NOVA PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA RFLP-COII PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO ALU I PARA GENOTIPAGEM DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Natália Caroline Manosso (PIC/CNPq/UEM), Bianca Yumi Yamada Geraldo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Paula Margioto Teston, Max Jean de Ornelas Toledo (Coorientador), Amanda Regina Nichi de Sá (Orientadora). E-mail: arnsa2@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, PR.

Parasitologia/Protozoologia de Parasitos/Biologia Molecular

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; COII-RFLP; genotipagem.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja ampla diversidade genética torna necessário o emprego de métodos eficazes de genotipagem. Este estudo teve como objetivo realizar uma nova padronização e otimizar a técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) do gene da subunidade II da citocromo C oxidase (COII) após a adição de albumina no tampão da enzima *Alu* I, pelo fabricante, que passou a comprometer a obtenção dos perfis de restrição utilizados na diferenciação das Unidades de Tipagem Distintas (Discrete Typing Units - DTUs) do parasito. Amostras-padrão das seis DTUs foram submetidas à amplificação do gene mitocondrial COII por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática sob diferentes condições experimentais. Variações no tempo de banho dos produtos enzimáticos não apresentaram resultado satisfatório, pois houve digestão parcial dos fragmentos. Outras modificações testadas não conseguiram eliminar a interferência da albumina, mantendo a dificuldade de visualização dos fragmentos de restrição. O gel de agarose a 2,5% e 3% com corante SYBR Safe eliminou a interferência da albumina, mas apresentou baixa intensidade das bandas de DNA e dificultou sua interpretação. Os resultados demonstraram que o ensaio em gel de poliacrilamida a 7,5% foi o que apresentou melhor separação entre os fragmentos de DNA e a banda de albumina, permitindo a análise dos perfis de restrição e possibilitando a continuidade da replicação da técnica no laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Maringá, mesmo apresentando limitações relacionadas à fragilidade do gel.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma protozoose tropical negligenciada que permanece como um importante problema de saúde pública. É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e acomete milhões de pessoas, principalmente na América Latina, região endêmica. A diversidade genética de *T. cruzi* é ampla e subdividida

em seis Unidades de Tipagem Discretas (Discrete Typing Units - DTUs), de TcI a TcVI (ZINGALES et al., 2012) e sua distinção molecular é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas que correlacionem sua biologia e patogenicidade. Nesse contexto, diferentes métodos de genotipagem vêm sendo empregadas em busca de aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ZINGALES et al., 2012; SÁ et al., 2013; PROBST et al., 2021). No Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), a técnica de RFLP, realizada no produto de amplificação do gene COII seguida de digestão com a enzima *Alu* I (New England - Biolabs), foi utilizada durante vários anos para a genotipagem de *T. cruzi* e diferenciação das DTUs de forma eficiente (SÁ et al., 2013). No entanto, alterações recentes no tampão da enzima por adição de albumina para maior estabilidade da digestão enzimática comprometeram a obtenção dos perfis de restrição esperados. Desse modo, o presente estudo teve por objetivo repadronizar e buscar otimizar a técnica, para garantir a continuidade das pesquisas desenvolvidas no laboratório da universidade após as alterações no reagente pelo fabricante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada a técnica RFLP-COII para a genotipagem de *T. cruzi* a partir de amostras-padrão representativas das seis DTUs, conforme metodologia descrita por Sá et al. (2013). Inicialmente, o DNA foi submetido à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores TcMit-10 e TcMit-21. Posteriormente, os produtos amplificados foram submetidos à digestão enzimática com *Alu* I e seu respectivo tampão de reação, sob diferentes condições experimentais. Com o objetivo de otimizar a técnica e estabelecer um protocolo mais prático e rápido, foram avaliados diferentes tempos de incubação (15 min, 1 h, 4 h e 16 h). Com o objetivo de reduzir ou eliminar a interferência da albumina presente no tampão, que também é corada pelo nitrato de prata e se sobrepõe aos fragmentos de DNA de aproximadamente 300 pb, foram empregados diferentes métodos, como diluição do tampão em água Milli-Q; uso do tampão de carregamento fornecido pelo fabricante para *Alu* I, devido à sua maior concentração salina, segundo as especificações do fabricante, que teoricamente poderia precipitar a albumina; utilização do tampão da enzima Taq-polimerase no lugar do tampão da enzima; e adição de acetato de amônio para precipitação da proteína. Além disso, foram avaliadas a RFLP-COII em eletroforese em gel de agarose a 2,5% e 3%, utilizando o corante SYBR Safe, que não cora a albumina, e a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, com o objetivo de minimizar a interferência da albumina na visualização das bandas de DNA após a digestão enzimática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tempos de incubação de 15 min, 1 h e 4 h não apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que foi observada digestão parcial dos fragmentos de DNA. Em contrapartida, a incubação por 16 h continuou apresentando o padrão de digestão esperado, com obtenção dos fragmentos característicos para a

genotipagem. Dessa forma, o tempo de incubação de 16 h foi mantido no protocolo. A diluição da reação de digestão enzimática em água milli-Q não reduziu a quantidade de albumina observada no gel. A utilização do tampão da enzima Taq-polimerase, por sua vez, não resultou em digestão enzimática adequada dos fragmentos de DNA. O tampão de carregamento fornecido pelo fabricante, apesar de apresentar maior concentração salina, também não promoveu a precipitação da albumina, que permaneceu visível no gel. Da mesma forma, a adição de acetato de amônio não promoveu alterações na precipitação da albumina e resultou em digestão parcial do DNA. Dessa forma, nenhuma das condições testadas foi capaz de eliminar ou reduzir satisfatoriamente a interferência da albumina sem comprometer a digestão enzimática (Figura 1). Continuando na tentativa de eliminar a interferência da albumina, foi avaliada a eletroforese em gel de agarose utilizando o corante SYBR Safe. Embora a albumina não tenha sido visualizada, conforme esperado, as bandas de DNA apresentaram baixa intensidade, dificultando sua visualização e não permitindo a adequada separação dos fragmentos necessários para a genotipagem. Na tentativa de melhorar a resolução, foram testados géis de agarose a 2,5% e 3%, bem como o aumento da quantidade de amostra aplicada, porém essas condições também não permitiram a obtenção de um padrão adequado para a genotipagem. Diante desses resultados, foi avaliada a utilização de gel de poliacrilamida com maior concentração, passando de 6% para 7,5%, com o objetivo de aumentar a resolução dos fragmentos e promover a separação entre a albumina e as bandas de DNA de interesse. Nessa condição, foi possível obter a separação da albumina dos fragmentos esperados, permitindo a visualização adequada das bandas utilizadas na genotipagem (Figura 1).

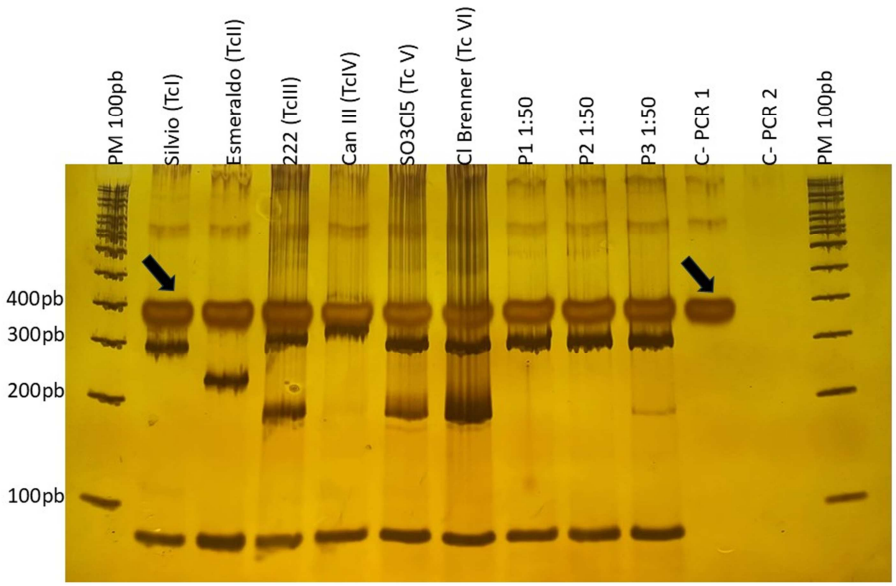


Figura 1 – Gel de poliacrilamida a 7,5%, corado com nitrato de prata, com os produtos de RFLP-COII de amostras-padrão de *T. cruzi* (TcI a Tc VI) sob tempo de incubação de 16h e condições padrão de reação. PM = peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), C-PCR 1 = controle negativo da PCR (sem adição de DNA) com adição do tampão de reação de Alu I e C-PCR 2 = controle negativo da

PCR (sem adição de DNA) e sem adição de tampão. Seta preta indica a banda de albumina de aproximadamente 400pb.

Apesar do resultado satisfatório quanto à separação dos fragmentos, o gel de poliacrilamida a 7,5% apresentou limitações operacionais, como maior fragilidade e ressecamento do gel, além de maior presença de arraste da amostra durante a eletroforese. Ainda assim, entre as condições avaliadas, essa foi a única que permitiu a separação satisfatória da albumina das bandas de interesse, sendo, portanto, mantida como alternativa para a continuidade da técnica.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que as modificações nas condições de digestão enzimática e a utilização de gel de agarose não foram suficientes para eliminar a interferência da albumina ou proporcionar resolução adequada dos fragmentos para a genotipagem. Entretanto, o gel de poliacrilamida a 7,5% mostrou separar melhor a albumina das bandas de DNA de interesse, possibilitando a visualização dos fragmentos esperados e a interpretação do perfil de restrição para a genotipagem. Apesar das limitações relacionadas à manipulação desse gel mais concentrado, foi a condição que apresentou o melhor resultado e mostrou-se uma alternativa viável para a continuidade da técnica RFLP-COII e a genotipagem de *T. cruzi* no laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

PROBST, C. M.; MELO, M. F. A. D.; PAVONI, D. P.; TOLEDO, M. J. O.; GALDINO, T. S.; BRANDÃO, A. A.; BRITTO, C.; KRIEGER, M. A. A new *Trypanosoma cruzi* genotyping method enables high resolution evolutionary analyses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 116, e200538, 2021. DOI: https://doi.org/10.1590/0074-02760200538. Acesso em: 29 jul. 2026

SÁ, A. R. N. *et al.* Cytochrome oxidase subunit 2 gene allows simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & Vectors*, London, v. 6, p. 363, 2013. DOI: https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-363. Acesso em: 29 jul. 2026.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution, v. 12, p. 240–253, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009. Acesso em: 18 ago. 2026