



ALVO MOLECULAR gGAPDH PARA AMPLIFICAÇÃO DE *Trypanosoma caninum*

ALUNO: Francisco Campos de Amorim; Colégio Pedro II/campus Centro; PROVOC (Programa de Vocação Científica); **ORIENTADORA:** Juliana H. S. Barros; **LABORATÓRIO:** Biologia de Tripanosomatídeos-IOC

Trypanosoma caninum é uma espécie caracterizada pela infecção natural em cães domésticos, com casos desta infecção sendo reconhecidos em diversas regiões do país. A identificação deste parasito em diversos estados gerou curiosidade e interesse por novas pesquisas. Seguindo esta linha, foram realizados ensaios PCR com os alvos moleculares ribossomais 18S rDNA e 24S rDNA e mitoncondriais citocromo b e minicírculos do kDNA. **Objetivo:** Realizar amplificação do DNA de *T. caninum* pela a reação de PCR pelo alvo molecular gGAPDH e o sequenciamento molecular.

Biossegurança

-EPI (Equipamento de Proteção Individual)

Itens de uso individual e obrigatório com a função de proteger o trabalhador nas suas atividades (exemplos: jaleco e luvas)



Luvas de proteção

-EPC (Equipamento de Proteção Coletiva)

Itens que protegem os trabalhadores dentro de um laboratório como um todo.



Capela biológica

Amostras de *T. caninum*

Um total de 4 (quatro) culturas de *T. caninum* foi utilizado. Estas amostras foram isoladas de cães do Rio de Janeiro.



1



2



3

Nas imagens acima, as formas evolutivas do parasito analisado, respectivamente identificadas como:

1- Tripomastigota; 2- Esferomastigota; 3- Epimastigota

Extração de DNA

O DNA foi extraído à partir da massa parasitária de 4 isolados em cultura, sendo estes obtidos de fragmentos da pele de cães infectados. A extração foi possibilitada pela ampliação destes isolados à partir de kit comercial, para ser utilizado na reação de PCR.



Kit comercial da marca Promega

PCR

O DNA das amostras de *T. caninum* foi amplificado através da técnica PCR (reação em cadeia da polimerase). Os primers em questão são designados para amplificar uma região específica do gene gGAPDH.

	[]	1x
Primer R	10 pMol	1,0 ul
Primer F	10 pMol	1,0 ul
Taq		12,5 ul
H2O		9,5 ul
TOTAL		24 ul
DNA	100 ng/ul	1,0 ul
Total Final		25 ul

GoTaq® Green Master Mix - Promega®

Ciclagem		
1X	94º C	3 min
30X	94º C	1 min
	54º C	2 min
	72º C	2 min
1X	72º C	10 min
	4º C	∞

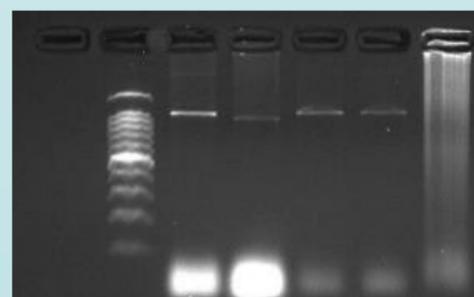
Multiplicamos as quantidades dos reagentes para conseguirmos fazer o suficiente para 6 microtubos de mix e em cada colocamos o DNA dos 4 isolados, além de um controle negativo e um controle positivo *T. cruzi* cepa F90.

Eletroforese

Foi realizada a eletroforese em gel de Agarose 2% - Tampão TBE, com intuito analisar o resultado obtido da reação de PCR.



1 2 3 4 5 6 7



1 – Controle negativo
2 – Marcador 100 bp
3 – Amostra 176
4 – Amostra 194
5 – Amostra 201
6 – Amostra 249
7 – *T. cruzi* F90

OBSERVAÇÃO

Seria realizado também o procedimento de **sequenciamento** dessas amostras, como uma conclusão de todo o processo. Porém, devido á pandemia da Covid-19, as atividades presenciais do PROVOC foram interrompidas pela Fiocruz.

AGRADECIMENTOS: Ao PROVOC (Programa de Vocação Científca) etapa iniciação 2019/20, à Fiocruz e ao Laboratório de Biologia Tripanosomatídeos – IOC/Fiocruz.