

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA
E GENÉTICA

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ATIVIDADE DIDÁTICA
DE BIOLOGIA MOLECULAR, APLICÁVEL EM COMUNIDADES
OU EM SALA DE AULA

Carolina Luiza de Quadros

Florianópolis
2018

Carolina Luiza de Quadros

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ATIVIDADE
DIDÁTICA DE BIOLOGIA MOLECULAR, APLICÁVEL EM
COMUNIDADES OU EM SALA DE AULA**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina
Orientador: Prof. Dr. André Ramos

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Quadros, Carolina Luiza

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ATIVIDADE DIDÁTICA DE BIOLOGIA MOLECULAR, APLICÁVEL EM COMUNIDADES OU EM SALA DE AULA / Carolina Luiza Quadros ; orientador, André Ramos, 2018.

74 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia Molecular. 3. Otimização. 4. Extração e análise de DNA. 5. Didático. I. Ramos, André. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Carolina Luiza de Quadros

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ATIVIDADE DIDÁTICA
DE BIOLOGIA MOLECULAR, APLICÁVEL EM COMUNIDADES
OU EM SALA DE AULA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em
sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 28 de novembro de 2018

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Ramos
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Yara Costa Netto Muniz
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os colaboradores por tornarem possível minha formação gratuita e de qualidade. Ao PIBIT/CNPq pela bolsa de iniciação tecnológica e à UFSC pela bolsa de extensão no Projeto Imagine e pela bolsa de estágio na secretaria regional da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) em Santa Catarina.

Aos professores responsáveis pelo auxílio na construção do meu conhecimento em Ciências Biológicas, onde tornaram possível minha aprendizagem na área, além do ampliação da minha percepção do mundo, da sociedade e da ciência, de formas que nunca imaginei. Nesse sentido agradeço em especial aos professores: Dr. André Ramos, Dr. Paulo Roberto Petersen Hofmann, Dra. Norma Machado da Silva, Dra. Daniela Cristina De Toni, Dra. Adriana Mohr, Dr. Alexandre Meyer Luz e Dr. José Salatiel Rodrigues Pires.

Agradeço também ao meu orientador, Dr. André Ramos por ser meu mestre e grande amigo no processo, me auxiliando e valorizando como orientanda, como membro do incrível Projeto Imagine, como membro do concurso “Imagine-PanGea”, como membro da secretaria regional da SBPC-SC, e como monitora por quatro semestres da disciplina de Biologia Molecular I. Quero que você saiba que te admiro como profissional e como ser humano e agradeço de coração por todas as oportunidades confiadas!

Gostaria de agradecer à Carolina Leite Martins, minha amiga que a graduação proporcionou, pessoa maravilhosa e dedicada, que me ajudou em todos os aspectos e esteve no meu lado desde os primeiros dias na UFSC.

Gostaria de agradecer aos parceiros de laboratório e/ou monitoria antigos e atuais, à Angela Alves dos Santos (do LBMBL/UFSC), ao Eike Hirsch (Monitoria 17.1 e 17.2), à Thays Vieira (Monitoria 18.1) e ao Nicolas Conceição (Monitoria 18.2). Agradeço pelo tempo, cooperação e parceria de vocês, vocês foram maravilhosos!

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) e em especial ao Dr. Rafael Diego da Rosa, ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), ao Laboratório de Protozoologia, ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) e ao Laboratório de Genética do Comportamento (LGC). Obrigado por emprestarem o tempo e uso de aparelhos e reagentes que contribuíram para as padronizações do presente trabalho.

Ao professor Guilherme Razzera e às professoras Yara Costa Netto Muniz e Norma Machado da Silva por aceitarem compor a banca avaliadora e disponibilizarem e dedicarem tempo na avaliação e contribuição com este trabalho.

Ao meu companheiro, Vinícius Matos, que está ao meu lado desde a época do cursinho pré-vestibular. Obrigado por me apoiar, acreditar em mim e suportar comigo todos os momentos difíceis e crises do processo. Obrigada por ser meu namorado e amigo. Te amo muito!

Agradeço às pessoas da minha família, em particular à minha prima Letícia Ventura e ao meu primo Felipe Vargas. Vocês são as pessoas mais malucas e sensacionais que eu conheço! Obrigado por serem seres humanos maravilhosos!

Agradeço ainda à Daniele Boeing, amiga de ensino médio, e à Hyanca Depieri e à Gabrielly Martins, amigas do ensino fundamental. Saibam que vocês são parte das pessoas que fazem minha vida valer a pena!

Agradeço ainda à minha família, que é muito grande e que combina com os tamanhos dos respectivos corações e que assim como meus pais e irmão, que mesmo sem entender em detalhes o que eu fiz/faço, confiam e acreditam em mim! Mãe e Gui, vocês são o que me move e o que me faz levantar todos os dias sem desistir! Amo muito vocês!

Por fim, às pessoas aqui citadas gostaria de reforçar que: “Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você” (Carl Sagan).

“A ciência, portanto, não é o retrato fiel da realidade. Isso não significa, todavia, que a ciência não seja capaz de oferecer ferramentas para entender o mundo.” (RICARDO, 2010)

RESUMO

Muitos trabalhos relatam a utilização de técnicas básicas de biologia molecular em aulas práticas de graduação e pós-graduação como ferramentas importantes do ponto de vista didático. O projeto Imagine, criado em 2013 por pesquisadores de diversos centros e departamentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), busca a popularização científica, compartilhando o conhecimento dos laboratórios da instituição com pessoas de diferentes localidades. O projeto possui três módulos, disponíveis em seu site, na forma de Recursos Educacionais Abertos (REAs). O módulo de interesse do presente trabalho: “DNA, Diversidade e Hereditariedade”, inclui protocolos de extração de DNA humano, PCR, confecção de gel de agarose e execução de eletroforese com fins de genotipagem. Todos esses protocolos são usados em etapas experimentais e sequenciais, para que haja a visualização e comparação genotípica, utilizando os marcadores moleculares AT3-I/D (rs3138521) e PV92-Alu (rs3138523), de indivíduos de uma mesma comunidade ou de comunidades distintas. Falhas nessas técnicas foram detectadas durante as aplicações do módulo em aulas práticas curriculares, realizadas na UFSC e, por esse motivo, o presente trabalho buscou a otimização dos protocolos que envolvem desde a extração do DNA até a sua análise final. Como resultado, foram adequados os seguintes passos: quantidade de DNAzol® durante a extração de DNA, de 500 para 250 μL ; solubilização final do DNA genômico mantida em Água Milli-Q; temperatura de anelamento (de 58 para 55 $^{\circ}\text{C}$), concentração dos *primers* (de 0,8 μM para 0,4 μM) e volume de DNA genômico (de 3 para 9 μL) usados na PCR; alteração da marca de corante intercalante de DNA utilizado na eletroforese (de Safer da Kasvi para Unisafe da Uniscience). As falhas detectadas nas técnicas foram solucionadas e com os resultados aqui obtidos, os protocolos serão atualizados no site do Projeto Imagine, em diversas línguas, para que estejam disponíveis à aplicação livre e gratuita em comunidades e sala de aula e assim sejam amplamente utilizados para fins de ensino e divulgação científica em diferentes países.

Palavras-chave: Extração de DNA. PCR. Eletroforese. Otimização. Padronização. Didático. Biologia Molecular.

ABSTRACT

Many articles report the use of basic molecular biology techniques in undergraduate and graduate laboratory classes as important teaching tools. The Imagine Project, created in 2013 by researchers from different departments of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), aims at scientific popularization by sharing the knowledge generated inside the institution with people from different rural areas. The project has three modules that are available in its website in the form of Open Educational Resources (OERs). The module of interest of the present work: "DNA, Diversity and Heredity", includes protocols of human DNA extraction, PCR, preparation of agarose gel and execution of electrophoresis for genotyping purposes. All these protocols are used in sequential experimental steps for genotypic determination and comparison using the molecular markers AT3-I/D (rs3138521) and PV92-Alu (rs3138523) from different individuals from the same or from different communities. Problems with these techniques have been detected during their application in curricular laboratory classes held at UFSC and, for this reason, the present work sought to optimize the protocols from DNA extraction to its final analysis. As a result, the following steps have been adjusted: amount of DNAzol® during DNA extraction, from 500 to 250 μ L; final solubilization of genomic DNA kept in Milli-Q Water; annealing temperature (from 58 to 55 ° C), final concentration of primers (from 0,8 μ M to 0,4 μ M); volume of genomic DNA (from 3 to 9 μ L) used in the PCR; and change of the DNA intercalating dye used in the electrophoresis (from Safer by Kasvi to Unisafe by Uniscience). All the technical problems have been solved and, thanks to the present study, the respective Imagine Project protocols will be updated and translated in its open website, therefore becoming available to be used free of charges for teaching and scientific popularization purposes all over the world.

Keywords: DNA extraction. PCR. Electrophoresis. Optimization. Standardization. Didactic. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático da sequência cronológica dos testes

Figura 2 – Teste com diferentes volumes de DNAzol® (250, 500 e 750 µL) e dois tipos de solventes (Água Milli-Q ou NaOH) utilizando o marcador genético AT3-I/D

Figura 3 – Teste com diferentes concentrações (0,4 e 0,8 µM) e origens dos primers utilizando o marcador AT3-I/D

Figura 4 – Teste com diferentes volumes de DNA genômico na reação de PCR, utilizando o marcador AT3-I/D

Figura 5 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 53-61.4 °C (AT3-I/D)

Figura 6 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 47-58.2 °C com genótipo 22 (AT3-I/D)

Figura 7 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 47-58.2 °C com genótipo 11 (AT3-I/D)

Figura 8 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 47-58.2 °C com genótipo 12 (AT3-I/D)

Figura 9 – Teste com dois diferentes corantes: Safer (Kasvi) e Brometo de Etídio utilizando os marcadores AT3-I/D e PV92-Alu

Figura 10 – Teste com diferentes volumes de marcador de peso molecular e corante Safer (Kasvi)

Figura 11 – Teste com diferentes volumes e diluições de produto da PCR com corante Safer (Kasvi) com marcador AT3-I/D (genótipo 12)

Figura 12 – Teste corante Safer (Kasvi) com diferentes concentrações de produto PCR com marcador AT3-I/D (genótipo 11)

Figura 13 – Teste com os corantes: Safer (Kasvi), UniSafe Dye (20,000x) Uniscience e Brometo de Etídio utilizando os marcadores AT3-I/D e PV92-Alu

Figura 14 – Teste final com o corante UniSafe Dye (20,000x) Uniscience (com AT3-I/D)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Informações sobre os dois marcadores moleculares informativos de ancestralidade utilizados: AT3-I/D e PV92-Alu

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase

Tabela 2 – Condições da PCR para os AIMs: AT3-I/D e PV92-Alu

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM: sigla do inglês: *Ancestry Informative Markers* (Marcador Informativo de Ancestralidade)

DNA: sigla do inglês: *DesoxiriboNucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs: Deoxinucleotídeos trifosfatados

Ladder: marcador de peso molecular

PCR: sigla do inglês: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Primers: oligonucleotídeos iniciadores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 CONTEXTO HISTÓRICO.....	27
1.2 BREVE DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS ENVOLVIDAS NESTE TRABALHO.....	27
1.3 AS TÉCNICAS MOLECULARES NO ENSINO DA BIOLOGIA	29
1.4 DESAFIOS TÉCNICOS.....	30
1.5 MARCADORES GENÉTICOS.....	31
1.6 PROTOCOLOS DE BIOLOGIA MOLECULAR USADO EM UM PROJETO DE EXTENSÃO DA UFSC.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO HUMANO.....	37
3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	38
3.3 ELETROFORESE.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO HUMANO.....	43
4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	45
4.3 ELETROFORESE.....	52
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A – Protocolos pertinentes do Módulo: “DNA, diversidade e hereditariedade”.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO HISTÓRICO

A partir da metade do século XX, com os conhecimentos acumulados nas décadas anteriores e com novos estudos, como a elucidação da estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (ou DNA, do inglês *DesoxiriboNucleic Acid*), por James Dewey Watson e Francis Harry Compton Crick em 1953 (WATSON; CRICK, 1953), a compreensão do código genético, por Severo Ochoa e posteriormente Har Gobind Khorana, e a descoberta do óperon lac, por François Jacobe e Jacques Monod, muitos avanços ocorreram na área da genética, incluindo o próprio desenvolvimento da biologia molecular (ANDRADE; CALDEIRA, 2009; GRIFFITHS et al., 2008). Conforme as técnicas de biologia molecular foram surgindo, muitas abordagens e estratégias de estudo utilizadas na área foram sofrendo alterações (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

O DNA é a macromolécula que compõe o material genético dos seres vivos, é dotada de informações que permitem e direcionam o desenvolvimento dos organismos. (ANDRADE; CALDEIRA, 2009).

Inicialmente, a molécula de DNA, considerada difícil de ser analisada, foi por algum tempo estudada de forma indireta, por meio de sequenciamentos de proteínas ou análises genéticas a partir de fenótipos. Com todos os avanços na área, hoje, em menos de um dia, é possível sequenciar os aproximados 3,2 bilhões de pares de nucleotídeos do DNA de um ser humano (ALBERTS et al., 2017).

1.2 BREVE DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS ENVOLVIDAS NESTE TRABALHO

A técnica de extração de DNA, utilizada nas mais variadas espécies para os mais diversos fins, possui etapas que podem ser classificadas em: (1) coleta das células, que são extraídas de tecidos; (2) lise celular; (3) digestão de proteínas e outros componentes celulares que não são interessantes ao estudo e (4) precipitação do DNA (HEARN; ARBLASTER, 2010).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) revolucionou os estudos de genética molecular, por tornar-se uma alternativa mais rápida e eficiente do que os métodos utilizados anteriormente, de clonagem e hibridização de fragmentos de ácidos nucleicos (CARVALHO; RECCO-PIMENTE, 2013). A PCR mudou o curso da biologia molecular, impactando e

mudando a perspectiva nessa e em muitas outras áreas das ciências biológicas (LORENZ, 2012; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

A PCR é uma de técnica realizada *in vitro*, que amplifica moléculas de DNA e possui como princípio algumas características da replicação de DNA celular (CARVALHO; RECCO-PIMENTE, 2013). É extremamente sensível, capaz de amplificar em quantidade, a partir de quantidades iniciais ínfimas de DNA genômico (ALBERTS et al., 2017). Na reação, a partir de uma amostra de DNA genômico, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (ou dNTPs), oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*), enzimas DNA-polimerase termoestáveis, tampão, concentrações ideais de MgCl₂ e variações na temperatura, é possível sintetizar bilhões de cópias de um conhecido e desejado fragmento de genoma de qualquer espécie (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Por fim, inicialmente utilizada na pesquisa de proteínas, a técnica de eletroforese tornou-se igualmente importante como ferramenta de análise do DNA, capaz de separá-lo de acordo com o tamanho dos fragmentos de interesse. Por conter um grupamento fosfato em cada nucleotídeo, que lhe confere carga negativa, o DNA, ao ser colocado em um campo elétrico, desloca-se em direção ao polo positivo. Esse é o princípio da eletroforese de DNA, que ocorre em um gel (de agarose ou poliacrilamida, por exemplo) imerso em tampão. Os fragmentos de tamanhos diferentes migram em velocidades diferentes através do gel e o tamanho da molécula de DNA é diretamente proporcional ao seu tempo de migração (ALBERTS et al., 2017). Ao final da corrida eletroforética, o DNA pode ser corado com produtos intercalantes de DNA (como o brometo de etídio), que quando expostos à luz ultravioleta (UV) emitem fluorescência, tornando possível a visualização, em bandas, do(s) local(is) onde as moléculas de DNA concentram-se no gel (ALBERTS et al., 2017; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Essas três técnicas, muitas vezes de forma combinada, são ampla e comumente utilizadas em pesquisas científicas em diversas áreas (HEPP, DIEGO; NONOHAY, 2016). A PCR, por exemplo, permite a obtenção de muitos dados sobre os genomas e sua diversidade e com frequência é adaptada para novos usos específicos. Sua plasticidade de uso é grande e é apenas o cientista que, por meio da sua imaginação, multiplica e inova suas aplicações (LORENZ, 2012). Hoje, o uso dessas técnicas é cotidiano em diversos setores, como na produção de alimentos, testes de paternidade, solução de crimes, prevenções,

diagnósticos e tratamentos clínicos, além de muitos outros (HEPP, DIEGO; NONOHAY, 2016).

1.3 AS TÉCNICAS MOLECULARES NO ENSINO DA BIOLOGIA

Dentro de um período de algumas décadas, o emprego das técnicas de biologia molecular passou de cursos especializados, fornecidos a estudantes de pós-graduação, para cursos com caráter mais introdutório (PEREZ-PONS; QUEROL, 1996). Elas são hoje comumente utilizadas em aulas de caráter prático em cursos de graduação (PHILLIPS et al., 2008). Por conta do profundo impacto social, seu uso no ensino de biologia do ensino médio tornou-se uma possibilidade real. Isso porquê, elas podem servir como facilitadoras no processo de compreensão de conceitos básicos por meio de metodologias experimentais (PEREZ-PONS; QUEROL, 1996).

Como as Ciências Naturais possuem caráter preponderantemente investigativo, esses recursos podem tornar-se aliados ao processo de ensino-aprendizagem da área, uma vez que seus usos em atividades práticas instigam a busca por conhecimento através da investigação e da análise de dados obtidos experimentalmente (XAVIER; CAVALCANTI, 2017). A extração de DNA, por exemplo, pode ser considerada uma técnica eficiente no que diz respeito ao seu uso como ferramenta pedagógica, pois permite uma melhor compreensão sobre o material genético, tornando-se aliada à conexão entre conceitos abstratos e produtos visíveis. Há um entusiasmo por parte dos estudantes quando manipulam seus próprios DNA (HEARN; ARBLASTER, 2010). Por meio de formas de aprendizagem ativa, ideias e conceitos errados podem inclusive ser identificados, tanto pelos instrutores quanto pelos próprios estudantes (PHILLIPS et al., 2008).

Atividades baseadas na investigação científica, possibilitam tanto a aprendizagem do campo conceitual quando do próprio conhecimento científico por trás dos conceitos. Quando o engajamento é alcançado, é possível que os estudantes adquiram, durante o processo, uma posição mais ativa intelectualmente (ZÔMPERO; LABURÚ, 2011).

Muitos recursos didáticos de biologia molecular podem ser encontrados atualmente em sites como *Learn Genetics*, da Universidade de Utah, onde, por exemplo, é possível o acesso a um protocolo de caráter básico, que ensina passo a passo como extrair DNA genômico utilizando detergente, amaciante de carnes e álcool (GENETIC

SCIENCE LEARNING CENTER, 2013). Outro exemplo é o site *NC DNA DAY* da Universidade da Carolina do Norte (UNC), onde é possível acessar um protocolo igualmente simples de extração de DNA a partir da saliva utilizando: detergente, sal de cozinha e álcool, em um tempo de 5 minutos (NC DNA DAY, 2018).

Na literatura, muitos trabalhos relatam a utilização de técnicas básicas de biologia molecular em aulas práticas como ferramentas importantes do ponto de vista didático. Isso pode ser observado, por exemplo, em trabalhos como o de Barton e Lieberman (1999), onde há o uso da técnica de PCR com DNA coletado da mucosa bucal para estudo de mutações com estudantes de medicina do primeiro ano, ou ainda, como visto no trabalho de Casla e Zubiaga (2010), onde há o uso da PCR a partir do DNA de estudantes para fazer testes de paternidade fictícios. Em um desenvolvido por Dolan DNA Learning Center (2006), é possível adquirir protocolos comercialmente que podem ser usados em aulas práticas com populações humanas usando um polimorfismo de Inserção Alu. No trabalho de Falteisek, Černý e Janštová (2013), relata-se o uso de células epiteliais de alunos para estudar polimorfismos de um co-receptor relacionado ao HIV. Já no trabalho de Pardiñas e outros autores (2010), usa-se células da mucosa de alunos, para realizar PCR e eletroforese utilizando o DNA mitocondrial. Em um trabalho de Streicher e Brodte (2002), usa-se PCR, enzimas de restrição e eletroforese para distinguir espécies de plantas com alunos de ensino médio. Wagoner e Carlson (2008), por outro lado, realizam atividades de prática forense na qual os alunos coletam material celular de uma cena do crime, além de seu próprio DNA, para a solução de um crime fictício. Apesar dos mais variados objetivos finais, esses trabalhos utilizam as técnicas com o intuito de despertar um maior interesse e envolvimento nos assuntos abordados.

1.4 DESAFIOS TÉCNICOS

A PCR apresenta muitas particularidades e muitas variáveis que podem influenciar nos resultados (KRAMER; COEN, 2001). Por esse motivo, trabalhos da literatura propõem formas de solucionar problemas, auxiliando na padronização e otimização dos protocolos. Como exemplo, temos os trabalhos de Kramer e Coen (2001), Lorenz (2012), e Roux (2009), que abordam formas de otimização da técnica de PCR.

As concentrações de Mg^{++} , pH do tampão e condições de temperatura nos ciclos, são as variáveis que se encontram no topo da lista de variáveis para otimização da técnica (ROUX, 2009).

Na extração de DNA, as etapas do processo são geralmente constantes nos protocolos, havendo maior número de variações geralmente na primeira etapa, que é a etapa de coleta das células (HEARN; ARBLASTER, 2010). Um problema que pode ser encontrado nessa técnica é a qualidade do DNA extraído que pode alterar consideravelmente a eficácia PCR (OLIVEIRA, 2008).

Em relação à técnica de eletroforese, desde a sua criação, novas formas de aplicação foram surgindo. Dependendo das características dos fragmentos de DNA a serem separados, os parâmetros são modificados e adaptados, conforme o desejado. As condições do tampão e concentração do gel, por exemplo, influenciam a corrida de DNA no gel. Portanto, esse e outros parâmetros devem ser considerados para que uma corrida eletroforética ocorra de forma ideal (LEE; BAHAMAN, 2012).

1.5 MARCADORES GENÉTICOS

Um marcador genético apresenta-se como um polimorfismo em uma sequência do DNA. Em geral, é um caractere onde há possibilidade de inferências a respeito da origem das populações e também de sua segregação ligada a um determinado segmento cromossômico (STRACHAN; READ, 2016).

Os polimorfismos genéticos podem ser classificados em três principais tipos: (1) variação de um único nucleotídeo, como os SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*); (2) variações de uma até centenas de pares de bases, que é o caso das inserções ou deleções (ou InDel); e por último (3) variações no número de sequências repetidas ou VNTR (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*). De acordo com o tipo de polimorfismo, as técnicas de genotipagem são ajustadas (VIGNAL et al., 2002).

Dentre os marcadores genéticos, há os chamados Marcadores Informativos de Ancestralidade (ou AIMS, do inglês *Ancestry Informative Markers*), que são comumente utilizados em estudos de inferências de ancestralidade humana. Eles podem ser usados na compreensão da ancestralidade biogeográfica, tanto em níveis populacionais, quanto de subgrupos, ou até mesmo ao nível individual (SHRIVER et al., 2003). Eles apresentam alelos que possuem variações de frequências capazes de diferenciar as populações parentais, sendo

bons indicadores das suas dinâmicas e misturas (BONILLA et al., 2004; LUIZON, 2007).

Dois exemplos desses marcadores são AT3-I/D (rs3138521) e PV92-Alu (rs3138523), que são utilizados por apresentaram variações nas suas frequências alélicas entre ameríndios, europeus e africanos (MUNIZ, 2008). O uso desses dois AIM, assim como de outros existentes, traz informações sobre diversidades humanas. Eles foram selecionados para os protocolos utilizados no presente trabalho, pois de acordo com a literatura eles possuem frequências alélicas suficientemente altas mesmo para as variantes mais raras, em diferentes grupos étnicos. Esta característica faz com que pessoas de uma mesma comunidade tenham grande chance de apresentarem variabilidade entre si e, ao mesmo tempo, pessoas de diferentes comunidades e etnias apresentem algum grau de semelhança (MUNIZ, 2008; “Projeto Imagine”, 2014).

O locus PV92-Alu é usado em um material didático elaborado pelo Centro de Aprendizagem de DNA do Laboratório *Cold Spring Harbor*. Esse material é vendido comercialmente e foi construído para auxílio na condução de aulas práticas para que os alunos façam suas caracterizações genotípicas acerca do marcador, dando oportunidade para contextualização dos estudos de genética populacional, evolução e outros. Nos protocolos apresentados, são abordadas metodologias de extração do DNA genômico humano, PCR dos produtos gerados e eletroforese (DOLAN DNA LEARNING CENTER, 2006).

1.6 PROTOCOLOS DE BIOLOGIA MOLECULAR USADO EM UM PROJETO DE EXTENSÃO DA UFSC

O projeto Imagine, criado em 2013 por pesquisadores de diversos centros e departamentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), busca a popularização científica, compartilhando o conhecimento dos laboratórios da instituição com pessoas de diferentes localidades (RAMOS; RAZZERA, 2014). Com caráter lúdico e multidisciplinar, o projeto, por meio de atividades científicas práticas, busca a democratização e o interesse do público pela ciência. O público-alvo consiste em adolescentes, professores e líderes comunitários de comunidades indígenas ou rurais de diferentes etnias (RAMOS, 2016). Ele tem como objetivo o diálogo entre culturas ancestrais e o conhecimento científico, buscando a desconstrução de preconceitos e a reflexão cientificamente referenciada das semelhanças e diferenças entre

indivíduos, culturas e etnias (“Projeto Imagine”, 2014; RAZZERA; HOFMANN; RAMOS, 2015).

Atualmente, o projeto possui três módulos disponíveis na forma de Recursos Educacionais Abertos (REAs), disponíveis em seu site¹. Entre eles, encontra-se o módulo de interesse do presente trabalho, “DNA, Diversidade e Hereditariedade”, aplicado em comunidades e disponível no site desde 2014. Por meio de atividades lúdicas práticas e debates acerca do tema, o módulo em questão busca dar subsídios na compreensão e respeito de diferenças e semelhanças em vários níveis. Dentre as metodologias práticas utilizadas, os protocolos de interesse do presente trabalho são: extração de DNA humano, PCR, confecção de gel de agarose e execução da eletroforese. Todos são usados em etapas sequenciais experimentais para que haja a visualização e comparação genotípica, utilizando os marcadores moleculares AT3-I/D e PV92-Alu, de indivíduos da mesma e de diferentes comunidades (Anexo A) (“Projeto Imagine”, 2014).

Os marcadores moleculares utilizados nos protocolos de interesse do presente trabalho, o AT3-I/D e PV92-Alu, não estão relacionados a diagnósticos funcionais, ou implicações fisiológicas, ou médicas, permitindo o seu uso em aspectos didáticos, sem maiores implicações éticas (RAZZERA; HOFMANN; RAMOS, 2015). Eles possuem polimorfismo do tipo Inserção ou Deleção (de 76 pares de base) e Inserção Alu (com cerca de 300 pares de base), respectivamente. Dependendo do tipo de polimorfismo presente em cada indivíduos, a determinação do genótipo apresenta-se pelo tamanho dos fragmentos diferentes, com a presença de alelos mais curtos ou alelos mais longos (MUNIZ, 2008).

Além da aplicação das atividades em comunidades que fazem parte do público-alvo do projeto, elas também são, desde 2015, ministradas para alunos do curso de Graduação em Ciências Biológicas, na forma de aulas práticas para a disciplina de Biologia Molecular I (BEG7013) da UFSC. Esse caso ilustra a alta plasticidade da ferramenta como recurso didático (PROJETO IMAGINE, 2015). No entanto, falhas nas técnicas foram detectadas durante as aplicações do módulo nas aulas práticas e, por esse motivo, o presente trabalho buscou a otimização dos protocolos que envolvem desde a extração do DNA até a sua análise final. A padronização levou em conta o caráter dos protocolos, que buscam ter um perfil relativamente acessível, visando, principalmente, a falta de recursos em instituições de ensino ou extensão, e levando em

1 <http://projetoimagine.ufsc.br>

consideração o tempo de execução e riscos em potencial, como o não uso substâncias nocivas.

Pretende-se, com os resultados aqui obtidos, a imediata modificação e atualização dos protocolos, para que estejam disponíveis à aplicação direta em comunidades e sala de aula, bem como no site do Projeto Imagine, para que assim sejam amplamente utilizados para fins de ensino e divulgação científica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo a otimização de três protocolos usados para extração e análise de DNA humano, buscando um perfil tecnicamente acessível e eficiente, para a execução, mesmo com recursos limitados, em projetos de ensino ou de extensão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização de um protocolo de extração de DNA humano a partir do material celular coletado da mucosa bucal com caráter de baixo custo e invasividade, com rapidez;
- Padronização de um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando dois marcadores genéticos informativos de ancestralidade humana: AT3-I/D e PV92-Alu;
- Padronização de um protocolo de eletroforese visando a genotipagem humana, sem a utilização de substâncias nocivas para as pessoas envolvidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Alguns protocolos das técnicas moleculares do módulo “DNA, diversidade e hereditariedade” do Projeto Imagine, aqui analisados e aperfeiçoados, são adaptações de protocolos utilizados previamente no LAPOGE e LGC. Ambos os laboratórios de pesquisa pertencem ao departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética (BEG) da UFSC. Outros protocolos se basearam em metodologias disponíveis comercialmente.

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (CAAE: 87772818.2.0000.0121). Os voluntários para doação do material biológico consistiram em discentes e docentes da UFSC que assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO HUMANO

No módulo do projeto Imagine, acima mencionado, o protocolo de interesse, intitulado: “Etapa 1 – Extração de DNA” (Anexo A, p. 70), utilizava como fonte de material biológico a mucosa bucal humana. Essa fonte de células para extração de DNA já era bastante conhecida, sendo inclusive utilizada em kits comerciais facilmente disponíveis, mas de custo elevado, como os produtos: *blackPREP Swab DNA Kit* da Analytik Jena, *Maxwell® RSC Buccal Swab DNA Kit* da Promega e outros (ANALYTIK JENA, 2018; PROMEGA, 2018).

O objetivo inicial de se utilizar essa fonte de material biológico nas comunidades, era sua maior simplicidade e menor invasividade, quando comparada a outras fontes classicamente usadas, como sangue, obtido através de coleta por profissional habilitado.

Os materiais necessários para uma amostra descritos no protocolo inicial são: 15 mL de solução de sacarose 3%; dois microtubos de 1,5 mL; espátula de madeira (do tipo abaixador de língua); copo descartável; centrífuga; 500 µL por amostra do reagente para extração de DNA (DNAzol® da marca Invitrogen); 500 µL de etanol absoluto gelado; 1,6 mL de etanol 75% gelado; micropipetas de 100 µL e 1000 µL; e 100 µL de água Milli-Q®.

O procedimento inicia com a raspagem da mucosa bucal do voluntário com uma espátula de madeira por 10 segundos em cada lado. Em seguida, é feito um bochecho com 15 mL de solução de sacarose 3% por 2 minutos, o volume obtido é despejado em um copo e a espátula da raspagem é imersa neste produto do bochecho. Em seguida, 1 mL do produto do bochecho é transferido para um microtubo de 1,5 mL. Esse

microtubo é centrifugado a uma força de 500 g por 5 minutos. O sobrenadante é descartado, 500 µL de DNAzol® são adicionados e o conteúdo do tubo é homogeneizado, por inversão. Em seguida, faz-se uma centrifugação por 10 minutos e 12.400 g. O sobrenadante é transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Nesse volume, são adicionados 500 µL de etanol absoluto gelado. Após centrifugar o microtubo por 3 minutos a 7000 g, o sobrenadante é descartado. São adicionados 800 µL de etanol 75% gelado. A homogeneização e centrifugação subsequentes ocorrem nas mesmas condições anteriores. Ao descartar o sobrenadante, a lavagem do DNA, feita no passo anterior, deve ser repetida. Após a segunda lavagem, o sobrenadante é descartado e adiciona-se 100 µL da água ultrapura Milli-Q® para diluição do DNA. Para uma melhor preservação as amostras devem ser conservadas a uma temperatura de -20°C.

As variáveis que foram testadas com o objetivo de otimizar o protocolo, foram: o volume (0,25 mL, 0,5 mL e 0,75 mL) de DNAzol® por amostra e o tipo de solvente no qual a amostra final de DNA é diluída: em água Milli-Q® ou NaOH a 8 mM (conforme recomendado pelo fabricante do produto DNAzol®).

3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O protocolo inicial que serviu como base, intitulado: “Etapa 2: Amplificação de DNA humano por PCR” (Anexo A, p. 72), apresentava os seguintes materiais a serem utilizados para uma amostra ou reação: micropipetas de 10 e 100 µL; termociclador (HB-Px2-MAN Thermal Cycler – Companhia Thermo Electron ou Mastercycler® personal – Eppendorf); tubos de 0,2 mL e 1,5 mL. O protocolo utilizava esses materiais para reunir os reagentes elencados na Tabela 1 em microtubos de 0,2 mL.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase

Reagente	Volume (μL) para uma reação (1X)	Concentração final na reação
Água Milli-Q®	14,37	-
Tampão ¹ (com MgCl_2)	5	1X (1.5mM MgCl_2)
dNTP	0,5	0,2mM
<i>Primer</i> R	1	0,8 μM
<i>Primer</i> F	1	0,8 μM
Taq Polimerase ²	0,13	1,25 u
DNA genômico	3	-
Volume final	25	-

Fonte: Tabela adaptada a partir do módulo “DNA, diversidade e hereditariedade” (“Projeto Imagine”, 2014).

¹ Tampão utilizado: 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Promega).

² Enzima utilizada: GoTaq®, DNA Polymerase (Promega) 5u/ μL .

Diferente dos protocolos clássicos, que utilizam DNA genômico a uma concentração específica, em nosso caso, por não dispormos de equipamento que possibilite a dosagem do DNA extraído no local de aplicação do módulo, optamos por utilizar um protocolo com volume específico de DNA (de 3 μL) que não foi previamente dosado nem diluído a uma concentração específica.

As mesmas condições iniciais de PCR foram utilizadas para os dois marcadores moleculares, AT3-I/D e PV92-Alu. Os *primers* e outras informações relevantes sobre os marcadores utilizados são descritos a seguir (Quadro 1).

Quadro 1 – Informações sobre os dois marcadores moleculares informativos de ancestralidade utilizados: AT3-I/D e PV92-Alu

<i>locus</i>	Tipo	Localização Cromossômica	Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Alelo e Tamanho do fragmento (pb)
AT3-I/D (rs3138521) ¹	InDel ² (76pb)	1q25.1	F: 5' CCACAGGTGTAACATTGTGT 3' R: 5' GAGATAGTGTGATCTGAGGC 3'	1: 496 2: 572
PV92-Alu (rs3138523) ¹	Inserção <i>Alu</i>	16q23.3	F: 5' AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAAGT 3' R: 5' TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG 3'	1: ~150 2: ~450

Fonte: Tabela adaptada de Muniz, 2008 (p.45).

¹ – Referência do AIM em bancos de dados públicos, como o repositório de polimorfismos dbSNP (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

² – Inserção ou Deleção de um fragmento de 76 pb.

O marcador AT3-I/D, apresenta dois alelos, um com 496 e outro com 572 pares de base (pb). Já o marcador PV92-Alu apresenta um alelo de aproximadamente 450 e outro de aproximadamente 150 pb (ver Quadro 1).

Após o preparo das amostras, os microtubos eram colocados em um termociclador, sob condições de variação de temperatura descritas na Tabela 2, para que a amplificação do DNA ocorresse. Após a amplificação, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Tabela 2 – Condições da PCR para os AIMS: AT3-I/D e PV92-Alu

	Estágio	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Repetições
	1	94	5	1
Passo 1	2	94	1	30
Passo 2	2	58	2	30
Passo 3	2	72	2	30
	3	72	5	1
Final		4		

Fonte: Tabela adaptada a partir do módulo “DNA, diversidade e hereditariedade” (“Projeto Imagine”, 2014).

As variáveis testadas, a fim de otimizar a técnica de PCR, que não vinham funcionando a contento, onde a PCR não apresentava amplificações ou ainda amplificações falhas, foram: concentração (0,4 ou 0,8 µM) e origem e local de armazenamento dos *primers* (Freezer do LGC/Projeto Imagine ou freezer do LAPOGE); volume de DNA (3, 6

ou 9 μL); e temperatura de anelamento (entre 47 °C e 61 °C). O teste de *primers* de dois estoques diferentes se deveu à nossa suspeitas de que as aliquotas do LGC/Projeto Imagine pudessem estar degradadas ou contaminadas, devido a sucessivas viagens do Projeto Imagine.

3.3 ELETROFORESE

De acordo com o protocolo intitulado: “Etapa 3: Confeção de gel de agarose 1%, aplicação das amostras e eletroforese” (Anexo A, p. 73), utilizaram-se os seguintes materiais: agarose, solução tampão TBE 0,5x, cuba para eletroforese, fonte de corrente elétrica, corante para visualização de DNA (*Safer* da marca Kasvi), corante de rastreamento e marcador de peso molecular (ou *Ladder*). O *Ladder* utilizado possui os seguintes tamanhos: 50, 100, 150, 200, 250 (banda mais brilhante), 300, 400 e 500 pb. A concentração de 1% de agarose era recomendada no protocolo original, mas uma concentração de 2% foi utilizada ao longo das padronizações do presente trabalho, com base em testes preliminares anteriores a ele. O TBE 5x, composto por Tris (tris(hidroximetil)aminometano a 445mM), ácido bórico (445mM) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético a 5mM), foi diluído 10 vezes para a solução de trabalho (0,5x). As condições de corrida variaram conforme o tamanho da cuba disponível. Em uma cuba com gel maior, voltagens e amperagens maiores foram utilizadas para que o tempo de corrida fosse mantido o mesmo. Sendo assim, utilizamos as seguintes condições (teto ou limite máximo de cada parâmetro) para um gel de 10 x 10 cm: 150 V, 300 mA, 100 W por 40 minutos; e em um gel de 20 x 20 cm: 300 V, 200 mA, 100 W por 40 minutos. Para cada amostra aplicada utilizou-se 2 μL do corante *Safer* (Kasvi) e 10 μL de produto de PCR. No caso do *Ladder*, utilizou-se 1 μL do corante e 5 μL de *Ladder*. O sistema de Fotodocumentação móvel utilizado, que pertence ao Projeto Imagine, foi o L-Pix STi da Locus Biotecnologia.

Dentre as variáveis testadas, a fim otimizar a técnica de eletroforese, estão: quantidades totais de corante *Safer* (Kasvi) e diferentes concentrações de produto de PCR (diluições de: 1X, 5X, 10X e 70X); diferentes volumes de marcador de peso molecular e corante *Safer* (Kasvi); tipo e marca do corante: *Safer* (Kasvi), UniSafe Dye (20,000x) Uniscience ou Brometo de Etídio.

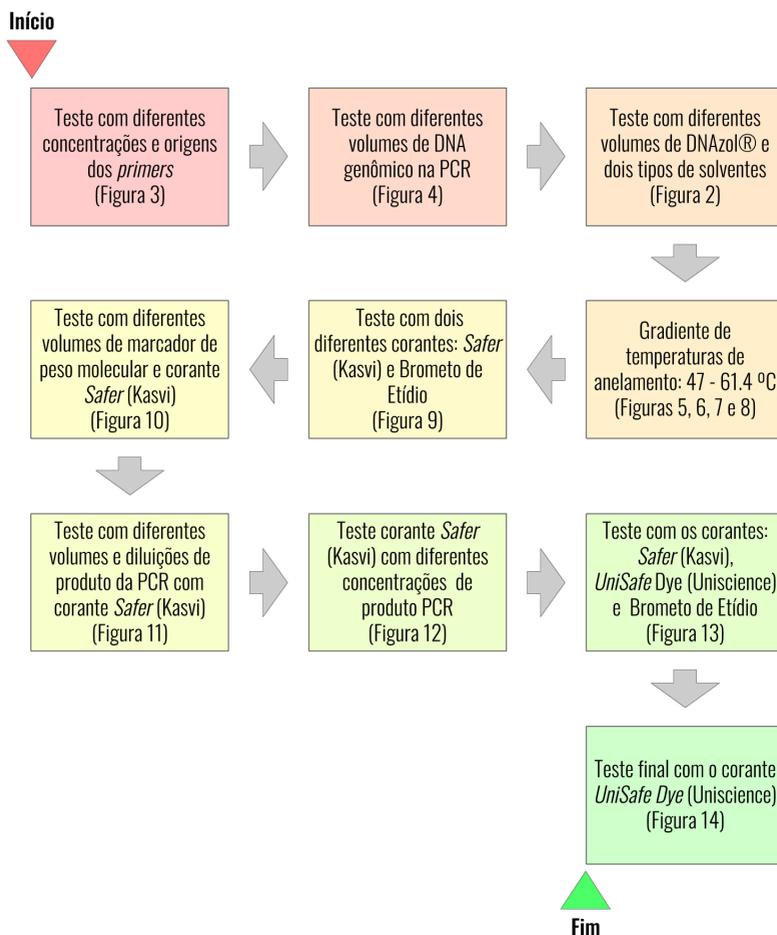
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, nas figuras que ilustram os resultados obtidos, utilizaremos a seguinte denominação para identificação dos três diferentes genótipos referentes a cada um dos dois marcadores, AT3-I/D e PV92-Alu, aqui analisados: “11” quando se observa a presença dos dois alelos de menor peso molecular, ou seja, quando o indivíduo é homocigoto para o alelo correspondente à banda baixa; “22” quando há a presença dos dois alelos de maior peso molecular, ou seja, genótipo homocigoto para a banda alta; e “12” quando se observa a presença de um alelo de maior e outro de menor peso molecular, ou seja, genótipo heterocigoto com bandas alta e baixa. É importante lembrar que o marcador AT3-I/D apresenta dois alelos, sendo o alelo 1 de 496 pares de base (pb) e o alelo 2 de 572 pb. Já o marcador PV92-Alu apresenta o alelo 1: ~150 pb e 2: ~450 pb (ver Quadro 1).

A sequência experimental aqui apresentada, agrupada por técnicas (ou seja Extração de DNA, PCR e Eletroforese), não equivale a sequência experimental feita cronologicamente. Por esse motivo, um diagrama foi elaborado e pode ser visto a seguir (Figura 1) apresentando a sequência cronológica dos testes feitos. Após cada teste, as variáveis testadas foram sendo ajustadas conforme seguíamos para o teste seguinte. Nas notas de cada figura, nos resultados em sequência, é possível consultar as condições específicas de cada teste. As amostras de DNA genômico usadas nos testes, feitos sem duplicata, possuíam genótipo previamente conhecido.

Todos os testes aqui apresentados foram feitos com o marcador AT3-I/D, com exceção das figuras 9 e 13, que incluem o marcador PV92-Alu e a figura 10 que se refere a um teste com o marcador de peso molecular (*Ladder*). Os testes e padronizações feitos com o marcador AT3-I/D, que era o que apresentava maiores dificuldades históricas em nosso Projeto para sua amplificação, foram imediatamente utilizadas para padronizações de protocolo do marcador PV92-Alu que respondeu bem a tais modificações.

Figura 1 – Diagrama esquemático da sequência cronológica dos testes



4.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO HUMANO

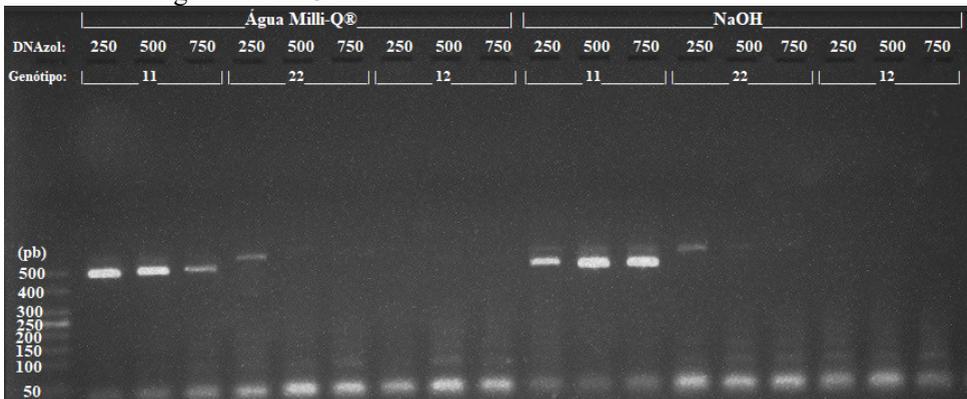
Na ficha de dados do kit DNAzol®, para extração de DNA genômico, é altamente recomendado pelo fabricante o uso de NaOH no processo de diluição final do DNA. Há ainda na mesma ficha um alerta sobre a não solubilização total do DNA em água (LIFE TECHNOLOGIES, 2001). No entanto, dados não publicados do

Laboratório de Genética do Comportamento (LGC) sobre o uso deste mesmo reagente para extração de DNA animal, indicavam que a água era um bom solvente, enquanto que o NaOH poderia ter influência prejudicial em uma posterior reação de PCR.

Por esse motivo, decidiu-se testar se há interferência destes dois tipos de solventes na solubilização do DNA extraído através do presente protocolo, e se isso geraria alteração na qualidade das bandas dos produtos de PCR observados no gel. Simultaneamente decidiu-se testar diferentes volumes de DNAzol® no processo de extração do DNA humano.

Os resultados do teste com diferentes volumes de DNAzol® utilizados (250, 500 e 750 µL) na extração de DNA genômico e variando o tipo de solvente (água Milli-Q® ou NaOH) no qual a amostra final de DNA é diluída, podem ser vistos a seguir:

Figura 2 – Teste com diferentes volumes de DNAzol® (250, 500 e 750 µL) e dois tipos de solventes (Água Milli-Q ou NaOH) utilizando o marcador genético AT3-I/D



Marcador genético utilizado: AT3-I/D. Os números 250, 500 e 700 representam os volumes de DNAzol® em µL. As nove primeiras amostras tiveram suas diluições finais em água Milli-Q® e as nove últimas em NaOH (8 mM). Na reação de PCR foram utilizados 9 µL de DNA genômico e concentração dos *primers* a 0,4 µM.

Ao observar a figura 2, é possível perceber, comparando os solventes água Milli-Q® e NaOH, que as amostras que amplificaram geraram bandas de qualidade semelhante. Apesar disso, o tipo de solvente Água Milli-Q® pareceu apresentar, em menores concentrações de DNAzol®, melhores resultados, assim como em maiores

concentrações o solvente NaOH apresentou bandas mais fortes. No entanto bandas inespecíficas para o genótipo 11 foram mais evidentes nos tratamentos com NaOH. É possível concluir que, apesar de no protocolo do kit DNAzol® haver o alerta sobre a não solubilização total do DNA em água, nenhuma interferência importante foi detectada no presente experimento. Na literatura, alguns artigos apresentam protocolos que usam, na suspensão final de DNA, água Milli-Q® ou até mesmo água destilada estéril (MADHAD; SENTHEIL, 2015; TAN; YIAP, 2009). Consideramos que, por questão de economia e eficiência, o uso de água deveria ser mantido.

Em relação aos volumes de DNAzol® testados, conforme observado na mesma figura, as amostras de genótipo 22 amplificaram com todas as quantidades testadas, independentemente do solvente. Já as amostras de 11, amplificaram apenas quando extraídas com 250 µL de DNAzol®, independentemente do solvente. Levando em conta essas observações, consideramos que o uso de 250 µL de reagente apresentou melhores resultados.

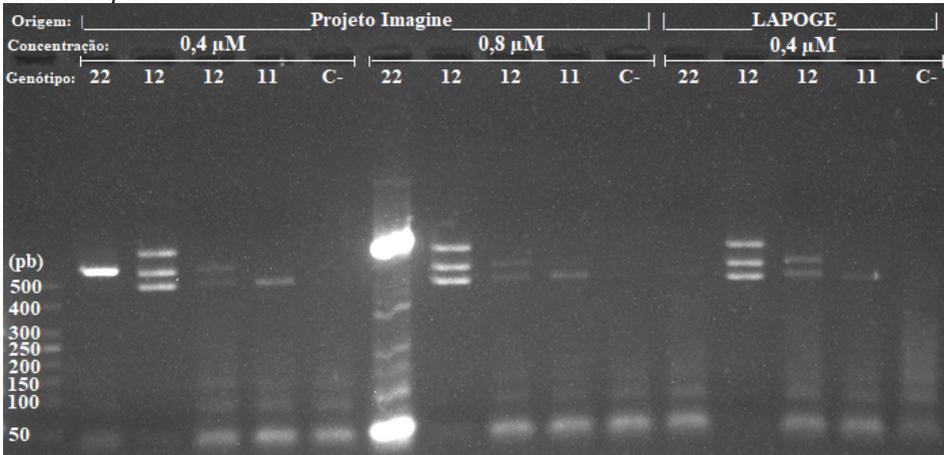
A partir desse experimento, por uma questão de economia e eficiência, decidiu-se alterar a quantidade de DNAzol® do protocolo inicial de 500 para 250 µL e manter a solubilização em água Milli-Q®, assim como vinha sendo realizado na extração de DNA animal havia alguns anos.

4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Conforme o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima aqui utilizada (Taq-polimerase), a concentração recomendada de cada um dos pares de *primers* na reação de PCR pode variar entre 0,1 e 1,0 µM (PROMEGA CORPORATION, 2018), sendo a mesma faixa de concentração também recomendada na literatura (BUTLER, 2012). No protocolo inicial do Projeto Imagine, a concentração utilizada dos *primers* na reação final era de 0,8 µM. Nos protocolos utilizados no LAPOGE, que colaborou conosco ao longo de todo presente projeto, os mesmos *primers* eram utilizados em uma concentração final de 0,4 µM. Desse modo, decidiu-se testar os *primers* do estoque do Projeto Imagine nas duas concentrações mencionadas, bem como utilizar uma alíquota de *primers* doados pelo LAPOGE a 0,4 µM.

Os resultados do teste com duas diferentes concentrações (0,4 e 0,8 µM) e com os *primers* de duas origens distintas (Projeto Imagine e LAPOGE), podem ser vistos a seguir:

Figura 3 – Teste com diferentes concentrações (0,4 e 0,8 μM) e origens dos *primers* utilizando o marcador AT3-I/D



Marcador genético utilizado: AT3-I/D. 0,4 e 0,8 μM : concentrações dos *primers* nas reações de PCR. Dez primeiras amostras: com *primers* do Projeto Imagine, em concentrações distintas. Cinco últimas amostras: com *primers* doados pelo Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da UFSC. (C-): controle negativo, utilizando água Milli-Q® no lugar do DNA genômico.

A partir da figura 3 é possível observar, nas amostras do Projeto Imagine com 0,4 e 0,8 μM , uma qualidade levemente superior na nitidez das bandas com 0,4 μM . Por essa razão e por uma questão de economia, decidiu-se alterar a concentração original do Projeto Imagine de 0,8 para 0,4 μM . No que diz respeito às reações com 0,4 μM de concentração, na figura 3, tanto aquelas testadas com *primers* estocados no LGC/Projeto Imagine quanto aquelas com *primers* estocados do LAPOGE, apresentaram intensidades semelhantes de brilho, com uma diferença observada apenas no genótipo 22, por uma possível falta de DNA genômico na 12ª amostra e excesso na 6ª, causadas por falha técnica. Considerando as outras amostras, esse teste indicou que os *primers* do Projeto Imagine estavam funcionando de forma adequada, levemente superior aos observados com os *primers* do LAPOGE.

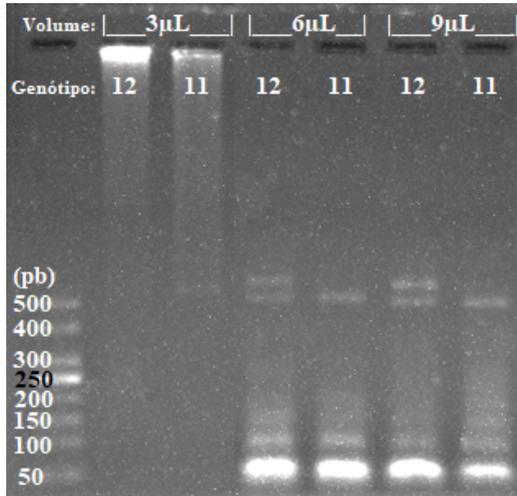
Ainda na figura 3, podemos observar que, para o marcador AT3-I/D, o genótipo heterozigoto 12 apresenta os dois alelos esperados, um mais curto com um tamanho de 496 pb, e um mais longo com um tamanho de 572 pb (MUNIZ, 2008). Além desses dois tamanhos esperados, podemos perceber que, nos primeiros indivíduos 12 (amostras 2, 7 e 12) uma terceira banda inespecífica acima da banda de

572 pb é observada, com mais de 700 pb. No presente trabalho, alguns géis mostrados a seguir trarão essa banda inespecífica de amostras de indivíduos diferentes, mas genotipicamente iguais (12). É importante que consideremos aqui apenas as duas bandas específicas (de 572 e 496 pb) abaixo da inespecífica. Possíveis soluções para esse problema de inespecificidade, não testadas no presente trabalho, seriam o sequenciamento para identificação do que são esses fragmentos maiores ou ainda o aumento da temperatura de anelamento dos *primers*.

Considerando a baixa concentração da maioria das amostras de DNA genômico extraídas com o protocolo do Projeto Imagine, que encontram-se quase sempre na faixa de 0 a 5 ng/ μ L, e com o objetivo de melhorar o brilho e qualidade das bandas, decidiu-se testar maiores volumes de DNA genômico usados na reação de PCR. Deve-se notar que, em função da natureza da utilização do presente protocolo, em comunidades ou salas de aula que não dispõem de aparelhos de medição de concentração de DNA, nosso objetivo é usar DNA humano sem dosagem prévia e sem ajuste nas suas concentrações originais.

Os resultados do teste com diferentes volumes de DNA genômico (3, 6 ou 9 μ L) na reação de PCR podem ser vistos a seguir (Figura 4). As amostras 12 e 11, testadas na figura 4, foram dosadas por espectrofotometria e possuíam uma concentração de aproximadamente 1 ng/ μ L de DNA genômico.

Figura 4 – Teste com diferentes volumes de DNA genômico na reação de PCR, utilizando o marcador AT3-I/D



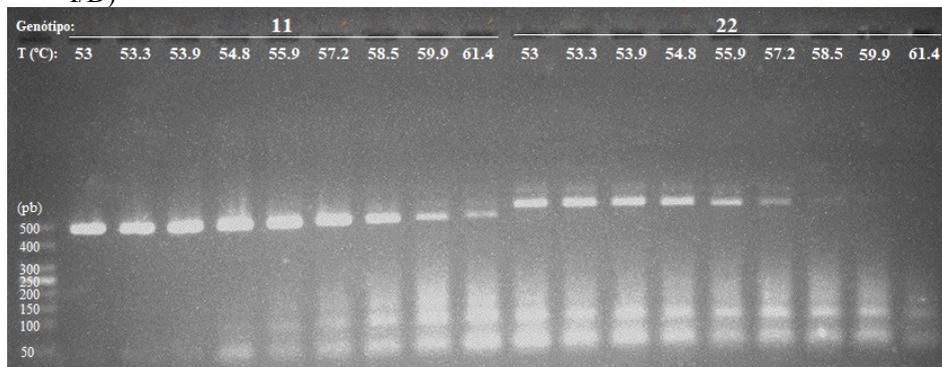
Marcador genético utilizado: AT3-I/D. Os números de 3, 6 e 9 µL representam os volumes de DNA genômico nas reações de PCR. A concentração de *primers* utilizada foi de 0,4 µM.

Na figura 4 podemos observar que o aumento no volume de DNA genômico utilizado na reação de PCR gerou um aumento no brilho das bandas. As amostras com 3 µL de DNA apresentaram bandas muito fracas e de difícil identificação dos genótipos. Em protocolos típicos de amplificação por PCR, a concentração ótima de DNA genômico na reação de PCR pode variar de 1 a 10 ng (BUTLER, 2012).

Considerando os resultados obtidos a partir da figura 3, decidiu-se alterar o volume de DNA genômico de 3µL, utilizado originalmente no protocolo do Projeto Imagine, para 9 µL por reação. Sendo assim, para manter o volume total final da reação de 25 µL, com o aumento no volume de DNA genômico adicionado, houve a compensação através da diminuição do volume acrescentado de água Milli-Q® na reação, que passou de 14,37 para 8,37 µL.

Para identificação de possíveis problemas na temperatura de anelamento, testes de gradiente de temperaturas foram feitos e seus resultados podem ser observados nas figuras 5, 6, 7 e 8 a seguir.

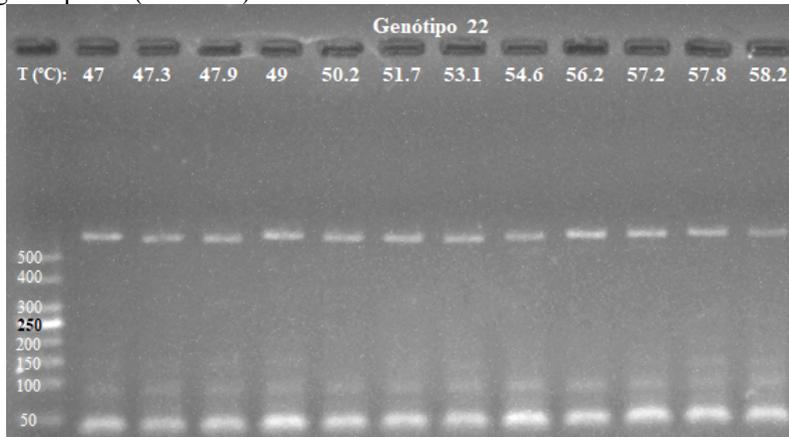
Figura 5 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 53-61.4 °C (AT3-I/D)



Marcador genético utilizado: AT3-I/D. Os números de 53 a 61.4 são as temperaturas de anelamento (em °C) utilizadas em cada uma das reações. Durante a extração utilizou-se 250 µL de DNAzol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 µM e o volume de DNA genômico de 9 µL.

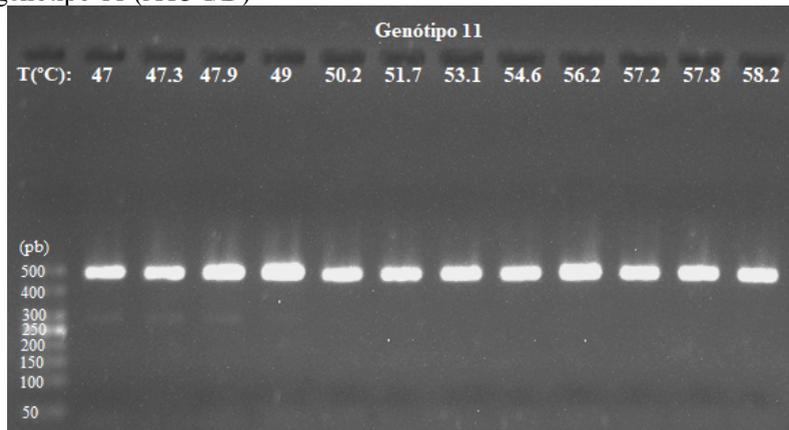
Como verificamos, a partir da figura 5 que temperaturas mais altas que 58 °C resultaram na não amplificação com o genótipo 22, os testes seguintes foram realizados em uma faixa mais baixa de temperatura de 47 a 50 °C.

Figura 6 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 47-58.2 °C com genótipo 22 (AT3-I/D)



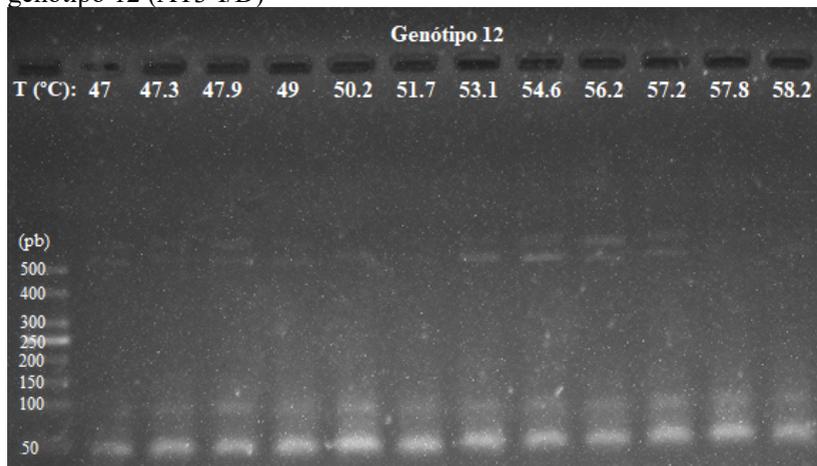
Marcador genético utilizado: AT3-I/D, genótipo HA. Os números de 47 a 58.2, são as temperaturas de anelamento (em °C) utilizadas em cada uma das reações. Durante a extração utilizou-se 250 µL de DNAzol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 µM e o volume de DNA genômico de 9 µL.

Figura 7 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 47-58.2 °C com genótipo 11 (AT3-I/D)



Marcador genético utilizado: AT3-I/D, genótipo HB. Os números de 47 a 58.2, são as temperaturas de anelamento (em °C) utilizadas em cada uma das reações. Durante a extração utilizou-se 250 µL de DNAzol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 µM e o volume de DNA genômico de 9 µL.

Figura 8 – Gradiente de temperaturas de anelamento: 47-58.2 °C com genótipo 12 (AT3-I/D)



Marcador genético utilizado: AT3-I/D, genótipo HE. Os números de 47 a 58.2, são as temperaturas de anelamento (em °C) utilizadas em cada uma das reações. Durante a extração utilizou-se 250 µL de DNazol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 µM e o volume de DNA genômico de 9 µL.

Conforme os procedimentos clássicos de PCR (KRAMER; COEN, 2001) e em acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante da Taq-polimerase aqui utilizada, a temperatura de anelamento recomendada deve ser ajustada idealmente para cada par de *primers*, podendo variar de 42 a 65 °C (PROMEGA CORPORATION, 2018). Isso ocorre devido às propriedades de hibridização diferentes das sequências iniciadoras (BUTLER, 2012). Ferramentas disponíveis na internet possibilitam calcular as temperaturas teóricas ideais de anelamento com base nas sequências dos *primers*. Segundo a *Tm Calculator*, a temperatura ideal de anelamento para os *primers* do marcador AT3-I/D é 48 °C e para o marcador PV92-Alu é 48,6 °C. Ainda se sugere que, para uma otimização da temperatura de anelamento, é recomendado um teste de gradiente de temperaturas para determinação empírica (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017).

A partir de nossos testes de gradiente das temperaturas de anelamento (figuras 5, 6, 7 e 8), foi possível observar que a alteração na temperatura interferiu na amplificação, alterando a qualidade das bandas no gel. As amostras dos géis testando 11 e 22 apresentaram-se mais brilhantes e com bandas mais definidas do que 12. Essa variação

provavelmente ocorreu devido à variações circunstanciais no momento da extração do DNA genômico que são características do presente protocolo. Para 12 (Figura 8) apenas dentro da faixa entre aproximadamente 53 a 57 °C foi possível perceber uma amplificação razoável. Na figura 7, é possível observar ainda que em temperaturas menores ou iguais a 48 °C, uma sutil banda inespecífica aparece na altura de 300 pb. Considerando essas observações, definiu-se que a temperatura de anelamento ideal, para nossas condições específicas, seria 55 °C. Esta também foi aplicada para o marcador PV92-Alu por questões práticas na execução da técnica de PCR. Testes subsequentes não publicados mostraram que essa temperatura mostrou-se adequada aos dois marcadores.

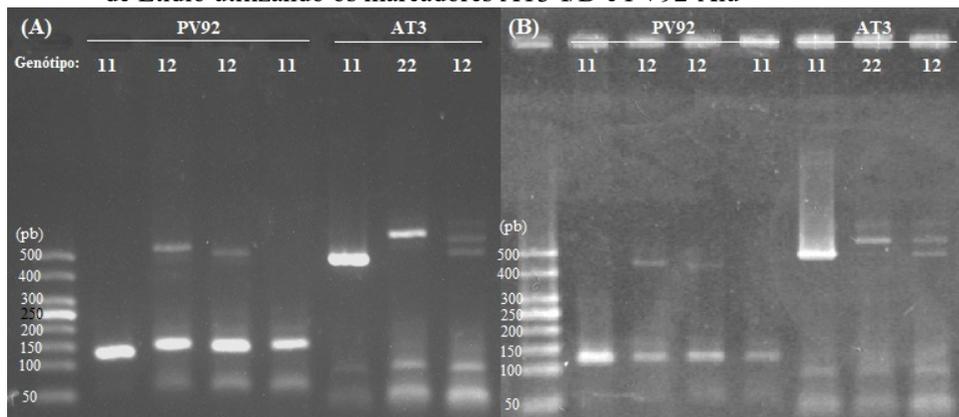
4.3 ELETROFORESE

No decorrer dos testes anteriores, percebeu-se, em alguns momentos, que a altura das bandas no gel estavam sofrendo interferência durante a corrida, pois as mesmas não eram encontradas nas posições esperadas em função do seu tamanho conhecido em pares de base, quando comparadas à referência de peso molecular. Além disso, como pode ser observado nas figuras 1, 2, 4 e 5, frequentemente amostras de genótipos idênticos, mesmo migrando lado a lado, produziram bandas com alturas diferentes, o que é incompatível com os princípios da eletroforese.

Nossa hipótese foi a de que o corante de DNA que vinha sendo usado estava de alguma forma interferindo na velocidade de migração das bandas.

Por esse motivo, testes foram feitos para comparar a altura de amostras geneticamente idênticas, utilizando-se o corante *Safer* (Kasvi) e o corante clássico Brometo de Etídio, utilizado aqui como controle positivo (Figura 9). O Brometo de Etídio é bastante perigoso por ser altamente mutagênico, sua manipulação exige muitos cuidados (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014). Por envolver públicos-alvo como comunidades ou sala de aula, esse corante não é uma opção viável para o presente protocolo.

Figura 9 – Teste com dois diferentes corantes: *Safer* (Kasvi) e Brometo de Etídio utilizando os marcadores AT3-I/D e PV92-Alu



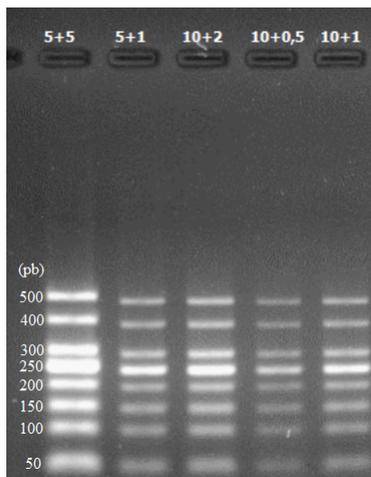
Marcadores genéticos utilizados: AT3-I/D e PV92-Alu. Corantes utilizados: (A) *Safer* (Kasvi) e (B) Brometo de Etídio. Durante a extração utilizou-se 250 μ L de DNazol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 μ M, volume de DNA genômico de 9 μ L e temperatura de anelamento de 55 $^{\circ}$ C.

Conforme presumido, é possível observar nos resultados da figura 9 que o corante *Safer* (Kasvi), em algumas ocasiões, é capaz de alterar a altura da banda de amostras geneticamente idênticas, interferindo na fidelidade da genotipagem. Pode ser observado na 2^a e 3^a amostras (A), com genótipos 12 referentes ao marcador PV92-Alu, que a banda do alelo mais alto (de 450 pb) encontra-se em uma altura maior que 500 pb. Ainda na mesma figura, nos genótipos referentes ao marcador AT3-I/D, a segunda (22) e terceira (12) amostra possuem tamanhos maiores do que os tamanhos de fragmentos esperados para seus alelos. Comparativamente, no gel com o corante Brometo de Etídio (B), todos os tamanhos de fragmentos dos genótipos testados apresentaram alturas dos tamanhos esperados.

Após entrar em contato com a empresa responsável pela produção do corante *Safer*, mostrando os dados obtidos na figura 9, obtivemos a resposta de que estaríamos utilizando quantidades desse corante adicionado ao marcador de peso molecular erradas e que isso afetaria a nossa correta genotipagem, pois alteraria a posição correta das bandas de referência de peso molecular. A proporção indicada pelo

fabricante era de 5 μ L de marcador de peso molecular misturado com 1 μ L do corante. Em momentos anteriores e no gel da figura 9, chegamos a utilizar uma proporção de 3:2 na tentativa de tornar o marcador de peso molecular mais brilhante. Por esse motivo, testamos em seguida diferentes quantidades de corante de DNA e de marcador de peso molecular para testar se as proporções destes dois componentes podem alterar as alturas das bandas (Figura 10).

Figura 10 – Teste com diferentes volumes de marcador de peso molecular e corante *Safer* (Kasvi)



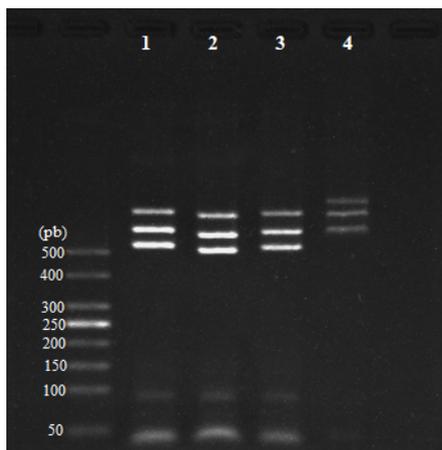
Volume de Corante e Marcador de peso molecular (μ L): (x + y) onde x = volume do marcador de peso molecular e y = quantidade de corante *Safer* (Kasvi).

Podemos observar na figura 10 que a proporção de DNA e corante podem afetar a corrida do DNA no gel. Todas as amostras de marcador de peso molecular, do segundo ao quinto poço, apresentaram as mesmas alturas de banda para todas as proporções testadas. Porém, a primeira amostra apresenta todas as bandas levemente acima, provavelmente devido à interferência da maior proporção de corante. Sugere-se que, diferente das grandes, as variações pequenas na proporção não afetam na migração dos fragmentos.

Seguindo a recomendação do fabricante de utilização de 1 μ L de corante a cada 5 μ L de amostra contendo no mínimo de 20ng de DNA (KASVI, 2015), decidiu-se então fazer testes com diferentes

volumes e diluições de produto PCR ou corante (figura 11). Nesse teste, quatro diferentes proporções de produto PCR, água e corante *Safer* (Kasvi), foram testadas, sendo elas: (1) 5:0:1; (2) 10:0:1; (3) 5:5:1 e (4) 1:9:1. A amostra de DNA utilizada, de genótipo HE (AT3-I/D), foi dosada e apresentava 251 ng/μL, portanto, bem mais do que o mínimo indicado pelo fabricante.

Figura 11 – Teste com diferentes volumes e diluições de produto da PCR com corante *Safer* (Kasvi) com marcador AT3-I/D (genótipo 12)



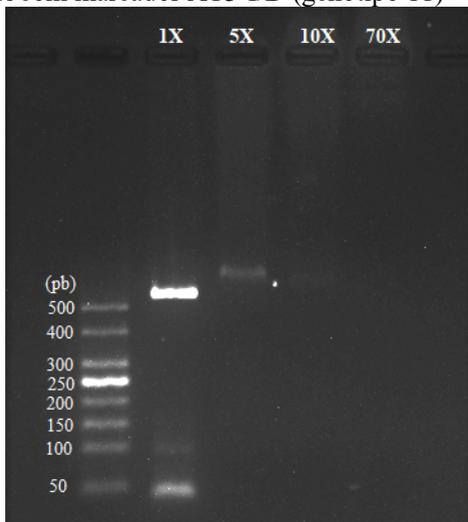
Marcador genético utilizado: AT3-I/D, genótipo HE. Diferentes proporções de produto PCR, água e corante Safer (Kasvi) onde (1) 5:0:1; (2) 10:0:1; (3) 5:5:1 (4) 1:9:1. Dosagem da amostra: 251 ng/ μL. Durante a extração utilizou-se 250 μL de DNAzol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 μM, volume de DNA genômico de 9 μL e temperatura de anelamento de 55 °C.

Apesar de a amostra 1 corresponder exatamente às proporções de DNA/corante indicadas pelo fabricante, observa-se que ela se apresentou acima dos tamanhos esperados dos fragmentos para o genótipo 12 (AT3-I/D), que deveria apresentar duas bandas específicas de 496 e 572 pb (além da banda inespecífica mais alta, já observada anteriormente). Já a amostra 2, que tinha o dobro do volume de produto PCR em relação ao recomendado, para 1μL de corante, apresentou a altura correta dos fragmentos. Na amostra 3, o produto de PCR foi diluído e apresentou um desvio das bandas para cima, assim como o que ocorreu na amostra 1. Em relação à amostra 4, com o produto PCR diluído 10 vezes, é possível perceber um grande desvio na altura dos

fragmentos, muito acima dos tamanhos esperados. A partir desse teste é possível concluir que há alterações produzidas pelo corante na altura das bandas, corroborando com a hipótese de que variações na proporção de DNA/corante *Safer* (Kasvi) alteram a velocidade de migração dos fragmentos.

Em seguida, com o objetivo de continuar corroborando nossa hipótese, diluições de 1, 5, 10 e 70 vezes de produto de PCR foram feitas, a partir de uma amostra previamente dosada com 276 ng/ μ L (Figura 12), para avaliar o quanto a proporção entre DNA e corante altera a altura das bandas e, além disso, verificar se a quantidade mínima de DNA recomendada pelo fabricante (20 ng de DNA em 5 μ L de amostra, ou seja, 4 ng/ μ L de DNA) seria de fato suficiente para a realização da genotipagem. Nem todos os casos, a quantidade de corante utilizada foi de 1 μ L para 5 μ L de produto de PCR, nas diferentes diluições.

Figura 12 – Teste corante *Safer* (Kasvi) com diferentes concentrações de produto PCR com marcador AT3-I/D (genótipo 11)



Marcador genético utilizado: AT3-I/D. Diluições: (1X) = 276 ng/ μ L; 5X = 55,2 ng/ μ L; 10X = 27,6 ng/ μ L; 70X = 4 ng/ μ L. Quantidade de corante utilizada: 1 μ L de Safer (Kasvi) para 5 μ L de produto PCR. Durante a extração utilizou-se 250 μ L de DNAzol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 μ M, volume de DNA genômico de 9 μ L e temperatura de anelamento de 55 °C.

Na figura 12, é possível ver que as amostras com diluições de 1X e 5X, que deveriam estar próximas à posição de 500 pb, apareceram a aproximadamente 600 e 700 pb, respectivamente. É importante observar que, essas duas amostras respeitaram o limite mínimo de nanogramas de DNA estabelecido pelo fabricante e, apesar disso, sofreram alterações significativas em suas corridas. Já as diluições de 10X e 70X, que também respeitam esse limite mínimo (sendo que a de 70X corresponde exatamente a ele), mostram claramente que os dados do protocolo proposto pelo fabricante do corante *Safer* (Kasvi) não conferem. O corante só não interferiu novamente na corrida dos fragmentos, como pode ser observado na amostra de 10X, como também não corou os fragmentos com limite mínimo estabelecido, conforme observado na amostra com diluição de 70X.

Ao longo desse e de outros experimentos, percebeu-se que bandas mais fracas, e portanto, com menores quantidades de DNA, estavam mais sujeitas a sofrerem uma interferência, neste caso de desaceleração de corrida, pelo corante *Safer* (Kasvi) durante a eletroforese.

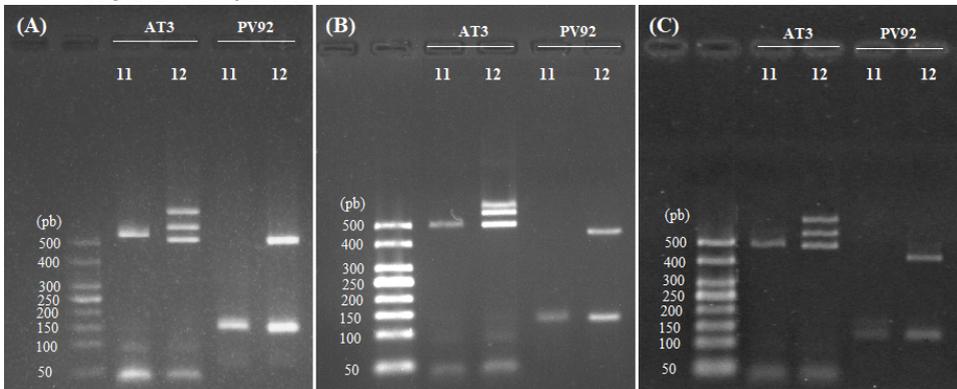
Com as figuras 11 e 12 analisadas conjuntamente, é possível concluir que, conforme aumentamos a proporção de corante para uma igual ou menor quantidade de produto PCR, há alteração da altura da banda em direção ao poço de origem da amostra, indicando um retardo na migração dos fragmentos pelo gel.

No protocolo de um dos corantes intercalantes de DNA mais amplamente utilizados, GelRed®, é mencionado que os mesmos corantes podem afetar a migração do DNA durante a eletroforese. Sendo assim, recomendam como alternativa a pós-coloração do gel (BIOTIUM, 2009), ou seja, com banho do gel contendo amostra já migradas, em solução de corante.

Apesar da metodologia de aplicação do corante *Safer* (Kasvi), que mistura o corante e a amostra no momento de aplicação no gel, ser ideal para o perfil do Projeto Imagine, ela mostrou-se falha. Por esse motivo, procuramos outra opção de corante intercalante de DNA, que não dependesse de um banho após a eletroforese, sem interferir na corrida das amostras. Levamos em consideração em nossa escolha, a característica de rapidez na execução e o não uso substâncias nocivas, como os diversos corantes intercalantes seguros e não mutagênicos disponíveis comercialmente, excluindo também, como já mencionado, a possibilidade do uso do Brometo de Etídio.

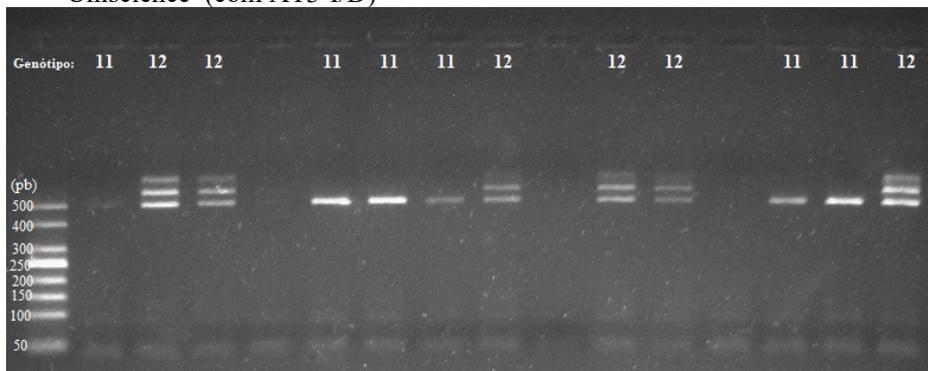
Como alternativa resolveu-se testar o corante UniSafe Dye (20,000x) Uniscience (Figuras 12 e 13) que propõem a opção de coloração pré-corrida dos próprios géis de agarose (UNISCIENCE, 2015). Na figura 12, três corantes foram utilizados: (A) *Safer* (Kasvi), (B) UniSafe Dye (20,000x) Uniscience e (C) Brometo de Etídio, como controle positivo. No gel com Unisafe, utilizou-se, conforme recomendações do fabricante, 5 μ L de corante para cada 100 mL de gel de agarose. Já na figura 13, várias amostras diferentes foram testadas utilizando o corante UniSafe Dye (20,000x) Uniscience.

Figura 13 – Teste com os corantes: *Safer* (Kasvi), UniSafe Dye (20,000x) Uniscience e Brometo de Etídio utilizando os marcadores AT3-I/D e PV92-Alu



Marcadores genéticos utilizados: AT3-I/D e PV92-Alu. (A) com corante *Safer* (Kasvi); (B) com corantes UniSafe Dye (20,000x) Uniscience; (C) com corante Brometo de Etídio. Durante a extração utilizou-se 250 μ L de DNazol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 μ M, volume de DNA genômico de 9 μ L e temperatura de anelamento de 55 $^{\circ}$ C.

Figura 14 – Teste final com o corante UniSafe Dye (20,000x) Uniscience (com AT3-I/D)



Marcador genético utilizado: AT3-I/D. Utilizou-se, conforme recomendações do fabricante, 5 μ L de corante para cada 100 mL de gel de agarose. Durante a extração utilizou-se 250 μ L de DNazol e solvente Água Milli-Q. Na PCR utilizou-se na reação a concentração de *primers* de 0,4 μ M, volume de DNA genômico de 9 μ L e temperatura de anelamento de 55 $^{\circ}$ C.

A partir das figuras 13 e 14 é possível perceber que o corante Unisafe Dye (Uniscience) mostrou-se um bom substituto ao corante anteriormente utilizado em nosso protocolo. Ele apresentou um brilho de qualidade, não interferindo na corrida dos fragmentos e portanto, não gerando distorção nas alturas das bandas. Por essa razão, em nosso protocolo, decidiu-se alterar o corante *Safer* (Kasvi) pelo corante da marca UniSafe Dye (20,000x) Uniscience. A partir da figura 14 é possível perceber que as doze diferentes amostras foram amplificadas e migraram de forma ideal no gel. Esse resultado aponta que os testes e padronizações das técnicas aqui efetuadas de fato foram eficientes.

5 CONCLUSÕES

A partir dos experimentos apresentados, o volume de DNAzol® usado durante a extração do DNA humano foi alterado de 500 para 250 μL . Foi mantida a solubilização final em água Milli-Q®. Houve a alteração na concentração de cada um dos *primers*, que passou de 0,8 para 0,4 μM . O volume de DNA genômico inserido na reação de PCR foi alterado de 3 para 9 μL , sendo compensado pela diminuição do volume de água Milli-Q®. A temperatura de anelamento foi outra variável otimizada, passando de 58 para 55 °C, em ambos os marcadores (AT3-I/D e PV92-Alu). Ao observar que o corante *Safer* (Kasvi), em algumas ocasiões, altera a altura de bandas no gel de agarose, interferindo na fidelidade da genotipagem, buscou-se uma nova alternativa, onde o corante Unisafe Dye (Uniscience) mostrou-se um bom substituto.

Com os resultados aqui obtidos, a imediata modificação e atualização dos protocolos será feita, para que eles estejam disponíveis à aplicação direta em comunidades e em sala de aula, bem como no site do Projeto Imagine, para que assim sejam amplamente utilizados para fins de ensino e divulgação científica.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Analisando células, moléculas e sistemas. In: **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 463–483.
- ANALYTIK JENA. **BlackPREP Swab DNA Kit**. Disponível em: <<https://www.analytik-jena.de/en/life-science/products/prod/cat/isolation-of-genomic-dna/prod/blackprep-swab-dna-kit.html>>. Acesso em: 8 out. 2018.
- ANDRADE, M. A. B. S. DE; CALDEIRA, A. M. D. A. O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o Ensino de Biologia. **Filosofia e História da Biologia**, v. 4, p. 139–165, 2009.
- BARTON, M.; LIEBERMAN, M. A. An optional laboratory in molecular techniques as an aid in the teaching of medical biochemistry. **Biochemical Education**, v. 27, n. 3, p. 150–152, 1999.
- BIOTIUM. **Product Information: GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X in Water**. Disponível em: <<https://arboretum.harvard.edu/wp-content/uploads/GelRed-stain.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.
- BONILLA, C. et al. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. **Annals of Human Genetics**, v. 68, n. 2, p. 139–153, 2004.
- BUTLER, J. M. PCR Amplification: Capabilities and Cautions. In: **Advanced Topics in Forensic DNA Typing**. Waltham: Elsevier, 2012. p. 69–97.
- CARVALHO, H.; RECCO-PIMENTE, S. M. Métodos de estudo da célula. In: **A célula**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2013. p. 55–94.

CASLA, A. V.; ZUBIAGA, I. S. Paternity testing in a PBL environment. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 38, n. 1, p. 37–42, 2010.

DOLAN DNA LEARNING CENTER. **Using an Alu Insertion Polymorphism to Study Human Populations**. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/gse:2002009>>. Acesso em: 10 set. 2018.

FALTEISEK, L.; ČERNÝ, J.; JANŠTOVÁ, V. A Simplified Technique for Evaluating Human CCR5 Genetic Polymorphism. **The American Biology Teacher**, v. 75, n. 9, p. 704–707, nov. 2013.

GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER. **How to extract DNA from anything living**. Disponível em: <<https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/howto/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

GRIFFITHS, A. F. et al. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008.

HEARN, R. P.; ARBLASTER, K. E. DNA extraction techniques for use in education. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 38, n. 3, p. 161–166, 2010.

HEPP, DIEGO; NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS – Campus Porto Alegre**, p. 114–124, dez. 2016.

KASVI. **CORANTE NÃO MUTAGÊNICO SAFER**. Disponível em: <<https://kasvi.com.br/produtos/?ref=K9-16C&desc=corante-nao-mutagenico-safer.-frasco-com-1-ml>>. Acesso em: 21 out. 2018.

KRAMER, M. F.; COEN, D. M. Enzymatic amplification of DNA by the polymerase chain reaction: standard procedures and

optimization. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 2, p. 15.1.1.1–15.1.7., 2001.

LEE, S. V.; BAHAMAN, A. R. Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis, Gel Electrophoresis. In: **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**. Shanghai: InTech, 2012. p. 41–56.

LIFE TECHNOLOGIES. **DNazol® Reagent Protocol**. Disponível em: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/10503.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2018.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 1–15, 2012.

LUIZON, M. R. **Dinâmica da Mistura Étnica em Comunidades Remanescentes de Quilombo Brasileiras**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 24 out. 2007.

MADHAD, V. J.; SENTHEIL, K. P. The Rapid & Non-Enzymatic isolation of DNA from the Human peripheral whole blood suitable for Genotyping. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 236, n. 3, p. 199–207, 2015.

MUNIZ, Y. C. N. **Marcadores Genéticos de Ancestralidade em Comunidades Fundadas por Açorianos na Ilha de Santa Catarina**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 30 maio 2008.

NC DNA DAY. **5-Minute DNA Extraction**. Disponível em: <<http://ncdnaday.org/learn-more/resources-2/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

OLIVEIRA, A. E. P. C. DE. **Controlo e Garantia de Qualidade da Técnica de PCR**. [s.l.] Universidade do Porto, 2008.

PARDIÑAS, A. F. et al. Introducing human population biology through an easy laboratory exercise on Mitochondrial DNA.

Biochemistry and Molecular Biology Education, v. 38, n. 2, p. 110–115, 2010.

PEREZ-PONS, J. A.; QUEROL, E. A Laboratory Class Experiment Illustrating Basic Principles of DNA Cloning and Molecular Biology Techniques. **Biochemical Education**, v. 24, n. 1, p. 54–56, 1996.

PHILLIPS, A. R. et al. Aligning goals, assessments, and activities: An approach to teaching PCR and gel electrophoresis. **CBE Life Sciences Education**, v. 7, p. 96–106, 2008.

Projeto Imagine. Disponível em: <<http://projetoimagine.ufsc.br/>>. Acesso em: 5 set. 2018.

PROJETO IMAGINE. **Projeto Imagine dá exemplo de integração entre ensino, pesquisa e extensão**. Florianópolis: [s.n.]. Disponível em: <<http://projetoimagine.ufsc.br/projeto-imagine-da-exemplo-de-integracao-entre-ensino-pesquisa-e-extensao/>>.

PROMEGA. **Maxwell® RSC Buccal Swab DNA Kit**. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/products/dna-purification-quantitation/genomic-dna-purification/maxwell-rsc-buccal-swab-dna-kit/?catNum=AS1640>>. Acesso em: 8 out. 2018.

PROMEGA CORPORATION. **GoTaq® DNA Polymerase**. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-dna-polymerase-m300.pdf?la=pt-br>>. Acesso em: 19 out. 2018.

RAMOS, A. **Tem Cientista na Aldeia! O desafio da conexão dos saberes para além de fronteiras geográficas, étnicas e culturais**. Mesa-Redonda: Popularizando a ciência em um mundo Globalizado. **Anais...Porto Seguro: 68ª reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)**, 2016

RAMOS, A.; RAZZERA, G. Funding plea for rural lab outreach. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 198, 2014.

RAZZERA, G.; HOFMANN, P.; RAMOS, A. O projeto Imagine e os desafios da extensão sem fronteiras. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, p. 27–36, 2015.

RICARDO, E. C. Problematização e contextualização no ensino de Física. In: **Ensino de Física**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 29–47.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 4, p. 1–7, 2009.

SHRIVER, M. D. et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Human genetics**, v. 112, n. 4, p. 387–399, 2003.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Análise da Estrutura e da Expressão de Genes e Genomas. In: **Genética Molecular Humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 213–254.

STREICHER, H.; BRODTE, A. Introducing students to DNA: Identifying nutritional plants in a simple tried and tested laboratory experiment. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 30, n. 2, p. 104–105, 2002.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1–10, 2009.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Tm Calculator**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>>. Acesso em: 20 out. 2018.

UNISCIENCE. **UniSafe Dye (20.000x) - Solução para coloração de ácidos nucleicos** ®. Disponível em: <http://uniscience.com.br/uploads/arquivos/UniSafe_Dye_UNI_R01_031.pdf>. Acesso em: 21 out. 2018.

VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, maio 2002.

WAGONER, S. A.; CARLSON, K. A. DNA Fingerprinting in a Forensic Teaching Experiment. **The American Biology Teacher**, v. 70, n. 6, p. 29–33, 2008.

WATSON, J.; CRICK, F. Molecular structure of nucleic acids. **Nature.**, v. 171, n. 4356, p. 737–8, 1953.

XAVIER, C. S.; CAVALCANTI, D. P. Desenvolvimento de um kit didático de eletroforese para o ensino prático de Biologia Molecular na educação básica e superior. **Revista de Ensino de Bioquímica**, v. 15, p. 49, 2017.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Técnicas de Biologia Molecular. In: **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZÔMPERO, A.; LABURÚ, C. Atividades investigativas no ensino de ciências: aspectos históricos e diferentes abordagens. **Rev. Ensaio**, v. 13, n. 03, p. 67–80, 2011.

ANEXO A – Protocolos pertinentes do Módulo: “DNA, diversidade e hereditariedade”.

O DNA Humano



Objetivo Geral

Realizar, de forma simplificada, um processo de extração de DNA humano.

Objetivos Específicos

- 1) Demonstrar que seres humanos, assim como as plantas, também possuem DNA e que este também pode ser extraído.
- 2) Perceber que existem formas diferentes de se extrair DNA, bem como outros componentes das células.
- 3) Compreender que nem sempre poderemos ver a olho nu as moléculas que purificamos

Material Necessário

- 1- Espátulas de madeira (uma para cada voluntário)
 - Centrífuga
 - Copos descartáveis
- 2- 10 mL de etanol absoluto gelado
 - 1 jaleco descartável por participante
 - 1 par de luvas de látex/pessoa

- 3- 1 micropipeta de 1000 μ L e ponteiras
- 4- Reagente para extração de DNA animal ou humano*
- 5- Solução de sacarose (1 colher de chá de açúcar em 100 mL de água)
- 6- Tubos de 1,5 mL (2 tubos por amostra)

* O presente protocolo foi otimizado para o reagente DNAzol da marca Invitrogen®, que utiliza 500 μ L por amostra. Outros reagentes podem ser usados, fazendo-se as necessárias adaptações, de acordo com as instruções do fabricante.



1

Dividindo Tarefas e Materiais

- Separar os participantes em dois grupos. Cada grupo terá um voluntário, que doará sua amostra de saliva, e um outro participante, que realizará o processo de extração de DNA do voluntário.
- Fornecer para cada grupo uma pipeta P1000, ponteiras, uma espátula de madeira, um copo descartável com 15 mL de solução de sacarose e 2 tubos de 1,5 mL.

2 Obtendo a Amostra

- Utilizando a espátula de madeira, o participante raspará, delicadamente, a mucosa bucal do voluntário, durante 10 segundos, em cada lado de dentro das bochechas. O participante conservará a espátula na mão, enquanto o voluntário realiza um bochecho.
- O voluntário deverá bochechar vigorosamente os 15 mL da solução de sacarose durante 30 segundos.



- O voluntário despejará o volume obtido no bochecho em um copo descartável, podendo colocá-lo no mesmo copo que já continha a solução.
- O participante mergulhará a espátula usada na raspagem dentro do líquido obtido no bochecho e deixará ali durante 2 minutos.

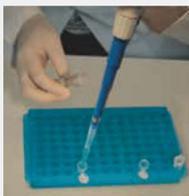
3 Separando o Material de Extração

- O participante transferirá 1 mL do volume obtido no passo anterior para um tubo de 1,5 mL e o centrifugará durante 5 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 500 g (ver especificações do fabricante).
- Com o auxílio de uma micropipeta, após a centrifugação desprezar o sobrenadante, deixando no tubo apenas o precipitado.

4 Extraindo o DNA

- Adicionar 500 μ L de DNAzol (ou o volume necessário de reagente de outra marca, se for o caso) a cada tubo.
- Homogeneizar bem invertendo várias vezes o tubo.
- Centrifugar por 10 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 12.400 g (ver especificações do fabricante).

Adicionando o
DNAzol.



Utilizando uma
centrífuga



Ampliando a Discussão!

Neste momento, enquanto se aguarda a centrifugação, você pode perguntar aos participantes o que eles acham que foi retirado da bochecha do voluntário. Seriam células? Onde está o DNA dentro dessas células? Qual poderia ser a função do reagente DNAzol no processo de extração do DNA?

- Pipetar o maior volume possível de sobrenadante e transferi-lo para um novo tubo de 1,5 ml.
- Sugestão: avisar que, no próximo passo, ao se colocar o álcool gelado no tubo, a nuvem de DNA aparecerá. Os participantes devem ficar bem atentos, pois às vezes a nuvem não é facilmente visível.
- Adicionar 500 μ L de etanol absoluto (100%) gelado, ao mesmo tempo em que se observa atentamente a formação da nuvem de DNA.



Ampliando a Discussão!

É possível propor aos participantes uma comparação entre a nuvem obtida nesta atividade e a nuvem observada anteriormente na extração de DNA do morango. Pode-se discutir a respeito das diferenças de tamanho e de natureza das amostras, bem como dos procedimentos adotados, lembrando que, embora tenha sido utilizado um reagente comercial para a extração de DNA humano, este deve apresentar a mesma função que o detergente e o sal utilizados para extrair DNA de morango.

A demonstração do protocolo de extração com todos os participantes finaliza aqui, mas ainda é possível fornecer uma explicação sobre os passos seguintes a serem realizados pelo aplicador do módulo (ver Anexo 1), em particular as lavagens com álcool 75% e a posterior conservação do DNA.

Anexo 1: Gerando material de discussão



Este processo será realizado por um dos aplicadores, sem a presença do público participante, já no primeiro dia de atividades, para gerar material de qualidade suficiente para garantir a discussão do último dia do módulo. O processo é composto por quatro etapas:

Etapa 1 - Extração de DNA de oito participantes voluntários.

Etapa 2 - Técnica de PCR para amplificação de dois marcadores moleculares a partir do DNA coletado.

Etapa 3 - Confeção de um gel de agarose a 1%, aplicação das amostras e corrida de eletroforese.

Etapa 4 - Observação e registro fotográfico do gel resultante da Etapa 3.

Etapa 1 - Extração de DNA

Objetivo Geral

Obter, através deste protocolo, amostras de DNA de voluntários para gerar material de qualidade para a discussão final com base em genótipos.

Material utilizado

O material será coletado de oito participantes voluntários pelo método de raspagem de tecido interno da bochecha. É imprescindível que se obtenha um termo de consentimento livre e esclarecido enfatizando que o material biológico obtido será utilizado somente para os fins de aprendizado no âmbito desta atividade educativa específica, sem finalidade de pesquisa presente ou futura.

Material Necessário

- 1 espátula de madeira para cada voluntário
- 2 copos descartáveis
- Centrífuga
- Etanol 75% gelado
- Etanol absoluto gelado
- Água miliQ (100 µL por amostra)
- Freezer
- Luvas e jaleco para o aplicador
- Microcentrífuga de baixa rotação do tipo spin (opcional)
- 1 micropipeta de 1000 µL e ponteiras
- Reagente para extração de DNA animal ou humano*
- Sacarose 3% (1 colher de chá de açúcar em 100 mL de água)
- Tubos de 1,5 mL do tipo eppendorf (2 tubos por amostra)
- Agitador tipo vórtex (opcional)

* O presente protocolo foi otimizado para o reagente DNAzol da marca Invitrogen®, que utiliza 500 µL por amostra. Outros reagentes podem ser usados, fazendo-se as necessárias adaptações, de acordo com as instruções do fabricante



Procedimentos

1) Obtendo a amostra

- Higienizar a boca dos oito voluntários fazendo bochechos com água ou, se possível, escovando os dentes.
- Delicadamente, raspar a mucosa bucal com uma espátula durante 10 segundos de cada lado. Conservar a espátula na mão enquanto o voluntário realiza o bochecho.
- Cada voluntário realizará um bochecho vigoroso com aproximadamente 15 mL da solução de sacarose 3% por 30 segundos.
- Cada voluntário despejará o volume obtido do bochecho no mesmo copo descartável que continha a solução de sacarose.
- Deixar a espátula usada na raspagem imersa na solução obtida do bochecho, mantendo-a mergulhada no copo durante 2 minutos.

2) Separando o material

- Transferir aproximadamente 1 mL do volume obtido no passo anterior para um tubo de 1,5 mL e centrifugar durante 5 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 500 g (ver especificações do fabricante).
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com a micropipeta e desprezá-lo.

3) Extraindo o DNA

- Adicionar 500 µL de DNAzol (ou o volume necessário de reagente de outra marca, se for o caso). Homogeneizar invertendo o tubo.
- Centrifugar os tubos por 10 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 12.400 g (ver especificações do fabricante).
- Coletar o sobrenadante (aproximadamente 600 a 700 µL) e transferir para um novo tubo.
- Adicionar 500 µL de etanol 100% gelado. Observar a formação da nuvem de DNA.
- Homogeneizar invertendo várias vezes os tubos.
- Centrifugar por mais 3 minutos a 7.000 g. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 800 µL de etanol 75 % gelado. (Primeira lavagem).
- Centrifugar por mais 3 minutos a 7.000 g. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 800 µL de etanol 75 % gelado. (Segunda lavagem).
- Centrifugar por mais 3 minutos a 7.000 g. Descartar o sobrenadante.

*Velocidade e tempo de centrifugação podem ser ajustados.

4) Secando e conservando as amostras

- Virar os tubos e deixá-los abertos por aproximadamente 30 segundos.
- Suspender o precipitado em 100 µL de água MilliQ.
- Conservar as amostras em um freezer.

Etapa 2: Amplificação de DNA humano por PCR

Objetivo Geral

Através de PCR de marcadores moleculares específicos, gerar material para avaliar e comparar os genótipos dos voluntários ao final do módulo.

Material utilizado

Amostras de DNA extraídas de oito voluntários pelo protocolo anterior (Etapa 1).

Material Necessário

- Luvas e jaleco para o aplicador
- Micropipetas P10 e P200 com suas ponteiros.
- Reagentes necessários:
 - Água MiliQ
 - DNA genômico na mesma concentração resultante da Etapa 1
 - dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) a 10 mM
 - Enzima Taq Polimerase
 - 2 pares de primers* (AT3 e PV92) a 20 µM
 - Tampão PCR (fornecido com a enzima Taq Polimerase)
- Termociclador
- Tubos de 1,5 mL
- Tubos de 200 µL para PCR.
- 1 estante para os tubos
- Agitador tipo vórtex (opcional)

* Primers para o marcador AT3

F: 5'CCACAGGTGTAACATTGTGT 3'

R: 5' GAGATAGTGTGATCTGAGGC 3'

* Primers para o marcador PV92

F: 5' AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAAGT 3'

R: 5' TGAGTTCTCAACTCTGTGTGTAG 3'

Procedimento

Tabela 1: Ingredientes para a Reação de PCR

	1X (volume em µL)	9X* (volume em µL)
H2O MiliQ	14,37	129,33
Tampão**	5,0	45
dNTP	0,5	4,5
Primer F	1,0	9
Primer R	1,0	9
Taq Polimerase	0,13	1,17
DNA	3,0	3,0 x 9
Vol. Final	25	225

* O cálculo para os volumes dos reagentes consideram n+1, onde n é o número de amostras. Isto porque se leva em conta o erro na pipetagem. Portanto, para 8 amostras, o cálculo é para 8+1=9 amostras.

** Se o tampão não contém MgCl₂, este deve ser adicionado. O volume de MgCl₂ adicionado será diminuído do volume de H₂O MiliQ, para que o volume final de 25 µL não se modifique.

- Preparar 16 tubos de 200 μL (2 tubos por voluntário, correspondendo aos marcadores AT3 e PV92). Cada tubo deverá estar identificado, com o nome do voluntário e nome do marcador correspondente.
- Em um tubo de 1,5 mL preparar o Mix 1 para 9 reações com o marcador AT3 segundo a Tabela 1, colocando por último a Taq polimerase. Não incluir ainda o DNA genômico. Homogeneizar no vórtex.
- Em um tubo de 1,5 mL preparar o Mix 2 para 9 reações com o marcador PV92 segundo a Tabela 1, colocando por último a Taq polimerase. Não incluir ainda o DNA genômico. Homogeneizar no vórtex.
- Colocar 22 μL do mix correspondente em cada tubo de 200 μL . (Ex.: No tubo identificado como "Maria AT3", se colocará 22 μL do Mix 1 e 3 μL do DNA extraído de Maria, e assim por diante).
- Adicionar 3 μL de DNA de cada voluntário no tubo correspondente, totalizando 25 μL de volume total de reação.
- Colocar os tubos no termociclador.

Tabela 2: Condições d\ PCR para os Marcadores AT3 E PV92

	TEMPERATURA	TEMPO	REPETIÇÕES	ESTÁGIO
	94°C	5 minutos	1	1
Passo 1	94°C	1 minuto		
Passo 2	58°C	2 minutos	30	2
Passo 3	72°C	2 minutos		
	72°C	5 minutos	1	3
FINAL	4°C			

- Ao finalizar a PCR, as amostras deverão ser conservadas em freezer.

Etapa 3: Confeção de gel de agarose 1%, aplicação das amostras e eletroforese.

Objetivo Geral

Permitir a visualização dos genótipos dos membros voluntários da comunidade, para posterior interpretação e discussão dos resultados.

Material Necessário

- Agarose
- Amostras de PCR
- Balança
- Cuba de eletroforese*
- Erlenmeyer de 500 mL
- Fonte de eletroforese
- Corante para visualização de DNA**
- Corante de rastreamento (loading buffer ou loading dye)***
- Luvas e jaleco para o aplicador
- Micro-ondas****
- Luva para micro-ondas.
- Micropipeta P10 e ponteiros
- Parafilm
- Proveta de 250 ml
- TBE 0,5X*****

* As quantidades aqui mostradas estão calculadas para um gel de 200 mL.

**O aplicador deve atentar para o fato de que há diferentes opções de corantes de DNA, o mais conhecido sendo o Brometo de Etídio (BE), que não é o mais recomendado atualmente por ser tóxico. Opções não tóxicas, como das marcas GelRed ou Diamond, são bons substitutos, que devem ser usados conforme orientação do fabricante. O presente protocolo usou o corante Safer Kasvi, que vem pronto para uso e dispensa adição de corante de rastreamento.

***A ser usado com certos tipos de corantes de DNA, como BE, GelRed ou Diamond.

**** Pode-se também usar banho-maria.

***** TBE: Solução tampão composta de Tris, Borato e EDTA.

Procedimento

Montar a bandeja completa (fora da cuba) em uma superfície reta e lisa.

Pesar 2 g de agarose.

Colocar a agarose em um Erlenmeyer de 500 mL e adicionar 200 mL de TBE 0,5X

Esquentar a mistura no micro-ondas até a completa dissolução da agarose. No processo, interromper o aquecimento para mexer a solução. Cuidar para não transbordar.

Uma vez que a agarose esteja pronta, deixar esfriar um pouco e despejar na bandeja montada no início, deixando solidificar (até ter uma aparência opaca e esbranquiçada). O tempo de solidificação depende da agarose utilizada e das condições do ambiente local.

Aplicação das amostras e corrida de Eletroforese

- Uma vez que o gel esteja solidificado, retirar os pentes, colocar o gel na cuba e adicionar TBE 0,5X até cobrir totalmente a superfície do gel.

- Em um pedaço de parafilm, colocar uma gota de 1 µL do corante Safer para cada amostra (neste caso, 16 gotas em linha, separadas e enfileiradas, sobre o parafilm).

- Pipetar 10 µL de cada amostra de produto de PCR e misturar com 1 µl do corante Safer no parafilm. Uma vez misturada, colocar a amostra no primeiro poço do gel.

- Realizar este procedimento com todas as amostras. A ordem das amostras deve ser anotada cuidadosamente. Utilizando o exemplo anterior, poderia ser aplicada a amostra de "Maria/AT3" seguida por "Maria/PV92".

- Uma vez aplicadas todas as amostras, colocar a tampa da cuba, os cabos correspondentes e ligar a fonte.

As condições de corrida dependerão do tamanho da cuba eletroforética utilizada.

Tabela 3: Condições de corrida de um gel 1% em uma cuba eletroforética com gel de 200 mL.

Volts	mA	Watts	Tempo	Concentração
95	300	100	40 minutos	1%

Etapa 4 – Observando o gel de agarose 1%

Objetivo Geral

Permitir a visualização dos genótipos dos membros voluntários da comunidade, para posterior interpretação e discussão dos resultados.

Material Necessário

- Transiluminador com luz UV (é necessário usar óculos protetores ou tampa de acrílico para se observar).
- Gel pronto.
- Caixa de papelão forrada com material preto ou pintada de preto, onde caiba o transiluminador, com um orifício na parte superior para se olhar dentro dela.

Procedimento

- Colocar o gel sobre a placa de luz UV e colocar os óculos ou a tampa de acrílico, dependendo do caso.
- Colocar a caixa preta sobre o aparato*.
- Ligar a luz UV para se observar o resultado.
- Fotografar e anotar os resultados obtidos.

*Segundo a disponibilidade, pode-se usar uma câmara escura fechada acoplada a um sistema de fotodocumentação, ao invés de uma caixa de papelão.

Discussão

Os resultados devidamente fotografados e identificados serão utilizados na atividade final deste módulo, que é a discussão coletiva, com base nas fotos do gel de agarose, da variabilidade genética humana, ou seja, das diferenças e semelhanças entre os seres humanos, de uma mesma comunidade ou de diferentes povos e etnias.

Um gel para ver DNA



Objetivo Geral

Aprender a preparar um gel de agarose para, posteriormente, realizar a separação de amostras de DNA de diferentes tamanhos.

Objetivos Específicos

- 1) Familiarizar os participantes com uma das ferramentas mais simples e universais da biologia molecular: o gel de agarose.
- 2) Demonstrar que algumas das técnicas usadas pelos cientistas podem ser simples como uma receita de cozinha.

Material Necessário

- 1 200 mL de tampão TBE** 0,5X
- 2 7 g de agarose
- 3 1 cuba de eletroforese horizontal com bandeja e pentes
- 4 Forno micro-ondas***
- 5 1 erlenmeyer de 500 mL
- 6 1 proveta de 250 mL
- 7 1 jaleco descartável por participante
- 8 1 par de luvas de látex/pessoa
- 9 1 luva para forno micro-ondas
- 10 1 pedaço pequeno (~10 x 10 cm) de papel pardo

Atenção

* O presente protocolo corresponde à preparação de um gel de agarose 3% com 200 mL de volume.

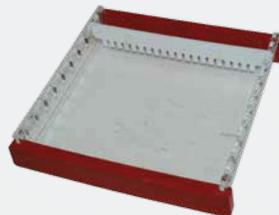
** TBE: Solução tampão composta de Tris, Borato e EDTA

*** Pode ser utilizado o banho-maria como substituto.



1 Procedimento

- Em caso de se contar com duas cubas de eletroforese, os materiais deverão ser duplicados e os participantes serão divididos em dois grupos, sendo cada grupo acompanhado por um mediador treinado.
- Um participante de cada grupo montará a bandeja do gel, com bandas isolantes nas extremidades, em uma superfície reta e lisa.
- Um outro participante colocará 6 g de agarose no erlenmeyer e adicionará 200 mL de TBE 0,5X
- Cobrir a boca do erlenmeyer com papel pardo, perfurando dois ou três buracos com uma ponteira para permitir a saída do vapor.



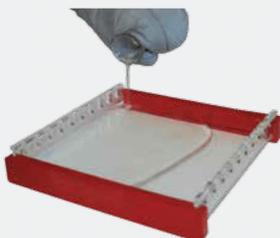
Sugestão

Se houver disponibilidade de uma balança no local, sugere-se que o participante pese os 6 g de agarose a serem adicionados ao erlenmeyer. Se possível, é interessante fornecer aos grupos o tampão TBE a uma concentração maior, de 5X, para que os participantes possam, eles mesmos, preparar o volume necessário de TBE 0,5X. Neste caso, eles misturariam em uma proveta 20 mL de tampão 5X com 180 mL de água destilada.



- Colocar o erlenmeyer no micro-ondas. Esquentar por um minuto. Retirar o erlenmeyer com ajuda de uma luva de cozinha, agitar suavemente a solução e colocar de novo no micro-ondas. Esquentar por mais 30 segundos. Retirar e mexer a solução, cuidando sempre para não transbordar devido ao aquecimento. Repetir os passos anteriores até conseguir uma solução transparente e sem grumos.

- Deixar esfriar um pouco, mexendo o erlenmeyer.
- Quando atingir uma temperatura suportável à mão do participante, verter o gel sobre uma das bordas da bandeja, bem devagar para não gerar bolhas.
- Encaixar cuidadosamente os pentes nos espaços apropriados da bandeja.



- Deixar solidificar por aproximadamente 20 minutos (até o gel ficar com uma aparência opaca e esbranquiçada).
- Uma vez solidificado, retirar os pentes do gel, com cuidado, e retirar as bandas de borracha das extremidades da bandeja.
- Colocar a bandeja com o gel dentro da cuba eletroforética



Ampliando a Discussão!

Sugere-se complementar esta atividade com uma explicação prática (utilizando-se uma peneira ou um filtro, por exemplo) a respeito da separação de coisas de diferentes tamanhos. No exemplo da peneira, diferentes tamanhos de partículas (de areia, terra ou semente) são separados em função do tamanho dos orifícios. Da mesma forma, o gel de agarose se assemelha a uma peneira ou a um filtro, com poros microscópicos por onde passam os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Pode-se usar aqui uma animação que mostre que fragmentos menores viajam mais rapidamente e, portanto, chegam mais longe durante uma corrida de eletroforese, em comparação com fragmentos maiores.

Diferenciando Espécies pelo seu DNA



Objetivo Geral

Demonstrar que, apesar de todos os seres vivos terem DNA, há diferenças entre o DNA das diversas espécies.

Objetivos Específicos

- 1) Aprender uma das formas mais comuns de se separar moléculas de tamanhos e formas diferentes.
- 2) Ilustrar experimentalmente que os organismos das mais variadas espécies, animais e vegetais, possuem DNA.
- 3) Demonstrar que estes organismos podem ser diferenciados por seu DNA.

Material Necessário

Atenção

Serão utilizados produtos previamente preparados de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir de DNA de diferentes espécies animais e vegetais. Para fins didáticos, as amostras devem gerar bandas de tamanhos diferentes para cada uma das espécies. Por tal motivo, foram escolhidos marcadores específicos que geram bandas de tamanho conhecidos e diferentes entre si.

Câmera fotográfica para documentar os resultados

- 1 Cuba e fonte para eletroforese
- 2 Transiluminador com luz UV
- 3 Corante para visualização de DNA*
Corante de rastreamento (loading buffer ou loading dye)**
- 4 Micropipeta P10 e ponteiros
- 5 1 pedaço de 10 cm de comprimento de Parafilm
Produtos de PCR de diferentes espécies***
Tampão TBE 0,5X em quantidade suficiente para encher a cuba****

Atenção

*O aplicador deve atentar para o fato de que há diferentes opções de corantes de DNA, o mais conhecido sendo o Brometo de Etídio (BE), que não é o mais recomendado atualmente por ser tóxico. Opções não tóxicas, como das marcas GelRed ou Diamond, são bons substitutos, que devem ser usados conforme orientação do fabricante. O presente protocolo usou o corante Safer Kasvi, que vem pronto para uso e dispensa adição de corante de rastreamento.

**A ser usado com certos tipos de corantes de DNA, como BE, GelRed ou Diamond.

***No Anexo 2, há detalhes dos marcadores moleculares de todas as espécies utilizadas nesta atividade. Tais marcadores podem ser modificados, desde que se garanta a presença de uma banda de tamanho diferente para cada espécie.

****TBE: Solução tampão composta de Tris, Borato e EDTA.



1 Procedimento

- Após os participantes terem realizado a atividade do REA anterior (ver “Como fazer um gel de agarose”) colocar o gel na cuba e cobri-lo com TBE 0,5X.
- Colocar sobre um pequeno quadrado de parafilme 1 μL do corante Safer por amostra (Ex.: se são 10 participantes e cada participante irá aplicar 2 amostras, coloca-se 20 gotas separadas e enfileiradas de 1 μL do corante Safer sobre o parafilme)

2 Sugestão

Dependendo do número de espécies disponíveis, podem ser definidas as repetições das amostras de cada espécie. (Ex.: se houver quatro espécies, pode-se montar um gel de 20 poços com cinco repetições de cada espécie).

- Com ajuda de uma micropipeta P10, o participante pegará 8 μL da amostra de DNA produto da PCR e a misturará com a gota de 1 μL do corante Safer sobre o parafilm.
- Uma vez misturada a solução, o participante identificará, com ajuda do mediador, o poço onde será colocada a amostra. A seguir, o participante aplicará a amostra no poço correspondente do gel.
- Uma vez que cada participante tenha aplicado pelo menos duas amostras no gel, um dos participantes será encarregado de colocar a tampa da cuba e inserir os cabos da fonte nos polos positivo e negativo.



Atenção

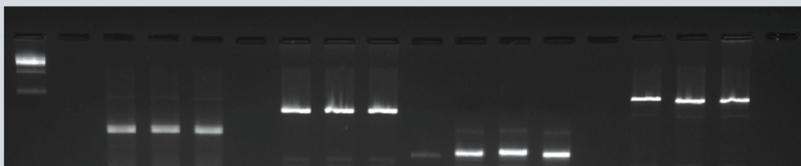
Prestar muita atenção, pois o DNA possui carga negativa e migrará para o polo positivo, que deve estar no lado oposto ao da posição das amostras

- Ligar a fonte e regula-la com os valores de corrida correspondentes (ver condições de eletroforese para gel 3%*)
- Uma vez transcorrido o tempo de corrida, os participantes observarão o gel na luz UV, protegidos por jaleco, luvas e óculos ou pela tampa de acrílico transparente do transluminador. Para escurecer o campo de visão, recomenda-se utilizar uma caixa de papelão de cor preta com um orifício apenas suficiente para permitir a visualização.



3 Sugestão

Tirar foto do gel e utilizá-la posteriormente para discussão. É muito importante que, durante toda a manipulação na presença de luz UV, nenhuma parte do corpo desprotegida (mãos, rosto, etc) seja exposta à esta luz.



*O tempo de corrida e os valores utilizados na fonte dependem do tamanho e da concentração do gel. Neste exemplo, o gel a 3% é de 20 x 20 cm e as condições de corrida são: 300 volts, 100 mA, 200 Watts durante 30 min.

Ampliando a Discussão!

A discussão final se dá com base na imagem das diferentes bandas obtidas no gel de agarose contendo as amostras de DNA das diferentes espécies. Sugere-se perguntar aos participantes se eles conseguem, a partir das posições conhecidas dos poços onde eles próprios aplicaram suas amostras, diferenciar as espécies com base na posição de suas bandas. Perguntar o que estas diferentes espécies têm em comum.

4 Conclusão Final

Concluir que todas as espécies, incluindo a nossa, possuem DNA, que pode ser extraído, manipulado, visualizado em um gel e analisado. Isto ocorre porque todas as espécies têm um certo grau de “parentesco” entre si. Enfatizar, no entanto, que cada espécie tem sua particularidade, tanto em termos de características aparentes como em termos de seu DNA.

Anexo 2: Marcadores moleculares utilizados na atividade “Diferenciando Espécies pelo seu DNA”



Para realizar a diferenciação das espécies estudadas no gel de agarose, ao se encomendar os primers, ou no caso dos mesmos serem desenhados especificamente para o projeto, deve-se prestar atenção aos tamanhos das bandas resultantes que serão observadas em agarose 3%. O gel das espécies conta geralmente com uma ou duas espécies de plantas, o ser humano e uma ou duas espécies animais. Abaixo, descrevemos as sequências dos pares de primers referentes aos marcadores utilizados no Projeto Imagine.

Goiabeira serrana (*Acca sellowiana*)

Marcador ASE59 – fragmento esperado 178–190 pb

Sequência F: 5'-ACTATTGCATGCTTGCTC-3'

OU

Sequência R: 5'-AGGTATCTTCAGTTCCTTG-3'

Marcador ASE31 – fragmento esperado 300–340 pb

Sequência F: 5'-TCTTCAAACAATCCACTCTC-3'

Sequência R: 5'-TCTTCATCAGCGACCATA-3'

Araucária (*Araucaria angustifolia*)

Marcador Ag45 – fragmento esperado 161-191 pb

Sequência F: 5'-CCATCCTCCATCATTATCC-3'

OU

Sequência R: 5'-TCCCTCCATGTCCTCAAG-3'

Marcador Ag94 – fragmento esperado 173-187 pb

Sequência F: 5'-CCCCACAATAACCAAGATG-3'

Sequência R: 5'-AGTAAATCCGCTAACAAATGC-3'

Milho (*Zea mays*)

Marcador Zeina – fragmento esperado 329 pb

Sequência F: 5'-TGCTTGCATTGTTGCTCTCCTAG-3'

Sequência R: 5'-GTCGAGTGACATTGTGGCAT-3'

Galinha (*Gallus gallus domesticus*)

Marcadores de sexagem* – fragmento esperado aproximadamente 344 pb

Sequência primer F: 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3' (R=A ou G; Y=T ou C)

Sequência primer R: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTT-3'

*A sexagem em aves se determina pelo número de bandas. Duas bandas indicam fêmeas enquanto que uma banda indica machos.

Rato (*Rattus norvegicus*)

Marcador D4Mgh22 – fragmento esperado 92-114 pb

Sequência F: 5'-CCTGCATGTTATTGATGATG-3'

Sequência R: 5'-GGTACATGAAATTTGACCTCA-3'

Humano (*Homo sapiens*)

Marcador PTPN – fragmento esperado 215 pb

Sequência F: 5'-TGCCCATCCACACTTTAT-3'

Sequência R: 5'-ACCTCTGGTTGTACCTTA-3'

A diversidade biológica



Objetivo Geral

Realizar uma discussão final ampla sobre a diversidade biológica, com base nas diversas práticas realizadas durante o módulo "DNA, diversidade e hereditariedade".

Objetivos Específicos

- 1) Perceber e discutir as diferenças existentes entre as espécies, em seus mais variados níveis.
- 2) Perceber e discutir as diferenças e semelhanças existentes entre os seres humanos, que variam tanto "dentro" como "entre" grupos, povos e etnias.
- 3) Demonstrar a utilidade da abordagem científica e das técnicas moleculares para se compreender a diversidade biológica, humana ou não humana.
- 4) Estabelecer uma relação natural entre o ser humano e as demais espécies.
- 5) Compreender que a humanidade é, do ponto de vista genético, como uma "grande família", dentro de uma família maior ainda que é a natureza.

Material necessário

Nesta atividade, os únicos materiais necessários serão as fotografias geradas em duas atividades precedentes: "O DNA Humano – Anexo 1" e "Diferenciando Espécies pelo seu DNA". Caso haja disponibilidade de um projetor multimídia, o ideal é fazer a discussão em torno de uma grande tela, onde serão projetadas as fotos e suas identificações. Caso contrário, pode-se fazer a atividade com as fotos impressas ou ainda utilizando a tela de um computador portátil.

Sugestão

No Projeto Imagine, a equipe sempre procura realizar esta etapa no último dia de atividades, momento em que todos os participantes se reúnem. Neste momento, outros membros da comunidade podem ser convidados a participar. O intuito principal é dar um fechamento e um sentido maior ao conjunto das práticas realizadas, possibilitando uma discussão horizontal e criativa. Antes disso, ou seja, até a noite do dia anterior, a equipe prepara as fotos na forma de uma apresentação de slides, onde se podem inserir explicações e resultados de experimentos reais, tanto da comunidade em questão quanto de comunidades de outros países ou regiões participantes do projeto.

Exemplos de duas fotos das espécies

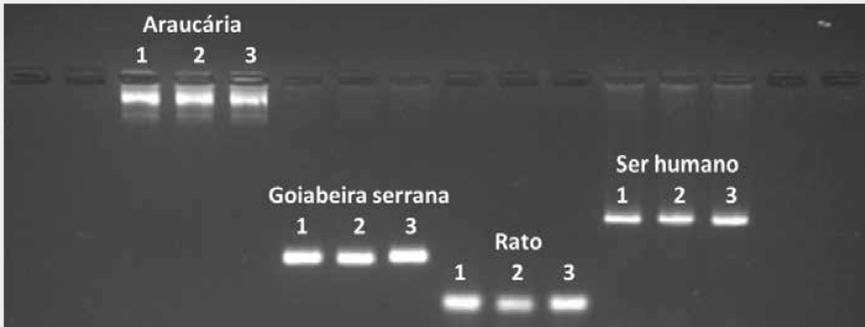


Foto 1: tirada no laboratório da UFSC com as mesmas condições dos projetos de pesquisa locais.



Foto 2: tirada em condições de campo, a partir do trabalho realizado pelas crianças das comunidades rurais de Calca no Peru. A maior parte do equipamento utilizado era pertencente à Universidad Andina del Cusco (agosto de 2014).

Com base nas fotos 1 e 2, inicia-se uma discussão envolvendo todos os participantes, na busca de uma interpretação dos resultados obtidos. É necessário explicar que os números em tela (1 a 3) correspondem às três amostras de DNA representando cada uma das espécies, que foram aplicadas pelos próprios participantes na prática “Diferenciando Espécies pelo seu DNA”.

Ampliando a Discussão!

Neste momento, pode-se fazer uma recapitulação de alguns conceitos já trabalhados nas etapas anteriores, como a separação de objetos ou partículas de tamanhos diferentes através do uso de peneiras, filtros ou da própria cromatografia em papel usados nas atividades “Desvendando Características Escondidas” e “Um Gel para Ver DNA”. Relembrar as características e a função do gel de agarose na separação de fragmentos de DNA.

Partindo-se do princípio que as bandas ou listras brilhantes representam as amostras de DNA de um determinado tamanho (quanto maior, mais alta a sua posição no gel), pode-se deduzir que a molécula de DNA está presente em todas as espécies trabalhadas, representando, portanto, um ponto de convergência ou de semelhança entre elas. Deve-se observar com os participantes que a posição das bandas, no entanto, permite diferenciar uma espécie da outra, representando assim um ponto de divergência entre elas. Deve-se observar que, nesta atividade, a espécie humana também apresenta semelhanças e diferenças em relação às demais espécies.

Ampliando a Discussão!

Pode-se salientar, neste momento, dependendo do grau de compreensão dos participantes, que as bandas observadas representam apenas um minúsculo fragmento (ou um “marcador”) do DNA destas espécies e não seu DNA total.

Concluir que todas as espécies, incluindo a nossa, possuem DNA. Enfatizar, no entanto, que cada espécie tem sua particularidade, tanto em termos de características aparentes como em termos de seu DNA.

Exemplos de duas fotos da diversidade humana

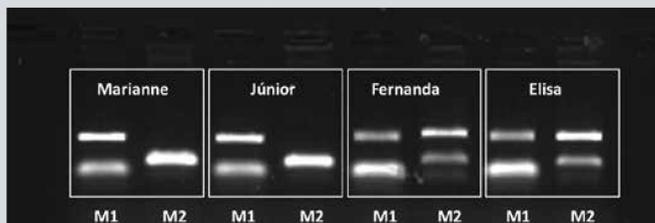


Foto 3: tirada no laboratório da UFSC com as mesmas condições dos projetos de pesquisa locais.

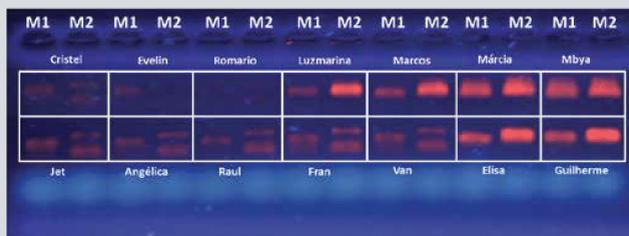


Foto 4: tirada em condições de campo, a partir do trabalho realizado pelas crianças das comunidades rurais de Calca no Peru. A maior parte do equipamento utilizado era pertencente à Universidad Andina del Cusco (agosto de 2014).

Com base nas fotos 3 e 4, deve-se conduzir uma discussão sobre a diversidade entre as pessoas, tanto dentro de uma mesma comunidade, como entre comunidades, etnias ou mesmo países diferentes. Os nomes representam as pessoas voluntárias e as legendas M1 e M2 representam os dois fragmentos ou “marcadores” de DNA analisados (AT3 e PV92, respectivamente), conforme descrito em “O DNA Humano – Anexo 1”.

Atenção

Nesta etapa, é muito importante que os participantes tenham espaço e liberdade para observar, analisar e interpretar os resultados de acordo com suas próprias visões e valores. Os mediadores devem simplesmente balizar a discussão, oferecendo as interpretações próprias do método científico, enfatizando que estes resultados se referem a uma porção ínfima do DNA de algumas poucas pessoas analisadas e que, portanto, não podem ser generalizados para todo o material genético de cada indivíduo, nem mesmo para todos os membros de uma determinada comunidade ou etnia.

- Perguntar aos participantes quantas bandas podem ser observadas para cada pessoa analisada, se considerarmos conjuntamente os dois marcadores, M1 e M2. Este número é variável?
- Perguntar se as pessoas podem ser diferenciadas com base no número e na posição de suas bandas. Neste caso, as pessoas voluntárias da comunidade local são todas iguais entre si ou também se diferenciam umas das outras?
- Neste momento, os mediadores podem informar de onde foram coletadas as outras amostras analisadas, por exemplo, de membros da equipe Imagine ou das comunidades X e Y que podem, inclusive, ser de países diferentes.
- Perguntar aos participantes se é possível, com base apenas nestes resultados específicos, identificar com certeza a origem das pessoas.

Ampliando a Discussão!

Pode-se sugerir aos participantes que verifiquem se os marcadores M1 ou M2 podem formar grupos diferentes de indivíduos dentro da mesma comunidade. Caso formem, pode-se iniciar uma discussão sobre quais os critérios utilizados, dando a ideia de que, ao introduzir mais marcadores, poderão se formar grupos diferentes e mais numerosos de “tipos genéticos”.

Sugestão

Com base nos dois marcadores aqui utilizados, é bastante provável que haja alguma variação entre as pessoas de uma mesma comunidade, principalmente se for evitada a seleção de voluntários com alto grau de parentesco. Além disso, também é provável que se observem semelhanças entre algumas pessoas daquela comunidade e pessoas externas à comunidade. Caso isso não aconteça num primeiro momento, pode-se ampliar o número de voluntários, incluir outras pessoas da equipe de mediadores ou mesmo selecionar os produtos de PCR armazenados de pessoas externas à comunidade. Para isso, recomenda-se que estas análises sejam feitas pelo mediador responsável já nos primeiros dois dias do módulo (ver “O DNA Humano – Anexo 1”), para que haja tempo de se ampliar as amostras e preparar o material fotográfico para a discussão final.

Conclusões finais

O que se busca ao final deste módulo é concluir, através de uma reflexão coletiva baseada em dados gerados pela própria comunidade e orientada pelos mediadores do projeto, que a diversidade é própria da natureza humana, em qualquer povo e em qualquer região do mundo. Esta diversidade faz com que não existam duas pessoas exatamente iguais e que também não existam dois povos ou etnias totalmente diferentes, pois todos compartilham, em algum grau, o seu material genético. A sugestão é que se abra a discussão para que todos manifestem suas impressões, conclusões e críticas e que reflitam sobre como as atividades realizadas poderiam dialogar com a cultura e as tradições locais.