

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

LARISSA BALDO VIEIRA

Relatório final do estágio para desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso no  
Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular

BOTUCATU

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu

Larissa Baldo Vieira

**Relatório final do estágio para desenvolvimento do  
trabalho de conclusão de curso no Laboratório de  
Virologia e Diagnóstico Molecular**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

**Co-orientadora:** Dra. Camila Dantas Malossi

**Botucatu**

**2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vieira, Larissa Baldo.

Relatório final do estágio para desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso no Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular / Larissa Baldo Vieira. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Coorientador: Camila Dantas Malossi

Capes: 20804008

1. Diagnóstico molecular. 2. Biologia molecular.  
3. Ciências da vida. 4. Virologia.

Palavras-chave: Biologia molecular; Diagnóstico molecular; Instrumentação.

## **Larissa Baldo Vieira**

Relatório final do estágio para desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso no  
Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular

Trabalho apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas

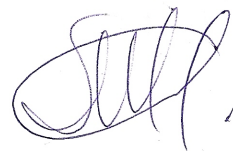
Orientador: Prof(a). Dr(a) João Pessoa Araújo Júnior

Comissão examinadora



Prof(a). Dr(a) João Pessoa Araújo Júnior

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Prof(a). Dr(a) Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

Botucatu, 14 de janeiro de 2022.

## RESUMO

VIEIRA, L. B. **Relatório final do estágio para desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso no Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular**. 2022. 49f. Trabalho de Conclusão de curso – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

O estágio obrigatório é um componente curricular do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Este relatório contém registros e reflexões sobre o estágio realizado no Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular. O estágio do tipo instrumentação foi fundamental para complementar e aprimorar a formação acadêmica, intelectual, ética e profissional.

Palavras-chave: Instrumentação, Biologia Molecular, Diagnóstico Molecular.

## ABSTRACT

VIEIRA, L. B. **Final report of the internship for the development of the course conclusion work at the Laboratory of Virology and Molecular Diagnosis.** 2022. 49f. Course conclusion work – Botucatu Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

The mandatory internship is a curricular component of the Bachelor degree of Biological Sciences course. This report contains records and reflections about the internship carried out in the Virology and Molecular Diagnostics Laboratory. The instrumentation type internship was fundamental to complement an academic, intellectual, ethical and professional formation.

Keywords: Instrumentation, Molecular Biology, Molecular Diagnosis.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
2 ACOMPANHAMENTO DAS PESQUISAS DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	11
3 ACOMPANHAMENTO DAS TÉCNICAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	16
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS .....	38
APÊNDICE .....	40
ANEXOS.....	48

## 1 INTRODUÇÃO

O Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular em que foi realizado o estágio durante o período de setembro de 2020 a dezembro de 2021 está localizado no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu. Esse laboratório está sob responsabilidade do Professor Associado do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior. Esse professor atuou como Orientador do estágio e a Bióloga e Técnica no IBTEC, Dra. Camila Dantas Malossi, atuou como Coorientadora.

Devido a pandemia ocasionada pelo novo coronavírus, foi criado o Laboratório de Apoio ao Diagnóstico (LAD), que realiza diagnóstico massivo de Covid de diversas cidades do estado de SP e também faz parte do projeto Corona-ômica, realizando monitoramento da evolução genômica do coronavírus circulante.

De acordo com o Regulamento do estágio curricular obrigatório do curso de bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, disponível no site do IBB, o estágio do tipo instrumentação é:

“Estágio no qual o aluno será orientado para desenvolver habilidades técnicas e científicas específicas ao desempenho de uma ou mais ocupação profissional prevista em lei, e por ele escolhida, que pode incluir a execução de técnicas de rotina, metodologias de ensaios experimentais, fundamentos teóricos e manuseio de equipamentos, interpretação e análise crítica de resultados, metodologias de ensino, uso de metodologias alternativas e outras adequadas ao exercício profissional competente.”

A área de formação no estágio curricular obrigatório selecionada e de acordo com o Projeto Pedagógico do curso é a de Biologia do Organismo. De acordo com o Conselho Regional de Biologia 1ª Região (SP, MT e MS), a área de atuação envolvida nesse estágio é a da Saúde, com Análises e Diagnósticos Biomoleculares.

Para atuar no laboratório, é imprescindível saber sobre conceitos de biossegurança e disposição de resíduos perigosos. A apostila do curso de extensão universitária da UFSCar de “Técnicas básicas em biologia molecular”, realizado em 2004, traz algumas instruções de segurança no laboratório e disposição de resíduos perigosos, disponibilizadas no anexo 1.



Os conhecimentos requeridos para execução das técnicas no laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular são principalmente os de Biologia Molecular. O dogma central da biologia molecular é DNA → RNA → Proteína, desdobrando e aplicando esse dogma *in vitro* diversos métodos de diagnóstico molecular são possibilitados. Técnicas moleculares proporcionam um diagnóstico direto, específico, sensível, robusto e preciso, com baixa probabilidade de obtenção de resultados falso positivos ou falso negativos.

Entre as principais técnicas de Biologia Molecular utilizadas para diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas, está a reação em cadeia da polimerase, suas variantes e aplicações. De acordo com Bianco e Lipai (2015),

“A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi desenvolvida na década de 1980 por Kary Mullis, que recebeu, em 1993, o prêmio Nobel. Essa técnica possibilita a síntese de fragmentos de DNA a partir de sequências-alvo de DNA definidas, capazes de gerar uma quantidade essencialmente ilimitada de uma sequência de interesse, e pode ser executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células”.

Além das linhas de pesquisa investigadas, o laboratório também oferece serviços de diagnóstico molecular e sequenciamento de DNA. Esses serviços contam com o apoio da FUNDIBIO (Fundação do Instituto de Biociências), fundação sem fins lucrativos e de direito privado instituída pela UNESP.

O estágio realizado teve como objetivo: ter experiência prática, familiarizar com demandas e rotina do laboratório, conhecer ferramentas de análises de dados na área de bioinformática, conhecer marcas e formas de compra dos materiais, reagentes e equipamentos e o funcionamento de equipamentos e ferramentas presentes em um laboratório de Diagnóstico Molecular.

## 2 ACOMPANHAMENTO DAS PESQUISAS DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

- 1) Estudo da variabilidade das regiões codificantes das proteínas p26 e gp90 de estirpes do vírus da anemia infecciosa equina (AIE) do Pantanal brasileiro – Doutorado Jaqueline Assumpção

A anemia infecciosa equina é causada por um retrovírus e os exames usados para diagnóstico são ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e IDGA (Imunodifusão em gel de agar). Esses exames são feitos basicamente pela ligação do antígeno ao anticorpo. Porém, comparando alguns diagnósticos feitos com esses testes a diagnósticos moleculares, constatou-se algumas incoerências nos resultados.

Este trabalho busca avaliar regiões específicas do genoma viral para levantar dados que possibilitem o aprimoramento desses diagnósticos. Busca-se analisar se as regiões moldes do DNA para proteínas codificantes (gp90 e p26) apresentam mutações e, conseqüentemente, interferem no diagnóstico sorológico.

- 2) Protocolo de extração de DNA de circovírus a partir do sangue e soro com *Beads*: Desenvolvimento e aplicação de Biossensor para detecção do Circovírus suíno 2 (PCV-2) – Mestrado Bruna Lindolfo

As *beads* estudadas são de dois tipos, uma modificada com carboxila e outra com sílica. As modificações possuem a função de promover a ligação reversível entre as partículas magnéticas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) em determinadas soluções. Este trabalho busca padronizar um protocolo utilizando reagentes produzidos no próprio laboratório (“in house”) visando um procedimento mais acessível, reduzindo significativamente o custo com a etapa de extração de material genético para o diagnóstico molecular do vírus em questão (PCV-2). Os parâmetros de quantidade e pureza de DNA estão sendo comparados a de dois *kits* comerciais (*beads* magnéticas comerciais e colunas de sílica) para validação do protocolo. A construção de um biossensor utilizando nanopartículas de ouro e sondas de DNA modificadas, específicas para regiões conservadas do genoma PCV-2 tem o intuito de desenvolver um *kit* colorimétrico para o rápido diagnóstico do PCV-2.

**3) Detecção Molecular de Zika vírus (ZIKV) em primatas não humanos (PNH) neotropicais – Mestrado Amanda Haisi**

O Zika vírus pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e possui similaridade com outros arbovírus de interesse para a saúde. A principal forma de transmissão do ZIKV ocorre por mosquitos vetores infectados, por meio do ciclo silvestre envolvendo PNH e mosquitos arborícolas, e um ciclo urbano envolvendo seres humanos e mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes spp.*

Estudos recentes indicam que PNH neotropicais podem atuar como hospedeiros de manutenção e/ou amplificação do vírus. Portanto, este trabalho tem como objetivo a detecção molecular de ZIKV e análise filogenética em amostras de sangue total e tecidos de PNH neotropicais do estado de São Paulo e Paraná a fim de caracterizar as cepas virais circulantes.

\*Texto informado pela mestranda responsável pelo projeto, adaptado.

**4) Desenvolvimento de *kit* colorimétrico com uso de nanopartículas de ouro para diagnóstico de parvovirus canino 2 – Mestrado Ana Carolina Yamakawa**

A parvovirose canina é uma enfermidade infectocontagiosa aguda, causada pelo parvovírus canino 2 (PVC-2), um DNA vírus de fita simples. Endêmica em todo território brasileiro, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico baratas, práticas e rápidas, são necessárias, uma vez que somente o diagnóstico clínico, não é suficiente. Biossensores vem se destacando na área tecnológica como uma ferramenta analítica que pode identificar a presença de patógenos (antígenos ou ácido nucleico) utilizando como base nanopartículas. O objetivo desse projeto é desenvolver e padronizar *kits* colorimétricos para a identificação do PVC-2 em amostras de fezes, utilizando nanopartículas de ouro modificadas com a deposição de anticorpos ou sondas específicas, que, ao se ligarem ao seu respectivo alvo proporcionarão uma mudança imediata de coloração. Essa é uma nova técnica que promoverá um diagnóstico de forma rápida, simples e de baixo custo, em comparação com as metodologias usuais.

\*Texto informado pela autora, adaptado.

**5) Sequenciamento do Sars-Cov-2 – Leila Sabrina Ullmann e Fábio Sossai Possebon**

O sequenciamento do Sars-Cov-2 é parte do projeto Corona-ômica Br MCTI, que desenvolve análises de genoma viral, metagenômica, exoma, transcrito e inteligência

artificial. O projeto recebe apoio do governo federal, da Rede vírus MCTI, do Cnpq, FNDCT, Finep e do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações.

Especificamente no Laboratório de Apoio ao Diagnóstico (LAD), é feita a vigilância genômica do coronavírus circulante em algumas cidades do estado de São Paulo. Para isso, é utilizada a metodologia de sequenciamento NGS (Next Generation Sequencing ou sequenciamento de nova geração) e pelo método tradicional Sanger.

Esse estudo é importante para acompanhar a evolução do vírus, as mutações que apresentam e o surgimento e dispersão geográfica de variantes. O conhecimento sobre as novas variantes também é importante para entender a resposta das mesmas a vacinas e a necessidade ou não de componentes vacinais específicos para a mesma.

- 6) Estudo da expressão gênica diferencial induzida pelo circovírus suíno tipo 2 em células de testículo de suíno e em leitões infectados experimentalmente – Pós-doutorado Taís Fukuta

O circovírus suíno é um vírus DNA que atinge suínos em escala global e causa imunodepressão em suínos. Seu monitoramento, compreensão de suas causas e efeitos é importantíssimo. A análise de transcriptoma neste trabalho foca no sequenciamento de RNAs envolvidos em uma via do sistema imune, buscando mRNAs com níveis de alta e baixa expressão. Essa compreensão pode auxiliar tanto no conhecimento da patogenia, como na detecção de possíveis alvos farmacêuticos e marcadores da doença, que posteriormente podem ser utilizados para métodos diagnósticos.

Para validação do transcriptoma é preciso desenhar *primers* específicos para os RNAs de interesse da via, obter produtos pela RT-qPCR (Reverse Transcriptase-Real Time PCR), purificá-los e sequenciá-los pelo método de Sanger.

- 7) Padronização de PCR em tempo real para diagnóstico e prognóstico da infecção pelo vírus da leucemia felina em gatos – Iniciação Científica Camila Percário

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus envelopado que atinge felinos em escala global. Animais infectados podem apresentar infecção em diferentes fases (abortiva, regressiva ou progressiva), essas fases podem ser diagnosticadas por testes de antígeno ou molecular. Porém, existem interpretações equivocadas dos resultados desses testes e esse trabalho visa padronizar e determinar a fase de infecção por FeLV através da qPCR e RT-qPCR, a fim de identificar a carga do DNA proviral e de RNA viral em amostras de sangue de gatos,

permitindo uma melhor e mais rápida classificação da fase de infecção que o animal se encontra e, conseqüentemente, um tratamento mais adequado.

- 8)** Detecção de *Salmonella spp.* e diferenciação dos sorovares de interesse na cadeia produtiva avícola por técnicas de amplificação isotérmicas – Mestrado Evelin Cristine

*Salmonella* está presente na cadeia produtiva avícola e é um grande desafio no que se refere à segurança alimentar e sanidade animal. Os métodos padrão-ouro para detecção de *Salmonella* estão relacionados às técnicas de microbiologia convencional e sorotipagem dos isolados. Entretanto, técnicas moleculares vêm sendo utilizadas de forma mais evidente por proporcionarem resultados rápidos e seguros em diferentes patógenos, sendo de grande importância para a avicultura e para a saúde pública de forma a limitar a exposição ao patógeno. Técnicas de biologia molecular são vantajosas por diversos aspectos, mas a reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas derivadas dependem de ciclagem térmica para aquecimento e resfriamento na replicação do material genético, necessitando de termociclador. Novas técnicas de amplificação isotérmica vêm sendo estudadas para amplificação de material genético como uma alternativa conveniente e econômica para triagem e diagnóstico de rotina. Assim, este projeto tem como objetivo desenvolver e avaliar duas técnicas de amplificação isotérmica, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) e a reação da polimerase em espiral (PSR) na identificação de *Salmonella spp.*, e dos seus sorovares Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum, e compará-las com as metodologias usualmente utilizadas de cultura microbiológica, caracterização bioquímica, sorotipagem e PCR em tempo real (qPCR). Há uma demanda em estabelecer novas metodologias de amplificação do material genético mais rápidas e eficientes no diagnóstico de *Salmonella*, pois são imprescindíveis para o desenvolvimento da produção avícola, da sanidade animal e da saúde pública, integrando a perspectiva da saúde única.

\*Texto informado pela mestranda responsável pelo projeto

- 9)** Desenvolvimento de Sistema de Detecção e Quantificação de *Salmonella spp.* por meio de Reação em Espiral da Polimerase (PSR) em carcaças de frango – Mestrado Amanda Laurindo

A *Salmonella* é um dos patógenos de origem alimentar mais importantes em escala global, portanto, é de fundamental importância seu monitoramento. A PSR é uma técnica isotérmica de amplificação do DNA, pode ser realizada sem muita estrutura laboratorial e é

promissora para testes *in situ*. O objetivo deste trabalho é padronizar um *kit* para quantificação de *salmonellas* em carcaças de frango usando essa técnica. A detecção é feita a partir da amplificação de uma região específica do genoma da *Salmonella* e a quantificação é uma estimativa feita por cálculo.

**10) Avaliação da Reação em Espiral da Polimerase (PSR) para diagnóstico da Leucemia Felina – Iniciação Científica Larissa Baldo**

O vírus da leucemia felina (FeLV) é de grande importância sanitária e acomete felinos em escala global. Por apresentar diferentes estágios de infecção, o diagnóstico é dificultado. Os diagnósticos rápidos muitas vezes são imprecisos e os diagnósticos moleculares são caros, demorados e requerem muita estrutura laboratorial. Neste estudo buscou-se avaliar a eficácia de detecção do genoma do FeLV em gatos naturalmente infectados por meio da reação em espiral da polimerase (PSR), uma técnica rápida, fácil e acessível.

### **3 ACOMPANHAMENTO DAS TÉCNICAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Alguns serviços oferecidos pelo laboratório: sorologia e viremia de circovírus em suínos, diagnósticos infecciosos para animais de pequeno porte e pescado por qPCR, diagnóstico de diversas doenças genéticas (hetero e homozigoto selvagem e mutante), sequenciamentos de primeira e segunda geração, detecção de patógenos por técnicas moleculares e outros.

#### **1) Técnicas de pipetagem - Webinar pipetas Gilson "Técnicas de Pipetagem":**

As micropipetas são usadas para transferência com precisão de pequenos volumes de líquido. O volume é dado na unidade de microlitros, a milionésima parte de 1 litro.

Existem as micropipetas de volume fixo e variável, do tipo simples, com uma única ponteira, ou do tipo multicanal, com uso de várias ponteiras simultaneamente pipetando o mesmo volume em cada uma delas.

De maneira geral, a estrutura da pipeta costuma possuir dois botões na parte superior. Um para aspiração e desprezo das amostras, que funciona em dois estágios e na maioria das vezes, ele também serve para alterar o volume aspirado, girando o botão. E outro botão mais abaixo, para a remoção da ponteira.

Na pipetagem direta, segura-se a pipeta na posição vertical e com a ponteira fora da amostra, pressiona-se suavemente o êmbolo até a posição do primeiro estágio. Coloca-se a ponteira no líquido e libera o êmbolo lentamente até chegar na posição inicial.

Para desprezar, aperta-se o botão do êmbolo suavemente até a posição do segundo estágio, para desprezar também o resíduo que fica na ponta da ponteira. Após desprezar o líquido, soltar suavemente o êmbolo, até que ele volte à posição inicial. Para desprezar segura-se a pipeta numa posição inclinada, geralmente apoiando na lateral do tubo.

Na pipetagem reversa, a pipeta é segurada na posição vertical. Com a ponteira fora da amostra o êmbolo é pressionado até chegar no segundo estágio. A ponteira é colocada no líquido e liberada lentamente até chegar no estágio inicial. Para desprezar, aperta o êmbolo até a posição do primeiro estágio. Nesse método, não se despreza o resíduo no tubo, pois o volume

residual na ponta está muito acima da margem de erro e do volume pretendido. Essa é uma ótima metodologia para líquidos viscosos e propensos a formar bolhas.

A ponteira deve ser sempre descartada após cada amostra ou reagente pipetado, utilizando o botão ejetor.

A profundidade com que a pipeta é imersa nas amostras está relacionada com a imprecisão das medidas. Caso a ponteira seja imersa profundamente em uma amostra, os resíduos dessa amostra ficam presos na parte externa da ponteira sendo somados com o volume aspirado, no momento da transferência. Ou seja, o volume despejado será maior que o volume desejado. Caso a ponteira seja imersa muito superficialmente, a quantidade aspirada será inferior à quantidade de interesse. Então, é preciso ter certeza de que a pipeta esteja imersa em uma quantidade adequada para o volume que será aspirado.

Pipetagem de um volume desconhecido: regula o volume da micropipeta para um volume conhecido que não seja o máximo e que seja maior do que o volume desconhecido. Colocar a pipeta em contato com esse líquido de volume desconhecido e girar a pipeta até capturar todo o volume desconhecido. Desconta-se o volume total atingido na micropipeta do volume inicial obtido e obtém o valor desse volume desconhecido.

As micropipetas devem ser sempre guardadas em posição vertical. O ajuste do volume deve ser feito antes de realizar o encaixe com a ponteira e com a pipeta na posição horizontal, para evitar o erro de paralaxe (=deslocamento aparente de um objeto quando se muda o ponto de observação).

Verificar a perfeita conexão da ponteira com o cone, quando acoplar, fazer uma leve pressão e giro. Ao utilizar a ponteira pela primeira vez, deve ser feita a ambientação, ou seja, aspirar e dispensar a amostra algumas vezes antes da aspiração definitiva. A ambientação é importante para minimizar a imprecisão do volume aspirado devido a capilaridade da ponteira.

É essencial a rotina de manutenção e calibração para manter as pipetas em boas condições de funcionamento. É necessário limpeza, autoclavagem e troca de peças periodicamente, orientações desses passos geralmente presentes no manual. A calibração deste instrumento consiste em acertar cuidadosamente o deslocamento do pistão para chegar ao volume exato. A informação de que as pipetas devem ser guardadas com o êmbolo em seu volume máximo não auxilia a preservá-la, mas apenas desgasta ainda mais seu material e ajuda a diminuir sua vida útil.



## 2) Extração de ácidos nucleicos

Para poder manipular o DNA é necessário extraí-lo das amostras de interesse. Basicamente, os protocolos de extração começam pela aplicação do tampão de lise, um agente caotrópico associado a detergentes e/ou proteases para proporcionar acesso ao DNA. As etapas seguintes servem para lavagem da amostra para retirada do que não é ácido nucleico e retenção dos ácidos. Os ácidos são retidos com materiais tratados com carga positiva para terem afinidade com o DNA, podendo ser sílica ou *beads* magnéticas.

## 3) PCR convencional

A PCR convencional consiste em um método de amplificação do material genético. Após esse tipo de amplificação, é possível verificar o tamanho dos produtos obtidos separando-os em gel de agarose com eletroforese. Nesse processo é possível qualificar o fragmento amplificado a partir de padrões de tamanho de fragmento já conhecidos e citados na literatura.

A PCR requer os reagentes necessários para a reação de amplificação e um termociclador, que submeterá as amostras a um ciclo de temperaturas ideais para a reação. Cada temperatura é ideal para um processo diferente da PCR: a primeira temperatura é ideal para desnaturação da fita de DNA, a segunda para o *anelamento* dos *primers* e a terceira para a extensão dos alvos.

Os reagentes necessários a PCR são: enzima DNA polimerase (geralmente a Taq), isolada de organismos termofílicos, que apresentam maior resistência à alta variação de temperatura; sal que forneça íons  $Mg^{2+}$ , cofator importante para o ótimo funcionamento da enzima polimerase; nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), que comporão os produtos da reação; os tampões, importantes para manter o pH da reação estável; molde de DNA e água *nuclease free*. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) também são colocados na reação e são eles que promovem o início da amplificação em cadeia do alvo específico desejado.

A PCR também pode ser realizada utilizando RNA como molde, nesses casos é necessária uma reação com enzima transcriptase reversa e molde de RNA para sua conversão em cDNA (DNA complementar).

A PCR convencional é muito utilizada em testes genéticos, uma vez que é possível identificar algumas mutações a partir do gel, e também realizar o sequenciamento dos seus *amplicons* para uma genotipagem mais específica.

*Amplicon*: um curto segmento de DNA gerado pelo processo da PCR ou eventos de replicação.

#### 4) Eletroforese

A eletroforese requer o gel de agarose na porcentagem adequada ao tamanho dos produtos que serão separados, a cuba de eletroforese, uma fonte de energia para proporcionar cargas opostas às duas extremidades da cuba, corante fluorescente no gel ou intercalante de DNA nas amostras, e um equipamento que emita luz UV para a visualização do gel (fotodocumentador/transluminador).

O intercalante de DNA penetra entre as bases de DNA e fluoresce quando exposto à luz UV, produzindo bandas brilhantes no gel (KASVI, 2017).

A técnica de eletroforese consiste em preparar o gel com as amostras e colocá-lo no campo elétrico com cargas opostas criadas na cuba. No tampão da cuba é colocado uma mistura numa proporção de 1:1 de água e TBE (Tampão Tris Borato EDTA), importante por conter íons que proporcionarão o campo elétrico e fazer com que as amostras migrem. Como o material genético possui carga elétrica negativa, o produto amplificado migra para o polo positivo. Conforme migra, as partículas do gel de agarose filtram o produto de acordo com o tamanho e carga elétrica das moléculas. Quanto maior o produto, menor o deslocamento do mesmo no gel. Esse processo precisa ocorrer por cerca de 15 minutos, ou quando aparentar um deslocamento relevante e que não ultrapasse a linha limite do gel.

A concentração do gel é um ponto importante da eletroforese, visto que essa concentração deve ser alterada de acordo com o tamanho das moléculas a serem separadas. Caso trate-se de amostras maiores, concentrações menores são melhores pois facilitarão a migração das mesmas pelo gel.

O reconhecimento do tamanho do produto é possível a partir do uso do “Ladder”, uma mistura de cadeias de DNA de fitas duplas de diferentes tamanhos e conhecidos que se deslocam no gel para servir como referência na determinação do tamanho do *amplicon*. Conforme o alinhamento do produto com esse padrão conhecido do *ladder*, é possível distinguir seu tamanho.

Com a eletroforese é possível certificar que houve amplificação específica e detectar patógenos em amostras, identificar algumas mutações, analisar tipos de hemoglobina circulante, realizar teste de paternidade entre outras aplicações (KASVI, 2015).

Nas análises podem ocorrer o aparecimento de bandas inespecíficas, provavelmente elas são providas de outras amplificações, que não as de interesse. Podem ser do gene ou até mesmo de outros organismos, como bactérias (usadas para produção de enzimas recombinantes, como no caso das polimerases comerciais).

Era uma prática comum usar banho de Brometo de etídeo como intercalante, a fim de melhorar a visualização das bandas. Com o tempo, viu-se que ele é extremamente tóxico e cancerígeno e atualmente ele não é mais utilizado sendo substituído por outros com o *SYBR safe* que proporcionam resultados semelhantes e são menos tóxicos.

## 5) qPCR

A PCR em tempo real é uma técnica de biologia molecular baseada em PCR onde a amplificação do DNA é concomitante com sua detecção. O termociclador é acoplado a um fluorímetro ligado a um computador que nos fornece dados indicativos da evolução da amplificação do material genético alvo. Além de índices numéricos para a amplificação, os programas de leitura da reação também fornecem dados de temperatura de *Melt*, *Cq*, gráficos em escala logarítmica e linear, dados normalizados, e outros.

Essa técnica é útil para diagnóstico de doenças infecciosas, em microbiologia para segurança alimentar, fermentação e qualidade da água, estudos sobre expressão gênica, detecção de fitopatógenos, detecção de OGMs (organismos geneticamente modificados), detecção e quantificação de patógenos virais (RNA e DNA), detecção de mutações de ponto, etc. Esse método é o padrão ouro utilizado para diagnóstico da COVID-19.

Os *primers* utilizados na qPCR precisam ser desenhados com cuidado e submetidos a processos de purificação maior que os *primers* da PCR convencional, principalmente se forem destinados a detecção de SNPs (mutações de nucleotídeo único). O *amplicon* da qPCR deve ser menor nas reações de PCR convencionais que devem ser preferencialmente de 80 a 200 pb (pares de base).

A reação é suscetível a falso positivo devido a amplificações inespecíficas e dímeros de *primers* que também emitem fluorescência. Devido a isso, é necessário o uso da Curva de *Melting* quando a reação é realizada com agentes fluorescentes intercalantes como o *SYBR green*.

**Curva de *Melting*:** a partir de um determinado momento, 50% do DNA da reação está com a fita aberta e 50% não está. Ela apresenta um padrão para cada organismo. Isso

delimita o perfil da amplificação do seu alvo, a temperatura média em que esse alvo amplifica. No gráfico,  $y$  = quantidade de DNA desnaturado e  $x$  = temperatura.

A **temperatura de *Melt*** ( $T_m$ ), é a temperatura em que metade das cópias estão em dupla fita e metade estão dissociadas.

**Curva de diluição seriada:** é feita com uma mesma amostra cada vez mais diluída. O gráfico gerado é dos ciclos da PCR pela intensidade de fluorescência emitida. Esse tipo de diluição seriada deve ser feito toda vez que se padroniza uma reação, com ou sem sonda. Essa curva é importante para analisar a eficiência proporcionada pelo par de *primers* e/ou sondas na reação. Esses dados são utilizados para obter uma reta de regressão linear para avaliar a qualidade da reação. Essa reta ajuda a analisar se o processo de quantificação está sendo eficiente, importante para uma quantificação acurada. O ideal é que o par de *primers* em diversas concentrações funcione e gere uma reta de regressão que denota que a eficiência da reação é próxima de 100%. O **coeficiente de correlação** das amostras com a curva calculada tem que ser alto, representando que as amostras estão próximas da reta de regressão calculada. A inclinação na reta é usada para calcular a eficiência da técnica. Quanto mais próximo de 100% maior a robustez dos dados obtidos na reação.

Como na reação de PCR ocorre a duplicação dos alvos a cada ciclo, quando a eficiência dos primers é 100%, ela é um exponencial de base 2,  $e=2$ . É possível obter o valor de expressão gênica relativa do grupo tratado comparado com o grupo controle, normalizado pelo gene de referência.

A linha de limiar gera o **C<sub>q</sub>** (ciclo de quantificação), ciclo no qual a fluorescência está significativamente acima do ruído de fundo. É importante determinar o limite em que a detecção passa a ser significativa visto que todos componentes do meio tem uma certa fluorescência. O ciclo do limiar é inversamente proporcional à quantidade de produto amplificado gerado na reação.

A leitura dos resultados pode ser feita pela utilização de **sondas** ou **intercalantes** de DNA. A sonda fluorescente usada na qPCR é específica e, conforme a amplificação vai ocorrendo, a atividade exonuclease 5'→3' da Taq cliva a sonda, separando o fluoróforo do *quencher*, permitindo que a fluorescência seja emitida proporcional a quantidade de *amplicon* produzida. O *quencher* é uma molécula ofuscante quando espacialmente próxima do fluoróforo, como no caso da sonda, que é um oligonucleotídeo, e deixa essas moléculas próximas de forma que o *quencher* absorva a fluorescência do fluoróforo por ressonância. Na fase de anelamento

ocorre o pareamento das bases não só dos *primers*, como também das sondas ao mesmo tempo. O equipamento termociclador em tempo real possui uma série de luzes que emitem comprimentos de onda específicos para detectar a fluorescência das cópias geradas.

Também é possível analisar o resultado da qPCR com o uso de *SYBR Green*. À medida que o produto de PCR é sintetizado, as moléculas fluorescentes de *SYBR Green* se associam ao produto de PCR de fita dupla e emite fluorescência ainda maior. O equipamento emite fluorescência por LED, que excita o fluoróforo e provoca maior emissão de fluorescência.

Esse tipo de PCR possui caráter quantitativo e pode ser feito de duas formas: quantificação relativa e absoluta.

Outros parâmetros da PCR em tempo real explicados na apostila (Real-Time PCR handbook Life Technologies):

“**Quantificação absoluta:** a quantificação absoluta descreve um experimento de PCR em tempo real no qual amostras de quantidade conhecida são diluídas em série e, em seguida, amplificadas para gerar uma curva padrão. Amostras desconhecidas são então quantificadas por comparação com esta curva.”

“**Quantificação relativa:** a quantificação relativa descreve um experimento de PCR em tempo real no qual a expressão de um gene de interesse em uma amostra (ou seja, tratada) é comparada à expressão do mesmo gene em outra amostra (ou seja, não tratada). Os resultados são expressos como variação (aumento ou diminuição) na expressão da amostra tratada em relação à amostra não tratada. Um gene normalizador (como  $\beta$ -actina) é usado como um controle para a variabilidade experimental neste tipo de quantificação.”

“A **curva de melting (dissociação)** traça a mudança na fluorescência observada quando o DNA de fita dupla (dsDNA) com moléculas de corante incorporadas se dissocia ("derrete") em DNA de fita simples (ssDNA) conforme a temperatura da reação é elevada... A caracterização dos produtos de reação (por exemplo, dímeros de primer vs. amplicons) através da análise da curva de fusão reduz a necessidade de eletroforese em gel demorada... A curva padrão fornece informações importantes sobre a eficiência de amplificação, consistência de replicação e limite de detecção teórico da reação.”

“O **baseline** pode ser equiparado ao ruído de fundo e deve ser definido para cada reação empiricamente. A linha de base se refere aos níveis de fluorescência detectados durante os ciclos iniciais da PCR e é importante para a determinação precisa do Ct.”

“O **threshold** é o limiar da reação de PCR em tempo real, o nível do sinal que reflete um aumento estatisticamente significativo sobre o sinal de linha de base calculado.”

“A **curva padrão** é importante para determinar a quantidade inicial do alvo ou para avaliar a eficiência da reação.”

“O **coeficiente de correlação** é uma medida de quão bem os dados se ajustam à curva padrão. O valor R2 reflete a linearidade da curva padrão. Idealmente,  $R2 = 1$ , embora 0,999 seja geralmente o valor máximo.”

“**Fase exponencial:** é importante quantificar sua reação de PCR em tempo real na parte inicial da fase exponencial, ao contrário dos ciclos posteriores ou quando a reação atinge o platô. No início da fase exponencial, todos os reagentes ainda estão em excesso, a DNA polimerase ainda é altamente eficiente e o produto de

amplificação, que está presente em uma quantidade baixa, não competirá com as capacidades de reconhecimento dos iniciadores. Todos esses fatores contribuem para dados mais precisos.”

“**Declive:** a inclinação da fase log-linear da reação de amplificação é uma medida da eficiência da reação. Para obter resultados precisos e reproduzíveis, as reações devem ter uma eficiência o mais próximo possível de 100%, equivalente a uma inclinação de -3,32.”

## 6) PCR digital

A Bio-Rad é uma empresa que trabalha com reagentes e equipamentos para execução de técnicas de Biologia Molecular. Em seu site, é disponível a definição, funcionamento, benefícios e aplicações da técnica de PCR digital:

“A PCR digital é uma tecnologia inovadora que fornece quantificação ultrasensível e absoluta de ácidos nucleicos. É particularmente útil para alvos de baixa abundância, alvos em fundos complexos, variantes alélicas (SNPs) e para monitorar mudanças sutis nos níveis alvo que não podem ser detectados com PCR em tempo real.”

“Com base na tecnologia de gotículas de emulsão de água, o Droplet Digital PCR fraciona uma amostra de DNA em 20.000 gotículas. A amplificação por PCR do modelo ocorre subsequentemente em cada gota individual e a contagem das gotas positivas fornece uma quantificação precisa e absoluta do alvo.”

“Quantificação absoluta - fornece uma contagem absoluta de cópias de DNA alvo por amostra de entrada, sem a necessidade de curvas padrão; Maior precisão e sensibilidade - a concentração de modelo enriquecida em gotículas de alvo positivo permite maior precisão e sensibilidade do que PCR em tempo real; Remoção do viés de eficiência de PCR - as taxas de erro são reduzidas removendo a confiança na eficiência de amplificação de qPCR.”

## 7) Nested PCR

É uma variação da técnica de PCR que realiza a reação em cadeia da polimerase a partir do produto de uma PCR anterior, com um par de primers internos ao par utilizado primeiramente. Essa técnica é importante para casos em que as amostras não apresentam boa sensibilidade e especificidade, aumentando-as.

## 8) Purificação de DNA/RNA

A purificação serve para separar o material genético do gel de agarose ou quaisquer outros reagentes que possam estar misturados a ele. Há vários meios de fazer isso, um deles é usando um tampão para degradar o gel e assim poder lavá-lo. Usa-se 100 µL do tampão para 100 mg de gel, numa proporção de 1:1.

Após a degradação do gel o produto da PCR é misturado à solução contendo as beads, o DNA demora cerca de 5 minutos para se ligar a elas. É utilizado um ímã para atrair essas beads, assim, elas são deslocadas para a lateral do microtubo levando o DNA junto (cerca

de 2 minutos). Dessa forma, o DNA fica separado dos materiais utilizados na PCR e é possível lava-lo para posteriormente pipetá-los.

Lava-se o ímã com álcool 70%, pois ele não interfere no DNA e serve para tirar resquícios dos reagentes usados na lavagem anterior. Ele é acrescentado ao microtubo e retirado com pipeta após 30 segundos, é necessário esperar cerca de 10 minutos para o álcool residual evaporar. O passo seguinte consiste em acrescentar ao microtubo um solvente para separar o DNA das *beads*.

É importante não deixar as *beads* secarem totalmente, observar o ponto onde ela começa a ficar com uma coloração opaca e antes que ela “craquele”, acrescentar a água *nuclease free* ao tubo.

Após, é feita a lavagem com o tampão de eluição, que tem alta afinidade com o DNA e faz com que ele se solte das *beads*, deixando o DNA “livre” no líquido, a água *nuclease free* é uma ótima opção. A água possui alta afinidade com o DNA e, portanto, ele se desliga da *bead* e passa a se ligar com o DNA. Essa lavagem é feita ressuspensando e voltando, jogando o líquido em cima da *bead*. Ele precisa ser deixado por 5 minutos, tempo suficiente para desligamento do DNA com a *bead*. Após, coloca-se o microtubo novamente no suporte do ímã e deixa por um tempo, até ver que o líquido não apresenta mais a coloração amarronzada e seja possível observar aparente separação. Quando chegar a esse ponto, o DNA está ligado a água e não mais às *beads*, então, essa água precisa ser pipetada e colocada em outro microtubo, a purificação está finalizada.

Após a purificação analisa-se a concentração de DNA, ácidos nucleicos obtida no espectrofotômetro com índice de absorbância a 260nm. Ele nos fornece apenas uma estimativa aproximada, não é preciso e, portanto, é útil em alguns tipos de análise apenas.

A força centrífuga também pode separar o DNA da água, decantando esse DNA. A purificação é necessária antes do sequenciamento e auxilia a separar a região de interesse de bandas inespecíficas, por exemplo.

## 9) Sequenciamento Sanger (Universidade do DNA)

O sequenciamento Sanger permite descobrir a sequência exata de um fragmento de DNA de interesse. Entre suas aplicações: análises de mutações e polimorfismos, genotipagem de vírus, análise de DNA mitocondrial, confirmação de construções em plasmídeos e outros.

Ele é feito em três etapas: reação de Sanger, eletroforese capilar para separação dos fragmentos gerados na reação de Sanger e análise da sequência obtida.

Uma etapa anterior ao sequenciamento, é o isolamento e amplificação da região de interesse por PCR.

Reação de Sanger: composto por DNA molde, produto de PCR ou plasmídeo purificado, apenas 1 *primer*, DNA polimerase, cofator  $Mg^{2+}$ , dNTPs e ddNTPs.

ddNTPs: didesoxinucleotídeos, não possuem O no carbono 2' nem no carbono 3'. Após esses nucleotídeos serem incorporados na cadeia, eles impedem a incorporação de outros, já que não terá uma hidroxila no carbono 3'. Esses ddNTPs vem ligados a moléculas fluorescentes, a adenina vem ligada a uma molécula de fluoróforo que emite luz verde, a timina a um fluoróforo que emite luz vermelho, a citosina azul e a guanina amarelo.

#### 1ª etapa – Reação de Sanger no termociclador

O número de diferentes cópias possíveis ao final da reação é a combinação do número de ciclos realizados na PCR.

#### 2ª etapa – Eletroforese capilar para separação dos fragmentos de Sanger

É uma metodologia que acontece dentro do sequenciador automático de DNA. Em uma parte do equipamento há um feixe de luz contínuo, um laser. Como os nucleotídeos ddNTPs estão ligados a moléculas fluorescentes, que são capazes de receber energia, excitar seus elétrons e devolver a energia na forma de luz, o equipamento consegue fazer a leitura de cada nucleotídeo ddNTPs e realizar o sequenciamento.

É difícil sequenciar um fragmento de mais de 700pb, devido às limitações da eletroforese capilar.

#### 3ª etapa - Análise da sequência obtida

É necessário *software* para essa análise. Há vários. Mais de uma curva presente no programa de leitura pode indicar a identificação de mutações e polimorfismos.

### **10) Sequenciamento de nova geração (NGS) – Universo da Biologia Molecular**

As metodologias de sequenciamento NGS permitem que o sequenciamento seja feito em larga escala e mais rapidamente. Ele é capaz de sequenciar até 60 bilhões de bases nitrogenadas em uma única corrida.



Duas empresas dominam esse mercado, a ThermoFisher e a Illumina. Em ambas o fluxo de trabalho segue quatro passos: construção de uma biblioteca de fragmentos com adaptadores e marcadores, amplificação através de uma PCR modificada, sequenciamento e análise de dados.

A construção de bibliotecas tem 3 objetivos principais: gerar fragmentos de tamanho adequado, adicionar adaptadores às extremidades de cada fragmento e adicionar marcadores de amostra (*index* ou *barcode*). Os fragmentos de tamanho adequado são importantes para compatibilidade com a tecnologia e podem ser gerados por digestão enzimática, quebra mecânica ou PCR.

A digestão enzimática é feita com uso de enzimas e a quebra mecânica pode ser feita por vibração em uma frequência rápida que provoca a quebra. O tamanho gerado pode ser escolhido de acordo com o tempo em que a amostra é submetida a um dos processos. A PCR *multiplex* é usada para gerar os diversos fragmentos, até milhares de alvos podem ser utilizados.

A adição de adaptadores às extremidades de cada fragmento é importante para o reconhecimento de cada fragmento. Essa adição é feita por reação enzimática, como a DNA ligase. Os marcadores de amostra são importantes para poder manipular diversas amostras juntas no sequenciamento, até 384 amostras podem ser manipuladas em conjunto com uso desses marcadores.

A amplificação difere um pouco entre os protocolos da Illumina e a ThermoFisher. A partir do protocolo da Illumina a amplificação gera diversas cópias de fragmentos que emitem fluorescência. As cópias são geradas por uma espécie de PCR, mas que mantém todos os fragmentos juntos. A amplificação da Illumina é feita em uma superfície com diversos oligonucleotídeos associados a ela. Esse oligos são *primers* complementares aos adaptadores, acrescentando-se outros reagentes necessários a reação em cadeia da polimerase, a extensão é realizada. Ao final do processo as cópias *cluster* geradas ficam presas a essa superfície.

Para iniciar o sequenciamento é necessário eliminar as fitas amplificadas no sentido 3'-5'. No sequenciamento é feito outro processo de extensão, mas dessa vez utilizando nucleotídeos marcados com fluoróforos, assim como os usados no sequenciamento de Sanger. O bloqueio e a fluorescência desses nucleotídeos são eliminados após os mesmos serem incorporados na fita cópia, mas anteriormente tem sua fluorescência captada e registrada pelo equipamento.

No caso do protocolo feito pela ThermoFisher para a amplificação é utilizada a PCR em emulsão feita dentro de uma micela (bolhas com reagentes de PCR). O produto das bibliotecas geradas deve ser inserido nessas micelas, o ideal é que cada micela contenha apenas um fragmento em seu interior. Além dos reagentes necessários para a PCR, no interior da micela está presente um *bead* com primers presos a ela, as cópias geradas ficam presas a essa esfera. Essas *beads* são transferidas para um chip com milhões de pocinhos, cada pocinho é capaz de receber apenas uma esfera.

A reação de sequenciamento ocorre em cada pocinho individualmente. Ela ocorre de forma semelhante a PCR, porém com apenas um tipo de nucleotídeo disponibilizado por vez. O equipamento é responsável por disponibilizar e retirar esses nucleotídeos do chip. Quando um nucleotídeo complementar é disponibilizado e incorporado, ocorre a liberação de pirofosfato e íons hidrogênio. Esses íons livres alteram o pH do meio e essa alteração é detectada pelos pocinhos do chip e registradas pelo computador, com isso, a sequência de bases é lida e registrada.

No processo de análise de dados é preciso eliminar os adaptadores das extremidades e os fragmentos gerados devem ter uma certa sobreposição para que a continuidade seja estabelecida. As análises são feitas por ferramentas de bioinformática, principalmente softwares de alinhamento.

O sequenciamento de nova geração está ficando cada vez mais acessível devido aos avanços e pesquisas na área de Biologia Molecular, com ele é possível realizar genotipagem, identificação humana, metagenoma, detecção de mutações, análise de expressão gênica, detecção de aneuploidias, sequenciamento *de novo* (sequenciamento sem referências) e de exomas.

## 11) ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é um teste imunoenzimático para detectar a presença de anticorpos ou antígenos em uma determinada amostra. Ele pode ser feito de diversas formas: direto, indireto ou por competição. Todos os passos baseiam-se em reações antígeno-anticorpo, que são detectáveis por meio de reações enzimáticas, as placas são submetidas a sensibilizações e lavagens.

A lavadora de placas do Elisa é uma máquina de lavagem que coloca e retira líquidos na placa. É preciso lavar a máquina antes e após usá-la, importante para evitar o

entupimento dos canalículos e a contaminação de futuras amostras. Para isso, programa-se a máquina no programa 6 e lava duas vezes com água Milli-Q. Há a placa específica de limpeza.

Após as sensibilizações e lavagens de placa, a mesma é lida no leitor de Elisa, que basicamente é um espectrofotômetro que lê absorbância em cada um dos 96 poços da microplaca. A leitura é feita rapidamente e o leitor precisa ser desligado logo em seguida para preservar sua lâmpada. Após a leitura, a placa é devidamente descartada junto com a mistura lida e os utensílios são deixados para autoclavar.

Na placa, são acrescentadas amostras com DO (Densidade Óptica) maior e com o DO menor, funcionam como uma espécie de controle positivo e negativo, respectivamente. As amostras precisam ser diluídas em 1:200, para isso faz-se uma diluição seriada (1:10 + 1:20 = 1:200). Essa concentração é necessária para melhorar os dados obtidos. Em altas concentrações, o resultado do ELISA seria impreciso, poderia dar muito alto.

A peroxidase é uma enzima comumente usada, ela catalisa a reação de oxirredução da água oxigenada em água e oxigênio. Esse oxigênio gerado é capaz de oxidar um cromógeno e disponibilizar um índice de densidade ótica, diretamente proporcional à concentração do antígeno ou anticorpo investigado. O cromógeno é uma substância com cor que na presença do oxigênio se oxida e muda de cor. No laboratório é muito utilizado o ELISA indireto para detecção de circovírus suíno.

## 12) Diagnóstico de COVID-19

O padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19 é feito por PCR em tempo real. O diagnóstico realizado no laboratório consiste em preparar as amostras para amplificar uma região do gene E, que codifica a proteína do envelope do Sars-Cov-2. Em casos de resultados inconclusivos, faz-se uma tentativa de amplificação dos genes N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> do capsídeo do vírus, é necessário dar positivo para os dois genes para o resultado ser considerado positivo. Caso apenas um gene apresenta amplificação da amostra, pode ser que a mesma seja referente a outros tipos de coronavírus.

Na placa de reação é necessário o controle da extração, o controle endógeno e os controles positivo e negativo. O controle de extração passa por todos processos da extração de ácidos nucleicos mas não é acrescentado amostra a ele, apenas água, ele deve ser negativo para constatar que não houve contaminação na extração. O controle endógeno é o gene humano que codifica a RNAase P, ele garante que a extração foi feita com sucesso caso todas as amostras

amplifiquem para esse gene. O controle negativo é necessário para garantir que as amostras foram bem manipuladas, que não houve contaminação durante o processo. O controle positivo é necessário para ter uma curva de base para comparação.

Como há alta demanda desses testes devido a pandemia, alguns robôs são utilizados no processo. Para extração, é preparada uma placa de extração em que cada coluna contém um reagente necessário para a extração com *beads* magnéticas. O robô faz a passagem das amostras por cada pocinho, deixando as amostras extraídas em colunas específicas.

Antes de passar as amostras para a placa de extração, é necessário retirar uma alíquota delas, que fica armazenada em  $-80^{\circ}\text{C}$  por até 2 anos e pode ser utilizada para pesquisas ou para repetição do diagnóstico. Após extraídas no robô, as amostras são passadas para a placa de armazenamento para poderem ser submetidas à reação de amplificação. Para a qPCR, coloca-se os reagentes necessários direto nessa placa.

A qPCR detecta a fluorescência que a amplificação emite e a mensura, os dados são fornecidos por gráficos. A interpretação dos resultados do exame é feita pela análise dos gráficos e Ct. Quando o resultado é positivo, o gráfico fornecido apresenta uma curva de crescimento exponencial que deve começar a aumentar até o Ct 45. Quando essa curva aumenta até atingir o platô, o resultado é positivo, realmente houve amplificação na amostra e, portanto, o gene em questão está presente nela, e obviamente, o ácido nucleico viral em questão também. Os resultados negativos apresentam curva que não se eleva muito e curvas mal formadas são consideradas resultados inconclusivos.

Algumas curvas obtidas apresentam comportamento fora do padrão esperado ou observado. Nesses casos, algumas amostras são analisadas novamente para um diagnóstico mais preciso. Após analisados, os resultados são lançados no sistema GAL, o sistema de saúde do SUS.

### 13) Diagnóstico Genético

O teste genético é usado para diagnóstico de diversas doenças, consiste em amplificar uma região de um gene conhecidamente envolvido na doença, sequenciar o produto amplificado da amostra e analisar suas bases nitrogenadas. Conforme descrito na literatura, podemos saber se um indivíduo é homocigoto ou heterocigoto, selvagem ou afetado. A sexagem é uma forma de descobrir o sexo de alguns organismos, como aves, a partir de exames

moleculares de DNA. Foi realizado um teste de *primers* para diagnóstico de algumas doenças, HNPK, LP e LAD e o protocolo testado pode ser visto no anexo 2.

O diagnóstico genético também pode ser utilizado para detecção de alguns patógenos, como citado anteriormente para o caso do Sars-Cov-2. Citomegalovírus é um vírus altamente letal para as tilápias. Esse é um dos poucos laboratórios que fazem esse tipo de diagnóstico. O gene é detectado por PCR, se houver amplificação do gene, a presença do vírus é constatada.

#### 14) Clonagem

A clonagem é o processo de obtenção de réplicas idênticas de um fragmento de interesse, assim como na PCR. A principal diferença é que a clonagem é feita *in vivo* e a reação em cadeia da polimerase *in vitro*. Por ser feita *in vivo*, a clonagem pode ser utilizada para obtenção de proteínas e enzimas de interesse, diferente da PCR, que fornece apenas cópias de ácidos nucleicos.

O primeiro passo é buscar as características básicas do gene e proteína de interesse. É necessário saber algumas características da proteína, sua toxicidade, se ela sofre modificações pós traducionais, a aplicação final da proteína, o RNA codificador, se há variação na *usage* de códons, se a proteína apresenta dobramento ou muitas modificações pós traducionais (fosforilação, glicosilação, etc), entre outras.

Há modificações pós traducionais que não são feitas em células procariotas, por isso é importante saber essas características da proteína de interesse. Esses e outros parâmetros são necessários para definir também o vetor de expressão. A expressão de proteínas recombinantes pode ser feita em sistemas heterólogos tanto em organismos de origem eucariota, como procariota, plantas transgênicas também podem ser utilizadas como biorreatores para produzir proteínas de interesse.

Normalmente é mais utilizado células procariotas devido a sua menor complexidade e maior facilidade de manipulação e outras vantagens, como o rápido processo de reprodução ~30min, fácil manipulação, baixo custo e facilidade de purificação das proteínas pós-expressão com obtenção de 90~99% de pureza sem necessidade de reagentes e equipamentos complexos e caros.

Então, basicamente, o processo de clonagem consiste em inserir um gene de interesse a partir do uso de enzimas de restrição em um plasmídeo (DNA circular bacteriano) e

inserir-lo em um organismo adequado. É inserido também alguns elementos que possam fazer com que o DNA inserido no vetor possa ser expresso de maneira adequada para obtenção da proteína: uma sequência promotora para viabilizar a transcrição e outros elementos como um operador, *tags* que possibilitam o processo de purificação, sinais que permitam o processo de tradução do RNA como por exemplo a presença de um códon de início da tradução do RNA como um códon de início da tradução, sítio múltiplo de clonagem, *tag* C-terminal em alguns casos e um terminador de transcrição. É mantida a origem de replicação.

Além do fragmento de interesse, é importante o acréscimo de um gene marcador para proporcionar meios para selecionar as células transformadas. Geralmente usa-se um gene marcador que confere resistência a antibióticos, no caso de uso de vetor bacteriano. Apenas as células transformadas sobrevivem ao meio de cultura com o antibiótico usado, o que proporciona a seleção das mesmas.

O promotor e o operador precisam ter características adequadas. Há promotores fortes: alta afinidade pela RNA polimerase, sequências downstream são altamente transcritas, e promotores regulados: controle efetivo do tempo/extensão da transcrição.

A introdução do vetor recombinante requer a desestabilização da membrana do organismo utilizado. Para isso pode ser utilizada a técnica de eletroporação, em que uma carga elétrica é aplicada às células bacterianas, causando instabilidade na membrana e possibilitando a entrada dos vetores recombinantes, ou também pode ser utilizada a técnica de choque térmico, que também desestabiliza as membranas.

A realização dessa técnica requer meios extremamente controlados para evitar contaminações, alguns passos são realizados em salas específicas, outros em fluxo laminar próximo a chama do bico de Bunsen. A área estéril próxima a chama é de aproximadamente uma bola de futebol (aproximadamente 20 cm).

## 15) Cálculos mais utilizados

Entre os cálculos mais utilizados no laboratório de Biologia Molecular, vale destacar a fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , onde  $C_1$  e  $C_2$  correspondem às concentrações inicial e final, respectivamente; e  $V_1$  e  $V_2$  aos volumes inicial e final, respectivamente. A manipulação de reagentes precisa ser feita em volumes e concentrações precisas para que as propriedades dos componentes da solução sejam devidamente mantidas. Essa fórmula possibilita o cálculo para diluição e preparo de soluções.

Os erros e as imprecisões experimentais são inerentes ao ser humano e a matéria que constitui os instrumentos. Frente a isso, testes estatísticos são cálculos úteis para análise de controle e confiabilidade dos resultados obtidos experimentalmente. Dentre diversos parâmetros, vale destacar:

- Acurácia é a probabilidade de o teste fornecer resultados corretos, ou seja, ser positivo nos positivos e negativo nos negativos.
- A sensibilidade é a probabilidade de resultados verdadeiro positivo.
- A especificidade é a probabilidade de resultados verdadeiro negativo.
- A média aritmética é uma medida de tendência central. É o centro de equilíbrio do conjunto de dados (VIEIRA, 2015).
- A mediana divide a amostra em duas partes: uma com números menores ou iguais à mediana e outra com números maiores ou iguais à mediana.
- O desvio padrão é uma medida de variabilidade muito recomendada, porque mede bem a dispersão dos dados e permite, por conta disso, interpretação de interesse.
- O estudo da regressão aplica-se a situações em que se supõe uma relação de causa-efeito entre duas variáveis quantitativas (y dependente e x independente).
- O  $R^2$  nos fornece dados sobre a especificidade e confiabilidade sobre os dados levantados, é uma medida do poder explicativo do modelo. A partir de 0,89 já pode ser levado em consideração, mas o ideal é a partir de 0,95.

“Coeficiente de variação é a razão entre o desvio padrão e a média, ele mede a dispersão dos dados em relação à média. É importante notar que o coeficiente de variação pode ser expresso em porcentagem porque é adimensional, ou seja, não tem unidade de medida. Isso acontece porque média e desvio padrão são medidos na mesma unidade – que, então, se cancelam. Por ser adimensional, o coeficiente de variação é útil para comparar a dispersão relativa de variáveis medidas em diferentes unidades” (VIEIRA, 2015).

## 16) Bioinformática no laboratório de Diagnóstico Molecular

O alinhamento de sequências é parte fundamental nos trabalhos de sequenciamento e também no desenho de *primers*. Programas de bioinformática são importantes para facilitar a comparação de sequências. Há programas que realizam o alinhamento de sequências específicas e há o BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide), que é um algoritmo que

busca comparar as sequências fornecidas com todo o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

*Softwares* de desenho de *primers* são importantes para facilitar o desenho dos mesmos, eles podem fornecer dados robustos sobre os *primers* desenhados, como Energia Livre de Gibbs presentes das extremidade 3' e 5' dos *primers*, Energia Livre para a formação de dímeros e *hairpins* entre os *primers*, porcentagem de GC, temperatura de *Melt* e outras.

Os *softwares* de leitura da PCR em tempo real acompanham os equipamentos e são criados pelas próprias marcas fabricantes. Alguns apresentam o *design* e uso mais amigável. Eles são importantes para fornecer os dados gerados em cada reação.

O *PRIMER BLAST* é um programa que lê sequências de nucleotídeos de *primers* e dá algumas características dessas sequências, como tamanho (em pares de base), temperatura de *Melt*, porcentagem de CG e outros.

#### 17) Diluição de primers

O Canal do Youtube Universidade do DNA tem um vídeo (FRANCISCHINI, 2021) em que explica todo o passo a passo para a diluição de *primers*. Dentre vários passos e detalhes práticos que comenta, o resumo a seguir contém pontos chave do vídeo:

No geral, os *primers* chegam do fabricante no estado sólido, liofilizados. O primeiro passo para diluição dos *primers* é submeter os tubos a um *spin down*, para que todo o conteúdo do microtubo seja levado para o fundo. Feito isso, passa-se para o preparo da solução mãe e solução de uso.

A solução de uso é importante para evitar a contaminação de todo o conteúdo de *primer*. Também é importante para que a solução mãe seja menos manipulada e, portanto, preservada de vários descongelamentos, o que pode comprometer sua qualidade.

Normalmente a solução mãe é preparada na concentração de 100µM. Para isso, leva-se em consideração a quantidade de *primer* em nmol contida no microtubo. Para preparar a solução nessa concentração, basta acrescentar o volume de solução TE 1x na quantidade 10x maior à concentração do *primer* indicada no rótulo do microtubo, revolver calma e cuidadosamente a solução por diversas vezes, fazer outro *spin down* e deixar o microtubo incubando por 15 minutos à temperatura ambiente. Todos os passos devem ser feitos em fluxo laminar, utilizando ponteiras com filtro.



Para preparar a solução de uso, precisa ser calculada a proporção de acordo com a concentração que se deseja preparar. Por exemplo, para preparar uma solução de uso a 10 $\mu$ M, é necessário realizar a diluição de 1:10 da solução mãe a 100 $\mu$ M. Então, para preparar 100 $\mu$ L de uma solução a 10 $\mu$ M partindo de uma solução à 100 $\mu$ M, coloca-se 10 $\mu$ L da solução mãe em 90 $\mu$ L de água *nuclease free*.

### 18) Termobloco

O termobloco é um equipamento capaz de atingir temperaturas extremas em seu suporte e mantê-las por horas, além disso, também é capaz de realizar programa de rotação no suporte.

### 19) Termociclador

O termociclador é capaz de ser programado para atingir diferentes temperaturas por diferentes tempos determinados. Além da temperatura do suporte, também é possível regular a temperatura da tampa do equipamento.

Anterior a criação do termociclador, as reações eram feitas em banho maria com necessidade de manipulação manual para submissão das amostras a diferentes temperaturas por diferentes períodos de tempo. Portanto, a criação desse equipamento foi revolucionária para facilitar o uso de técnicas de Biologia Molecular.

### 20) Centrífugas

As centrífugas podem ser utilizadas para separação de sólidos e líquidos ou *spin down* de amostras e reagentes. O *spin down* faz com que toda substância contida no microtubo seja levada para seu fundo, técnica importante para evitar contaminações. É importante sempre colocar a placa ou os tubos balanceados na centrífuga, ela pode ser balanceada com água ou papel, qualquer material que faça o contrapeso e não contamine o equipamento. Caso não esteja balanceado, a centrífuga pode descalibrar e até quebrar.

### 21) Fluxo laminar

“As Cabines de Fluxo laminar, também conhecida como Cabines de Fluxo Unidirecional, foram desenvolvidas com o objetivo de proporcionar um ambiente limpo que permita a manipulação de forma segura de materiais biológicos ou estéreis, que não podem sofrer qualquer tipo de contaminação oriunda do meio externo ou ainda de contaminações cruzadas” (LUTECH, 2021).

### 22) Fotodocumentador

Fotodocumentador/transluminador é um equipamento usado para fotografar o gel de eletroforese, suas fotos podem ser salvas na própria máquina ou em pendrive.

No caso da documentação por fluorescência, é necessário o uso do corante/intercalante de DNA com fluoróforos no gel. O gel é submetido a uma luz ultravioleta para essa documentação.

### 23) NanoDrop (espectrofotômetro)

NanoDrop (espectrofotômetro) é utilizado para mensurar a concentração de ácidos nucleicos e a pureza de amostras de ácidos nucleicos. Basta pipetar uma pequena quantidade da amostra, uma gota de 1µL, e colocá-la no equipamento. De uma amostra para outra é necessário limpar o equipamento apenas com papel macio.

Como todo espectrofotômetro, inicialmente é necessário calibrá-lo com uma substância translúcida. É utilizado água *nuclease free*, que serve tanto para calibrar como para limpar o equipamento.

O espectrofotômetro funciona com uma lâmpada que emite luz ultravioleta (fora da faixa do visível) e uma lâmpada que emite luz visível de todas as cores. Quando a luz atravessa uma solução, dependendo do tipo de substância, ela pode absorver uma parte da luz. O aparelho mede a absorvância em cada comprimento de onda com índice de 260nm.

### 24) Fluorímetro

O fluorímetro realiza quantificação por fluorescência, uma substância com fluorescência que se liga ao DNA pode ser utilizada para quantificar mais precisamente a concentração de DNA. O que nos fornece essa quantificação é a intensidade e distribuição de comprimentos de onda do espectro de emissão após excitação luminosa. Útil no processo de PCR em tempo real.

### 25) Autoclave

Autoclave é um equipamento que realiza descontaminação em alta pressão e temperatura, através de vapor de água. É o método de esterilização mais eficaz para destruir agentes patogênicos.

### 26) Tipos de água purificadas

Numa escala de menor purificação para maior: Destilada, deionizada, *nuclease free*. Todas passam por processos de filtração, alguns processos são mais refinados e tem maior potencial de filtração. Ao último tipo, acrescenta-se uma toxina (DEPC) que acaba com todas as enzimas da água já deionizada, esse tipo de água pode ser obtida ou preparada.

## 27) Comunicação virtual

Grande parte das marcas de reagentes e equipamentos utilizados no laboratório de Biologia Molecular são importados. Portanto, a maioria das compras e solicitações de revisão, orçamento, bem como tiragem de dúvidas são feitas de forma *online* por sites, e-mails e ligações. É imprescindível o domínio mínimo do inglês e conhecimento sobre a confiabilidade de endereços de sites.

Além do contato com essas marcas e seus representantes, muitos serviços podem ser oferecidos para todo o país. Com a Pandemia causada pelo Sars-Cov-2 esse tipo de serviço ganhou uma dimensão ainda maior e é uma possibilidade de mercado a ser explorado nessa área.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular obrigatório é um componente importantíssimo para a formação profissional do Biólogo. Com o estágio, o profissional em formação tem contato com a aplicação prática dos conhecimentos obtidos durante a formação acadêmica.

Trabalhar com técnicas de Biologia Molecular exige a capacidade de abstração para imaginar o que está ocorrendo na reação a nível molecular, essa capacidade é importante para entender erros, mudar detalhes, tomar decisões, etc. A experiência prática é indispensável para aprimorar essa capacidade.

A dialética trata da “coisa em si”, mas para chegar à compreensão da “coisa em si” é preciso distinguir especialmente duas qualidades da práxis humana, a união de teoria e prática. Com esse período de estágio foi possível aproximar a compreensão da “coisa em si”, a partir da vivência prática no laboratório articulada a conhecimentos teóricos.

“O mundo da pseudoconcreticidade é um claro-escuro de verdade e engano. O seu elemento próprio é o duplo sentido. O fenômeno indica a essência e, ao mesmo tempo, a esconde. A essência se manifesta no fenômeno, mas só de modo inadequado, parcial ou apenas sob certos ângulos e aspectos” (KOSIK, 1926).

Portanto, o período de desenvolvimento do estágio curricular obrigatório foi importantíssimo para concluir minha formação profissional. Além de proporcionar meios para a superação do mundo da pseudoconcreticidade na área profissional de enfoque, tive a oportunidade de conhecer uma linha de pesquisa que me despertou muito interesse. Com esse estágio, conheci a possibilidade de trabalhar na pesquisa desenvolvendo projetos que visem aumentar a acessibilidade a diagnósticos moleculares, uma forma útil e direta de devolver para a sociedade o que tive a oportunidade de obter em uma Universidade Pública, gratuita e de qualidade.

## REFERÊNCIAS

ANTONINI, S. R.; C. MENEGHIN S. P.; URASHIMA A. S. **Técnicas básicas de Biologia Molecular**. Araras/SP: Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular. UFSCar 2004. Disponível em: [http://www.lamam.ufscar.br/files/2010/07/apostilacurso\\_molecular.pdf](http://www.lamam.ufscar.br/files/2010/07/apostilacurso_molecular.pdf). Acesso em: 18 nov. 2020.

BANNOEHR J.; BALMER P.; STOFFEL M.H.; JAGANNATHAN V.; GASCHEN V.; KUHNI K. et al. **Abnormal keratinocyte differentiation in the nasal planum of Labrador Retrievers with hereditary nasal parakeratosis (HNPK)**. Itália: Vincenzo Miragliotta, Universidade de Pisa 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225901>. Acesso em: 24 jan. 2021.

BAUER A.; JAGANNATHAN V.; HOGLER S.; RICHTER B.; MCEWAN N.A.; THOMAS A., et al. **MKLN1 splicing defect in dogs with lethal acrodermatitis**. Friburgo/Alemanha: Judith Fischer, Centro Médico Universitário 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007264>. Acesso em: 1 dez. 2020.

BIO-RAD. **Digital PCR**. Brazil: Bio-Rad Laboratories, Inc. [2022]. Disponível em: [https://www.bio-rad.com/pt-br/life-science/digital-pcr?ID=M9HE2R15&WT\\_knsh\\_id=kenshoo\\_clickid &WT\\_mc\\_id=170125000772&WT\\_srch=1](https://www.bio-rad.com/pt-br/life-science/digital-pcr?ID=M9HE2R15&WT_knsh_id=kenshoo_clickid &WT_mc_id=170125000772&WT_srch=1). Acesso em: 5 jan. 2022.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR handbook**. Publicação CO010759 0914. [S. l.]: Thermo Fisher Scientific Inc, 2014. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>. 2014. Acesso em: 2 jan. 2021.

CASTAN, E. **Aprenda os fundamentos do sequenciamento de nova geração**, 2020. 1 vídeo (49:21 min). Publicado pelo canal Universo da Biologia Molecular. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=uKCCIAhLFrU>. Acesso em: 16 out. 2021.

CONCUR. Conselho de Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências. **Projeto Político Pedagógico do Curso de Ciências Biológicas (Ingressantes entre 2015 a 2018)**. Botucatu/SP: Unesp, 2015. Disponível em: [https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/graduacao/cienciasbiologicas/ppp\\_ciencias\\_biologicas\\_atualizado\\_aacc.pdf](https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/graduacao/cienciasbiologicas/ppp_ciencias_biologicas_atualizado_aacc.pdf). Acesso em 9 Ago 2021 .

CONCUR Conselho de Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências. **Regulamento do estágio curricular obrigatório do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP (nos**

**termos da Resolução UNESP 35/2004**), (s/d). Botucatu/SP: Unesp, Disponível em: [https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/graduacao/cienciasbiologicas/reg\\_estagio\\_obrig\\_bach\\_arelado.pdf](https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/graduacao/cienciasbiologicas/reg_estagio_obrig_bach_arelado.pdf). Acesso em: 9 ago. 2021.

FRANCISCHINI, C. **Tudo o que você precisa para entender o sequenciamento Sanger!**, 2021. 1 vídeo (1:12:46). Publicado pelo canal Universidade do DNA. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=DxkY4kNfBJM>. Acesso em: 23 jun:2021.

FRANCISCHINI, C. **Tudo que você precisa para fazer diluição de primers da maneira correta!**, 2021. 1 vídeo (40:22 min). Publicado pelo canal Universidade do DNA. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=3UIWxPHJoBo&t=748s>. Acesso em: 16 jun. 2021.

KASVI. **Brometo de etídio x Corante safer: Qual a melhor opção? São José dos Pinhais/PR: Kasvi, 2017**. Disponível em: <https://kasvi.com.br/brometo-de-etidio-corante-safer/>. Acesso em: 31 out. 2021.

KASVI. **O que é eletroforese e qual sua importância? São José dos Pinhais/PR: Kasvi, 2015**. Disponível em: <https://kasvi.com.br/o-que-e-eletroforese-e-qual-a-sua-importancia/>. Acesso em: 31 out. 2021.

KOSIK, K. **Dialética do concreto**. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 9º reimpressão no Brasil, 2011. Trecho do Cap. I - Dialética da totalidade concreta. p. 13-17. 1 fev. de 2021.

LIPAY, B. E. **Biologia Molecular: Métodos e Interpretação**. Rio de Janeiro: Roca/Grupo GEN, 2015. *Ebook*. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2768-6/pages/recent>. Acesso em: 9 ago. 2021.

LUTECH. **Cabines de Fluxo Laminar: Vertical e Horizontal, conheça as diferenças, 2021**. Disponível em: <https://lutech.com.br/fluxo-laminar-vertical-horizontal-quais-as-diferencas/>. 14 Set 2021. Acesso em: 12 dez. 2020.

RASOULIHA S.; BARRIENTOS L.; ANDEREGG L.; KLESTY C.; LORENZ J.; CHEYALLIER L.; et al. **A RAPGEF6 variant constitutes a major risk factor for laryngeal paralysis in dogs**. Reino Unido: Jeffrey J. Schoenebeck, Universidade de Edimburgo 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008416>. Acesso em: 27 jan. 2021.

VIEIRA, Sônia. **Introdução à Bioestatística**. 5. ed. Rio de Janeiro: GEN/ Grupo Editorial Nacional S.A. Publicado pelo selo Editora Guanabara Koogan Ltda, 2020. *Ebook*. Disponível em: [https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595150911/epubcfi/6/10\[%3Bvnd.vst.idref%3Dcreditoxhtml\]!/4/14/3:37\[git%2Cal\]](https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595150911/epubcfi/6/10[%3Bvnd.vst.idref%3Dcreditoxhtml]!/4/14/3:37[git%2Cal]). Acesso em: 15 nov. 2021.

## APÊNDICE

### Apêndice 1: Protocolos de testes genéticos

#### PROCOLOS DE PADRONIZAÇÃO DE TESTES GENÉTICOS

*Primers* da marca EXXTEND, alguns retirados de artigos e outros desenhados pelos pesquisadores.

Inicialmente, os *primers* são ressuspensos com a solução tampão TE 1x (Tris-EDTA) para preparo da solução mãe.

A quantidade de TE necessária para preparo da solução a 100µM acompanha a embalagem. Após passar no *vórtex* e *spin*, a solução mãe precisa ficar 15 minutos incubando a temperatura ambiente, então os *primers* ficam prontos para uso.

Parte da solução mãe é dissolvida em água *nuclease free* para preparo dos primers a 10 µM. Nesse caso a proporção é de 1:10, 45µL de água e 5µL de solução mãe.

#### Preparo do mix para reações de PCR:

6µL de água *nuclease free*

1µL de cada primer (F e R)

10µL da enzima, no caso a GT- GoTaq master mix (Promega)

Totalizando 18 µL de mix por reação

A ciclagem no termociclador foi a padrão do laboratório com T<sub>m</sub> de acordo com cada gene de interesse:

- Volume total no tubo: 20 µL (18 µL mix + 2 µL amostra).

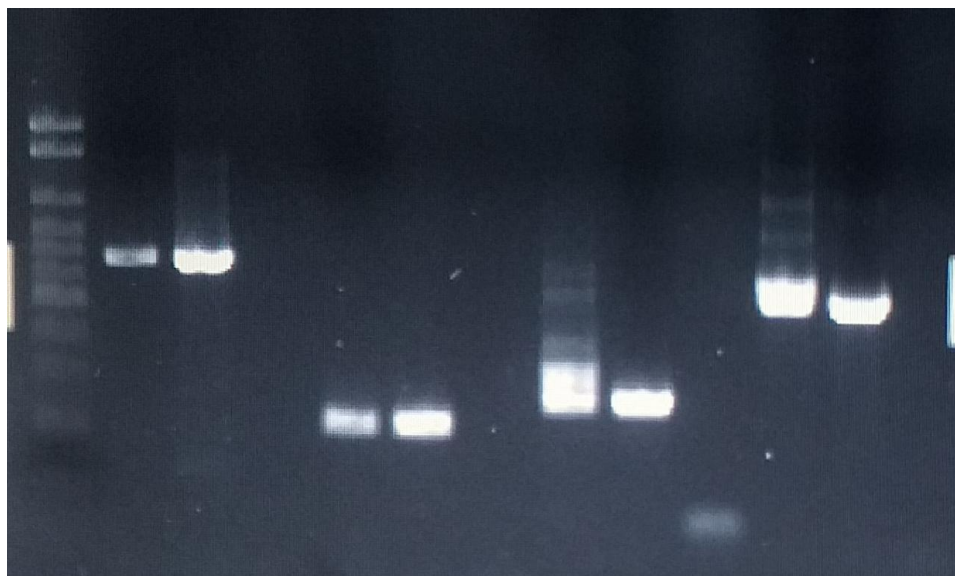
- Temperatura da tampa: 105°C
- 40 ciclos

95°C por 5 minutos
95°C por 1 minuto
T <sub>m</sub> por 1 minuto
72°C por 1 minutos
72°C por 5 minutos

Após a amplificação, o produto obtido é separado em corrida em gel de eletroforese.

- 20ml do gel de agarose 1,5% é misturado a 1 µL de corante SYBR.
- 5 µL de cada amostra em cada pocinho
- 3,5 µL de *ladder* (100pb)
- 10 – 20 minutos a 100V, checando de 5 em 5 minutos após os 10 primeiros minutos.

O tamanho dos *amplicons* obtidos indica se os testes tiveram sucesso em amplificar a região de interesse. A confirmação desse sucesso é a partir do sequenciamento.





Da esquerda para a direita:

- 1: Ladder 100pb
- 2: HNPk1 – LDM 459 (9672)
- 3: HNPk1 - LDM 511 (2819)
- 4: HNPk1 - CN
- 5: HNPk2 LDM 459 (9672)
- 6: HNPk2 LDM 511 (2819)
- 7: HNPk2 - CN
- 8: Rasouliha RAPGEF6 - LDM 431
- 9: Rasouliha RAPGEF6 - LDM 432
- 10: Rasouliha RAPGEF6 - CN
- 11: RAPGEF6 - LDM 431
- 12: RAPGEF6 - LDM 432
- 13: RAPGEF6 - CN

Após indícios de sucesso na eletroforese, as amostras precisam ser purificadas para serem posteriormente sequenciadas. A purificação segue o protocolo padrão de purificação com *beads* magnéticas. Após a purificação, é necessário o preparo de outro mix para sequenciamento.

**Preparo do mix:**

2µL do PCR purificado
1µL de cada <i>primer</i> (F e R) separadamente

**TESTE GENÉTICO HNPk 1**

**Sequências dos *primers* (5'- 3'):**

**HNPk F1:** CACAAGCAGGAAGAGAGACAG

**HNPk R1:** CTCAGCGGTTGAGCATCTT

Gene SUV39H2

Amostras LDM 459 (9672) e LDM 511 (2819).

O produto procurado apresenta fragmento de 706 pb.

T<sub>m</sub>= 62°C

Análise do sequenciamento, seguindo (Bannoehr et. a., 2020):

- As amostras são homozigotas selvagens.
- Nenhuma apresentou a deleção das bases AGTGTAAGTGA na região 18.122 do gene.

## TESTE GENÉTICO HNPk 2

### Sequência dos *primers* (5'- 3'):

**HNPk F2:** CACAAGCGAAGAAGCTGAAAG

**HNPk R2:** TACTCCTCAACTATGGACAAATCG

Tentativa de amplificação do gene SUV39H2

Amostras LDM 459 (9672) e LDM 511 (2819).

O produto procurado apresenta fragmento de 219 pb.

T<sub>m</sub>= 62°C.

Análise do sequenciamento seguindo (Bannoehr et.al., 2020):

- As amostras são homozigotas selvagens.
- Nenhuma apresentou a deleção das bases AGTGTAAGTGA na região 18.122 do gene.

## TESTE GENÉTICO LP

### Sequência dos *primers* (5'- 3'):

**Rasouliha RAPGEF6 F:** AAGTTGTGACCCCACTTCTCA

**Rasouliha RAPGEF6 R:** CCAAAAATGTTGGTCTTCACAG

Gene RAPGEF6

Amostras LDM 431 e LDM 432, #9179.

O produto procurado apresenta fragmento de 265 ~ 301 pb segundo (Rasouliha et. al., 2019).

$T_m = 59,6^\circ\text{C}$ .

Análise do sequenciamento:

- Na localização 1793, a amostra 431 parece ser heterozigota no local da inserção.
- As amostras 431 e 432 acrescidas do *primer forward* obtiveram sequenciamento melhor do que a amostra com acréscimo do *primer reverse*.
- A amostra LDM 432 não apresentou inserção.

## TESTE GENÉTICO LP

**Sequência dos *primers* (5'- 3'):**

**RAPGEF6 F1:** GTTGTTTCATACAAGGGTGCATTT

**RAPGEF6 R1:** GGTGCTGCCTAGCAAAGTATAG

Gene RAPGEF6

Amostras: LDM 431 e LDM 432, #9179.

O produto procurado com fragmento de 540 pb.

$T_m = 62^\circ\text{C}$ .

Análise do sequenciamento:

- Na localização 1793, a amostra 431 parece ser heterozigota no local da inserção.
- As amostras 431 e 432 acrescidas do *primer forward* obtiveram sequenciamento melhor do que a amostra com acréscimo do *primer reverse*.
- A amostra LDM 432 não apresentou inserção.

## PROTOCOLO TESTE GENÉTICO LAD

### **Primers MKLN1 F1 e MKLN1 R1:**

Foram testadas três diferentes temperaturas de *Melt* para amplificação do gene MKLN1 das amostras LDM 431 e LDM 432, #9179. O produto procurado apresenta fragmento de 797 pb segundo (Bauer et. al., 2018). O protocolo seguido foi desenvolvido *in house* e segue o padrão para preparo do mix:

5µL de água <i>nuclease free</i>
1µL de cada <i>primer</i>
10µL da enzima, no caso a GT - GoTaq master mix (Promega)
Totalizando 17 µL de mix, com mais 3µL de amostra

As três diferentes temperaturas ( $T_m$ ) usadas foram: 58°C, 60°C e 62°C, a programação usada no termociclador foi:

95°C por 5 minutos
95°C por 1 minuto
$T_m$ por 1 minuto (ciclagem de 40 vezes para amplificação)
72°C por 1 minutos
72°C por 5 minutos

Após amplificação, o produto obtido foi corrido em gel de eletroforese, em que obtivemos os fragmentos na faixa dos 700 a 800 pb.



Da esquerda para direita:

1: LDM 431 a 58°C

2: LDM 432 a 58°C

3: Controle negativo a 58°C

4: LDM 431 a 60°C

5: LDM 432 a 60°C

6: Controle negativo a 60°C

7: LDM 431 a 62°C

8: LDM 432 a 62°C

9: Controle negativo a 62°C

10: Ladder 100pb

O tamanho dos *amplicons* obtidos indica que os testes realizados tiveram sucesso em amplificar a região de interesse.

Então, as amostras foram purificadas para serem posteriormente sequenciadas.

A purificação seguiu o protocolo desenvolvido *in house* e as concentrações (em ng/uL) obtida foram de:

58°C		60°C		62°C	
LDM431	LDM432	LDM431	LDM432	LDM431	LDM432
6	13,2	8,9	11,7	6,0	7,8

## ANEXO

**Anexo 1:** Conceitos de biossegurança no laboratório e disposição de resíduos perigosos (adaptado de ANTONINI et. al., 2004).

Durante o trabalho experimental, trabalha-se com reagentes e equipamentos potencialmente perigosos, sendo necessário adotar procedimentos de segurança no laboratório:

1. É proibido comer, beber, fumar, estocar alimentos e usar cosméticos no laboratório.
2. Devem ser usados sapatos adequados, fechados, e com sola não deslizante em todas as áreas do laboratório.
3. Cabelos longos devem estar presos para evitar acidentes e contaminações.
4. Jalecos devem ser usados para a proteção contra contaminação ou danos às roupas. Eles devem ser removidos ao deixar as áreas do laboratório para evitar transferência de contaminantes do laboratório para as áreas normalmente limpas (como escritórios, copas, etc.)
5. As mãos devem ser lavadas depois da retirada das luvas, antes de deixar o laboratório, e a qualquer tempo depois do manuseio de materiais tidos como suspeitos de contaminação.
6. A proteção da face e dos olhos (usando óculos, visores ou outros equipamentos de proteção) deve ser feita, para evitar o impacto de objetos, substâncias prejudiciais, luz ultravioleta ou outras radiações.
7. Pipetar qualquer substância com a boca é proibido.

### **Disposição de resíduos perigosos**

#### **Resíduos biológicos perigosos**

Resíduos biológicos perigosos é ‘qualquer material que está ou esteve em contato com carcaça de animais e/ou produtos animais’. Isto inclui todos os resíduos associados com

procedimentos microbiológicos (bactérias e vírus) e qualquer item que esteve em contato com enzimas e DNA recombinante. Portanto, a maioria das ponteiros e tubos são perigosos. Todos os materiais líquidos e sólidos contaminados ou infectados devem ser autoclavados por 40 minutos antes de serem dispostos ou reutilizados.

### **Resíduos orgânicos**

Solventes orgânicos como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico não devem ser despejados na pia. A maioria dos materiais contaminados com solventes orgânicos devem ser colocados num recipiente reforçado. Quando estes recipientes estiverem cheios, devem ser encaminhados ao serviço de coleta especializado.

### **Brometo de etídio**

Os materiais contaminados com brometo de etídio (luvas, ponteiros, tubos e géis) devem ser colocados num recipiente reforçado e dispostos como os resíduos orgânicos. A disposição de solução de brometo de etídio com concentração inferior a 0,5 µg/mL pode ser feita da seguinte maneira:

- acrescentar 1 g de carvão ativado por litro de solução
- agitar por 1 hora a temperatura ambiente
- filtrar usando papel de filtro Whatman no. 1 e dispor como sólido contaminado com luvas, ponteiros, etc.

### **Outras soluções**

Soluções solúveis em água, não perigosas, podem ser despejadas na pia.

### **Objetos perfurocortantes**

“A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) classifica como Grupo E os resíduos que são constituídos por materiais perfurocortantes, como por exemplo, os objetos e instrumentos que contenham cantos, bordas, pontos ou protuberâncias rígidas e agudas capazes de cortar ou perfurar.”

Objetos perfurocortantes devem ser descartados em recipientes específicos, resistentes a vazamentos, rupturas e ao processo de esterilização. Na parte externa desses recipientes deve conter o símbolo internacional de risco biológico e o escrito “PERFUROCORTANTE”. Esses recipientes não podem ser reaproveitados após seu



esvaziamento. Por medidas de segurança, esses recipientes devem ser preenchidos com apenas  $2/3$  de sua capacidade total. Esses materiais devem ser descartados no local em que foram gerados, separada e imediatamente após o seu uso.