

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE  
JOAQUIM VENÂNCIO



Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico

**IOC**

Instituto Oswaldo Cruz

# *Estudo do alvo molecular gGAPDH para caracterização molecular de Trypanosoma caninum*

Programa de Vocação Científica  
(PROVOC 2021/2022)

**Aluna: Brendha Veras de Lima Lopes**  
Colégio Pedro II- Campus Realengo 2

**Orientadoda: Juliana Helena da Silva Barros**  
Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos/IOC





## O que é um tripanosomatídeo?

- Tripanosomatídeos são protozoários parasitas flagelados, pertencentes à família *Trypanosomatidae*, que abrange os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Esses Tripanosomatídeos são eucariontes e unicelulares (Nascimento et al., 2022).



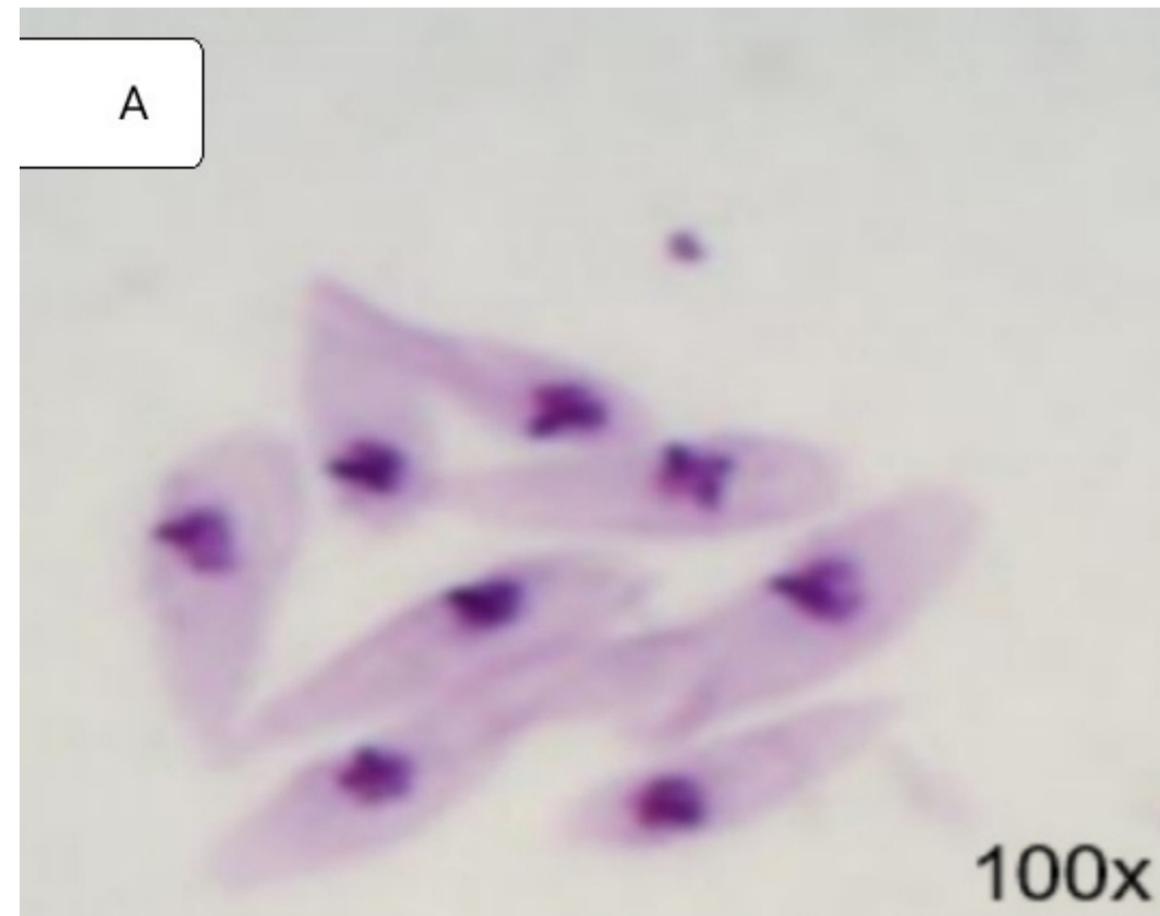
## Quais as características do *Trypanosoma caninum*?

- O parasito apresenta preferência por vasos sanguíneos periféricos e é encontrado em fragmentos de pele íntegra de cães (Madeira et al., 2014).
- Até agora foram isolados somente no meio de cultura axênico. Nesse meio de cultura, os parasitos do gênero *Trypanosoma* são encontrados sob as formas epimastigota, esferomastigota e tripomastigota (Barros et al., 2014).



## Forma epimastigota atípica

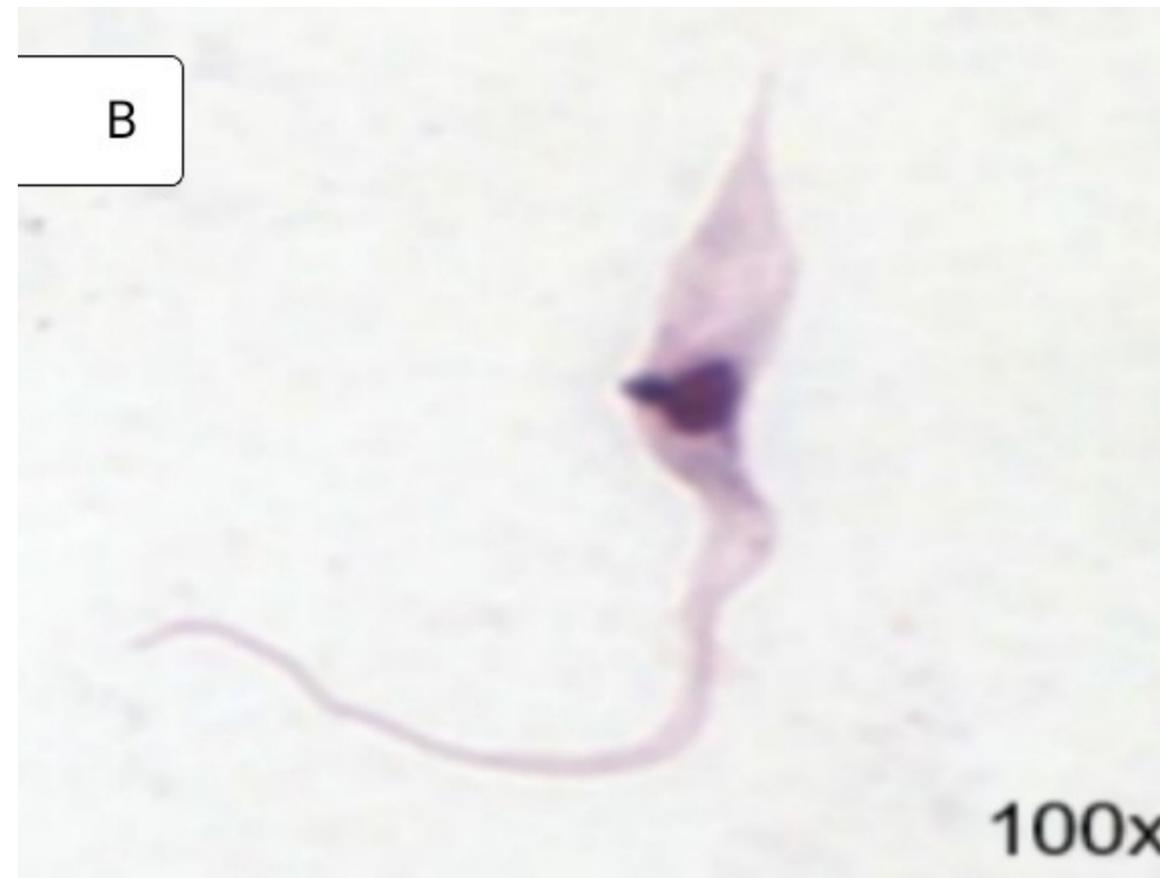
- A forma epimastigota atípica (Figura 1A) não apresenta flagelo para locomoção, sua forma é alongada.





## Forma epimastigota

- A forma epimastigota (Figura 1B) tem como diferença apenas a presença do flagelo, que nesse caso emerge da lateral do corpo do parasito.





## Forma esferomastigota

- A forma esferomastigota (Figura 1C) possui forma arredondada, caracteriza a transição da epimastigota para a tripomastigota (Figura 1D) e possui flagelo.





## Forma tripomastigota

- A forma tripomastigota tem um corpo alongado, com um formato em S (figura 1D) e apresenta flagelo.





## Problemática

- É visto que, os cães domésticos podem apresentar mais de uma infecção causada por tripanossomatídeos, pois são encontrados em uma área geográfica onde as espécies se sobrepõem, dificultando assim, o diagnóstico laboratorial (Madeira et al., 2009).



## Problemática

- No município do Rio de Janeiro, 6 dos 19 animais estudados foram submetidos à eutanásia por suspeita de LV após apresentarem sororreatividade para leishmaniose (de Pinto et al., 2010).

# INTRODUÇÃO



## Biologia Molecular

- Neste estudo, com o objetivo de conhecer mais uma região do DNA de *T. caninum*, foi realizado um estudo molecular utilizando uma região parcial do gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH). Com o intuito de detectar estes parasitos, foi utilizado o diagnóstico molecular, através da técnica PCR (Reação em cadeia polimerase).

# OBJETIVO



## Propósito do trabalho

- Conhecer uma sequência parcial do gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) para ser utilizada na caracterização molecular de *Trypanosoma caninum*.

# O QUE FOI FEITO NESSE PERÍODO?



## Fichamento de resumos e fontes bibliográficas

- Foi realizado o fichamento de resumos relacionados ao tema e buscas por fontes bibliográficas no site PubMed, durante o período online em que as atividades estavam suspensas por conta da pandemia.

# O QUE FOI FEITO NESSE PERÍODO?



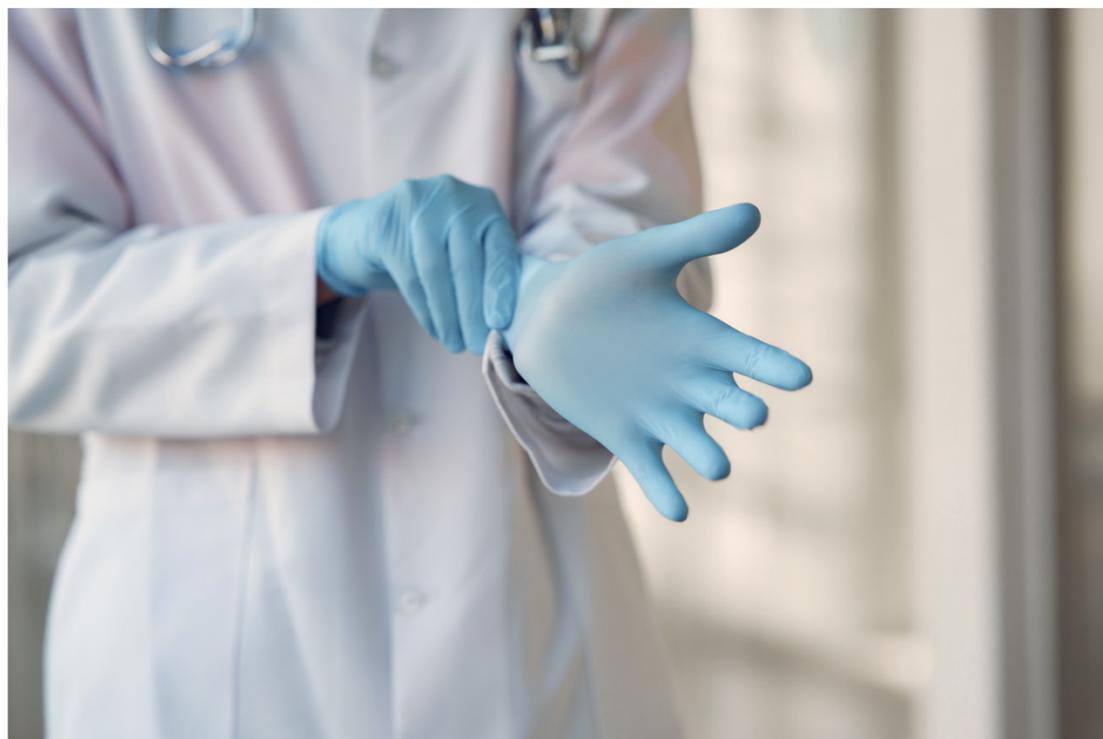
## Biossegurança

- Quando as atividades iniciaram presencialmente, fui instruída quanto as normas de biosegurança do laboratório. No laboratório são utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e o Equipamento de Proteção Coletiva (EPC).

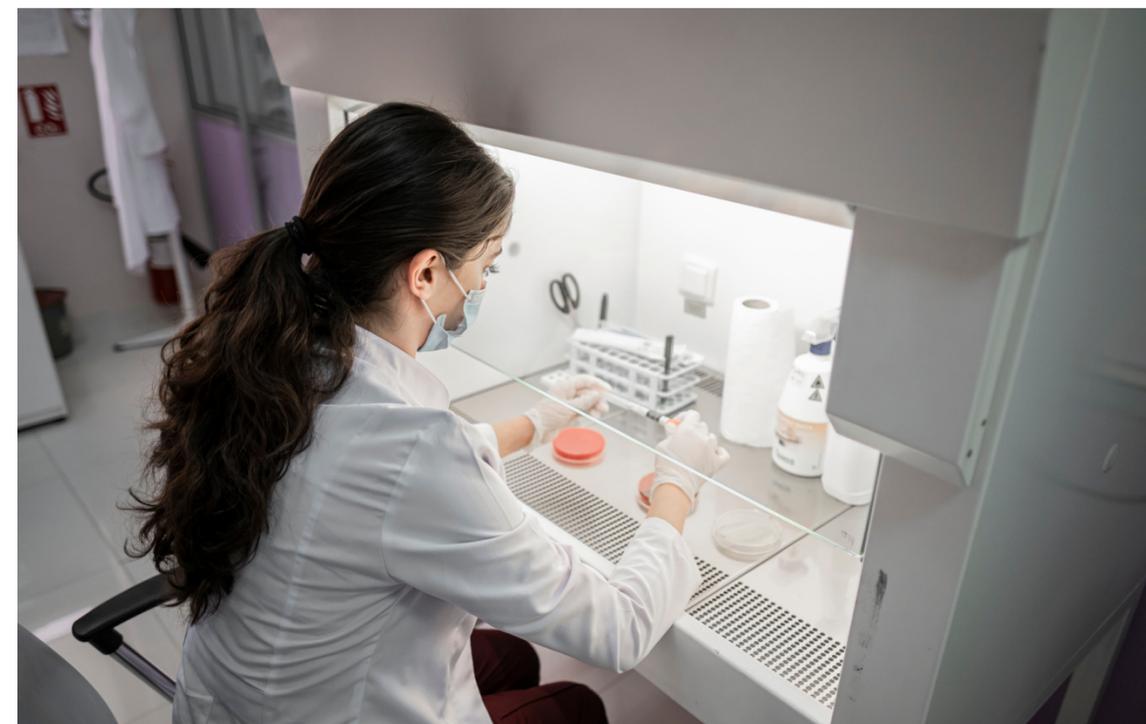
# O QUE FOI FEITO NESSE PERÍODO?



## Biossegurança



EPI.



EPC.



## Desenvolvimento

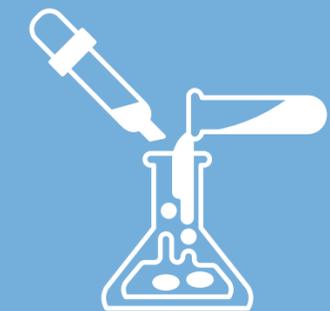
A partir do início das atividades presenciais, foram realizadas técnicas moleculares para estudo do alvo molecular gGAPDH, a fim de identificar isolados de *T. caninum*.



## Métodos

### 1- Dosagem de DNA

Foi realizada a dosagem de DNA de *T. caninum* no espectrofotômetro. O espectrofotômetro é um equipamento utilizado para medição da intensidade da luz em comprimentos de onda. Desse modo, é possível saber qual é a dosagem da concentração exata do DNA utilizado.



## Métodos

### **2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento nucleotídico**

As amostras de DNA obtidas de cultura de *T. caninum* foram submetidas à técnica PCR, para a região parcial do gene gGAPDH, um marcador molecular específico para membros da família *Trypanosomatidae*, o que permite a sua identificação.

Após o preparo dos reagentes necessários para a PCR (mix), as amostras foram colocadas no termociclador e passaram pela corrida eletroforética. Por último, produtos amplificados na PCR foram visualizados por meio de um fotodocumentador.



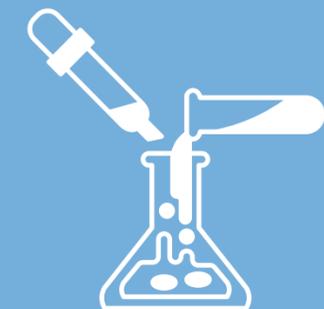
## Métodos

### 3- Protocolo para PCR deste estudo

A PCR foi feita com as seguintes amostras de DNA: *T. caninum* 20, *T. caninum* 176, *T. caninum* 201, *T. caninum* 42, controle positivo *T. cruzi* F90 e controle negativo.

Os primers são designados para amplificar uma região específica do gene gGAPDH (Boucinha et Al., 2009).

# DESENVOLVIMENTO E MÉTODOS



Segue abaixo a quantidade de reagentes utilizados:

| REAGENTES                        | CONCENTRAÇÃO | 1X      | 6X      |
|----------------------------------|--------------|---------|---------|
| PRIMER F                         | 10 pmol      | 1,0 uL  | 6,0 uL  |
| PRIMER R                         | 10 pmol      | 1,0 uL  | 6,0 uL  |
| ENZIMA (TAQ POLIMERASE OU GOTAQ) |              | 12,5 uL | 75,0 uL |
| H2O (ÁGUA DESTILADA)             |              | 9,5 uL  | 57,0 uL |
| TOTAL INICIAL                    |              | 24 uL   | 24,0 uL |
| DNA                              |              | 1,0 uL  |         |
| TOTAL FINAL                      |              | 25,0 uL |         |

**Tabela 1:** Concentração e quantidade dos reagentes utilizados no protocolo de PCR.



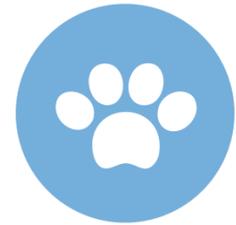
## Métodos

### 4- Ciclagem da PCR

Segue abaixo as temperaturas e tempos ideais de anelamento das fitas de DNA:

| CICLAGEM |      |                    |
|----------|------|--------------------|
| 1X       | 94°C | 3 minutos          |
| 30X      | 94°C | 1 minuto           |
|          | 54°C | 2 minutos          |
|          | 72°C | 2 minutos          |
| 1X       | 72°C | 10 minutos         |
|          | 4°C  | tempo inespecífico |

**Tabela 2:** Temperatura e quantidade de tempo que as amostras devem ficar no termociclador,



## Métodos

### **5- Técnica de eletroforese em gel de agarose**

É realizada para separar os fragmentos de DNA por tamanho. Pelo fato da carga de DNA ser negativa, na corrida eletroforética, o DNA percorre a partir do eletrodo negativo em direção do eletrodo positivo, numa voltagem entre 70W e 90W. Fragmentos maiores demoram mais tempo para passar pelos poros presentes no gel de agarose e fragmentos menores passam mais rapidamente através deles, tendo maior alcance na corrida eletroforética.



## Resultados

Como consequência, é possível observar o gel de agarose TBE 2%, demonstrando resultados da amplificação de *Trypanosoma caninum* para o alvo molecular gGAPDH (figura 3).

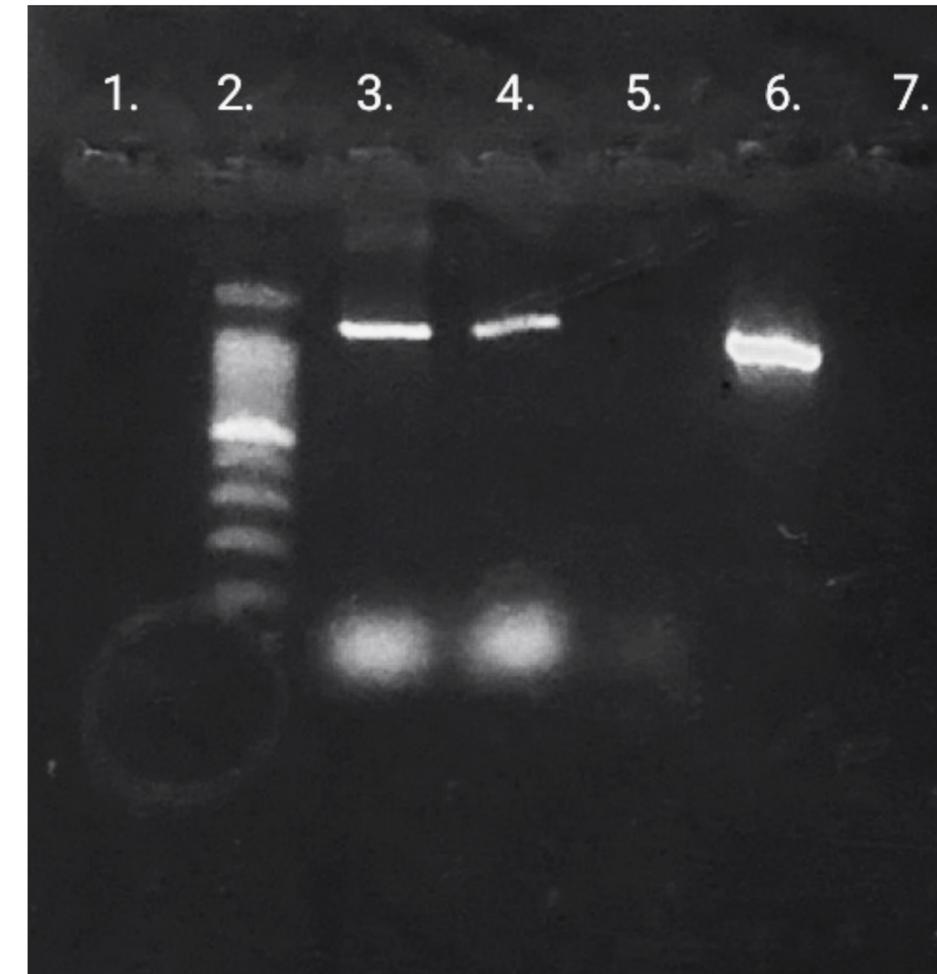


Figura 3: Poço 1- controle negativo; poço 2- marcador molecular; poço 3- *T. caninum* 20; poço 4- *T. caninum* 176; poço 5- *T. caninum* 42; poço 6- controle positivo (*T. cruzi* F90); poço 7- *T. caninum* 201.

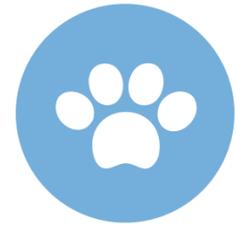


## Métodos

### 6- Purificação de DNA

A técnica de purificação do DNA consiste em separar o material genético de restos celulares e proteínas, através da precipitação e suspensão do material.

As amostras *T. caninum* 176 e *T. caninum* 20 foram submetidas à purificação por meio do kit da marca GE. Além disso, o produto final foi colocado em tubos esterilizados e posteriormente foram enviados para a plataforma de sequenciamento.



## Métodos

### 7- Sequenciamento nucleotídico

No sequenciamento nucleotídico, foram usadas as amostras amplificadas com o alvo molecular para gene gGAPDH, e foram purificadas. Posteriormente, sucederam para a plataforma de sequenciamento da Fiocruz.

As sequências resultantes foram analisadas pelo programa BioEdit, e as sequências de consenso são obtidas pelo programa SeqMan. Todas as sequências foram comparadas com os nucleotídeos de diferentes espécies de tripanossomatídeos depositados no GenBank com o programa Blast.

# RESULTADO E CONCLUSÃO



Logo, conclui-se que, as amostras *T. caninum* 176 e *T. caninum* 20 apresentaram percentual máximo de identificação de 83,38% (Figura 4) ao serem analisadas com outras sequências de tripanosomatídeos do programa Blast/NCBI. Portanto, tal resultado evidencia que a sequência obtida é completamente diferente das sequências depositadas no GenBank, demonstrando mais uma vez a distinção entre *T. caninum* e as demais espécies do gênero *Trypanosoma*.

# RESULTADO E CONCLUSÃO



blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download | Select columns | Show 100

select all 36 sequences selected

GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

|                                     | Description   | Scientific Name                   | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession                  |
|-------------------------------------|---|-----------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma sp. currawong AAT partial gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydroge...</a>    | <a href="#">Trypanosoma sp...</a> | 617       | 617         | 99%         | 5e-172  | 83.38%     | 900      | <a href="#">AJ620264.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma sp. voucher THBat19_161 glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) ge...</a>       | <a href="#">Trypanosoma sp.</a>   | 612       | 612         | 99%         | 2e-170  | 83.21%     | 851      | <a href="#">OL691562.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma sp. voucher THBat18_036 glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) ge...</a>       | <a href="#">Trypanosoma sp.</a>   | 606       | 606         | 99%         | 1e-168  | 83.06%     | 904      | <a href="#">OL691559.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma corvi isolate OA6 glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene .p...</a>     | <a href="#">Trypanosoma corvi</a> | 601       | 601         | 99%         | 5e-167  | 82.93%     | 883      | <a href="#">HQ906660.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma corvi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene .partial cds</a>          | <a href="#">Trypanosoma corvi</a> | 601       | 601         | 99%         | 5e-167  | 82.93%     | 889      | <a href="#">FJ649496.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma theileri partial gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. isolat...</a> | <a href="#">Trypanosoma th...</a> | 593       | 593         | 94%         | 9e-165  | 83.57%     | 862      | <a href="#">AJ620282.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma theileri isolate Tthc29 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gen...</a>   | <a href="#">Trypanosoma th...</a> | 588       | 588         | 94%         | 4e-163  | 83.41%     | 847      | <a href="#">HQ664799.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma theileri isolate Tthc40 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gen...</a>   | <a href="#">Trypanosoma th...</a> | 588       | 588         | 94%         | 4e-163  | 83.41%     | 847      | <a href="#">HQ664795.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Trypanosoma theileri clone 256 glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) pseudogen...</a>     | <a href="#">Trypanosoma th...</a> | 582       | 582         | 94%         | 2e-161  | 83.25%     | 889      | <a href="#">MK674005.1</a> |

Figura 4: Imagem dos resultados obtidos na comparação das sequências deste estudo com as sequências depositadas no GenBank pelo programa Blast/NCBI.