas pelo protocolo 8. A maior capacidade de detecção do Gel Red® nos conduz indicá-lo como corante de géis de agarose, proporcionando melhor percepção de amostras positivas, fato imprescindível em estudos clínicos e epidemiológicos.

O teste exato de Fisher indicou não haver diferença estatística significativa entre os protocolos 08 e 09 quanto ao número de amostras amplificadas. Entretanto, nas amostras de ninfas com concentração de 100 parasitas foi demonstrado que o protocolo 09 apresentou resultados superiores aos do 08. Este resultado discordante pode ser explicado por erros na diluição do *T. cruzi* ou na manipulação e extração das amostras. Estas etapas devem ser repetidas com o intuito de esclarecer ou confirmar os resultados descritos.

Entretanto, não seria ideal analisar a eficiência de um método apenas por alguns parâmetros isolados. É possível que determinado protocolo apresente bom desempenho em determinado parâmetro, mas não seja satisfatório em outro. Este fato foi verificado nas extrações com o protocolo 12, o qual foi capaz de amplificar a sequência de 330 pb do kDNA do *T. cruzi*, porém seus resultados de concentração e pureza do DNA foram insatisfatórios.

A amplificação de diferentes sequências a partir da mesma amostra extraída pode servir como um bom parâmetro para avaliar a performance do protocolo. Isso foi avaliado em 3 protocolos de diferentes performances, protocolos 01, 08 e 09, e confirmamos que o protocolo 01 tem baixo rendimento, uma vez que não foi capaz de amplificar um fragmento do citocromo b de triatomíneo, fato possível nos outros 2 protocolos. A não amplificação de fragmento de citocromo b do triatomíneo no protocolo 01 pode ser explicada pela alta concentração de inibidores da PCR, assim como ocorreu com o fragmento do *T. cruzi*.

Apesar de, ao final de nossos estudos, verificarmos protocolos com resultados satisfatórios, para aprimorar um protocolo para amostras com polissacarídeos sugerimos diminuir o tempo de incubação com tampão de lise e ação de reagentes que fazem a purificação da amostra, para diminuir o tempo total de extração e ser capaz de oferecer resultados com maior rapidez.

Dentro da análise dos parâmetros avaliados, o protocolo 08 seria o mais indicado para trabalhos de campo, pois apresentou maiores resultados de concentração de DNA total, pureza dentro da faixa ideal e maior número de amostras com baixa concentração de parasitas

positivas. Por outro lado, considerando a dinâmica de um laboratório de rotina, o protocolo ideal seria um com boa performance, mas que demandasse menor tempo de execução total e tivesse custo baixo, como é o caso do *kit* do *QIAamp DNA Mini Kit* (protocolo 09).

Para otimização do protocolo 08 em amostras de triatomíneos, e até mesmo outros artrópodes, seria necessário diminuir o tempo de incubação em tampão e precipitação com etanol, através da realização de testes com o intuito de verificar a ocorrência de diferenças significativas na ação dos reagentes do tampão sobre os polissacarídeos e da quantidade de DNA precipitado.

Considerando que um único protocolo testado não mostrou-se ideal em todos os parâmetros avaliados, sugerimos o desenvolvimento de um *kit* comercial que associe as melhores características de ambos os protocolos que apresentaram os melhores desempenhos.

Este *kit* deveria conter em seu tampão de lise o composto CTAB, por ser eficiente quando aplicado em amostras de artrópodes, característica imprescindível para o diagnóstico de parasitos em seus vetores. Para a obtenção de DNA com pureza satisfatória, seria necessário um composto adicional de purificação, como um solvente orgânico. Para facilitar a realização do método, todos os reagentes deveriam ser fornecidos prontos, eliminando o gasto de tempo com preparo de reagentes.

Outro item importante a ser ponderado seria o tempo total de extração, que deveria ser o mais reduzido possível, assim como a realização de poucas etapas de manipulação, a fim de reduzir os riscos de contaminação externa da amostra. Também o custo do *kit* deveria ser analisado de modo que sua aquisição não fosse inviável aos laboratórios.

Um *kit* comercial que associasse estas características teria uma aplicação logística factível em estudos epidemiológicos, onde é importante verificar a prevalência de parasitos circulantes em determinada área.

A preservação do material a ser extraído também exerce influência na obtenção do DNA, uma vez que o DNA é degradado em amostras conservadas de maneira inadequada (Gruzmacher *et al.*, 2002). A nossa análise foi efetivada a partir de amostras de triatomíneos vivos com jejum de 15 a 21 dias, porém o desempenho dos protocolos de extração também deveriam ser analisados em triatomíneos conservados sob diferentes métodos, a fim de atestar a eficiência em material que não seja fresco. Esta etapa já encontra-se em andamento no Laboratório de Doenças Parasitárias IOC/FIOCRUZ.

Apesar de não se tratar de um avanço científico “per se”, segundo o revisor e membros da banca de qualificação, temos plena certeza, através dos resultados que obtivemos, que o tema estudado contribui com a ciência, uma vez que propiciará não só uma maior atenção ao

processo da extração de DNA, como conduzirá à necessidade na melhora dos protocolos de extração, tanto em tempo, como em número de etapas e qualidade do DNA extraído. Os resultados foram tão distintos, que o insucesso de algumas reações pode não ter sido devido ao protocolo da reação de amplificação, senão que por obtenção de um DNA de má qualidade. Observações desta natureza, de certa forma, retardam o avanço tecnológico nos métodos de diagnóstico que lançam mão da biologia molecular para detecção de agentes infecciosos.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados descritos, verifica-se que todos os protocolos, com exceção do 01, são capazes de amplificar DNA de *T. cruzi* em macerados de triatomíneos inteiros.

Do total de 12 protocolos, 7 foram capazes de detectar a concentração de 1 *T. cruzi* por amostra extraída, independente do estágio testado (ninfa de 4º estágio ou adulto), e não houve correlação com a concentração estimada de DNA total.

Além do bom rendimento na detecção do *T. cruzi*, os protocolos 08 e 09 mostraram-se satisfatórios na amplificação de uma sequência do citocromo b dos triatomíneos dos macerados, podendo os referidos protocolos serem empregados em estudos com o vetor. Em relação aos demais protocolos, com exceção do 01 que não apresentou nenhuma banda, esse estudo deve ser mais aprofundado.

Os melhores resultados nos parâmetros concentração, grau de pureza e amplificação por PCR, foram apresentados pelos protocolos 08 (*in house*) e 09 (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*), tendo o protocolo 08 mostrado maior concentração estimada de DNA total e extrações dentro da faixa de pureza, em relação ao 09 e a todos os outros protocolos. Porém, em relação às variáveis que definiram o custo e a praticidade, o protocolo 09 mostrou ser mais econômico e demanda menos tempo na sua execução quando comparado com os demais protocolos testados. Dentro do questionário de opinião, que apontou o grau de pureza como parâmetro mais importante, o protocolo mais indicado para amplificação de *T. cruzi* em amostras extraídas de triatomíneos seria o protocolo 08.

Como o protocolo 10 corresponde ao *kit* de extração com maior descrição na literatura científica e ele apresentou resultados inferiores àqueles obtidos pelos protocolos de melhor rendimento nos parâmetros avaliados (08 e 09), verifica-se que não é o mais indicado para extração de DNA de *T. cruzi* em amostras do vetor, sendo necessária uma avaliação deste método em outras amostras biológicas.

O protocolo de menor rendimento quanto à pureza (protocolo 01) foi aquele em que o menor número de etapas foi realizado, o que pode ter sido consequência da não retirada de inibidores e de uma menor precipitação do DNA.

Para obtenção de melhores resultados de concentração de DNA, pureza e amplificação, considerando os resultados observados nesta dissertação, pode-se supor que um protocolo necessita de uma lise celular eficiente (processo físico associado à ação química de reagentes), uma etapa de purificação para a remoção de inibidores da PCR e de uma precipitação do DNA obtido.

A avaliação dos 12 protocolos sugere a importância da realização das 3 etapas básicas da extração (rompimento celular, purificação e precipitação do DNA), uma vez que quando não cumpridas, separadamente ou na sua totalidade, como no protocolo 01, há um comprometimento na obtenção de um DNA de qualidade. Neste protocolo, nenhum produto foi amplificado nas 3 concentrações de parasita, e a quantificação de DNA da maioria das amostras extraídas apresentaram valores negativos, mostrando o fracasso na extração de DNA de *T. cruzi* das amostras provenientes de triatomíneo.

7. REFERÊNCIAS

Alarcón M, Pérez MC, Villarreal J, Araujo S, Goncalves L, González A, Moreno E, Lugo-Yarbu A. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in the placenta and fetuses of mice with Chagasic acute infection. *Invest Clin*. 2009; 50(3): 335-45.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Manipulação de proteínas, DNA e RNA. In: *Biologia molecular da célula*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 469-546.

Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 4692-3.

Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P. Insect Cuticular Proteins. *Insect Biochem Mol Biol*. 1995; 25: 153-76.

Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev Pat Trop*. 1974; 3: 65-121.

Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30: 27-35.

Anonymus. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 (Suppl I): 429-432.

Araújo-Jorge TC, Sampaio EP, De Souza W, Meirelles M de N. *Trypanosoma cruzi*: the effect of variations in experimental conditions on the levels of macrophage infection *in vitro*. *Parasitol Res*. 1989; 75(4): 257-63.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(7): 2034-9.

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva E, Degrave W, Morel CM. 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.* 1993; 31(9): 2421-6.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1991; 48: 211-22.

Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004; 26: 274-81.

Berezcky S, Mårtensson A, Gil JP, Färnert A. Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 249-51.

Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Ponzi NA, Cavallo R. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol.* 2006; 29: 111-9.

Beroldingen CH, Blake ET, Higuchi R, Sensabaugh GF, Erlich H. Applications of PCR to the analysis of biological Evidence. In: Erlich HA, editor. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification.* New York: M Stocton Press; 1989. p.209-23.

Bextine B, Tuan SJ, Shaikh H, Blua M, Miller TA. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the glassy-winged sharpshooter. *Econ Entomol.* 2004; 97(3): 757-63.

Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992; 34(5): 403-8.

Borém A, Vieira MLC. *Glossário de Biotecnologia.* 1 ed. Editora Folha de Viçosa; 2005.

Borges-Pereira J, Junqueira ACV, Santos LC, Castro JAF, Araújo IB, Coura JR. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica. I- sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma Infestans*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 29(4): 341-7.

Botto-Mahan C, Ortiz, S, Rozas, M, Cattan, PE, Solari, A. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 237-39.

Brasileiro Filho G, Pena SDJ. Molecular biological techniques for the diagnosis of infectious diseases. Rev Soc Bras Med Trop. 1992; 25: 59-71.

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1962; 4: 389-96.

Breniere SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M. Direct Identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. Am J Trop Med Hyg. 1992; 46(3): 335-41.

Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, Noireau F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53(2): 179-84.

Brinkman JA, Rahmani MZ, Elizabeth Jones W, Chaturvedi AK, Hagensee ME. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. J Clin Virol. 2004; 29: 230-40.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88(1): 171-2.

Bueno V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. Rev Bras Hematol Hemoter. 2004; 26(4): 233-4.

Callegari-Jacques SM. Testes não-paramétricos. In: Bioestatística: Princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.165-84.

Campos R, Botto-Mahan C, Ortiz S, Acuña M, Cattan PE, Solari A. *Trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76: 324-6.

Castro C, Santos MCA, Silveira CA. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico artificial realizado imediatamente e quatro horas após a coleta de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37(2): 128-30.

Center for Diseases Control. Chagas disease after organ transplantation. *Morb Mortal Wkly Rep.* [periódico na internet] Jul 2006 [acesso em 05 Feb 2009]; 55 (29): Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5529a3.htm>

Chagas C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1(2): 159-218.

Chiari E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl 1: 299-300.

Chiari L, Valle JVR, Resende RMS. Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. *Circular Técnica.* 36, 2009. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/bio_9.pdf

Chieffi PP, Neto VA. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2000.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979; 18: 5294-9.

Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNazol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques.* 1997; 22: 550-3.

Ciampi AY, Azevedo VCR, Silva VP. Análise genética populacional de *Tabebuia impetiginosa* utilizando marcadores moleculares RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.* 55. Brasília, DF. 2003.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Princípios Éticos na Experimentação Animal. São Paulo, SP. 1991. 1 p.

Coronado X, Zulantay I, Reyes E, Apt W, Venegas J, Rodriguez J, Solari A, Sanchez G. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease. Acta Trop. 2006; 98: 314-7.

Coelho EGA, Oliveira DAA, Teixeira CS, Sampaio IBM, Rodrigues SG, Alves C. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 56(1): 111-5.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 1985; 16: 315-27.

Costa-Neves V. Detecção qualitativa de DNA de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos avaliando diferentes protocolos de extração. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro; 2008. 106 p.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 Suppl 1: 113-22.

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 Suppl 1: 31-40.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002; 18(4): 171-6.

Coura JR, Albajar-Viñas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010; 465: S6-S7.

Coutinho M, Dias JCP. A descoberta da doença de Chagas. Cad Cienc Tecnol. 1999; 16(2): 11-51.

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AM. Epi Info, Version 6.04: a word processing, database and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2000.

Deborggraeve S, Koffi M, Jamonneau V, Bonsu FA, Queyson R, Simarro PP. Molecular analysis of archived blood slides reveals an atypical human *Trypanosoma* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 61: 428-33.

Desloire S, Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L. Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet Res*. 2006; 37: 725-32.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. 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*. 2003; 98(1): 1-12.

Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 48-74.

Dias JCP. Doença de Chagas Aguda - Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN. In: Ministério da saúde do Brasil. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN); 2004.

Dias JCP. The treatment of Chagas disease (South American Trypanosomiasis). *Ann Intern Med*. 2006; 144(10): 772-4.

Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saude Publica*. 2007; 23 Suppl 1: 13-22.

Dias JCP, Prata A, Schofield CJ. Doença de Chagas na Amazônia - Esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(6): 669-78.

Dokanehiifard S, Bidmeshkipour A. Comparison of three methods for hepatitis b virus dna extraction from infected serum samples. *Eur J Biol Sci*. 2010; 2(1): 26-30.

Duffy T, Bisio M, Altchek J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(4): e419. doi:10.1371/journal.pntd.0000419

Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Eur J Biochem. 1974; 47: 91-7.

Embrapa Pecuária Sudeste. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/serviços/publicacao gratuita/ebooks/LVFund DNA.pdf>

Erlich H, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science. 1991; 252: 1643-51.

Fafi-Kremer S, Morand P, Barranger C, Barguès G, Magro S, Bés J, Bourgeois P, Joannes M, Seigneurin JM. Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification *kit* in whole blood with different extraction methods and PCR platforms. J Mol Diagn. 2008; 10: 78-84.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. Trypanosomiasis in the Brazilian Amazon: a mini-exon multiplex PCR to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95: 97-9.

Ferreira AW, Ávila SLM. Doença de Chagas. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 241-9.

Fundação Oswaldo Cruz. Manual de utilização de Animais/FIOCRUZ. 1 ed. Rio de Janeiro, RJ. 2008. 54 p.

Firestein GS, Gardner SM, Roeder WD. Quantitative molecular hybridization with unfractionated, solubilized cells using RNA probes and polyacrilamide gel electrophoresis. Anal Biochem. 1987; 167: 381-6.

Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Togneti A, Bevilaqua G, Segura EL. Chagas disease in Peruvian Inca mummy. Lancet. 1992; 339: 128-9.

Funada MR. Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium spp.* Em amostras fecais e comparação da nested PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009. 76p.

Galvão LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. J Clin Microbiol. 2003; 41(11): 5066-70.

Gomes ML, Galvao LMC, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60(2): 205-10.

Grutzmacher DD, Zimmer PD, Oliveira AC, Loeck AE, Fischer S, Elias AS, Vargas CCJ. Comparação de protocolos para extração de DNA de *Acromyrmex heyeri*. R Bras Agrobiologia. 2002; 8(2): 165-7.

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. Am J Phys Anthropol. 1999; 108(4): 401-7.

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, A-Arroyo FC, Aufderheide AC. Chagas disease and human migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95 (4): 553-5.

Guhl F, Lazdins-Helds JK, editores. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires: OMS/TDR; 2005. TDR/GTC/09. Patrocinado por UNICEF/PNUD/Banco Mundial/OMS.

Gürtler RE. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (Suppl. I): 52-9.

Gürtler RE, Kitron U, Carla Cecere M, Segura EL, Cohen JE. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104 (41): 16194-9.

Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. Vet Res. 2004; 35: 709-13.

Hamano S, Horio M, Miura S, Higo H, Iihoshi N, Noda K, Tada I, Takeuchi T. Detection of kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* from dried feces of triatomine bugs by PCR. Parasitol Int. 2001; 50: 135-138.

Hatefi Y, Hanstein WG. Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents. Proc Natl Acad Sci USA. 1969; 62: 1129-36.

Hoare CA. Morphological and Taxonomic Studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. J Eukaryot Microbiol. 1964; 11: 200-7.

Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1972.

Hoff R. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* blood lysed with ammonium chloride. J Parasitol. 1974; 60: 527-8.

Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE, Remington JS. Laboratory-acquired Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81(3): 437-40.

Huber WG. Antissépticos e desinfetantes. In: Jones LM. Farmacologia e terapêutica em veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1983. p.620-42. apud <http://www.fmvz.unesp.br/paulodomingues/graduacao/aula5-texto.pdf>

Junqueira ACV. *Trypanosoma cruzi* em áreas do Médio e Alto Rio Negro, Amazonas, Brasil. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005.

Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996; 90: 129-32.

Junqueira AC, Viñas Albajar P, Coura JR. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In: Coura JR, editor. In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 78-80.

Kalia A, Rattan A, Chopra P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. Anal Biochem. 1999; 275: 1-5.

Kitchin PA, Bootman JS. Quality control of the polymerase chain reaction. Rev Med Virol. 1993; 3: 107-14.

Kjos SA, Snowden KF, Olson JK. Biogeography and Trypanosoma cruzi Infection Prevalence of Chagas Disease Vectors in Texas, USA Vector Borne Zoonotic Dis. 2009; 9 (1): 41-9.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J Mol Biol. 1971; 56: 341-61.

Krettli AU, Cançado JR, Brener Z. Criterion of cure of human Chagas' disease after specific chemotherapy: recent advances. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79: 157-64.

Lallo MA, Santos MJ, Bondan EF. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. Rev Saude Publica. 2002; 36: 621-5.

Lana M, Lopes LA, Martins HR, Bahia MT, Machado-de-Assis GF, Wendling AP, Martins-Filho OA, Montoya RA, Dias JC, Albajar-Viñas P, Coura JR. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:1139-47.

Lardeux F, Tejerina R, Aliaga C, Ursic-Bedoya R, Lowenberger C, Chavez T. Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify *Plasmodium* parasites in wild-caught *Anopheles* in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102(5): 485-92.

Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, Lee HS, Jeon WJ, Choi KS, Kweon CH, Yoo HS. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. J Vet Sci. 2009; 10:43-51.

Lilacs [homepage]. São Paulo, SP: Biblioteca Virtual em Saúde [acessado em 03 jul 2009]. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>

Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT, Chou CM, Yeh PY, Huang CJ, Chou HY, Wang CH, Kou GH. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis Aquat Organ. 1996; 25: 133-41.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. Biomembranas e arquitetura celular. In: Biologia celular e molecular. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. p.146-93.

Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 344-78.

Machado EMM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. 2000. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95: 863-866.

Mahittikorn A, Wickert H, Sukthana Y. Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a b1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005; 36 (6): 1377-82.

Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology. 2006; 132: 57-65.

Marcon GE, Andrade PD, De Albuquerque DM, Wanderley JS, De Almeida EA, Guariento ME, Costa SC. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. Diagn Microbiol Infec Dis. 2002; 43: 39-43.

Matta A. Um novo reduvéio do Amazonas. *Rhodnius brethesi* n.sp. Amazonas Med. 1919; 2: 93-4.

Merzendorfer H. Insect chitin synthases: a review. J Comp Physiol B. 2006; 176: 1-15.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica. Doença de Chagas Aguda por transmissão oral. Brasília, 2007.

Miyamoto CT, Gomes ML, Maragon AV, Araújo SM, Liberati APT, Cabral RFP, Bahia MT, Lana M, Toledo MJO. Reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Rev Bras Anal Clin. 2007; 39: 275-8.

Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. Mol Ecol. 2003; 12: 997-1006.

Morgado MG, Ivo-dos-Santos J, Pinho RT, Argüelles E, Rezende JM, Galvão-Castro B. *Trypanosoma cruzi*: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84(3): 309-14.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27(7): 1477-82.

Mullis K, Fallona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986; 51: 263-73.

Nicklas JA, Buel E. Quantification of DNA in forensic samples. Anal Bioanal Chem. 2003; 376: 1160-7.

Noireau F, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L. Some considerations about the ecology of Triatominae. An Acad Bras Cienc. 2005; 77(3): 431-6.

Oskam L, Schoone GJ, Kroon CCM, Lujan R, Davies JB. Polymerase chain reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of blackflies. Trop Med Int Health. 1996; 4: 522-7.

Palomera-Avalos V, Castro-Félix P, Villalobos-Arámbula AR. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). Afr J Biotechnol. 2008; 7(1): 51-4.

Panaccio M, Lew A. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. Nucleic Acids Res. 1991; 19: 1151.

Pavan MA. Filogeografia de *Rhodnius pictipes* (Hemiptera: Reduviidae) na região amazônica [dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Oswaldo Cruz; 2009.

Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 2 - Attempts to upgrade the

reliability and the efficacy of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82(2): 259-72.

Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, de Carvalho Moreira CJ. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3 - On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev Saude Publica. 1988; 22(5): 390-400.

Pinto AYN, Valente SA, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(6): 602-14.

Pinto AS, Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrenc M. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. Int J Parasitol. 2000; 30: 843-8.

Pizarro JC, Lucero DE, Stevens L. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia. BMC Infect Dis. 2007; 7: 66-73.

Pizzi T, Prager R. Estabilizacion de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infeccion. Biologica. 1952; 16/17: 3-12.

Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev Saude Publica. 2003; 37(1): 107-15.

PubMed [homepage]. [acessado em 14 jul 2009]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Qiagen [homepage]. [acessado em 04 jan 2010]. Disponível em: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnastoolminikit.aspx>

Ramos NP, Brunelli KR, Camargo LEA, Marcos Filho J. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. Rev Bras Sementes. 2006; 28(1): 99-105.

Rampelotti FT, Ferreira A, Tcacenco FA, Martins JFS, Grützmacher AD, Prando HF. Diversidade genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, usando marcadores RAPD. Neotrop entomol. 2008; 37(1): 20-9.

Relatório Técnico. Consulta Técnica em Epidemiologia, Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos (DTA). Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(5): 512-514.

Ribeiro MG, Siqueira AK, Langoni H, Paes AC, Victória C, Da Silva AV, Listoni FJP, Souza AH. Modified E-test by the addition of EDTA-Tris and dimethyl sulfoxide on the potentiation of the effects of some antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bovine mastitis. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 56: 676-8.

Rojas A, Vinhães M, Rodríguez M, Monroy J, Persaud N, Aznar C. Reunião internacional sobre vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Implementação da iniciativa intergovernamental de vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Relatório Técnico. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(1): 82-9.

Romano E, Brasileiro, ACM. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ano 2, n. 9, p. 40-43, 1999. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/bio_9.pdf.

Rosner B. Fundamentals of Biostatistics. 4 ed. Duxbury Resource Center. 1994.

Rothhammer F, Allison MJ, Núñez L, Staden V, Arriaza B. Chagas disease in pre Columbian South America. Am J Phys Anthropol. 1985; 68: 495-8.

Russomando G, Rojas de Arias A, Almiron M, Figueredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *T. infestans*. Exp Parasitol. 1996; 83: 62-6.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, Fallona F, Arnheim N. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239: 487-91.

Saiki RK, Scharf S, Fallona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230: 1350-4.

Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 1996; 82: 363-6.

Sambrook J, Manniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sanchez MCA. Testes sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-ímmunes*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 9-44.

Santos AA, Neves VC, Junqueira ACV. Avaliação de protocolos de extração de DNA empregados na detecção de *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) por PCR em invertebrado: 1-escolha de um *kit* comercial. *Rev Soc Bras Med Trop*. [25^a Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 13^a Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; 2009; Uberaba] No Prelo. 2010.

Santos A, Cremades R, Rodríguez JC, García-Pachón E, Ruiz M, Royo G. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. *APMIS*. 2010; 118 (1): 60-5.

Santos RR, Silva JRV, Costa SHF, Rodrigues APR, Lôbo RNB, Figueiredo JR. Effect of 0.9% saline solution and phosphate buffer saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2002; 39: 254-9.

Sarkar G, Sommer SS. Shedding Light on PCR Contamination. *Nature*. 1990; 343: 27.

Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. 1991; 31(6): 547-57.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl 1: 75-85.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution and species groups within Triatominae. *Acta Trop*. 2009; 110: 88-100.

Schofield CJ, Grijalva MJ, Diotaiuti L. Distribución de los vectores de la Enfermedad de Chagas en países “no endémicos”: la posibilidad de transmisión vectorial fuera de América Latina. *Enferm Emerg*. 2009; 11 Suppl 1: 20-7.

Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser GP, Fish D. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 56: 339-42.

Scientific Eletronic Library Online [homepage]. São Paulo, SP: Scientific Eletronic Library Online [acessado em 27 jul 2009]. Disponível em: <http://www.scielo.org/php/index.php>

Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em doença de chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38 (Suplemento III).

Shiguti WA, Shiguti VSC. Apostila de estatística. Brasília; 2006. 69 p.

Shikanai-Yasuda MA, Ochs DE, Tolezano JE, Kirchhoff LV. Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996; 90: 649-51.

Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol*. 1997; 85: 225-32.

Silva LH, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin Biol*. 1953; 20(3): 191-207.

Silveira AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saude Publica*. 2000; 16 Suppl 2: 35-42.

Silveira JF. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 127-52.

Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang*. 2004; 87: 204-7.

Sonleitner FJ. The stress factor in insect colonies. *Bull World Health Organ*. 1964; 31: 545-9.

Souza MA. Apostila da Disciplina de Biologia e Taxonomia de Tripanossomatídeos. Rio de Janeiro; 2000. 54 p.

Stange C, Prehn D, Arce-Johnson P. Isolation of *Pinus radiata* Genomic DNA Suitable for RAPD Analysis. *Plant Mol Biol Rep*. 1998; 16: 1-8.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989; 33: 205-14.

Sturm NR, Teixeira A. Redes entrelaçadas. In: Teixeira A, editor. *Doença de Chagas e evolução*. Brasília: Editora Universidade de Brasília: Finatec; 2007. p. 59-64.

Suarez-Mutis M, Cuervo P, Leoratti FMS, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49: 159-64.

Teixeira A. Aspectos médico-sociais da doença de Chagas. In: Teixeira A, editor. *Doença de Chagas e evolução*. Brasília: Editora Universidade de Brasília: Finatec; 2007. p. 293-304.

Teixeira SMR, Bartholomeu DC. Doença de Chagas. Arquitetura genômica e composição gênica do parasito [homepage]. [acessado em 13 jun 2010]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=14>

Trochimchuk T, Fotheringham J, Topp E, Schraft H, Leung KT. A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in cattle manure. *J Microbiol Methods*. 2003; 54: 165-75.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr. N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira ACV, Camargo ME. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute, and Chronic Chagas' Disease. *J Clin Microbiol*. 1996; 34 (9): 2143-7.

Valadares HMS, Pimenta JR, Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, Oliveira RP, Chiari E, Moreira MCV, Brasileiro-Filho G, Schijman AG, Franco GR, Machado CR, Pena SD, Macedo AM. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 839-50.

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*. 1999; 72: 203-12.

Veloso IF, Lopes MT, Salas CE, Moreira EC. A comparison of three DNA extractive procedures with leptospira for polymerase chain reaction analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 339-43.

Vieira CA, Vieira LA, Bueno JJR, Debiassi MRM, Mancim AC, Giglio JR. Ação de vários agentes sobre o efeito paralisante dos membros posteriores induzido pela crotamina em camundongos. *Biosci J*. 2006; 22: 125-32.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68: 574-82.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose gel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 615-9.

Webster G, Newberry CJ, Fry JC, Weightman AJ. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale *J Microbiol Methods*. 2003; 55: 155– 64.

Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8: 113–30.

Werneck GL, Costa CHN, Costa D. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection.* 2003; 31: 174-7.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a Simplified Polymerase Chain Reaction Procedure to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples from Chronic Chagasic Patients in a Rural Endemic Area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51(6): 771-777.

World Health Organization. TDR Strategic Direction for research: Chagas disease. February 2002. Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Resolution Chagas disease: control and elimination. 63 World Health Assembly, 17-21 Mayo 2010. Geneva, Switzerland.

Xavier MO, Madrid IM, Meinerz ARM, Cleff MB, Schuch LFD, Nobre1 MO, Meireles MCA. Atividade “*In vitro*” de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*. *Arq Inst Biol.* 2007; 74(1): 49-53.

Yamada Y, Makimura K, Mirhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, Osumi M. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis.* 2002; 55: 122-5.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 1051-4.

Zulantay I, Apt W, Gil LC, Rocha C, Mundaca K, Solari A, Sánchez G, Rodriguez C, Martínez G, De Pablos LM, Sandoval L, Rodríguez J, Vilchez S, Osuna A. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *T. infestans* fed on patients with chronic american trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007; 101: 673-9.

8. APÊNDICES

Apêndice 1: Descrição dos protocolos testados

Protocolo 01 (Modificado de Breniere *et al.*, 1992)

- Distribuir água ultra-pura em tubos *ependorf* de 1,5 ml, conforme o volume recomendado, sendo este proporcional ao peso do triatomíneo;

OBS: O protocolo original recomenda empregar 200 μ L de água destilada por amostra de fezes de triatomíneo, porém alteramos esse volume, uma vez que não trabalhamos com excreta e sim com o inseto inteiro. Para calcular este “novo” volume, pesamos o espécime e fizemos uma regra de três, considerando que 1g corresponde a 1ml*. Os volumes empregados encontram-se descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume de água
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4 ^o estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	0,53 mL (530 μ L)
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	1,46 mL (1.460 μ L)
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	2,4 mL (2.400 μ L) ←

*O artigo recomenda utilizar 200 μ L de H₂O destilada para 10 a 20 μ L de fezes. Calculamos a média entre esses valores, cujo resultado foi 15 μ L.

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 μ L de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 μ L de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 μ L de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 2400 μ L ←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Após macerar, ferver a amostra por 10 minutos (Britto *et al.*, 1993). Passado os 10 minutos, deixar esfriar e distribuir o “macerado fervido” em dois ou três tubos de *ependorfs* de 1, 5 mL (quantidades iguais);
- Centrifugar os tubos a 8000g (vide tabela de conversão a seguir) por 10 minutos;
- Retirar o sobrenadante de cada um deles e transferir para um único tubo de *ependorf* de 1,5 mL ou 2 mL. Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C.

Protocolo 02 (Modificado de Shikanai-Yasuda *et al.*, 1996)

- O protocolo original recomenda empregar a solução de extração (Triton-X 100 1%, sacarose; 0,32 M; Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM) na proporção de 1 volume da amostra (triatomíneo) para 5 volumes de solução;
- Após preparar a solução de extração, distribuir em tubos *ependorf* de 1,5 ml, conforme o volume recomendado, sendo este proporcional ao peso do triatomíneo;

OBS: Para calcular este volume, pesar o espécime e fazer uma regra de três, considerando que 1 g corresponde a 1 ml**. Os volumes empregados encontram-se descritos na tabela abaixo;

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume de tampão
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	0,20 mL (200 µL)
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	0,55 mL (550 µL)
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	0,90 mL (900 µL)

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 2400 µL ←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Digerir com proteinase K (300 µg/mL) a 55°C por 1 hora. Informação repassada via e-mail pelo último autor do artigo (Dr. Kirchhoff), uma vez que a concentração descrita no original é de 300 mg/mL. Os volumes encontram-se descritos na tabela abaixo:

Espécie	Ptn K 20mg/mL	Ptn K 20mg/mL
Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	3 µL	6 µL
Adulto de <i>Rb</i>	8,25 µL	16,5 µL
Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	13,5 µL	27 µL

- Inativar a enzima por 10 minutos à 95°C;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;

- Adicionar igual volume de fenol-clorofórmio (pH 8,0), ao tubo contendo o sobrenadante coletado. Seguimos o protocolo fenol-clorofórmio descrito no Sambrook, Manniatis e Fritsch (1989) uma vez que os autores não detalham os procedimentos de extração;
- Misturar até formar uma emulsão e centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se a fase orgânica ou aquosa não ficarem bem separadas, centrifugar por mais tempo ou a uma velocidade maior;
- Após centrifugação, transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Descartar o tubo contendo a fase orgânica e a interface;
- Adicionar fenol-clorofórmio (pH 8,0) em volume igual a fase aquosa obtida na primeira centrifugação. Essa repetição foi sugerida no artigo original, porém sem detalhamento; por isso seguimos o processo de fenol-clorofórmio descrito no Sambrook, Manniatis e Fritsch (1989);
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Descartar a fase orgânica e a interface;
- Adicionar 2 volumes de etanol absoluto, 50 μ L de acetato de sódio 3M e 1 μ L de glicogênio 20 mg/mL;
- Transferir o tubo para um recipiente com gelo e deixar por 1 hora. Como o artigo original, não entra em detalhamento sobre a precipitação, seguimos o processo de precipitação de DNA descrito no Sambrook, Manniatis e Fritsch (1989);
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos;
- Verter o tubo para descarte do sobrenadante em béquer com água sanitária;
- Rinsar o sedimento preenchendo o tubo com 500 μ L de etanol 70%;
- A seguir, verter o álcool em um béquer com água sanitária;
-
- Deixar o tubo aberto, na bancada a temperatura ambiente, para evaporação do etanol;
- Dissolver o pellet de DNA em 2 volumes de água destilada;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 03 (Modificado de Oskam *et al.*, 1996)

- Adicionar o tampão de lise 1 (NaCl 50mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 10Mm pH 8,0, Triton X-100 1%, DTT 10mM), na concentração de 15µL/simulídeo, de acordo com o peso dos triatomíneos;

OBS: Pesar o triatomíneo e, considerando que 1 g corresponde a 1 ml, fazer uma regra de três para achar o volume sugerido, considerando a relação fornecida pelo artigo de 15 µL/ simulídeo, ou seja, 15 µL – 0,0004g (peso médio de simulídeo da espécie *Simulium guianense*, fornecido pela Dra. Verônica Marchon). Considerando que desejamos obter o DNA do parasito e não do vetor, utilizaremos apenas um quinto do volume calculado em relação à concentração indicada no artigo original, pois o volume calculado iria diluir muito a amostra utilizada. Os valores encontram-se descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume	1/5 do volume
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	1.500 µL	300 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	5.250 µL	1.050 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	6.750 µL	1.350 µL

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 2400 µL ←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Passar o material homogeneizado por 4 ciclos, como segue:
 - 1- Congelar em nitrogênio líquido
 - 2- Descongelar em água a 60°C
- Incubar por 1 hora a 60°C;
- Adicionar o segundo tampão de lise 2 (NaCl 50mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 10Mm pH 8,0, Proteinase k 200µg/mL, Triton X-100 1%), na concentração de 80µL/simulídeo, de acordo com o peso dos triatomíneos (cálculo realizado do mesmo modo que o primeiro tampão). Os valores encontram-se descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume	1/5 do volume
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	8.000 µL	1.600 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	28.000 µL	5.600 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	36.000 µL	1.350 µL

- Incubar as amostras por 3 horas a 60°C;
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Para prevenir a inibição da reação da PCR, o DNA isolado será diluído 10 vezes e fervido a 100°C por 5 minutos;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 04 (Modificado de Silber *et al.*, 1997)

- Adicionar água ultra-pura de acordo com o peso dos triatomíneos;

OBS: Pesar o triatomíneo e, considerando que 1 g corresponde a 1 ml, fazer uma regra de três para achar o volume sugerido). Por não ser suficiente para cobrir o triatomíneos, decidimos multiplicar o valor encontrado por 10. Os valores encontram-se descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume	10x o volume
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	40 µL	400 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	110 µL	1.100 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	180 µL	1.800 µL

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 2400 µL ←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Ferver o macerado por 15 minutos;
- Adicionar fenol-clorofórmio (pH 8,0) em volume igual ao da amostra (seguimos o processo de fenol-clorofórmio descrito no Sambrook, Manniatis e Fritsch (1989));
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se as fases não estiverem separadas, centrifugar novamente por mais tempo ou a uma maior velocidade;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Repetir a extração com fenol-clorofórmio até não existir mais proteínas visíveis na interface das fases aquosa e orgânica (normalmente apenas mais uma etapa é o suficiente);

- Adicionar água ultra-pura em volume igual ao da amostra do tubo original;
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;
- Centrifugar novamente a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Transferir o sobrenadante para o mesmo tubo contendo o sobrenadante retirado anteriormente e, a seguir, adicionar fenol-clorofórmio (pH 8,0) em volume igual;
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Descartar a fase orgânica e a interface;
- Adicionar igual volume de clorofórmio;
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se as fases não estiverem separadas, centrifugar novamente por mais tempo ou a uma maior velocidade;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Para precipitação do DNA, adicionar 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (concentração inicial) e misturar;
- Posteriormente adicionar 2 volumes de etanol absoluto p.a. (merck ou similar) gelado (-20°C) e misturar;
- A seguir, transferir o tubo para um recipiente com gelo e deixar por 30 minutos;
- Centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos;
- Remover o sobrenadante;
- Preencher o tudo até a metade com etanol 70%;
- Centrifugar a 12.000 g por 2 minutos a 4°C;
- Remover o sobrenadante;
- Deixar o tubo aberto, na bancada, para evaporação do etanol a temperatura ambiente;
- Dissolver o pellet de DNA em 25 µL de água ultra-pura;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 05 (Modificado de Aljanabi & Martinez, 1997)

1ª Etapa:

- Distribuir o tampão de lise (NaCl 0,4M, Tris-HCL 10 mM pH 8.0, EDTA 2mM pH 8.0) em tubos *ependorf* de 1,5 µL;

OBS: No artigo é recomendado utilizar 400 µL de tampão de lise para uma amostra biológica com peso de 50-100 mg. Considerando as faixas de peso dos triatomíneos a serem empregados (ninfas e adultos), optamos pelo peso médio recomendado no artigo (75mg) como base para calcular o volume a ser empregado. Pesamos os espécimes e fizemos uma regra de três, considerando que 1g corresponde a 1mL. Os volumes empregados encontram-se descritos na tabela abaixo, na faixa amarela.

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume 1	Volume 2
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	160 µL	213 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	440 µL	587 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	720 µL	960 µL

* Considerando 400 µL para 0,100 g.

** Considerando 400 µL para 0,075 g.

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (incluir 1.000 e fazer inicialmente apenas com *R.brethesi*) parasitas. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 960 µL←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática (no caso de utilizar tubo de *ependorf*) de 200 µL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- O protocolo original recomenda adicionar 40 µL SDS 20% (concentração final de 2%) e 8 µL de proteinase K 20 mg/mL (concentração final 400 µg/mL), porém baseado nos valores que alteramos inicialmente empregar os novos volumes na tabela abaixo:

Espécie	Ptn K 20mg/mL	Ptn K 20mg/mL
Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	21,3 µL	4,7 µL
Adulto de <i>Rb</i>	58,7 µL	12,9 µL
Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	96 µL	21,1 µL

- Homogeneizar bem, batendo com o dedo no tubo;
- Incubar a 65°C *overnight* em banho-maria.

2ª Etapa:

- O protocolo original recomenda adicionar 300 µL de NaCl a 6 M (NaCl saturado em água) de acordo com a tabela abaixo:

Espécie	NaCl 6M
Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	159,75 µL
Adulto de <i>Rb</i>	440,25 µL
Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	720 µL

- Passar em vortex por 30 segundos na velocidade máxima;
- Centrifugar por 30 minutos a 10.000 g;
- Transferir o sobrenadante para outro tubo;
- Adicionar volume igual de isopropanol (calcular o volume de sobrenadante retirado em cada tubo). Homogeneizar bem a amostra e incubar a -20°C por 1 hora;
- Centrifugar por 20 minutos a 10.000 g a 4°C (colocar centrifuga dentro da geladeira);
- Verter o tubo para descarte do sobrenadante em um Becker com água sanitária;
- Lavar o pellet com 500 ul de etanol a 70% (valor suficiente para preencher o tudo até aproximadamente metade). Não centrifugar;
- Verter o tubo para descarte do sobrenadante para um Becker com água sanitária;
- Deixar o tubo aberto, na bancada, dentro da capela, para evaporação do etanol a temperatura ambiente;

OBS: Não deixar o tubo muito tempo aberto (+ de 5 min), pois o contato com o ar dificulta a dissolução do DNA.

- Ressuspender o pellet de DNA com 300-500 µL (optamos por 400 µL) de água destilada (utilizamos água ultra-pura). A “ressuspensão” do DNA tem melhor rendimento quando efetuada lentamente;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C. Nunca realizar a PCR no dia da extração;

Protocolo 06 (Modificado de Vallejo *et al.*, 1999)

1ª Etapa:

- Distribuir a solução de 6M guanidina hidrocloreídrica/200mM EDTA (GuanidinaHCl-EDTA=GE) em tubos *eppendorf* de 1,5 µL (Ávila *et al.*, 1993);

OBS: O protocolo original recomenda diluir em Guanidina-EDTA o conteúdo fecal de diferentes partes do tubo digestivo, na proporção de 1:1. Diferente do protocolo original, utilizamos um novo volume que foi baseado na quantidade mínima suficiente para “cobrir” o triatomíneo dentro de um tubo *eppendorf* de 1,5 µL. Os volumes empregados e sua relação com o peso do espécime encontram-se descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume GE
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	500 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	1.100 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	1.500 µL

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 1500 µL←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Após macerar, reservar em temperatura ambiente por 1 semana (Britto *et al.*, 1993). Essa informação de uma semana não consta na artigo de Britto *et al.*, mas foi repassada verbalmente pelo referido primeiro autor. Esse período é importante para “ação da guanidina”.

2ª Etapa:

- Ferver as amostras por 15 minutos (o tubo só deverá ser colocado na água após a mesma estar em ebulição). Não deixar mais que 15 min para não haver degradação do DNA;
- No dia seguinte à fervura, retirar uma alíquota de 200 µL da amostra fervida, em vez de duas como recomendado no protocolo original, e colocar em um tubo de *eppendorf* de 1,5 mL;

- Adicionar 200 μ L fenol-clorofórmio (pH 8,0) a amostra aliqotada. Seguimos o protocolo de fenol-clorofórmio descrito no Sambrook, Manniatis e Fritsch (1989) uma vez que o autor não detalha os procedimentos de extração;
- Misturar até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se as fases orgânica e aquosa não ficarem bem separadas, centrifugar por mais tempo ou a uma velocidade maior;
- Após centrifugação, transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionar igual volume de água ultra-pura ao tubo contendo o sedimento (fase orgânica e interface) da primeira centrifugação. Exemplo: se obtiver 100 mL de fase orgânica mais interface, adicionar 100 ml de água ultra-pura. Misturar bem até formar uma emulsão. Centrifugar novamente a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Após centrifugar, transferir o sobrenadante para o mesmo tubo contendo o sobrenadante retirado inicialmente. Descartar o tubo contendo a fase orgânica e a interface;
- Adicionar igual volume de clorofórmio saturado, ao tubo contendo os dois sobrenadantes coletados;
- Misturar até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se as fases não estiverem separadas, centrifugar novamente por mais tempo ou a uma maior velocidade;
- Após a centrifugação, transferir o sobrenadante para um novo tubo e quantificar o volume obtido;
- Precipitar o DNA, adicionando 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (concentração inicial) e logo a seguir 2 volumes de etanol absoluto p.a. (merck ou similar) gelado (-20°C). Homogeneizar e transferir o tubo para um recipiente com gelo e deixar por 30 minutos;
- Passado os 30 minutos, centrifugar a 12.000g durante 10 minutos;
- Após centrifugação, descartar o sobrenadante. O descarte deve ser efetuado vertendo o tubo em um Becker pequeno contendo hipoclorito. Ter cuidado para que o tubo não entre em contato com o hipoclorito;
- Deixar o tubo aberto, contendo o pellet de DNA, dentro em um *heat block* com objetivo de promover a evaporação do etanol “residual”, por cerca de 5 a 10 minutos. Sobre o tubo aberto colocar um tampa grande de plástico do tamanho do bloco;
- Ressuspender o pellet de DNA adicionando “lentamente” 30 μ L de água destilada (utilizamos água ultra-pura). A “ressuspensão” do DNA tem melhor rendimento quando efetuada lentamente;
- Conservar/estocar O DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 07 (Modificado de Hamano *et al.*, 2001)

- Adicionar tampão de lise (Tris HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%) na quantidade referente ao peso do triatomíneo;

OBS: Valores baseados no protocolo modificado de Aljanabi & Martinez (1997), o qual apresentou, no estudo-piloto, os melhores resultados de amplificação, ao invés de 200 µL como sugerido no artigo original.

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume 1	Volume 2
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	160 µL	213 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	440 µL	587 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	720 µL	960 µL

* Considerando 400 µL para 0,100 g.

** Considerando 400 µL para 0,075 g.

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 1500 µL←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Adicionar proteinase K 10 mg/mL (concentração final 200 µg/mL) baseado nos valores descritos na tabela abaixo:

Espécie	Ptn K 10mg/mL
Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	4,26 µL
Adulto de <i>Rb</i>	11,74 µL
Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	19,2 µL

- Reservar a 37°C por 2 horas;
- Adicionar fenol-clorofórmio (pH 8,0) em volume igual ao da amostra;
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;

- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se as fases não estiverem separadas, centrifugar novamente por mais tempo ou a uma maior velocidade;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Descartar a fase orgânica;
- Adicionar igual volume de clorofórmio;
- Misturar a amostra até formar uma emulsão;
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se as fases não estiverem separadas, centrifugar novamente por mais tempo ou a uma maior velocidade;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Precipitar o DNA, adicionando 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (concentração inicial) e logo a seguir 2,5 volumes de etanol absoluto p.a. (merck ou similar) gelado (-20°C). Homogeneizar e transferir o tubo para um recipiente com gelo e deixar por 30 minutos;
- Passado os 30 minutos, centrifugar a 12.000g durante 10 minutos;
- Após centrifugação, descartar o sobrenadante. O descarte deve ser efetuado vertendo o tubo em um Becker pequeno contendo hipoclorito. Ter cuidado para que o tubo não entre em contato com o hipoclorito;
- Deixar o tubo aberto, contendo o pellet de DNA, dentro em um heat block com objetivo de promover a evaporação do etanol “residual”, por cerca de 5 a 10 minutos. Sobre o tubo aberto colocar um tampa grande de plástico do tamanho do bloco;
- Ressuspender o pellet de DNA adicionando “lentamente” em 100 µL de água destilada (utilizamos água ultra-pura). A “ressuspensão” do DNA tem melhor rendimento quando efetuada lentamente.
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 08 (Modificado de Desloire *et al.*, 2006)

- Distribuir o tampão de lise (CTAB 2%, NaCl 1,4M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, β -mercaptoetanol 0,2%) pré-aquecido a 65°C, na quantidade referente ao peso do triatomíneo nos tubos;

OBS: O artigo original relata que o *D. gallinae* pesa 11 mg (0,01g) e utiliza 200 μ L de tampão de lise. Fazendo as devidas correções com os pesos dos triatomíneos, chegamos aos valores descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume do tampão
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	800 μ L
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	2.200 μ L
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	3.600 μ L

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 μ L de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 μ L de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 μ L de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 1500 μ L←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Incubar a amostra a 65 °C por 1 hora;
- Adicionar 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1);
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se as fases não estiverem separadas, centrifugar novamente por mais tempo ou a uma maior velocidade;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionar 1 volume de isopropanol;
- Reservar a amostra -20°C por 2 horas;

- Centrifugar a 18000 g por 30 min;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 300 μ L de etanol 70% ao pellet;
- Centrifugar a 12.000 g por 2 minutos a 4°C;
- Remover o sobrenadante;
- Secar por 10-15 min a 50°C (heat block);
- Ressuspender o pellet de DNA adicionando “lentamente” 20 μ L de água destilada (utilizamos água ultra-pura). A “ressuspensão” do DNA tem melhor rendimento quando efetuada lentamente;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 9
KIT: QIAamp DNA Stool Mini Kit
(Protocolo para isolamento do DNA em fezes de organismos patogênicos)

- Com auxílio de uma pinça, transferir o exemplar de triatomíneo para um tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (*ependorf*) e este para o gelo. Reservar por 10 minutos;

OBS: Como recomendado pelo fabricante, nós verificamos antes o peso de um triatomíneo e a seguir fizemos a correlação com o peso estabelecido (180-220 mg). Para efetuar a correlação, empregamos o valor médio (200 mg) compreendido entre os valores estabelecidos (180-220 mg) e realizamos a conversão com base no peso dos exemplares a serem testados.

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume de tampão ASL
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	280 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	770 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	1.260 µL

- Adicionar o volume re-calculado do tampão ASL, conforme a tabela acima;
- Em seguida, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 1260 µL←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Logo a seguir, com o auxílio de uma ponteira estéril com barreira, macerar o triatomíneo;
- Após o exemplar ficar em pedaços, passar o tubo com o macerado no vortex e deixar por 1 minuto ou até que a amostra esteja completamente homogeneizada;
- Após passar no vortex, aquecer a suspensão por 5 minutos a 70°C em placa de aquecimento. Logo a seguir, com o auxílio de uma ponteira estéril com barreira, novamente macerar o triatomíneo. Esse aquecimento aumenta a recuperação do DNA total e ajuda na lise de bactérias e outros parasitas;
- Passar novamente no vortex durante 15 segundos e a seguir centrifugar rapidamente a 12.000 rpm por 1 min para “agregar as partículas maiores do macerado” e com isso a formação de um pellet;
- Transferir um volume determinado do sobrenadante para um tubo de microcentrífuga de 2 ml. O volume sugerido pelo fabricante é de 1,2 ml, porém seguir a correlação com o peso estabelecido do triatomíneo (vide tabela a seguir). Descartar o pellet;

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume de tampão ASL
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	240 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	660 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	1.080 µL

Nota: I. Os tubos usados devem ser grandes o suficiente para acomodar um *Inhibitex Tablet*.

II. Transferência de pequenas quantidades de material de sedimento não afetará o procedimento.

- Adicionar 1 tablete de *InhibitEX* em cada tubo contendo o sobrenadante e passar no Vortex imediatamente e continuamente por 1 minuto ou até que o tablete fique totalmente dissolvido (informação fornecida pelo fabricante). Incubar a suspensão por 1 min em temperatura ambiente para permitir adsorção dos inibidores à matriz *InhibitEX*;
- Centrifugar a amostra à velocidade de 12000 rpm por 4 minutos para que os inibidores ligados à matriz do *InhibitEX* formem um pellet;
- Pipetar todo o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (não fornecido) e descartar o sedimento (pellet);
- Centrifugar o sobrenadante na velocidade de 12000 rpm por 4 min;

Nota: Transferência de pequenas quantidades de material sedimentado a partir do passo 7 não afetará o procedimento.

- Pipetar um volume determinado de proteinase K para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (não fornecido). Alterar o volume de 15 µl de proteinase k, estabelecido pelo fabricante, segundo a relação peso/volume utilizado inicialmente, conforme tabela a seguir:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Proteinase K
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	3 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	8,25 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	13,5 µL

- Pipetar um volume determinado do sobrenadante centrifugado por 4 min na etapa 8 para o tubo de microcentrífuga já contendo a proteinase K. O volume de sobrenadante recomendado pelo fabricante é de 200µl, porém alterar o volume estabelecido segundo a relação peso/volume utilizado inicialmente, conforme tabela a seguir:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Sobrenadante
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	40 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	110 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	180 µL

- Adicionar o tampão AL ao tubo contendo o último sobrenadante da etapa 8 mais a proteinase K. Alterar o volume de 200 µL de tampão AL, estabelecido pelo fabricante, segundo a relação peso/volume utilizado inicialmente (tabela a seguir) e passar no Vortex por 15 segundos;

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Tampão AL
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	40 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	110 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	180 µL

Nota: Não adicionar proteinase K diretamente no tampão AL. É essencial que a amostra e a solução tampão AL sejam misturadas para formar uma solução homogênea.

- Incubar a 70°C por 10 minutos, porém antes centrifugar brevemente (spin) para remover as gotas de dentro da tampa do tubo (opcional);
- Passado os 10 minutos, adicionar o etanol PA de boa qualidade (100%) ao lisado. Alterar o volume de 200 µL de etanol, estabelecido no protocolo, segundo a relação peso/volume utilizado inicialmente (tabela abaixo) e passar no Vortex por 15 segundos. Feito isso centrifugar brevemente (spin) para remover as gotas de dentro da tampa do tubo (opcional);

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Etanol
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	40 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	110 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	180 µL

- A seguir, tomando cuidado para não umedecer o aro, passar todo o lisado (volume máximo total= 553,5 ul) pela QIAamp spin column (coluna). Feche a tampa e centrifugue a velocidade máxima (aproximadamente 14000 rpm) por 1 min. Passado 1 minuto, transferir cuidadosamente a coluna para um novo tubo (vem no *kit*) de 2 ml, e descartar o tubo contendo o filtrado anterior;

Nota. I. Fechar a coluna antes de cada centrifugação, a fim de evitar a formação de aerossóis durante a mesma.

II. Se todo o lisado não tiver passado através da coluna, após a centrifugação, centrifugar novamente até que a coluna (QIAamp spin column) esteja vazia.

- Cuidadosamente abra a coluna e adicione o volume estabelecido na tabela abaixo do tampão AW 1. Feche a tampa e centrifugue a toda velocidade (aproximadamente 14000 rpm) por 1 min. Passado 1 minuto, transferir cuidadosamente a coluna para um novo tubo de 2 ml (vem no *kit*), e descartar o tubo contendo o filtrado anterior;

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Tampão AW1
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	100 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	275 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	450 µL

- Pela terceira vez, abra a coluna e adicione o volume estabelecido na tabela abaixo de tampão AW2. Feche a tampa e centrifugue a toda a velocidade (aproximadamente 14000 rpm) por 3 min. Descartar o tubo de coleta contendo o filtrado;

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Tampão AW2
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	100 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	275 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	450 µL

Nota: O resíduo do tampão AW2 no eluído pode causar problemas nas aplicações. Algumas centrífugas podem vibrar em desaceleração resultando, no fluxo contínuo, onde o Tampão AW2 pode entrar em contato com o *QIAamp spin column*. Retirar a coluna e o tubo de coleta a partir do rotor também pode causar fluxo podendo entrar em contacto com o *QIAamp spin column*.

- Passado os 3 min, coloque a coluna em um novo tubo de 2 ml (não fornecido) e descarte o tubo anterior com o filtrado. Centrifugue a velocidade máxima (14000 rpm) por 1 min. Este passo ajuda a eliminar a possibilidade de contaminação do tampão AW2;
- Transfira a coluna para um 5° tubo (caso efetue a etapa 17) de microcentrífuga 1,5 ml (não fornecido). Cuidadosamente abra a coluna e pipetar o volume estabelecido na tabela abaixo de Tampão AE diretamente na membrana QIAamp. Feche a tampa e incubar durante 1 min a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar a velocidade máxima (aproximadamente 14000 rpm) por 1 min para eluição de DNA;

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Tampão AE
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	40 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	110 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	180 µL

Nota:I. Para obter melhores resultados da PCR, utilize o mínimo de líquido possível no procedimento; o volume de líquido utilizado como modelo não deve exceder 10% do volume final da mistura de PCR. Além disso, nota-se que grandes quantidades de DNA podem inibir a PCR. O rendimento do DNA é tipicamente 15-60 g, mas, dependendo da amostra individual de fezes e a forma como ele foi armazenado, pode variar de 5 a 100 mg. Concentração de DNA é tipicamente 75-300 ng / µl.

- O material filtrado deve ser conservado/estocado à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 10
KIT: QIAamp DNA Mini Kit
(Protocolo para isolamento do DNA de tecido)

- Colocar o triatomíneo em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, adicionar PBS conforme valores estabelecidos na tabela abaixo e macerar bem o triatomíneo com o auxílio de uma ponteira estéril com barreira;
- Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C por 10 min. Esta escolha foi baseada nos trabalho de Britto *et al.*, (1993) que demonstra que a fervura por 5 min a 100°C causa a linearização da maioria dos minicírculos do kDNA. Optamos pelo tempo de 10 min, pois verificamos que no tempo de 5 min o kDNA ainda não está totalmente linearizado e em 15 min, apesar de totalmente linearizado, o kDNA começa a ser degradado (Britto *et al.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 88; 171-2. 1993);

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume de PBS
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	128 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	352 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	576 µL

- O protocolo sugere transferir 25 µL, porém colocaremos 30 µL do macerado fervido para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 100 µL de tampão ATL;
- Adicionar 20 µL proteinase K, passar em vortex e incubar a 56°C por 3 horas. Durante as 3 horas de incubação, passar em vortex 2 vezes: 1º vortex após a primeira hora e 2º vortex após a segunda hora de incubação, para dispersar a amostra;
- Centrifugar brevemente (spin) o tubo de 1,5 ml de microcentrifuga para remover as gotas do interior da tampa;
- Adicionar 200 µL de tampão AL, passar em pulse-vortex por 15 seg e incubar a 70°C por 10 min;
- Passados os 10 min, centrifugar brevemente o tubo de 1,5 ml para remover gotas do interior da tampa.

Nota:I. É essencial que a amostra e o tampão AL sejam bem misturados para produzir uma solução homogênea.

II. Um precipitado branco pode se formar com a adição de tampão AL, que, na maioria dos casos, se dissolve durante a incubação a 70°C. O precipitado não interfere no procedimento.

- Após o spin, adicionar 200 µL de etanol PA de boa qualidade (100%) ao lisado e passar em pulse-vortex por 15 s. A seguir, brevemente centrifugar o tubo de 1,5 ml para remover gotas do interior da tampa.

Nota: I. É essencial que a amostra, o tampão AL e o etanol sejam bem misturados para produzir uma solução homogênea.

II. Um precipitado branco pode se formar com a adição de etanol. É essencial aplicar todo o sedimento na *QIAamp Mini spin column* (etapa seguinte). O precipitado não interfere no procedimento.

III. Não usar álcool diferente do etanol, pois pode resultar na diminuição da obtenção de DNA.

- Transferir cuidadosamente (com o auxílio de uma pipeta com barreira) a mistura do passo 6 (incluindo o precipitado) para a *QIAamp Mini spin column* (que já deve estar acoplada a um tubo de 2 ml), sem molhar a borda do tubo. Fechar a tampa, e centrifugar a 6000g (8000 rpm) por 1 min. Transferir a coluna para um tubo limpo de 2 ml (fornecido), e descartar o tubo contendo o filtrado;

Nota: I. Fechar a coluna a cada centrifugação, para evitar a formação de aerossóis durante a mesma.

II. É essencial aplicar todo o precipitado para o *QIAamp Mini spin column*.

III. A centrifugação é executada em 6000 xg (8.000 rpm), a fim de reduzir o ruído.

IV. Centrifugação a alta velocidade não vai afetar o rendimento ou a pureza do DNA.

- Cuidadosamente abrir a coluna e adicionar 500 µL de tampão AW1, sem molhar a borda do tubo. Fechar a tampa e centrifugar a 6000g (8000 rpm) por 1 min. Transferir a coluna para um tubo limpo de 2 ml (fornecido) e descartar o tubo contendo o filtrado;
- Cuidadosamente abrir a coluna e adicionar 500 µL de tampão AW2, sem molhar a borda do tubo. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade máxima (14000 rpm) por 3 min;
- Transferir a coluna para um tubo limpo de 2 ml (não fornecido), e descartar o tubo contendo o filtrado. Centrifugar à velocidade máxima (14000 rpm) por 1 min;
- Transferir a coluna para um tubo limpo de 1,5 ml (não fornecido) e descartar o tubo contendo o “filtrado”. Cuidadosamente, abrir a coluna e adicionar 200 µL de água ultra-pura;
- Incubar em temperatura ambiente (1min), e, em seguida, centrifugar a 8.000 rpm (1min);
- Após a centrifugação de 1 min, abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 100 µL de água ultra-pura, em vez de 200 µL recomendado pelo fabricante. Durante a eluição, manter o mesmo tubo da etapa anterior. Incubar em temperatura ambiente por 5 min, e, em seguida, centrifugar a 6000g (8.000 rpm) por 1 min;

Nota: I. Uma incubação de 5 min da coluna contendo tampão AE ou água, antes da centrifugação, geralmente aumenta o rendimento do DNA.

II. Uma terceira etapa de eluição adicionando tampão AE aumenta o rendimento em até 15%.

III. Volumes maiores que 200 µL não devem ser eluídos em um tubo de 1,5 ml, pois a coluna entrará em contato com o eluato, levando à possível formação de aerossóis durante a centrifugação.

IV. A eluição de volumes inferiores a 200 µL aumenta significativamente a concentração final do DNA no eluato, porém reduz um pouco o rendimento do DNA global. Uma eluição com 4 x 10 uL ao invés de 2 x 200 uL não aumenta a eficiência da eluição.

V. Para armazenagem a longo prazo do DNA, eluir em tampão AE e armazenar a -20 ° C é recomendado, pois o DNA armazenado em água está sujeito à hidrólise ácida.

VI. O rendimento do DNA vai depender da quantidade e do tipo de tecido processado. 25 mg de tecido produzirá cerca de 10-30 µg de DNA em 400 µL de água (25-75 ng / µl), com uma relação 260/280 de 1,7-1,9.

- Descartar a coluna e fechar o tubo como o material filtrado e este deve ser armazenado a -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 11
KIT: instagene matrix kit
(Protocolo para isolamento do DNA de Cultura de Células de Mamífero)

O *kit* apresenta três protocolos (para sangue, cultura de células e bactérias), onde optamos pelo protocolo de cultura de células por estarmos trabalhando com um macerado de células, pois no sangue possui menos células que uma cultura.

- Distribuir PBS em um tubo de *ependorf* de 1,5 mL, conforme valores estabelecidos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Volume de PBS
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4º estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	128 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	352 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	576 µL

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
- Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 2400 µL ←);
- Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 200 µL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
- Em seguida, o macerado será aquecido a 100°C por 10 min. Esta escolha foi baseada nos trabalhos de Britto *et al.*, (1993) que demonstra que a fervura por 5 min a 100°C causa a linearização da maioria dos minicírculos do kDNA. Optamos pelo tempo de 10 min, pois verificamos que no tempo de 5 min o kDNA ainda não está totalmente linearizado e em 15 min, apesar de totalmente linearizado, o kDNA começa a ser degradado (Britto *et al.*, 1993). Após a fervura, deixar esfriar por 20 minutos;
- O protocolo sugere adicionar 20 µL da mostra, porém colocaremos 25 µL do macerado fervido em 200 µL de matriz InstaGene (segundo informação, por e-mail, do representante, manter os 200 µL de matriz InstaGene independente do produto de células obtidos dos triatomíneos);

- Incubar a 56°C por 25 minutos;

IMPORTANTE: Antes de adicionar a matrix *InstaGene*, ela deve ser misturada a uma velocidade moderada em um agitador magnético para manter a matriz em suspensão. A ponta da pipeta usada deve ter um grande furo, como a ponta da pipeta de 1.000 µl.

- Vortexar em alta velocidade por 10 segundos. Colocar o tubo em um bloco de calor ou em banho-maria a 100°C à 8 minutos (optamos pelo bloco);
- Vortexar em alta velocidade por 10 segundos. Centrifugar a 10.000-12.000 rpm por 2-3 minutos;
- Retirar o sobrenadante de cada um deles e transferir para um único tubo de *ependorf* de 1,5 mL;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Protocolo 12 DNAzol

- Adicionar DNAzol de acordo com o peso dos triatomíneos;

OBS: Pesar o triatomíneo e, considerando que 1 g corresponde a 1 ml, fazer uma regra de três para achar o volume sugerido). O artigo utiliza a relação de 1 mL de DNAzol para 25-50 mg de tecido. Ao invés de utilizar o peso médio para o cálculo (37,5 mg), optamos por 1 mL/ 50 mg, cujos valores estão descritos na tabela abaixo:

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	DNAzol (peso 50mg)	DNAzol (peso 37,5mg)
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	800 µL	1.100 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	2.200 µL	2.900 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	3.600 µL	4.800 µL

- Em seguida, introduzir, com o auxílio de uma pinça, o espécime de triatomíneo virgem de infecção e com no mínimo 3 semanas de jejum (não passar de 8 semanas), tendo o cuidado para que a pinça não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. No caso do controle positivo não utilizar espécime de triatomíneo, mas apenas formas de *T. cruzi* provenientes de cultura (vide etapa seguinte). Diferente do controle positivo, no controle negativo empregar espécime de triatomíneo;
 - Após introduzir o espécime no tubo, adicionar 30 µL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) contendo formas flageladas de *T. cruzi* coletadas do tubo digestivo de triatomíneo, nas seguintes concentrações: 1, 10 e 100 parasitos. Essas formas deverão ser provenientes de triatomíneos com 3 a 4 semanas de alimentação infectante. No caso do controle negativo, empregar 30 µL de solução fisiológica sem adição de formas evolutivas do parasita. No controle positivo adicionar 30 µL de solução fisiológica contendo formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de cultivo acelular-meio LIT, também nas concentrações: 1, 10 e 100 parasitos (optamos por fazer apenas no maior volume: 2400 µL ←);
 - Macerar bem o triatomíneo, com o auxílio de uma pipeta automática de 200 µL e ponteira estéril com barreira. Ter cuidado para que a pipeta não entre em contato com o líquido ou a parede do tubo. Independente disso, descontaminar a pipeta entre uma amostra e outra;
 - **Etapa sugerida como opcional, mas adotada em nossos experimentos:** Centrifugar por 10 min a 10000g a 4°C ou temperatura ambiente;
 - Após a centrifugação, transferir o sobrenadante para um novo tubo.
- Nota:** Essa etapa remove tecidos não homogeneizados, RNA e excesso de polissacarídeos.
- Para a precipitação do DNA, adicionar 0,5 mL de etanol absoluto p.a. por 1 mL de DNAzol (vide valores na tabela abaixo):

Faixa definida (g)	Peso médio	Espécie	Etanol 100%
0,01-0,07	0,04 g (40 mg)	Ninfas 4° estágio (<i>Rb</i> , <i>Pm</i> e <i>Ti</i>)	550 µL
0,08-0,14	0,11 g (110 mg)	Adulto de <i>Rb</i>	1.450 µL
0,15-0,21	0,18 g (180 mg)	Adultos de <i>Pm</i> e <i>Ti</i>	2.400 µL

- Misturar a amostra por inversões do tubo e reservar a temperatura ambiente por 2 min;
- Centrifugar a 4000g por 2 min a temperatura ambiente para formação de um pellet;
- Adicionar 1 mL de etanol 75% ao pellet;
- Inverter o tubo de 3-6 vezes;
- Reservar o tubo verticalmente por 2 min para que o DNA se acomode no fundo do tubo;
- Remover o etanol por pipetagem;
- Adicionar novamente 1 mL de etanol 75% ao pellet;
- Inverter o tubo de 3-6 vezes;
- Reservar o tubo verticalmente por 0,5-1 min para que o DNA se acomode no fundo do tubo;
- Remover o etanol por pipetagem;
- Deixar o tubo aberto, na bancada, dentro da capela, de 5-15 seg para evaporação do etanol a temperatura ambiente;
- Ressuspender em 250uL de NaOH 8 mM;
- Conservar/estocar o DNA extraído à -20°C e nunca realizar a PCR no dia da extração.

Apêndice 2: Concentrações das soluções tampões utilizadas na eletroforese.

Solução ou Tampão	Preparo	Quantidade
TBE 5x	Tris base (Invitrogen)	54 g
	Ácido bórico (Sigma)	27,5 g
	EDTA (Sigma)	20 ml
	Água destilada	Completar para 1L
TBE 1x	TBE 5X	200 ml
	Água destilada	800 ml
Tampão de amostra	<i>Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye Solution</i> (Sigma)	5 ml
	Água ultra-pura	7 ml
	Glicerol (Sigma)	40 %
Brometo de etídeo (Sigma)	10 µg/ml em água destilada	10 µg

Apêndice 3: Questionário de opinião.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EMPREGANDO DISTINTOS PARÂMETROS

1. Trabalha na área de diagnóstico utilizando métodos de biologia molecular? () Sim () Não

Caso SIM, favor preencher todos os itens abaixo:

2. Nome completo: _____

3. Escolaridade: () Fundamental () Médio () Superior incompleto () Superior completo
() Mestrado cursando () Mestrado completo () Doutorado cursando () Doutorado completo
() Outra: _____

4. Área de atuação: () Pesquisa () Medicina diagnóstica () Ambos

5. Tempo de experiência: Pesquisa _____ Medicina diagnóstica _____

6. Profissional da iniciativa: () Privada () Pública () Ambas

7. Qual o método que utiliza para realizar a extração DNA? () Kit comercial () Método "in house"

8. Se emprega kit comercial de extração de DNA, qual (quais) utiliza no momento (nome, marca e referência)? _____

9. Se emprega método "in house", qual o princípio do método de extração?

10. Avaliação de diferentes parâmetros em um método de extração de DNA ideal

Considerando os parâmetros descritos abaixo, de acordo com seu entendimento e experiência, avalie a importância de cada atributo para a escolha de um método de extração de DNA ideal para a amostra biológica e o DNA alvo com os quais trabalha. Antes, porém, favor: (1) especificar qual o tipo de amostra biológica empregada na extração (Ex: Líquido amniótico, vilos coriais, fragmento de biópsia de pulmão, sangue total etc.); (2) indicar o DNA ou sequência alvo (Ex: o DNA extraído será empregado para amplificação de uma sequência do *Mycobacterium tuberculosis*, o alvo é o DNA de células humanas para detecção de anomalias cromossômicas etc.); (3) preencher um quadro diferente para cada tipo de amostra biológica e DNA alvo do seu estudo ou diagnóstico de rotina.

Os valores da avaliação estão dispostos em uma barra graduada com tons que variam do branco ao cinza escuro, sendo o branco o menor valor (igual a 0) e o cinza mais escuro o valor maior (igual a 100). A nota 0 corresponde a *pouco importante* e 100 a *muito importante*. Para fazer sua análise basta arrastar a coluna em vermelho (■) ao lado do quadro de atributos para o local da barra que você considera mais próximo do valor de importância que deseja atribuir.

Ao responder, considere as seguintes definições:

A. Sensibilidade:

A.1. Concentração do DNA: a quantidade total de DNA obtido após a extração;

A.2. Grau de pureza do DNA: obtenção de DNA com pouco ou nenhum inibidor;

B. Reprodutibilidade do método:

Capacidade de se obter sempre o mesmo resultado todas as vezes em que o método for aplicado na mesma amostra;

C. Custo-benefício do método:

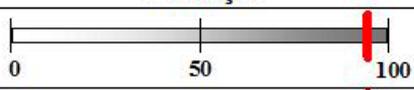
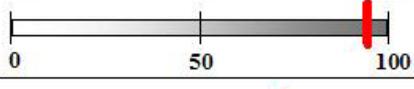
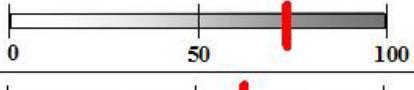
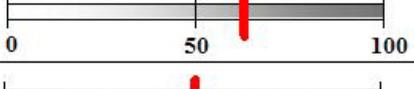
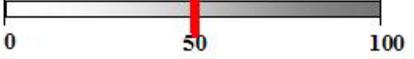
C.1. Praticidade do método: a realização de poucas etapas de manipulação da amostra, o tempo total para a realização da extração, a dificuldade no preparo e manuseio dos reagentes ou do kit (tamponamento de fenol etc.) e a necessidade de aparelhos (centrífuga, vortex, banho-maria etc.);

C.2. Custo do método: o valor global gasto em todo o processo de extração (reagentes, ponteiros com barreira, tubos etc.).

Exemplo: Para o diagnóstico laboratorial de paciente com suspeita de doença de Chagas na fase crônica, em amostra de sangue total, na qual a quantidade de parasitos circulantes é escassa, a quantidade de DNA recuperado deve ser a máxima possível e o material deve ter o mínimo de inibidores, a fim de não interferir na amplificação e com isso não apresentar resultado falso-negativo. Certamente, os outros três atributos também são importantes, porém se atribuirmos graduações no referido exemplo a concentração, o grau de pureza e a reprodutibilidade devem ser priorizados. Assim, os valores a serem atribuídos para ambos os parâmetros devem estar próximos de 100 (cinza escuro).

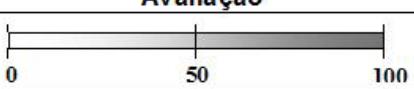
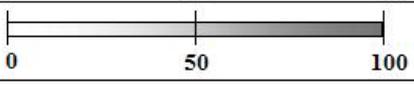
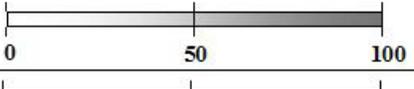
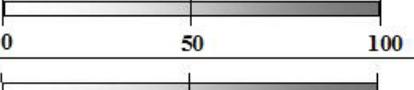
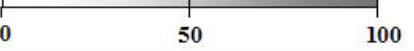
Amostra biológica (especificar): sangue total humano

DNA alvo (especificar): minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi*

Atributos do método/ técnica	Avaliação
A.1. Concentração do DNA obtido	
A.2. Grau de pureza do DNA	
B. Reprodutibilidade	
C.1. Praticidade	
C.2. Custo	

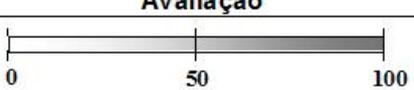
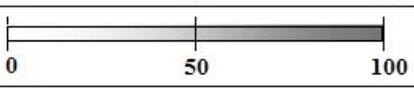
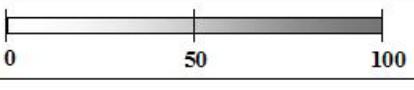
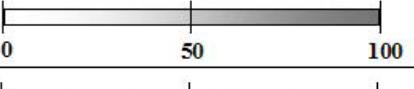
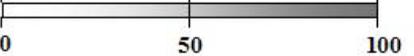
10.1. Amostra biológica (especificar): _____

DNA alvo (especificar): _____

Atributos do método/ técnica	Avaliação
A.1. Concentração do DNA obtido	
A.2. Grau de pureza do DNA	
B. Reprodutibilidade	
C.1. Praticidade	
C.2. Custo	

10.2. Amostra biológica (especificar): _____

DNA alvo (especificar): _____

Atributos do método/ técnica	Avaliação
A.1. Concentração do DNA obtido	
A.2. Grau de pureza do DNA	
B. Reprodutibilidade	
C.1. Praticidade	
C.2. Custo	

Apêndice 4: Laboratórios de maior destaque no Brasil.

- Diagnósticos da América S.A. (DASA) *

- Fleury

- GENE

- Hermes Pardini

- Laboratório Paulo C. Azevedo

- Rede Labs D'or

- Santa Luzia Laboratório Médico

- Sérgio Franco

- Total Laboratórios

- Weinmamm Laboratório

*Empresas do grupo DASA: Lâmina Medicina Diagnóstica, Delboni Auriemo Medicina Diagnóstica, Bronstein Medicina Diagnóstica, MedLabor Medicina Diagnóstica, Medicina Diagnóstica Pasteur.

Apêndice 5: Protocolo de licença de utilização de animais – CEUA/FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-13/09

Certificamos que o protocolo (P-13/09-4), intitulado "Avaliação de Protocolos de Extração e Preservação de DNA Empregados na Detecção de *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) por PCR em Vertebrado e Invertebrado.", sob a responsabilidade de VANESSA DA COSTA NEVES, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Esta licença tem validade até 05/10/2010 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 300 Machos de Swiss Webster, Idade: 21 Dia(s), Peso: 15,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 5 de outubro de 2009

Dr^o Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br