



Programa de Vinculación de Científicos y Tecnológicos – 2015 - 2016

LAURA ALICIA GONZALEZ BARRIOS
FCV - UNA

Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos

Dentro del marco de referido programa se realizó una pasantía tecnológica – científica en el Laboratorio de Biología Molecular de la Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de la Universidade Federal de Mato Grosso do Sul y en EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropécuaria).

Fecha de inicio: 11/04/16.

Fecha de culminación: 29/07/16.

Objetivos

Entrenamiento en Técnicas de Biología Molecular

Entrenamiento en Bioinformática

Procesamiento de Muestras biológicas pertenecientes a diversas regiones del país (Paraguay) para determinación de ADN de Leishmania.

Actividades realizadas

1. Extracción de ADN de muestras de médula ósea y los ganglios de caninos muestreados en diversas regiones del Paraguay.

*Las muestras extraídas mediante la punción y aspirado de Medula Ósea y Linfonódulos previa deshidratación y secado y conservación en etanol, fueron procesadas para la extracción de ADN de *Leishmania spp.**



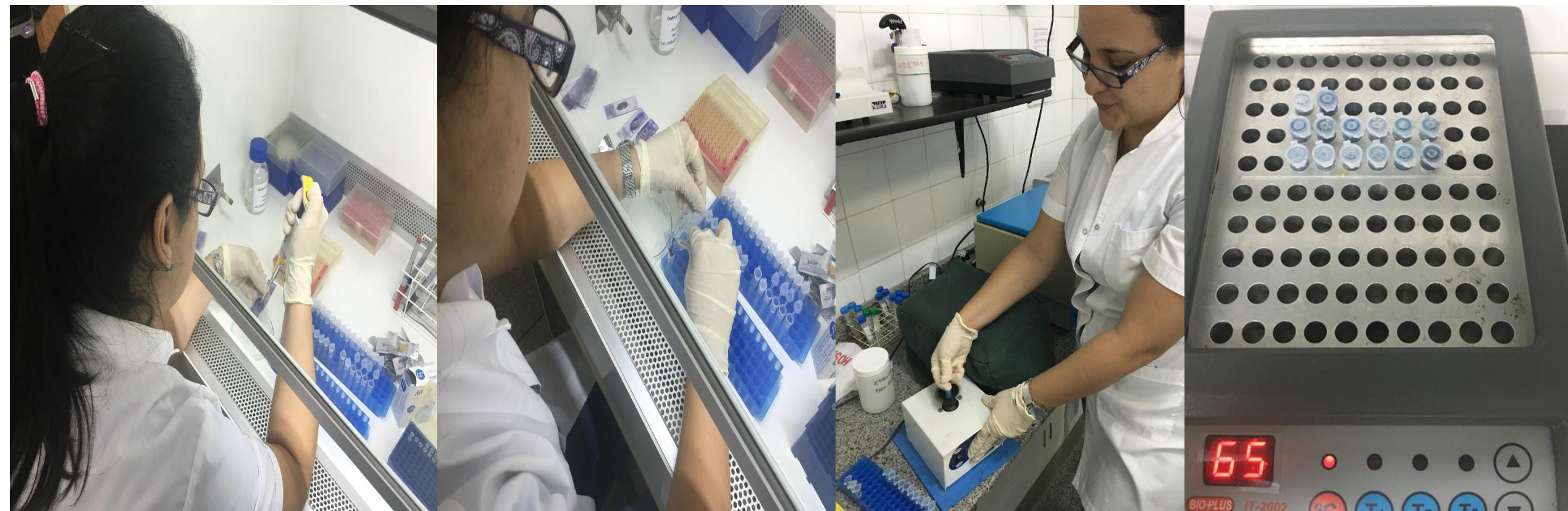
Reactivos



Araújo et al., 2009

1-Adicionar 350 μ L de sangue (ou volume aproximado de outros tecidos*) em um tubo de polipropileno de 2 mL.

2-Acrescentar 500 μ L de SDS 20%, homogeneizar em vortex e incubar a 65°C por 6 minutos.



3-Remover o tubo da incubação e adicionar 400 μ L de clorofórmio. Agitar vigorosamente em vortex até completa homogeneização.

4- Acrescentar 300 μ L de solução de precipitação protéica e homogeneizar novamente em vortex. • Centrifugar a 10.000 x g por 10 minutos.

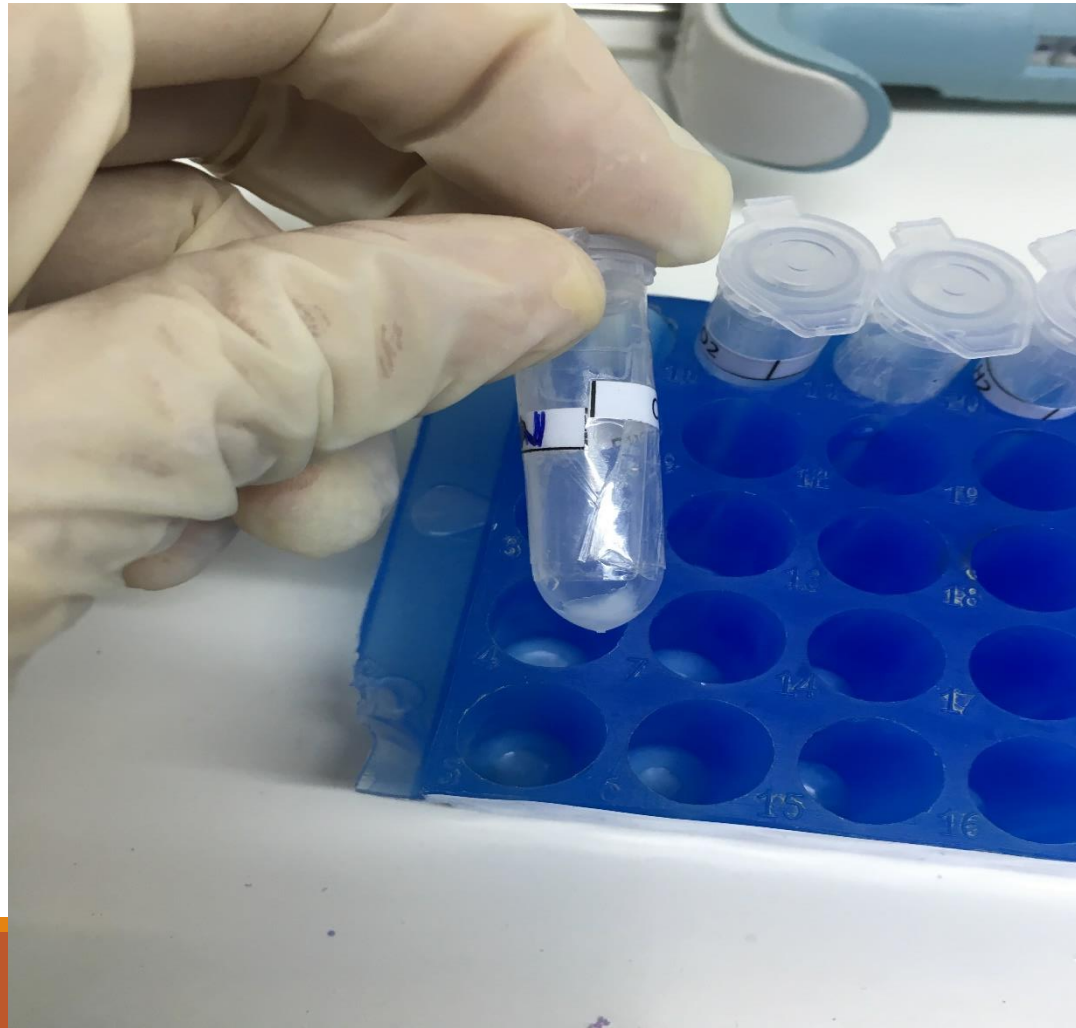
5- Pipetar a fase aquosa e transferi-la para um novo tubo.



6- Adicionar 1 mL de etanol 100% ou isopropanol, homogeneizar por inversão e centrifugar a 10.000 x g por 5 minutos.

7- Desprezar o sobrenadante e acrescentar 1 mL de etanol 70%.

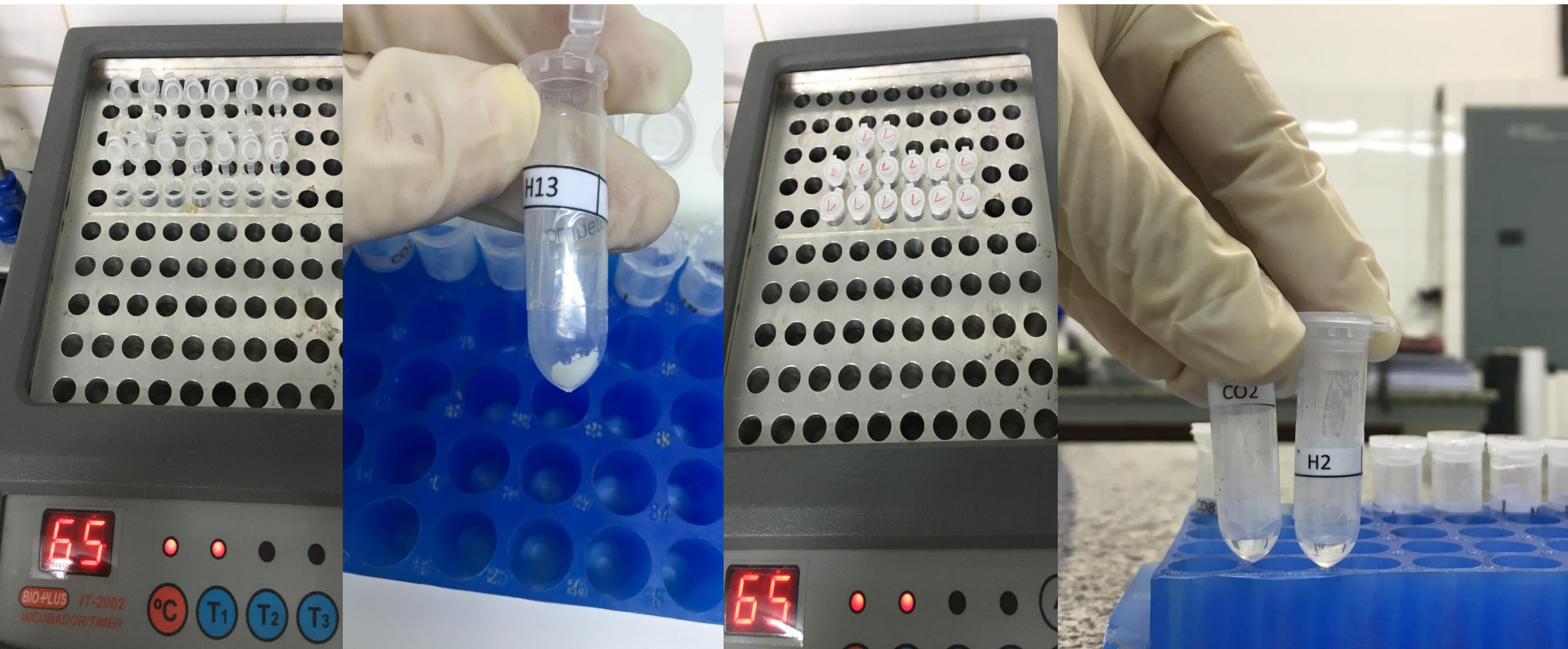
8-Centrifugar novamente por 2 minutos a 10.000 x g e desprezar o sobrenadante.



9- Centrifugar novamente por 1 minuto e retirar o resí- duo de etanol com o auxílio de uma micropipeta. Inverter o tubo para secagem do sedimento (aproximadamente 10 minutos).

10- Adicionar 100 μ L de água livre de nucleases ou tampão TE e homogeneizar lentamente.

11- Incubar a 65°C por cinco minutos para completa solubilização do sedimento.



Evaluación de cantidad de DNA (Post Extracción)

La cantidad e integridad de las muestras extraídas fueron verificadas por espectrofotometría (A260/A280) y electroforesis en gel de agarosa 0,8%, respectivamente. Para el análisis de viabilidad de las muestras fue utilizado una Reacción de PCR para gen constitutivo (β -actin) de acuerdo con el protocolo descrito por Wang et al. (2007)

Reacciones de PCR

Reacción de amplificación PCR con cebadores B - actina para evaluar la calidad del ADN extraído de muestras de médula ósea y linfonódulos. (Wang et al., 2007)

Estandarización de Reacción de PCR con cebadores ICD (Isocitrato Deshidrogenasa) para determinar el ADN de Leishmania en muestras de diferentes regiones del Paraguay (Boite et al., 2013)

Reacción de PCR con primers MPI (fosfato isomerasa de manosa), ICD (isocitrato deshidrogenasa), ME (enzima málico), G6PDH (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato) y FH (fumarato hidratasa) para determinar ADN complejos Leishmania

Referência: Zemanová et al. (2006)

Primers

ICD F: 5´-ATGTTCCGCCATGTTTCGGC-3´

ICD R: 5´-TTACGCGCTCATCGCCTT -3´

Fragmento amplificado: 1308 pb

Reação

H₂O – 17,95

Tampão 10x – 2,5µL (10mM Tris-HCl pH8.3, 50µM KCl

MgCl₂ – 0,75µL (1,5mM)

dNTPs – 0,5 µL (0,2mM cada)

ICD F – 0,5 µL (11pMol)

ICD R – 0,5 µL (11pMol)

Taq DNA Pol – 0,25 µL (1.5)

DNA – 50ng (2 µL)

Programa de termociclagem

96°C – 5min

96°C – 1min |

55°C – 1min | 30X

72°C – 1,5min |

72°C – 10min

4°C – forever

MC1 GTT AGC CGA TGGTGG TCT TG (*Leishmania infantum*)

MC2 CAC CCA TTT TTC CCG ATT TTG (*Leishmania infantum*)

Tamaño amplicon: 450 pb

Amplificación del ADN de *Leishmania infantum* mediante la reacción de PCR con los primers MC a partir de muestras extraídas y extendidos citológicos de medula ósea y linfonódulos pertenecientes a regiones de Filadelfia, Concepción, Santa Rita, Central, Ciudad del Este, Hernandarias - Paraguay.

Amplificación del ADN de *Leishmania infantum* mediante la reacción de PCR con primers RV a partir de muestras extraídas y extendidos citológicos de medula ósea y linfonódulos pertenecientes regiones de Filadelfia, Diseño, Santa Rita, central, esta ciudad, Hernandarias - Paraguay.

Primers:

RV-1 CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G

RV-2 CAC CTG GCC TAT TTT ACA CCA

L. infantum

REFERENCIA: Lima-Junior et al., 2009

Tamaño amplicon: 145 pb

REACCIONES PCR

Evaluación de los primers para la determinación de ADN de *Leishmania infantum* (RV 1 y 2 RV), *Leishmania amazonensis* (A1 y A2) y *Leishmania braziliensis* (B1 y B2).

Evaluación de los primers A1 y A2 para la determinación de ADN de *Leishmania amazonensis* con controles positivos.

Amplificación de ADN de *Leishmania amazonensis* por reacción de PCR con los cebadores A1 y A2 en muestras de regiones pertenecientes a Filadelfia, Concepción, Santa Rita, Central, Ciudad del Este, Hernandarias - Paraguay.

Primers:

A1 TGC GAG GAT AAA GGG AAA GAA

A2 TGC CCT GAC TTG CAT GTC TA

L. amazonensis

Referencia: (Lima-Junior et al., 2009)

Tamaño amplicon: 62 pb.

Amplificación de ADN de *Leishmania* braziliensis por reacción PCR con los cebadores B1 y B2 en las muestras pertenecientes a regiones de Concepcion - Paraguay.

Amplificación del ADN de *Leishmania* braziliensis mediante la reacción de PCR con cebadores B1 y B2 en las muestras pertenecientes a regiones de Concepcion y Ciudad del Este - Paraguay.

Primers:

B1 GTG GGC GTA TCT GCT GAT GAC

B2 CAA AAA GCG AGG GAC TGC GGA

L. braziliensis

Referencia: Lima-Junior et al., 2009

Tamaño amplicon: 103 pb

HSP70: proteínas de shock térmico de 70 KDa o Hsp70

Evaluación de los cebadores HSP70 (1, 2, 3, 4)

Test de muestras con resultado positivo de *L. infantum* y *L. amazonensis* mediante PCR con cebadores HSP70 (1)

HSP70 1F GAA GGC GCC ATC GGCA

HSP70 1R ACC TCC AGG CCA GCA ATC

HSP70 2F GCC GGC ACGATTGCT G

HSP70 2R CGC CGA AGA AGT CCG ACA C

HSP70 3F ACG CGA AGA TGG ACA AGC G

HSP70 3R CGT ATC TTC ATC GCG TCG TTC

HSP70 4F AAG CGC AAC CAG ATC ACC ATC

HSP70 4R GTC GAC CTC CTC GAC CTT G

HSP70: proteínas de shock térmico de 70 KDa o Hsp70

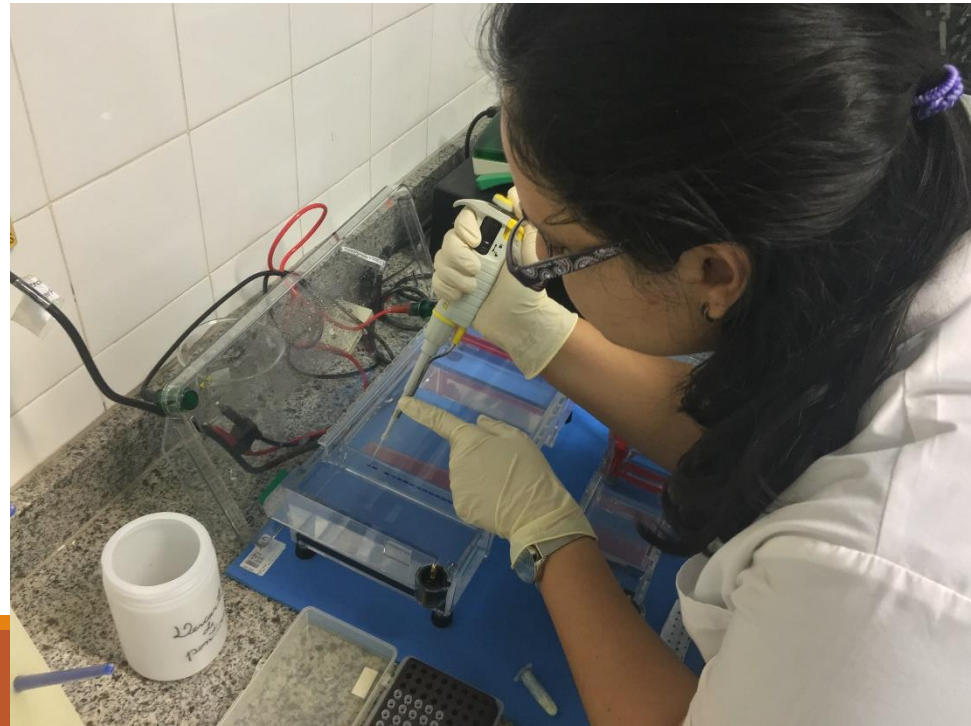
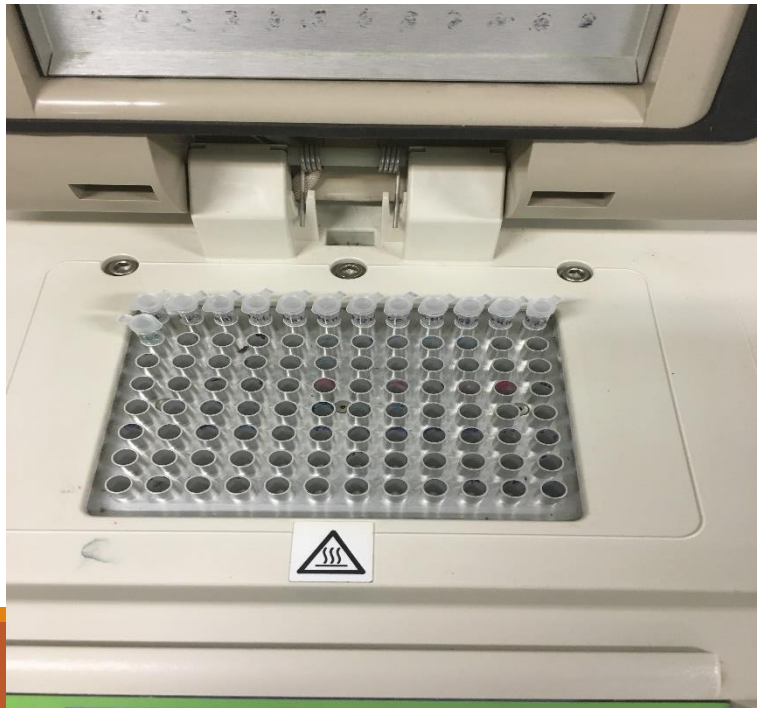
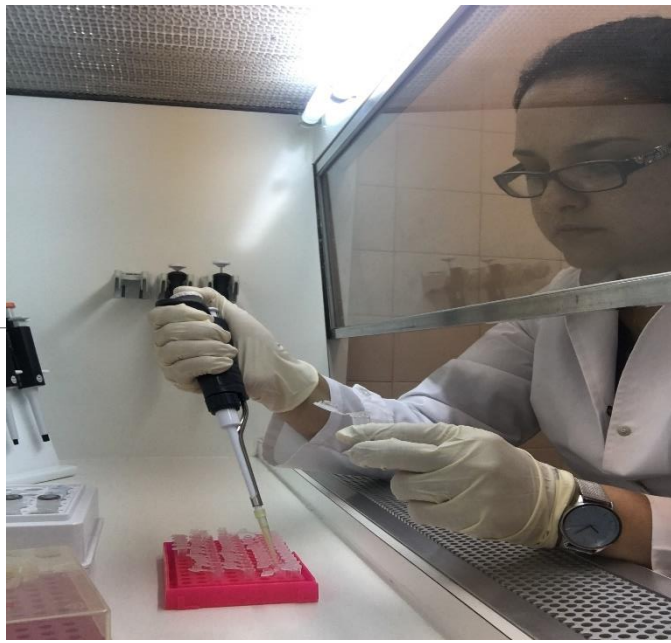
Amplificación de ADN de Leishmania sp. por reacción de PCR con cebadores HSP70 (1) en muestras pertenecientes regiones de Concepcion, Ciudad del Este, Filadelfia, Hernandarias, Central - Paraguay.

Amplificación de ADN de Leishmania sp. por reacción de PCR con cebadores HSP70 (1) en las muestras positivas para la secuenciación.

Amplificación de ADN de Leishmania sp. por reacción de PCR con cebadores HSP70 (2, 3, 4) en las muestras positivas seleccionados para la secuenciación.

Re -amplificación de ADN de Leishmania sp. por reacción de PCR con cebadores HSP70 (1) en las muestras positivas para la secuenciación.

Re - amplificación de ADN de Leishmania spp. por reacción de PCR con cebadores HSP70 (2, 3, 4) en las muestras positivas seleccionados para la secuenciación.



(-) (+)

MUESTRAS EXTRAIDAS DE MO Y LN (DEPTO CENTRAL)

Marcador de Peso Molecular

450PB

