

# Protocolos genotípicos para nematoides gastrintestinais

*Simone Cristina Méo Niciura*

### 5.1 Extração de DNA de larvas e adultos de helmintos gastrintestinais

A etapa que antecede qualquer procedimento de biologia molecular consiste na preparação e no isolamento de material genético (DNA ou RNA) puro e de qualidade (AUSUBEL et al., 2003) do parasita de interesse. Diversas técnicas podem ser utilizadas para a extração de DNA; no entanto, a seleção da técnica mais adequada deve ser feita com base no parasita em estudo e na finalidade de utilização do DNA extraído.

Para a extração de DNA de larvas individuais ou em *pool*, e de adultos de helmintos gastrintestinais, com vista a procedimentos de genotipagem por nested-PCR, PCR-RFLP e ARMS-PCR, entre vários protocolos avaliados, a extração com solvente orgânico (fenol e clorofórmio) mostrou-se a mais adequada (MELLO et al., 2009).

Assim, o protocolo a seguir descreve as principais etapas para a extração de DNA de larvas e de adultos de helmintos, entre as quais se destacam: a) recuperação de nematoides e lavagem para a remoção de sal da cutícula; b) digestão com proteinase K; c) extração de DNA com solvente orgânico; e d) avaliação da quantidade e da qualidade do DNA extraído. A preparação das soluções-estoque está descrita no item 11.9.

#### **a) Recuperação, lavagem e remoção de sal da cutícula de helmintos**

Esta etapa destina-se à lavagem dos helmintos para a remoção de contaminantes e também para a remoção de sal da cutícula, facilitando, assim, a exposição do material genético, com o propósito de extrair o DNA.

### Larvas individuais ou em *pool*

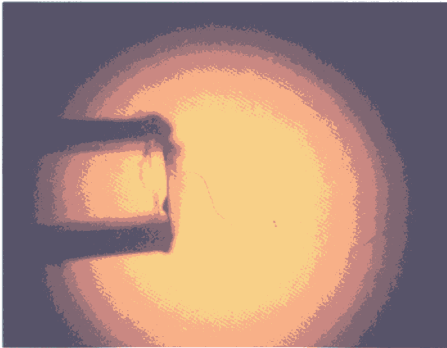
- Após a coprocultura, coletar de 20  $\mu\text{L}$  a 30  $\mu\text{L}$  de suspensão de larvas (no máximo 1.000 larvas/mL) (Figura 1). Em seguida, depositar em uma placa de Petri.
- Acrescentar à suspensão de larvas 4 mL de água Milli-Q e 250  $\mu\text{L}$  de hipoclorito de sódio (com 2,5% de cloro ativo).
- Manter por 5 minutos, em temperatura ambiente.
- Acrescentar 4 mL de água Milli-Q à placa de Petri.
- Coletar as larvas individualmente, em volume de 2  $\mu\text{L}$  (Figura 2), ou em *pools* de 100 larvas (em volume de 250  $\mu\text{L}$ ), com o auxílio de um microscópio estereoscópico ou de um microscópio invertido.
- Depositar as larvas individuais em placas de PCR ou em microtubos de 0,5 mL, e as larvas em *pool* em microtubos de 1,5 mL.
- Congelar e descongelar as placas ou os microtubos que contêm as larvas, por cinco vezes, em nitrogênio líquido.
- Armazenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até os procedimentos de extração de DNA.



Foto: Simone Cristina Melo Niclaura

**Figura 1.** Suspensão de larvas obtida após coprocultura.

Foto: Simone Cristina Méo Niciura



**Figura 2.** Coleta de larva individual sob microscópio invertido.

### Adultos

- Após a recuperação dos nematoides adultos do trato gastrintestinal dos hospedeiros (item 11.5), incubar por 5 minutos, em 4 mL de água Milli-Q, com 250  $\mu$ L de hipoclorito de sódio (com 2,5% de cloro ativo) em placa de Petri.
- Transferir os nematoides adultos para a nova placa de Petri que contém somente água Milli-Q para lavagem.
- Macerar os nematoides individualmente, em cadinho com pistilo com nitrogênio líquido (Figura 3).

Foto: Débora Araujo Santos Ponderak



**Figura 3.** Maceração de nematoides adultos em cadinho com pistilo em nitrogênio líquido.

- Coletar os nematoides macerados em 250  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e transferir para um microtubo de 1,5 mL.
- Armazenar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até os procedimentos de extração de DNA.

### **b) Início da extração de DNA: digestão com proteinase K**

Como principais componentes utilizados nesta etapa, destacam-se: a proteinase K, potente enzima proteolítica que promove digestão de células e tecidos; o EDTA, que sequestra cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e, assim, inibe a atividade das DNases (enzimas que degradam o DNA); e o detergente SDS, que solubiliza as membranas e desnatura as proteínas (AUSUBEL et al., 2003; SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os demais componentes desempenham as seguintes funções: o Tris-HCl é um tampão que mantém o pH constante; o NaCl promove precipitação de proteínas por excesso de íons; e o DTT atua como agente redutor, que evita a oxidação de enzimas e proteínas (REGITANO et al., 2007).

#### **Larvas individuais**

- Preparar 10  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão (pH 7,5) para cada amostra

Componente	[inicial]	[final]	1 larva
Água Milli-Q			8,0 $\mu\text{L}$
Tris-HCl pH 7,5	1 M	10 mM	0,1 $\mu\text{L}$
EDTA pH 8,0	0,5 M	10 mM	0,2 $\mu\text{L}$
NaCl	5 M	50 mM	0,1 $\mu\text{L}$
SDS	20%	2%	1,0 $\mu\text{L}$
DTT	1 M	40 mM	0,4 $\mu\text{L}$
Proteinase K	20 mg/mL	0,4 mg/mL	0,2 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>			<b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>

- Acrescentar, a cada microtubo ou placa de PCR, 10  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão.

- Homogeneizar suavemente, por inversão.
- Incubar a 56 °C *overnight*, em thermomixer (Figura 4) ou termociclador.

Foto: Delcristin Araujo Santos, Pondejak



**Figura 4.** Thermomixer para incubação sob agitação.

### Larvas em *pools* e nematoides adultos

- Preparar 1,5 mL de tampão de digestão (pH 7,5) para cada amostra

Componente	[inicial]	[final]	Uma amostra
Água Milli-Q			1,29 mL
Tris-HCl pH 7,5	1 M	10 mM	15 µL
EDTA pH 8,0	0,5 M	10 mM	30 µL
NaCl	5 M	50 mM	15 µL
SDS	20%	2%	150 µL
<b>Total</b>			<b>1,5 mL</b>

- Acrescentar 1 mL de tampão de digestão a cada microtubo.
- Homogeneizar suavemente, por inversão.
- Centrifugar a 14.000 g, por 5 minutos, à temperatura ambiente.

- Remover o sobrenadante e deixar cerca de 50  $\mu$ L do tampão no fundo do microtubo.
- Homogeneizar o pélete com o tampão de digestão, por inversão.
- Adicionar 0,5 mL de tampão de digestão.
- Adicionar 20  $\mu$ L de DTT 1 M (concentração final de 40 mM), por microtubo.
- Adicionar 10  $\mu$ L de proteinase K 20 mg/mL (concentração final de 0,4 mg/mL), por microtubo.
- Homogeneizar por inversão.
- Incubar a 56 °C *overnight*, em thermomixer ou termociclador.

### c) Extração de DNA de larvas e de nematoides adultos: extração com solvente orgânico

Na etapa de extração de DNA propriamente dita, com a utilização de solventes orgânicos, os principais componentes empregados são: fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, que levam à desnaturação e à precipitação de proteínas intracelulares e à solubilização do DNA; isopropanol, que promove a precipitação e a concentração do DNA; e etanol 70%, que remove sais e pequenas moléculas orgânicas. Esse método de extração de DNA com solvente orgânico é adequado para a utilização em *Southern blot*, em reações em cadeia da polimerase (PCR) e na construção de livrarias de DNA genômico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

#### Larvas individuais

- Aos microtubos incubados *overnight* em tampão de digestão, adicionar 10  $\mu$ L de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1).



- Agitar em vórtex por 15 segundos.
- Centrifugar a 14.000 g, por 5 minutos, em temperatura ambiente, para a separação das fases (Figura 5).
- Transferir a fase aquosa (superior) (cerca de 8  $\mu$ L), que contém o DNA, para um novo microtubo ou placa de PCR.
- Acrescentar igual volume (8  $\mu$ L) de isopropanol 100%, em temperatura ambiente.
- Inverter o tubo suavemente, por 50 vezes.
- Centrifugar a 14.000 g, por 15 minutos, para a obtenção do pélete de DNA.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 10  $\mu$ L de etanol 70%, em temperatura ambiente, para a lavagem do pélete de DNA.
- Centrifugar a 14.000 g, por 5 minutos.
- Descartar o sobrenadante.
- Deixar o microtubo invertido sobre papel-filtro, por 2 a 3 horas, para a secagem do pélete de DNA.

Foto: Simone Cristina Mão Nictum



**Figura 5.** Separação das duas fases após a centrifugação: DNA (superior) e fenol e outros resíduos (inferior amarela).

- Ressuspender o DNA com 10  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.
- Incubar o DNA a 37 °C, por 30 minutos, em thermomixer ou termociclador.
- Armazenar a -20 °C.

### **Larvas em *pools* e nematoides adultos**

- Aos microtubos incubados *overnight* em tampão de digestão, adicionar 0,5 mL de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1).
- Submeter a vórtex por 15 segundos.
- Centrifugar a 14.000 g, por 5 minutos, em temperatura ambiente, para a separação das fases.
- Transferir a fase aquosa (superior) (cerca de 600  $\mu\text{L}$ ), que contém o DNA, para um novo microtubo.
- Acrescentar igual volume (600  $\mu\text{L}$ ) de isopropanol 100%, em temperatura ambiente.
- Inverter o tubo suavemente, por 50 vezes.
- Centrifugar a 14.000 g, por 15 minutos, para a obtenção do pélete de DNA.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 1 mL de etanol 70% em temperatura ambiente, para a lavagem do pélete de DNA.
- Centrifugar a 14.000 g, por 5 minutos.
- Descartar o sobrenadante.
- Deixar o microtubo invertido sobre papel-filtro, por 2 a 3 horas, para a secagem do pélete.
- Ressuspender o DNA, com 20  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q.
- Incubar o DNA a 37 °C, por 30 minutos, em thermomixer ou termociclador.
- Armazenar a -20 °C.



#### **d) Avaliação da quantidade e da qualidade do DNA extraído**

Antes de sua utilização, o DNA extraído deve ser avaliado quanto à quantidade e à qualidade. A avaliação do DNA em espectrofotômetro permite a determinação tanto da concentração do DNA quanto de sua pureza. Em relação à concentração, uma solução com absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) igual a 1 contém, aproximadamente, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A determinação da razão entre a  $A_{260}$  e a absorvância a 280 nm ( $A_{280}$ ):  $A_{260}/A_{280}$  permite avaliar a pureza do DNA. Em geral, DNA de alta pureza possui razão  $A_{260}/A_{280}$  superior a 1,8, enquanto a mistura 50% proteína/50% DNA possui razão próxima a 1,5 (AUSUBEL et al., 2003). Vale ressaltar que essa estimativa é incorreta caso a amostra apresente quantidade significativa de fenol, visto que o pico de absorvância desse componente dá-se a 270 nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

#### **Avaliação do DNA em espectrofotômetro**

Vários espectrofotômetros podem ser utilizados para a avaliação do DNA, destacando-se, entre eles, o NanoDrop ND-1000 (Figura 6), que possui cobertura de 220 nm a 750 nm e mensura concentrações de 2  $\text{ng}/\mu\text{L}$  a 3.700  $\text{ng}/\mu\text{L}$  a partir de pequenos volumes (de 1  $\mu\text{L}$  a 2  $\mu\text{L}$ ) (REGITANO et al., 2007).

#### **Avaliação do DNA por eletroforese em gel de agarose**

A qualidade do DNA extraído também pode ser determinada por meio da avaliação de sua integridade após a eletroforese em gel de agarose. Para tanto, procede-se à eletroforese de 1  $\mu\text{g}$  de DNA em gel de agarose 1%, com tampão TBE 1x. Após a coloração com corante de DNA, observa-se a integridade do DNA (presença de banda única) em transiluminador UV (Figura 7). O protocolo de eletroforese para avaliação da integridade do DNA encontra-se descrito a seguir.

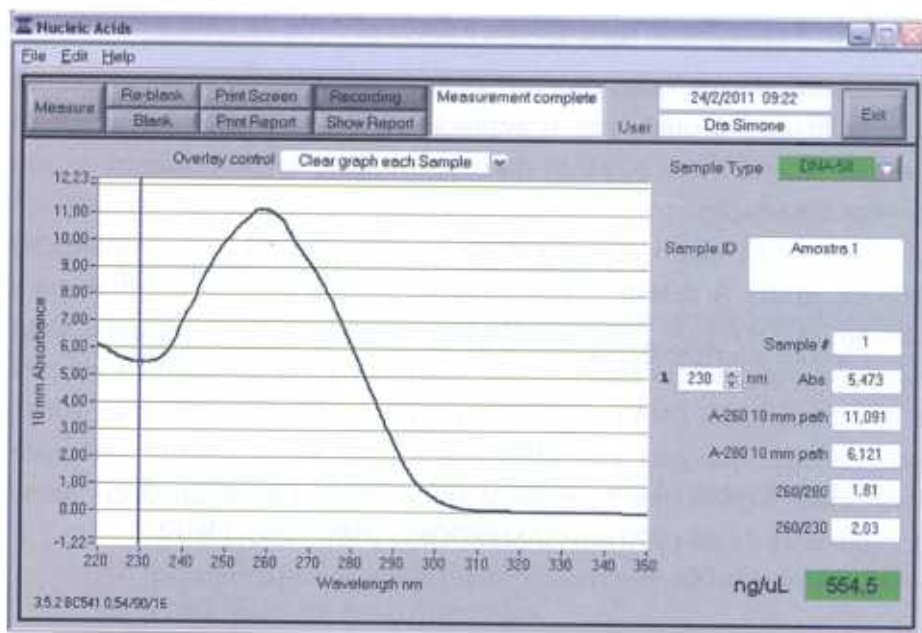


Figura 6. Avaliação do DNA quanto à quantidade (ng/μL) e à pureza (260/280) em NanoDrop.

- Preparar um gel de agarose a 1%

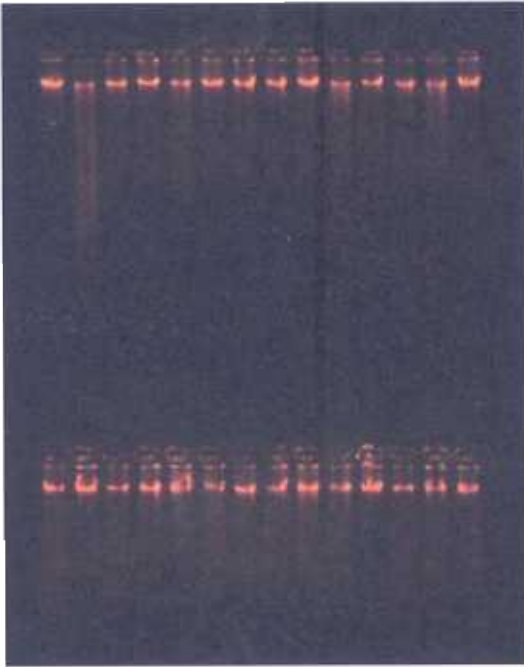
Componente	[final]	Quantidade	Quantidade	Quantidade
TBE 1x	-	80 mL	100 mL	200 mL
Agarose	1%	0,8 g	1,0 g	2,0 g

- Pesar a agarose em um béquer, acrescentar o TBE 1x e misturar. Deixar dissolver em micro-ondas até ficar bem transparente, mas não permitir a fervura, para evitar a formação de bolhas.
- Acrescentar ao gel, ligeiramente frio, e antes da polimerização, o corante de DNA (brometo de etídeo ou Nancy-520). No caso da utilização do corante GelRed, acrescentá-lo diretamente às amostras.

**Obs.:** Para o brometo de etídeo, acrescentar 0,5 μL de brometo de etídeo diluído 40x (0,25 μg/μL) a cada 10 mL de gel, ou seja, 4 μL para gel de 80 mL,



Foto: Flávia Aline Bressiani Donatoni



**Figura 7.** DNA íntegro após eletroforese em gel de agarose 1%, coloração com GelRed e observação em transiluminador UV.

5  $\mu\text{L}$  para gel de 100 mL e 10  $\mu\text{L}$  para gel de 200 mL, resultando na concentração de 0,125  $\mu\text{g}$  de brometo/mL de gel. Para o Nancy-520, acrescentar 10  $\mu\text{L}$  para cada 50 mL de gel, ou seja, 16  $\mu\text{L}$  para gel de 80 mL, 20  $\mu\text{L}$  para gel de 100 mL e 40  $\mu\text{L}$  para gel de 200 mL. Para o GelRed, diluir 1  $\mu\text{L}$  do estoque em 500  $\mu\text{L}$  de água (1:500). Preparar uma mistura 1:1 de loading e GelRed (2  $\mu\text{L}$  de loading + 2  $\mu\text{L}$  de GelRed) suficiente para o número de amostras.

- Despejar o gel no aparato de eletroforese horizontal e esperar polimerizar.
- Cobrir o gel e os eletrodos com tampão TBE 1x.
- Aplicar as amostras no gel de agarose.

**Obs.:** Para brometo de etídeo e Nancy-520, em uma fita de parafilme, colocar gotas (suficientes para o número de amostras) de 2  $\mu\text{L}$  de loading, acrescentar 1  $\mu\text{g}$  de DNA, completar com água para volume de 10  $\mu\text{L}$  e aplicar a mistura a cada poço do gel. Para o GelRed, em uma fita de parafilme, colocar gotas de 4  $\mu\text{L}$  da mistura loading + GelRed, acrescentar 1  $\mu\text{g}$  de DNA, completar com água para volume de 14  $\mu\text{L}$ , misturar e aplicar no gel.

Separar os fragmentos por eletroforese (90 V, 70 mA e 5 W) em tampão TBE 1x, até a metade do gel.

Ligar os eletrodos à cuba de eletroforese. Correr o gel da esquerda (eletrodo preto – polo negativo) para a direita (eletrodo vermelho – polo positivo), em tampão TBE 1x.

- Observar os fragmentos em transiluminador UV e digitalizar a imagem do gel (Figura 7).

## 5.2 Reação de nested-PCR para amplificação de fragmento do gene da $\beta$ -tubulina em *Haemonchus contortus*

A  $\beta$ -tubulina é uma proteína monomérica que, ao ser polimerizada, forma os microtúbulos, componentes do citoesqueleto celular, responsáveis pelas seguintes funções: tráfego intracelular, absorção e secreção, ancoramento de receptores de membrana, divisão celular, arquitetura e migração celular (PRICHARD, 2008). A  $\beta$ -tubulina constitui o sítio-alvo de ação dos anti-helmínticos à base de benzimidazol. Assim, o benzimidazol ligado à  $\beta$ -tubulina impede a sua polimerização em microtúbulos e leva os helmintos à morte.

Entretanto, a existência de mutações no gene da  $\beta$ -tubulina diminui a afinidade de ligação ao benzimidazol, o que resulta em resistência parasitária a esse princípio ativo (BEECH et al., 1994). Entre as mutações descritas no isótipo 1 do gene da  $\beta$ -tubulina, destaca-se uma transversão de timina (T) em adenina (A) no DNA, que leva à substituição de fenilalanina por tirosina no aminoácido 200 (F200Y) e confere resistência aos benzimidazóis (KWA et al., 1994, 1995). Assim, os helmintos homozigotos TT (Fen/Fen) e heterozigotos AT (Fen/Tir) são suscetíveis ao benzimidazol, enquanto os homozigotos AA (Tir/Tir) são resistentes a ele (ELARD et al., 1999).

A seguir, serão apresentados os protocolos para a genotipagem do polimorfismo F200Y no isótipo 1 do gene da  $\beta$ -tubulina em *H. contortus*. Essa

metodologia é uma adaptação (GROMBONI et al., 2009; MELLO et al., 2009) dos protocolos descritos por Silvestre e Humbert (2000) e Coles et al. (2006).

Em virtude da pequena quantidade inicial de DNA presente em helmintos, principalmente em larvas individuais, para aumentar as chances de amplificação e de avaliação de um fragmento gênico, é necessária a realização de duas reações de PCR consecutivas, no procedimento denominado de nested-PCR. Na primeira reação de nested-PCR, são utilizados *primers* mais externos, que flanqueiam o DNA alvo e geram um produto de amplificação (*amplicon*) maior. Na segunda reação de nested-PCR, o *amplicon* da primeira reação é utilizado como DNA molde para *primers* mais internos e que geram um *amplicon* menor. Assim, o produto inicialmente amplificado na primeira reação de nested-PCR é reamplificado na segunda reação, o que aumenta a especificidade da reação. Um esquema da nested-PCR está demonstrado na Figura 8.

A PCR é um procedimento rápido para a amplificação enzimática in vitro de um segmento de DNA específico (DNA alvo ou DNA molde) (AUSUBEL et al., 2003). Assim como a PCR, a reação de nested-PCR envolve a utilização dos mesmos componentes e em concentrações similares: tampão (concentração de 1x), que mantém constante o pH da reação; dNTP

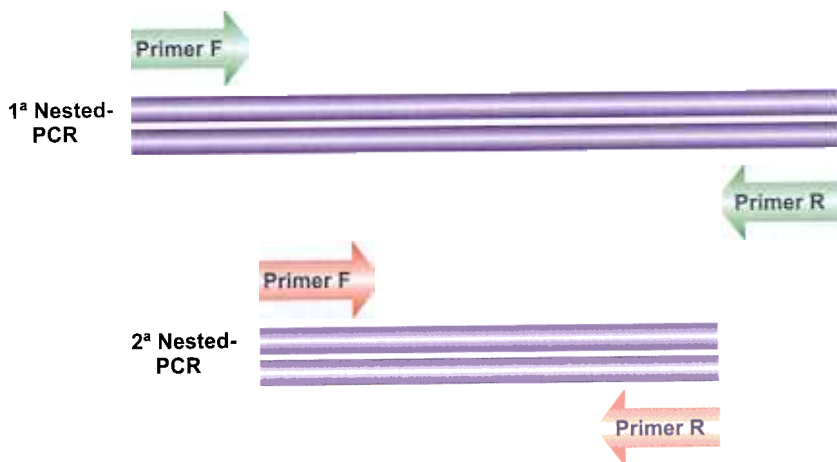


Figura 8. Reação de nested-PCR para amplificação de um fragmento de DNA alvo

(mistura equimolar dos desoxirribonucleosídeos trifosfato dATP, dTTP, dCTP e dGTP; de 200  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$ ), que fornece as bases para a síntese do DNA;  $\text{Mg}^{2+}$  (cátion divalente; 1,5 mM), cofator enzimático; um par de *primers* (ou oligonucleotídeos iniciadores específicos; de 0,1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ , de cada um) delimita o DNA alvo da amplificação e constitui o sítio de iniciação para a Taq DNA polimerase; Taq DNA polimerase (de 0,5 U a 2,5 U por reação-padrão de 25  $\mu\text{L}$  a 50  $\mu\text{L}$ ), enzima que catalisa a síntese de DNA a partir de um DNA molde; e DNA (15 ng a 100 ng) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A reação de nested-PCR também ocorre em ciclos (de 25 a 40) de amplificação, realizados em um equipamento termociclador. Esses ciclos são compostos pelas etapas de: desnaturação (de 94 °C a 95 °C, por 30 segundos a 1 minuto), abertura da fita dupla de DNA; anelamento de *primers* (de 3 °C a 5 °C abaixo da temperatura de *melting* dos *primers*), ligação dos *primers* à fita de DNA molde; e extensão (de 72 °C a 78 °C, por 1 minuto, a cada produto de 1.000 bp), síntese enzimática do DNA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

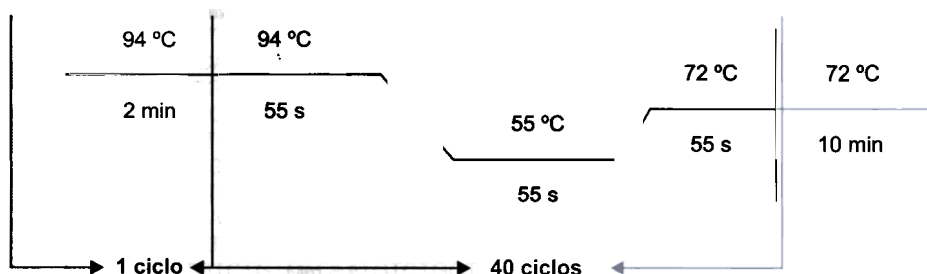
A seguir, estão descritos os protocolos da primeira e da segunda reações de nested-PCR para a amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -tubulina em *H. contortus*.

### a) Primeira reação de nested-PCR

Preparar 20  $\mu\text{L}$  do mix da primeira reação de nested-PCR por amostra

Componente	[ Inicial ]	[ Final ]	
Água	-	-	14,00 $\mu\text{L}$
Tampão	10x	1,0x	2,00 $\mu\text{L}$
Primer 36F	10 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$	0,50 $\mu\text{L}$
Primer 961R	10 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{M}$	0,50 $\mu\text{L}$
dNTP	20 mM	0,2 mM	0,20 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$	50 mM	1,5 mM	0,60 $\mu\text{L}$
Taq DNA polimerase	5,0 U/ $\mu\text{L}$	0,05 U/ $\mu\text{L}$ ou 1 U	0,20 $\mu\text{L}$
DNA			2,00 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>			<b>20,00 <math>\mu\text{L}</math></b>

- Adicionar 18,0  $\mu$ L do mix + 2,0  $\mu$ L de DNA extraído (referente a 0,2 larva individual, 5 larvas em *pool* ou 0,1 nematoide adulto) a cada poço da placa de PCR, que constituem reação de PCR de 20,0  $\mu$ L.
- Proceder à seguinte termociclagem:



Os *primers* e os respectivos sítios de anelamento na sequência de DNA de *H. contortus* (GeneBank X80046.1) da primeira reação de nested-PCR, que gera produto de amplificação de 926 bp, estão demonstrados na Figura 9.

36F: 5'-TCGTTCTTCAGGAGGCAAGT-3' (*Primer forward*).

961R: 5'-TGCAGACAGTGGAGCAAAAC-3' (*Primer reverse*)

>gi|897752|emb|X80046.1| H.contortus TUB-1 gene exons 3,4,5,6,7

TCACCCATGTTTCTTTATTGAAATGTATGTGCGGTCTTCTTCAGGAGGCAAGTATGTTCCA  
 CGTGCTGTTCTTGTGATCTCGAGCCTGGAACGATGGACTCCGTTCTGTTCTGGACCGTATG  
 GACAGCTTTCCGTCAGATAATTACGTGTTTGGCCAGTCAGGAGCGGGTAAACAATTGGGC  
 GAAGGGCCACTATACTGAGGGAGCCGAGCTAGTTGATAACGTATTAGACGTTGTCCGCAAA  
 GAAGCTGAAGGTTGTGATTGCCTTCAGGTACTGACTTCATCAACAATTTACAGCTTCAACTT  
 TGATGTGTGAATACATTTCAATTCGTGCTCAGGGCTTCCAATTTGACGCATTCACCTTGGAGGA  
 GGCCTGGACTCTGGAATGGGCCTTTGTTAATTTCAAAAATTCGTGAAGAGTACCCTGATA  
 GAATTATGGCTTCGTTCTCCGTTGTTCCATCACCCAAGGTGAGATCGTGTTAATCTTTGCTT  
 TTTTCTAAATTGTGATTTGAATTACTTATCCTCATGAAGATCCAAGTTGAAATAAGTCTCAC  
 CACCTGTAACATGTGAAAGGAAGATGTTTTAAGGTATCCGACACTGTCGTAGAACCCTACAA  
 TGCTACCCTTTCCGTCATCAACTGGTAGAGAACACCGATGAAACATTCTGTATTGACAACGA  
 AGCTCTGTATGATATCTGCTTCCGCACTTTGAAACTCACAAATCCAACCTATGGAGATCTCA  
 ACCACCTTGGTAATTGTTATTACACTTACTAAAGTATACTTAGACCTTTTTTCATGCTGAAATG  
 TGCAATTGAAGTGTCTGTCAACAATGTCTGGTGTACAGACCTGCCTTCGATCCCTGGACAGC  
 TGAATGCTGATCTTCGCAAGTTAGCCGTGAACATGGTTCATTCCCTCGTCTTCACTTCTTCA  
 TGCCCCGTTTTGCTCCACTGTCTGCAAGGGTGTCTAAGCATATCGCGCTTCGACAGTTGC  
 TGAGCTTACACAGCAAGTACGCCATTACTCTTTATAGCATAGTGATTCAAAATTACAGCCACC  
 CATATTTAGATGTTTCGATGCAAGAACATGATGGCTGCCTGTGATCCTCGCCATGGACGT  
 TATCTTACGGTCGCTGCTATGTTCCGTGGTTCGATGAGCATGCCAGTGAGTATTTTTA

**Figura 9.** *Primers* e sítios de anelamento na sequência de DNA de *Haemonchus contortus* da primeira reação de nested-PCR.

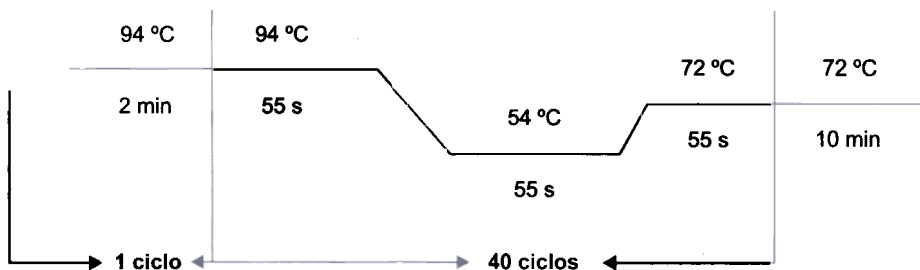
### b) Segunda reação de nested-PCR

- Preparar 20 µL do mix da segunda reação de nested-PCR por amostra

Componente	[ Inicial ]	[ Final ]	1 amostra
Água			15,00 µL
Tampão	10x	1,0x	2,00 µL
Primer PN3s	10 µM	0,25 µM	0,50 µL
Primer PN4s	10 µM	0,25 µM	0,50 µL
	20 mM	0,2 mM	0,20 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,60 µL
Taq DNA polimerase	5,0 U/µL	0,05 U/µL ou 1 U	0,20 µL
Primeira nested-PCR			1,00 µL
<b>Total</b>			<b>20,00 µL</b>

Depositar 19,0 µL de mix + 1,0 µL do produto da primeira reação de PCR em cada poço de uma nova placa, constituindo reação de PCR de 20,0 µL.

- Proceder à seguinte termociclagem:



Os *primers* e os respectivos sítios de anelamento na sequência de DNA de *H. contortus* da segunda reação de nested-PCR, que gera produto de amplificação de 772 bp, estão demonstrados na Figura 10.





Polimorfismos no gene da  $\beta$ -tubulina que permitem a identificação da espécie de helminto podem ser avaliados por meio da digestão do produto da segunda reação nested-PCR com a enzima de restrição *RsaI*, por meio da técnica de PCR-RFLP, conforme protocolo descrito a seguir.

#### a) PCR-RFLP: protocolo de digestão

- Preparar 2  $\mu$ L de mix de RFLP para cada amostra

Componente	[inicial]	[final]	Uma amostra
Água Milli-Q			1,1 $\mu$ L
Tampão	10x	1x	0,8 $\mu$ L
<i>RsaI</i>	10 U/ $\mu$ L	1U	0,1 $\mu$ L
<b>Total</b>			<b>2,0 <math>\mu</math>L</b>

Realizar a digestão de 6  $\mu$ L do produto da segunda reação de nested-PCR com 2  $\mu$ L da mistura de digestão (1 U da enzima *RsaI*).

Incubar a 37 °C, por 3 horas.

#### b) PCR-RFLP: protocolo de eletroforese em gel de agarose

A visualização dos produtos de digestão da PCR-RFLP e a identificação da espécie de helminto podem ser feitas após eletroforese em gel de agarose a 2,5%, segundo protocolo descrito a seguir.

- Preparar um gel de agarose a 2,5%

Componente	Quantidade
TBE 1x	100 mL
<u>Agarose</u>	<u>2,5 g</u>

- Pesar a agarose em um béquer, acrescentar o TBE 1x e misturar. Deixar dissolver em micro-ondas até ficar bem transparente; evitar a fervura para não formar bolhas.

- Acrescentar o corante de DNA ao gel (brometo de etídeo ou Nancy-520) ou às amostras (GelRed), da mesma maneira como foi descrito no item 5.1, para eletroforese de DNA em gel de agarose.
- Despejar o gel no aparato de eletroforese horizontal, aguardar a polimerização e cobrir o gel e os eletrodos com tampão TBE 1x.
- Aplicar as amostras e o padrão de tamanho (*ladder*) ao gel de agarose a 2,5%.
- Separar os fragmentos por eletroforese e observar em transiluminador UV.

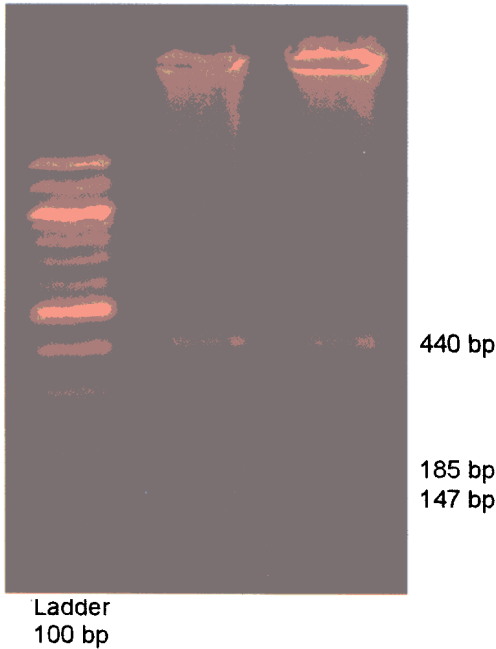
Os sítios de reconhecimento da enzima de restrição *RsaI* (GT/AC) no produto de amplificação da segunda reação de nested-PCR da sequência de DNA de *H. contortus* estão demonstrados na Figura 11. A enzima *RsaI* reconhece dois sítios de restrição no produto de amplificação de 772 bp da segunda reação de nested-PCR, o que gera, após eletroforese em gel de agarose, o padrão de bandas de restrição de 440 bp, 185 bp e 147 bp em *H. contortus* (Figuras 11 e 12).

Sítio de reconhecimento da enzima de restrição *RsaI*: 5'-GT/AC-3'  
 >gij|897752|emb|X80046.1| H.contortus TUB-1 gene exons 3,4,5,6,7

TCACCCATGTTTCTTTATTGGAAATGTATGTGCGGTCGTTCTTCAGGAGGCCAAGTATGTTCC  
 CACGTGCTGTTCTTGTGATCTCGAGCCTGGAACGATGGACTCCGTTCTGTTCTGGACCGTA  
 TGGACAGCTTTCCGTCAGATAATTACGTGTTGGCCAGTCAGGAGCGGGTAACAATTGGG  
 CGAAGGGCCACTATACTGAGGGAGCCGAGCTAGTTGATAACGTATTAGACGTTGTCGCAA  
 AGAAGCTGAAGGTTGTGATTGCCTTCAGGTACTGACTTCATCAACAATTTACAGCTTCAACT  
 TTGATGTGTGAATACATTTCAATTCGTGCTCAGGGCTTCCAATTGACGCATTCACTTGGAG  
 GAGGCACTGGATCTGGAATGGCACTTTGTTAATTTCAAAAATTCGTGAAGAGTACCCTGA  
 TAGAATTATGGCTTCGTTCTCCTGTTCCATCACCCAAGGTGAGATCGTGTTAATCTTTGCTT  
 TTTTCTAAATTGTGATTTGAATTACTTATCCTCATGAAGATCCAAGTTGAAATAAGTCTCAC  
 CACCTGTAAACATGTGAAAGGAAGATGTTTTAAGGTATCCGACACTGCTGTAGAACCCTACAA  
 TGCTACCCTTTCCGTCATCAACTGGTAGAGAACACCGATGAAACATTCTGTATTGACAACGA  
 AGCTCTGTATGATATCTGCTTCCGCACTTTGAAACTCACAAATCCAACCTATGGAGATCTCA  
 ACCACCTTGGTAATGTTATTACACTTACTAAAGTATACTTAGACCTTTTTTCATGCTGAAAATG  
 TGCAATTGAAGTGTCTGTCACAATGCTGGTGTCCAGACCTGCCTTCGATTCCCTGGACAG  
 CTGAATGCTGATCTTCGCAAGTTAGCCGTGAACATGGTTCCATTCCTCGTCTTCACTTCTT  
 CATGCCCGGTTTTGCTCCAAGTGTCTGCAAAAGGGTGTCAAGCATATCGCGCTTCGACAGT  
 TGCTGAGCTTACACAGCAAGTACGCCATTACTCTTTATAGCATAGTGATTCAAAATTACAGC  
 CACCCATATTCTTAGATGTTGATGCAAAAGAACATGATGGCTGCTGTGATCCTCGCCATGGA  
 CGTTATCTTACGGTCGCTGCTATGTTCCGTGGTCTGATGAGCATGCGAGTGAGATTTTTTA

Figura 11. Sítios de restrição (GTAC) da enzima *RsaI* em fragmento do gene da  $\beta$ -tubulina em *Haemonchus contortus*.

Foto: Simone Cristina Méo Niclaura



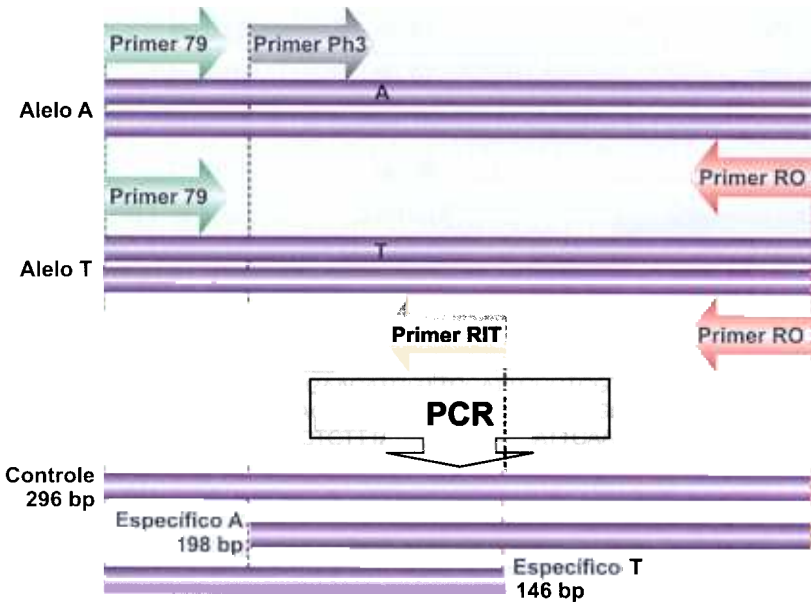
**Figura 12.** Padrão de bandas (440 bp, 185 bp e 147 bp) em *H. contortus*, após digestão do produto de amplificação da segunda reação de nested-PCR com a enzima de restrição *RsaI* e eletroforese em gel de agarose a 2,5%.

#### 5.4 ARMS-PCR para genotipagem do polimorfismo F200Y no isotipo 1 do gene da $\beta$ -tubulina em *Haemonchus contortus* e diagnóstico de resistência parasitária

A sigla ARMS, que significa *amplification refractory mutation system*, é traduzida como “sistema de amplificação por mutação refratária”. A ARMS-PCR é uma ferramenta de genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e constitui, ao mesmo tempo, uma reação de PCR multiplex, já que são utilizados mais de dois *primers*, e uma reação de PCR alelo-específica, uma vez que é possível amplificar e diferenciar um alelo do SNP do outro.

O princípio da ARMS-PCR consiste na utilização, na mesma reação de PCR, de quatro *primers* (YE et al., 2001), dois *primers* externos (*forward* e *reverse*) controles e dois *primers* internos específicos: um *primer forward*, que se liga a um alelo, e um *primer reverse*, que se liga ao outro alelo.

Na Figura 13, está demonstrado um esquema de reação de ARMS-PCR para a genotipagem do polimorfismo F200Y (transversão T > A) no isotipo 1 do gene da  $\beta$ -tubulina em *H. contortus*.



**Figura 13.** Amplificação do polimorfismo F200Y (T > A) no gene da  $\beta$ -tubulina em *Haemonchus contortus* por ARMS-PCR.

O protocolo de ARMS-PCR para genotipagem do polimorfismo F200Y (transversão T > A) no isotipo 1 do gene da  $\beta$ -tubulina em *H. contortus* está descrito a seguir.

**a) ARMS-PCR: protocolo de reação**

- Preparar 10  $\mu$ L do mix da reação de ARMS-PCR para cada amostra.

79: 5'-AAATAAGTCTCACCACCTGTAAG-3' (Primer forward controle)  
 RO: 5'-CCAGACATTGTGACAGACACTTCA-3' (Primer reverse controle)  
 Ph3: 5'-CTGGTAGAGAACCACCGATGAAACATA-3' (Primer forward para resistência)  
 RIT: 5'-CAGAGCTTCGTTGTCAATACGGA-3' (Primer reverse para susceptibilidade)

Polimorfismo T > A: ■: susceptível; ■: resistente.

Padrão de bandas: Controle: 296 bp; Resistente: 198 bp; Susceptível: 146 bp.

>gil|897752|emb|X80046.1| H.contortus TUB-1 gene exons 3,4,5,6,7

TCACCCATGTTTCTTTATTGGAATGTATGTGCGGTCTGTTCTTCAGGAGGCAAGTATGTTCCA-  
 CGTGCTGTTCTTGTGATCTCGAGCCTGGAACGATGGACTCCGTTCTGGACCGTATG-  
 GACAGCTTTCCGTCCAGATAATTACGTGTTTGGCCAGTCAGGAGCGGGTAACAATTGGGC-  
 GAAGGGCCACTATACTGAGGGAGCCGAGCTAGTTGATAACGTATTAGACGTTGTCCGCAAA-  
 GAAGTGAAGGTTGTGATTGCCTTCAGGTAAGTACTGACTTCATCAACAATTTACAGCTTCAACTT-  
 TGATGTGTAATACATTTCAATTCGTGCTCAGGGCTTCCAATTGACGCATTCACTTGGAGGA-  
 GGCACCTGGATCTGGAATGGGCACCTTTGTTAATTTCAAAAATTCGTGAAGACTACCTGATACA-  
 ATTATGGCTTCGTTCTCCGTTGTTCCATCACCCAAGGTGAGATCGTGTAAATCTTTGCTTTTT-  
 TCCTAAATTGTGATTTGAATTACTTATCCTCATGAAGATCCAAGTTGAAATAAGTCTCACCACC-  
 TGTAAACATGTGAAAGGAAGATGTTTAAGGTATCCGACACTGTCGTAGAACCCTACAATGC-  
 TACCCCTTCCGTCCACTCAACTGGTAGAGAACCACCGATGAAACATTCTGTATTGACAACGAAG-  
 CTCTGTATGATATCTGCTTCCGCACTTTGAAACTCACAAATCCAACCTATGGAGATCTCAACCAC-  
 CTGGTAATTGTTATTACACTTACTAAAGTATACTTAGACCTTTTTTCATGCTGAAAATGTGCA-  
 AT [REDACTED] TGTCACGACCTGCCTTCGATTCCCTGGACAGCTGAA-  
 TGCTGATCTTCGCAAGTTAGCCGTGAACATGGTTCATCCCTCGTCTTCACTTCTTCATGCC-  
 CGTTTTGCTCCACTGCTGCAAAAGGGTGCTCAAGCATATCGCGCTTCGACAGTTGCTGAG-  
 CTTACACAGCAAGTACGCCCATTAFACTTTATAGCATAGTATTCAAATTACAGCCACCCATAT-  
 TCTTAGATGTTGATGCAAAGAACATGATGGCTGCCTGTGATCCTCGCCATGGACGTTATCTTA-  
 CGTGCCTGCTATGTTCCGTGGTTCGTATGAGCATGCGAGTGAGTATTTTA

Figura 14. Primers e respectivos sítios de anelamento na sequência de DNA de *Haemonchus contortus* para reação de ARMS-PCR, genotipagem do polimorfismo F200Y (T > A) no gene da β-tubulina e determinação da resistência parasitária.

### b) ARMS-PCR: eletroforese em gel de agarose e genotipagem para diagnóstico da resistência parasitária

Para a visualização dos produtos de amplificação da reação de ARMS-PCR, a genotipagem das amostras quanto ao polimorfismo F200Y no isótipo 1 do gene da β-tubulina e a determinação da resistência parasitária, proceder à eletroforese das amostras em gel de agarose a 2,5%, conforme descrito anteriormente.

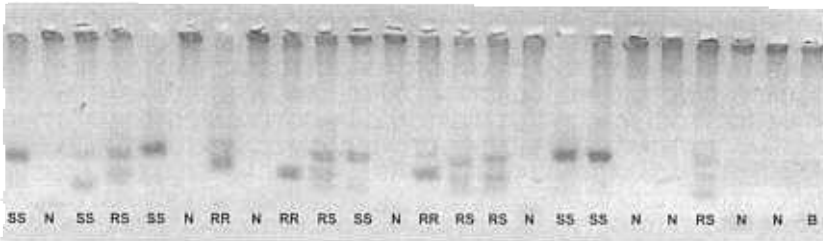
Os indivíduos homocigotos resistentes (AA ou RR) apresentam bandas de 296 bp e 198 bp; os homocigotos susceptíveis (TT ou SS), de 296 bp e 146 bp; e os heterocigotos susceptíveis (AT ou RS), de 296 bp, 198 bp e

figura 15). Assim, de acordo com o padrão de bandas observado, é determinar o genótipo (AA, TT ou AT) dos indivíduos e o estado de resistência parasitária (resistente ou susceptível).

**Indivíduo resistente** (genótipo AA, RR ou Tir/Tir): 296 bp e 198 bp.

**Indivíduo susceptível** (genótipo TT, SS ou Fen/Fen): 296 bp e 146 bp.

**Indivíduo susceptível** (genótipo AT, RS ou Fen/Tir): 296 bp, 198 bp e 146 bp.



Padrão de bandas após eletroforese para a determinação do genótipo de helmintos morfismo F200Y (AA, TT ou AT) e do estado de resistência parasitária: resistente (RR) ou susceptível (SS e RS).