

Atena
Editora
Ano 2021



AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva
(Organizadores)

Atena
Editora
Ano 2021



AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva
(Organizadores)

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremona

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

Shutterstock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Daniel Richard Sant'Ana – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Elói Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
 Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Sidney Gonçalves de Lima – Universidade Federal do Piauí
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
 Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
 Profª Drª Fernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
 Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
 Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
 Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
 Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
 Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
 Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
 Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
 Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
 Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
 Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
 Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
 Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
 Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
 Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
 Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
 Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
 Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Me. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
 Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
 Profª Drª Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
 Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
 Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
 Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa

Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
 Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
 Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
 Prof. Me. Edson Ribeiro de Britto de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
 Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
 Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
 Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
 Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
 Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
 Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
 Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
 Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
 Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
 Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
 Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Me. Gustavo Krahll – Universidade do Oeste de Santa Catarina
 Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
 Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
 Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
 Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
 Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
 Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
 Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFGA
 Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Profª Ma. Lilian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
 Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
 Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembi Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Natália Sandrini de Azevedo
Correção: Giovanna Sandrini de Azevedo
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadores: Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A946 Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia / Organizadores Anderson Barros Archanjo, Aline Ribeiro Borçoi, Suzanny Oliveira Mendes, et al. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Outra organizadora
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-175-3
DOI 10.22533/at.ed.753210406

1. Biologia Molecular. 2. Biotecnologia. 3. DNA. I. Archanjo, Anderson Barros (Organizador). II. Borçoi, Aline Ribeiro (Organizadora). III. Mendes, Suzanny Oliveira (Organizadora). IV. Título.

CDD 572.8

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

APRESENTAÇÃO

O livro “Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia” é uma obra com o foco principal na valorização acerca do conhecimento aprofundado em Biologia Molecular e Biotecnologia, assim como do histórico e das técnicas recentes mais aplicadas para o estudo do tema.

A obra é fruto do trabalho dos professores e alunos da disciplina “Tópicos Especiais em Biotecnologia II: Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia (BIOTEC024)”, ofertada pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os diversos temas relacionados à Biologia Molecular e à Biotecnologia foram abordados tendo como foco os avanços nas metodologias utilizadas ao longo dos anos. A obra consta de sete capítulos, nos quais foram discutidos a evolução da biologia molecular e das ômicas, assim como os sequenciadores de próxima geração, os métodos de estudo em epigenética, a amplificação do DNA em single-cell, estudo de expressão gênica, ferramentas de edição gênica e expressão heteróloga de proteínas.

Deste modo a obra “Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia” apresenta uma ferramenta de estudo que proporciona aos leitores uma visão ampla das principais metodologias em Biologia Molecular e Biotecnologia, assim como as suas evoluções ao longo dos anos.

Desejamos uma excelente leitura a todos!

Anderson Barros Archanjo

Aline Ribeiro Borçoi

Suzanny Oliveira Mendes

Adriana Madeira Álvares-da-Silva

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATÇÖES E SIGLAS	1
CAPÍTULO 1.....	3
A EVOLUÇÇÖ DA BIOLOGIA MOLECULAR E AS ÔMICAS	
Tamires dos Santos Vieira	
Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104061	
CAPÍTULO 2.....	14
GENÔMICA E OS SEQUENCIADORES DE PRÓXIMA GERAÇÇÖ	
Paola Cerbino Doblas	
Iuri Drumond Louro	
DOI 10.22533/at.ed.7532104062	
CAPÍTULO 3.....	26
EPIGENÉTICA E MÉTODOS DE ESTUDOS EPIGENÉTICOS	
Ivana Alece Arantes Moreno	
Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104063	
CAPÍTULO 4.....	35
PRÍNCÍPIOS BÁSICOS EM AMPLIFICAÇÇÖ DO DNA E GENÔMICA DE CÉLULAS ÚNICAS	
Bárbara Risse-Quaioto	
Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104064	
CAPÍTULO 5.....	46
RT-qPCR: ESTUDOS DE EXPRESSÇÖ GÊNICA	
Mayara Mota de Oliveira	
Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104065	
CAPÍTULO 6.....	58
FERRAMENTAS DE EDIÇÇÖ GÊNICA	
Joaquim Gasparini dos Santos	
Aline Ribeiro Borçoi	
DOI 10.22533/at.ed.7532104066	
CAPÍTULO 7.....	69
EXPRESSÇÖ HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS	
Karolinni Bianchi Britto	

Greiciane Gaburro Paneto

DOI 10.22533/at.ed.7532104067

SOBRE OS ORGANIZADORES	85
-------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
5hmC	5 hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
AD	Domínio de Ativação
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
BACs	Cromossomos Artificiais Bacterianos
BiTS-ChiP	Isolamento Descontínuo da Cromatina Específica de Tecido para Imunoprecipitação
cDNA	DNA complementar
ChiP	Imunoprecipitação da Cromatina
ChIP-chip	Imunoprecipitação de Cromatina Ligada a Microarranjos
ChIP-Seq	Imunoprecipitação da Cromatina com Tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
DCR	Doença Renal Crônica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA recombinante
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DOP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Iniciada por Oligonucleotídeo Degenerado
dPCR	PCR digital
DSB	Quebra Dupla da Fita de DNA (do inglês <i>Double-Stranded Break</i>)
ESI-MS	Espectrometria de Massa de Eletrospray
FACS	Classificação Celular Ativada por Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
<i>FOK I</i>	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência
FTIR	Espectroscopia Infravermelha de Transformação Fourier
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GST	Glutathione S-transferase
HATs	Histonas Acetiltransferases
HDACs	Histonas Desacetiltransferases
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
HR	Recombinação Homóloga (do inglês <i>Homologous Recombination</i>)
INTACT	Isolamento de Núcleos Marcados em Tipo Celular Específico
LCM	Microdissecção de Captura a Laser
Lpp	Lipoproteína Mureína
MACS	Classificação de Células Ativadas Magneticamente
MALBAC	Múltiplos Ciclos de Amplificação Baseados em Anelamento e Loop
MBP	Proteína Ligante da Maltose
MDA	Amplificação de Deslocamento Múltiplo
miRNA	microRNA

NGS	Sequenciadores de Próxima Geração
NHEJ	Junções Terminais não Homólogas (do inglês <i>non-homologous end joining</i>)
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OmpA	Proteína A da membrana externa
OmpT	Protease VII
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	Personal Genome Machine
PhoE	Proteína E dos poros da membrana externa
qPCR	Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase (qPCR)
RBS	Sequência Shine-Dalgarno (do inglês <i>Ribosome Binding Site</i>)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RT	Transcriptase reversa
RT-PCT	PCR de transcrição reversa
RT-qPCR	PCR de transcrição reversa quantitativa
RVS	Repetições Variáveis Diresíduos
Sars-cov-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDS-PAGE de	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato Sódio
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STR	Sequências de Repetições Curtas em Tandem
TALENs	Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (do inglês <i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>)
TET	Translocação Metilcitosina Dioxigenase
TFIIIA	Fator de transcrição IIIA
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TRX	Tiorredoxina
YACs	Cromossomos Artificiais de Leveduras
ZFN	Nucleases de Dedo de Zinco (do inglês <i>Zinc Finger Nucelases</i>)

RT-qPCR: ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Data de aceite: 10/05/2021

Data de submissão: 08/04/2021

Mayara Mota de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/
RENORBIO, Universidade Federal do Espírito
Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/5495329160438980>

Anderson Barros Archanjo

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
RENORBIO, Universidade Federal do Espírito
Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/5529149503714764>

RESUMO: O entendimento sobre o transcriptoma trouxe novas perspectivas sobre a biologia da célula, no qual o estudo do RNA mensageiro (RNAm) e da expressão gênica poderiam auxiliar no entendimento sobre as respostas obtidas à medicamentos, tratamentos, e comportamentos biológicos associados. O PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) é resultado da evolução da técnica amplamente empregada na biologia molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) e as plataformas de quantificação. A técnica baseia-se na formação de uma fita de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA (RNAm), uma enzima transcriptase reversa e a extensão de um ou mais oligonucleotídeo. Para além da pesquisa a ser aplicada, o RT-qPCR ganhou um conjunto de estratégias metodológicas que podem variar nos métodos de detecção, na escolha sobre os iniciadores da transcrição reversa, nas etapas de execução e outras. Este

capítulo reúne os processos de evolução da técnica e apresenta algumas das estratégias amplamente empregadas na RT-qPCR.

PALAVRAS-CHAVE: RT-qPCR; Expressão Gênica; Biologia Molecular

RT-qPCR: GENE EXPRESSION STUDIES

ABSTRACT: The understanding of the transcriptome brought new perspectives on the cell's biology. Thus, the study of messenger RNA (mRNA) and gene expression could assist in understanding the responses obtained to drugs, treatments, and associated biological behaviors. The quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) is the result of the evolution of the technique widely used in molecular biology of polymerase chain reaction (PCR) and the quantification platforms. The technique is based on the formation of a complementary DNA strand (cDNA) from RNA (mRNA), a reverse transcriptase enzyme and the extension of one or more oligonucleotides. The RT-qPCR gained a set of methodological strategies that can vary in the detection methods, in the choice of the initiators of reverse transcription, in the stages of execution, and others. This study brings together the processes of evolution of the technique and presents some of the strategies widely used in RT-qPCR.

KEYWORDS: RT-qPCR; Gene expression; Molecular biology

1 | INTRODUÇÃO

O percurso evolutivo das tecnologias de diagnóstico avançou ao passo da criação de novas máquinas, insumos e tecnologias. Seguindo esse percurso a reação em cadeia da

polimerase (PCR¹), usada em larga escala para pesquisas biológicas, no campo clínico e de diagnóstico e forense, alcançou novos alvos genômicos, deixando de ser restrito ao DNA, e aplicando-se ao RNA e suas variantes mi-, pi-, sno-, si-, sr-, U-RNA (HOLLAND et al., 1991; KUBISTA et al., 2006).

O entendimento sobre o transcriptoma trouxe novas perspectivas sobre a biologia da célula, e as especificações e desdobramentos relacionados ao RNA mensageiro (RNAm) e a regulação gênica. Entender o padrão de expressão para diferentes tecidos e as correlações químicas, bioquímicas e respostas fisiológicas poderiam auxiliar no entendimento sobre as respostas obtidas à medicamentos, tratamentos, os comportamentos associados e até sobre os mecanismos iniciadores (ROCHA; SANTOS; PACHECO, 2015; SANDERS et al., 2018).

Para se alcançar o que conhecemos hoje como PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR²), foi necessário o aprimoramento e derivações da técnica, na qual o PCR digital (dPCR), PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e PCR de transcrição reversa (RT-PCR), somam-se para solucionar a necessidade de uma análise qualitativa e quantitativa dos ácidos nucleicos nos diferentes sistemas biológicos (TAYLOR; MRKUSICH, 2014) (Tabela 1).

Para melhor entendimento, as técnicas citadas têm como pilar à detecção dos produtos do PCR com o auxílio de uma Taq polimerase estável ao calor, Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs) e as sondas iniciadoras (oligonucleotídeo). Mediante a evolução do termocicladores, acrescentou-se uma molécula repórter fluorescente que auxilia a identificação e quantificação dos produtos em análise produzida em cada ciclo (HOLLAND et al., 1991; GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

	PCR	qPCR	RT-qPCR
Princípio da Técnica	Baseia-se na presença ou ausência da amplificação do material genético.	A marcação fluorescente permite a detecção da amplificação (dados) de acordo com os ciclos da PCR.	Reação direcionada ao entendimento sobre o RNA e expressão gênica.
Método	· Amplificação de uma Região gênica; · Combinação de DNA polimerase, cofatores, nucleotídeos, e sequencia direcionadora (<i>Primer</i>); · Precisa fazer eletroforese em gel para ver seu produto de PCR amplificado.	· Uso de marcador fluorescente, somado aos constituintes da reação de PCR; · Resultado é atribuído ao <i>Ct</i> de amplificação em resultado digital.	· Etapa antecessora de conversação do RNA em cDNA; · <i>RT: Transcriptase reversa;</i> · Segue os parâmetros da qPCR para análise dos transcritos.

1. Dados Históricos: O PCR foi inventado por Kary B. Mullis e Michael Smith no início dos anos 80. Ambos ganharam o Nobel de Química de 1993 pela invenção.

2. Nos anos 90 foi considerado como o “padrão ouro” na análise quantitativa de ácido nucleico, devido à sua alta sensibilidade, boa reprodutibilidade, ampla faixa dinâmica de quantificação, fácil uso e razoável custo-benefício.

Aplicações Comuns	· Sequenciamento; · Clonagem; · Detecção de Mutações; · Validação de OGM; · Detecção de patógenos; · Testes forenses.	· Genotipagem; · Análise de Mutações; · Análise de Metilação do DNA; · Detecção de patógenos; · Quantificação de carga viral.	· Análise de perfis de expressão gênica; · Aplica-se ao RNA e suas variantes.
-------------------	--	---	--

Tabela 1. Classificação e diferenciação das técnicas de PCR, qPCR e RT-qPCR

2 | A TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para o estudo do RNA, de forma que este seja passível à técnica de PCR necessitou de uma nova etapa que antecederesse a técnica e denominada transcrição reversa (RT da sigla). Esta etapa baseia-se na formação de uma fita de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA (RNAm), uma enzima transcriptase reversa e a extensão de um ou mais oligonucleotídeo iniciadores (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; BUSTIN, 2000).

Inicialmente observado no comportamento dos retrovírus nos processos infecciosos, para a aplicação molecular o processo de iniciação da reação de transcrição reversa pode usar três abordagens, que são: *Random Primers*, *Oligo(dT)s* e os *Primers* de sequência específica (*Sequence Specific Primers*). Os *Random Primers*, amplamente empregados atualmente, baseiam-se em sondas variadas que se anelam e pontos variados do RNA como ponto de partida. Os *Oligo(dT)s* baseiam-se na estrutura do RNAm, na qual o *primer* se âncora a extremidade 5 ‘da cauda poli (A). Já o *Primers* de sequência específica baseia-se em *Primers* personalizados que visam a sequência específica de um mRNA, garantindo que a síntese do cDNA seja específica a um gene de interesse (STANGEGAARD; DUFVA; DUFVA, 2006; LI; BROWNLEY, 2010; GREEN; SAMBROOK, 2019) (Figura 1).

O processo de síntese deste cDNA é dependente das sequencias de anelamento destes iniciadores de reação, polimerização e inativação da atividade da enzimaDNA polimerase RNA-dependente (*Transcriptase reversa*), em um processo dependente do aquecimento similar ao PCR (BUSTIN, 2000; NAKAMURA et al., 2003).

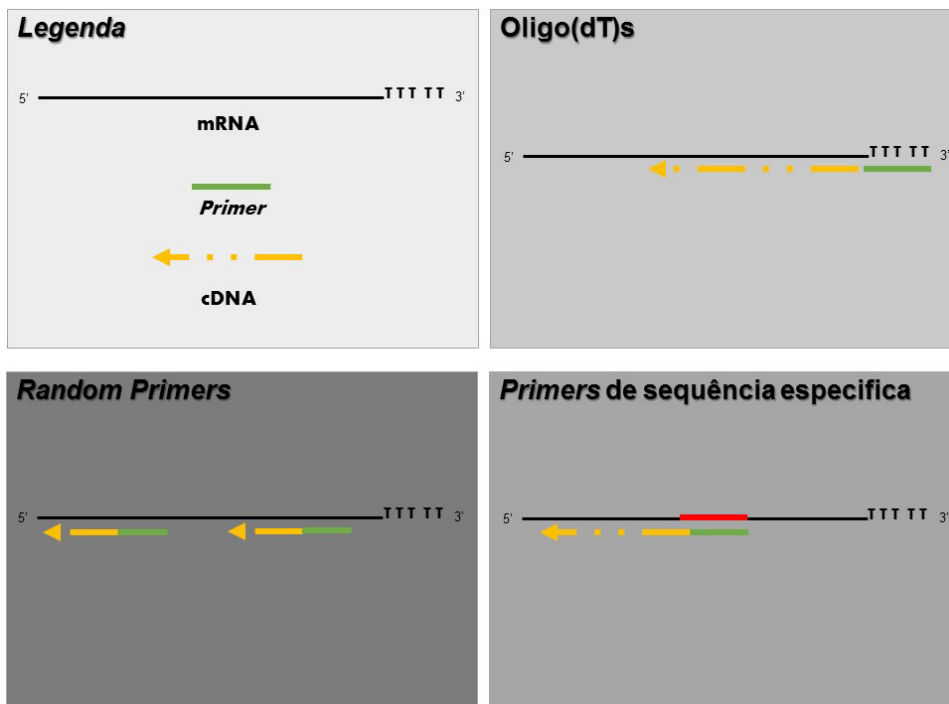


Figura 1. Iniciadores da Transcrição Reversa. Os iniciadores *Oligo(dT)s* se ligam a calda poli(A) do RNA mensageiro. Os iniciadores *RandomPrimers* se ligam a pontos diversos do RNA mensageiro. Os iniciadores *Primers* de sequência específica se ligam à uma região específica do RNA mensageiro.

3 | ONE-STEP X TWO-STEP

Entre as estratégias para realização das reações do RT-qPCR está a escolha de kits a serem realizados em uma ou duas etapas. Essas estratégias baseiam-se na combinação ou não da etapa da transcrição reversa e PCR em tempo real, modificando-se assim as estratégias de iniciação, os processos de otimização dos *primers*, e as condições de reação (WONG; MEDRANO, 2005).

Entre as vantagens e desvantagens relatadas pelas marcas disponíveis no mercado demonstra-se que a escolha por fazer as reações em um único tubo garante uma menor variação experimental e uma maior reprodutibilidade do experimento, no entanto, questões como otimização das reações, baixa sensibilidade e a detecção de menos alvos por amostra são pontos negativos para a escolha desta abordagem experimental (Figura 2) (DE PAULA et al., 2004; RASHED-UL ISLAM; JAHAN; TABASSUM, 2015).

Na abordagem mais comum, no qual as etapas são feitas de forma separada, a vantagem de maior destaque é a possibilidade de armazenamento do cDNA por longos períodos, e a disponibilidade deste para novas reações, além da possibilidade de otimização e flexibilização das reações. No entanto, o processo em duas etapas segue sendo mais oneroso em tempo e no uso de materiais plásticos.

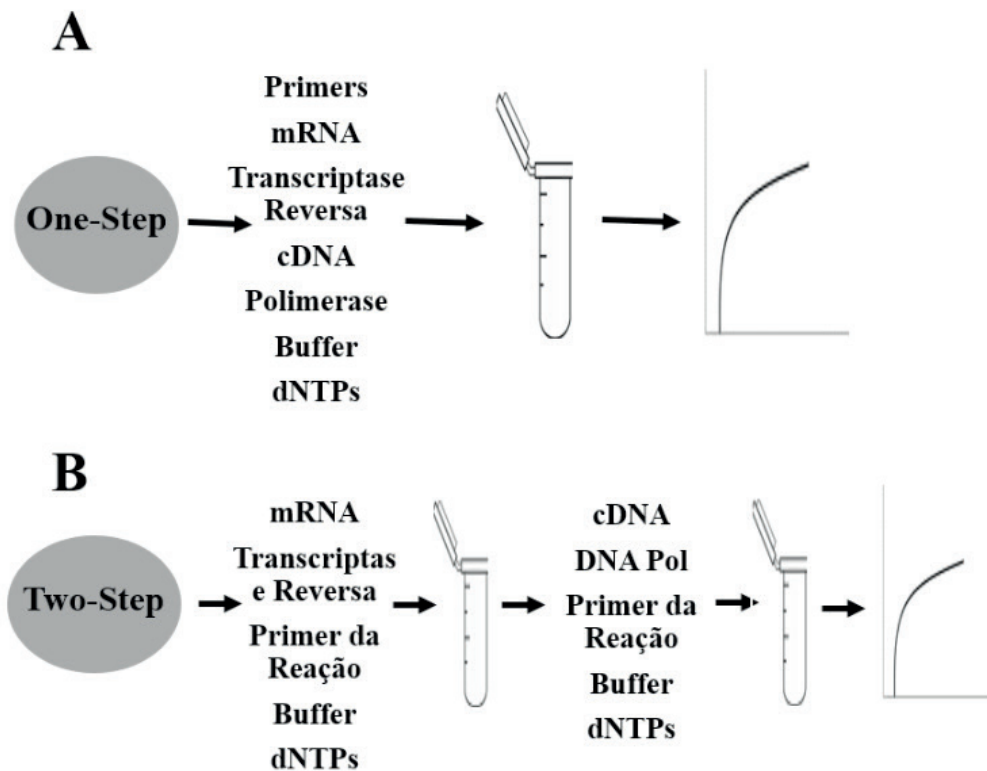


Figura 2. Estratégias para realização das reações do RT-qPCR. **A.** Reação estabelecida em uma única etapa, na qual os reagentes para a transcrição reversa e para o qPCR participam da mesma reação. **B.** Reação estabelecida em 2 etapas. A primeira o referente a transcrição reversa e a segunda referente ao qPCR.

3.1 Instrumentação e princípios de detecção da técnica

O princípio das análises de PCR em “tempo real” pauta-se na identificação dos fluorocoromo “*Reporter*” associados ao produto do PCR durante os ciclos de reação (HEID et al., 1996). Nesse sentido, o entendimento sobre esta técnica baseia-se na escolha dos sistemas de detecção, e seus derivados como: módulo de reação, sistema de detecção óptica, e os softwares (BUSTIN, 2000).

O módulo de reação consiste no processo de aquecimento e resfriamento do equipamento em uso, o entendimento deste processo relaciona-se as etapas de separação das fitas duplas, hibridização dos *primers* e a polimerização. Ligado a esta etapa também está a escolha correta das placas ou tubos usados para perfeito aproveitamento da reação. Em relação ao sistema de detecção é importante entender a interação entre fluorescência e filtros que acompanham o equipamento e o fluorocoromo “*Reporter*” à ser usado. O software em questão é a forma de interação com a reação e necessária para o processo de interpretação dos resultados. O entendimento destas etapas garante que erros sejam evitados na escolha dos kits, e o processo de otimização e configurações ganhem mais celeridade (BUSTIN, 2000).

Entre os métodos de detecção disponíveis no mercado, os sistemas mais comuns são o de detecção específica (Sistema TaqMan®) ou inespecífica (Sistema SYBR Green I). No primeiro, utiliza-se uma sonda fluorescente ancorada na extremidade 5' por um fluorocromo "Reporter", que tem como papel emitir a fluorescência, e em uma molécula "Quencher" na sua extremidade 3', que atua na absorção dessa fluorescência enquanto a sonda está estável, em um sistema denominado transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). O processo de detecção é dependente da clivagem da sonda pela enzima Taq DNA polimerase, que libera o fluorocromo "Reporter" que fica livre para ser excitado e produzir fluorescência (HEID et al., 1996) (Figura 3). Nesse sentido, a fluorescência produzida é proporcional aos alvos recém-sintetizados a cada ciclo.

Já o sistema SYBR Green I, utiliza fluorocoromos com afinidade por moléculas de DNA dupla-fita, de forma que com o decorrer dos ciclos as moléculas se intercalamaos produtos do PCR. A etapa de detecção ocorre no processo de polimerização da dupla fita neste sistema, já que a fluorescência é reduzida no processo de desnaturação (MORRISON; WEIS; WITTEWER, 1998). Por ser um método mais barato, a técnica é amplamente utilizada pelos pesquisadores, no entanto, a inespecificidade da fluorescência aos alvos de escolha pode-se tornar um problema na amplificação de produtos inespecíficos ou na ocorrência de dímeros de *primers* (Figura 3).

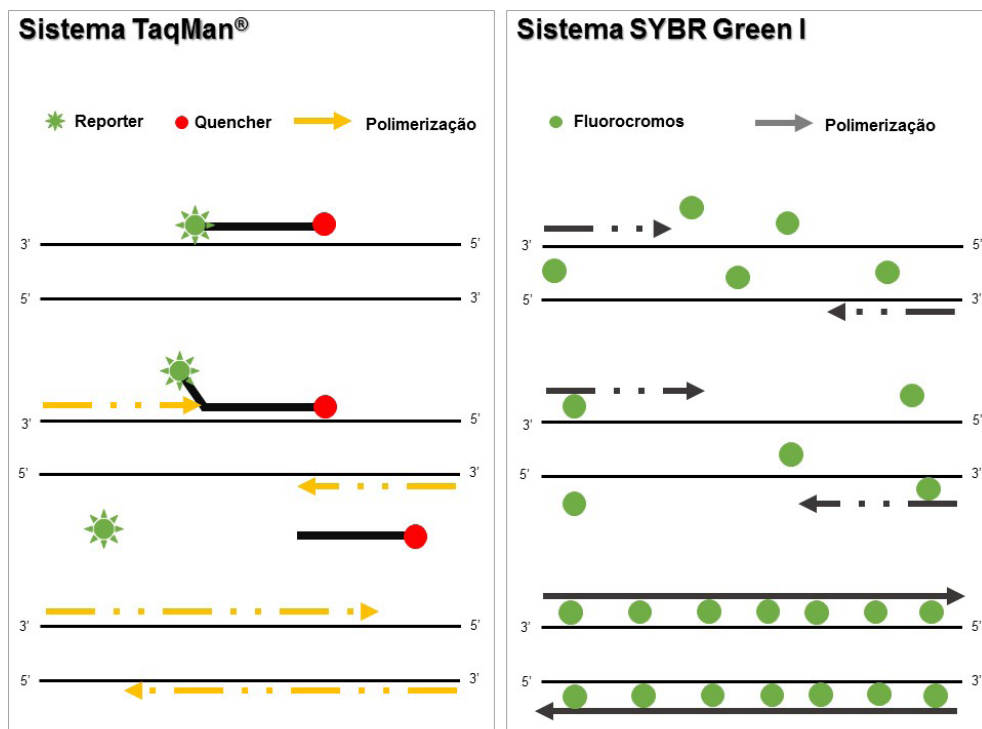


Figura 3. Sistema de detecção no qPCR. O Sistema TaqMan® baseia-se na *desestabilização do sistema transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) entre fluorocromo "Reporter" e a molécula "Quencher"*. O rompimento da ligação libera o fluorocromo "Reporter" para ser excitado e produzir fluorescência. O sistema SYBR Green I baseia-se na *ligação do fluorocromo as moléculas de DNA dupla-fita*.

Com o entendimento dos métodos de detecção a quantificação da técnica baseia-se na fluorescência obtida em relação aos ciclos de PCR. Nesse sentido, a representação gráfica da curva de amplificação pode ser dividida em fase de iniciação, fase exponencial e fase platô (HEID et al., 1996; DING; CANTOR, 2004).

Os primeiros ciclos caracterizam-se por uma baixa detecção da fluorescência, e com o passar dos ciclos e com um acúmulo exponencial dos produtos do PCR, o sinal de fluorescência torna-se detectável nomeando-se esta etapa como ciclo de quantificação. O valor basal de detecção é a base da quantificação, demonstrando-se que em reações que você entra com a mesma concentração de material biológico consegue-se comparar a presença gene em estudo (DING; CANTOR, 2004; TAYLOR et al., 2010).

Este conceito também torna essencial as etapas de padronização das reações, já que a quantidade de material biológico presente no início da reação é um fator determinante para que o ciclo de quantificação seja identificado nos ciclos iniciais ou tardios da reação de qPCR (BUSTIN, 2000).

O ciclo de quantificação também pode ser entendido pelos termos apresentados pelo software, entre estes estão (Figura 4):

- ΔRN : é o sinal da fluorescência calculado pela subtração da fluorescência emitida pelo produto da reação e emissão basal detectada, e os valores são apresentados com base nos ciclos;
- THRESHOLD: Com base no limite de detecção da fluorescência o próprio software determina o limiar baseado no sinal de amplificação real para reação. Seu cálculo é baseado no desvio padrão do sinal médio da fluorescência entre os 15 primeiros ciclos da reação;
- C_t : é definida como o valor em que o ΔRN de uma amostra ultrapassa o limiar mínimo de detecção. Este valor compõe a base cálculo das metodologias de quantificação.

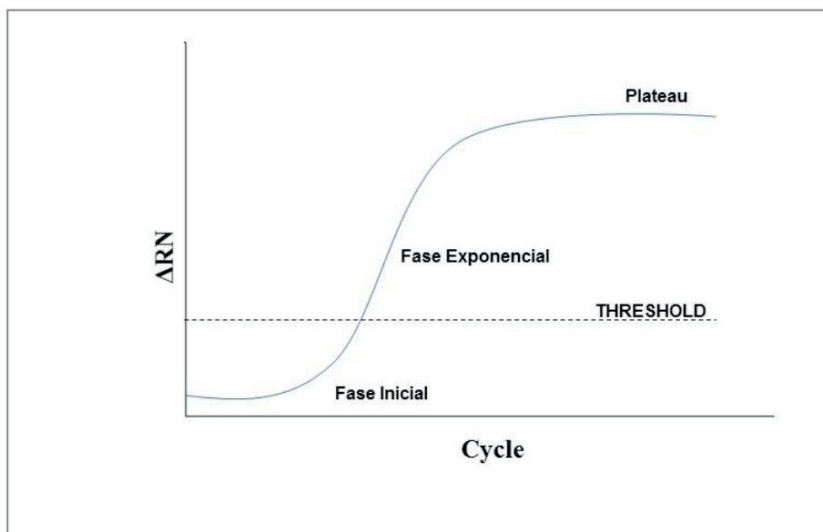


Figura 4. Exemplificação gráfica dos conceitos relacionados a curva de amplificação e definição do C_t da reação.

4 | TEMPERATURA DE *melting* (T_m):

Um dos princípios básicos para quem trabalha com PCR é a temperatura na qual a metade do produto de PCR está dissociado e a outra metade hibridado. A temperatura de *melting* está diretamente relacionada ao tamanho do fragmento em estudo e a presença de guanina e citosina neste (Figura 5).

Os *amplicons* produzidos na reação tem um pico de fusão característico à temperatura, nesse sentido, no RT-qPCR a análise sobre o *melting* contribui sobre a identificação e entendimento de agentes contaminantes ou da inespecificidade do *primer* (NAKAMURA et al., 2003).

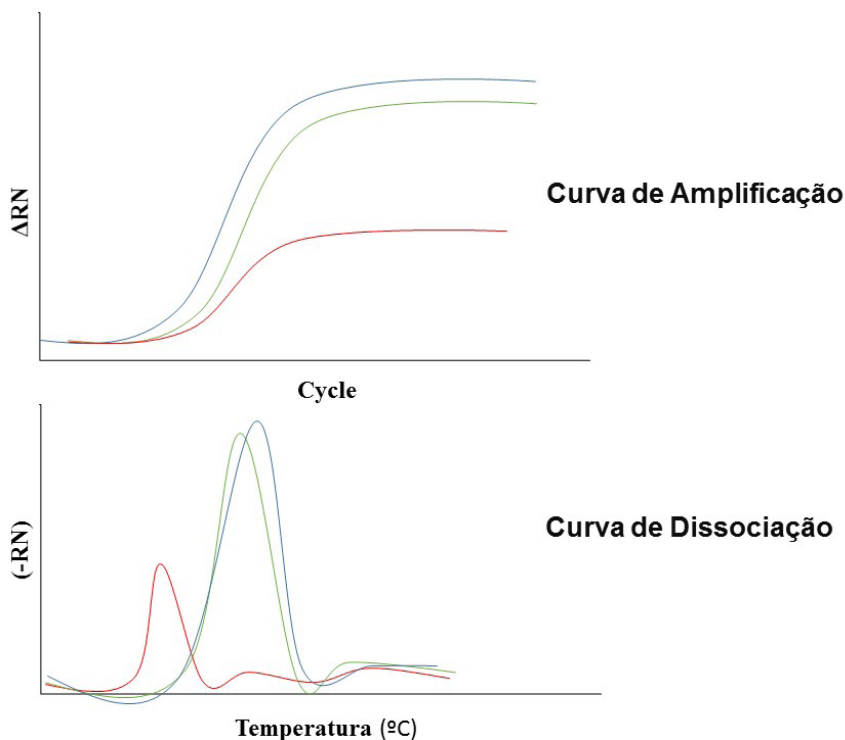


Figura 5. Exemplificação das Curva de Amplificação e de dissociação. A curva de amplificação demonstra a detecção de produtos amplificados em uma amostra. A Curva de dissociação que na reação foi encontrado diferentes temperaturas de *melting* para o produto da amplificação.

5 | ANÁLISE QUANTITATIVA

Como a grande parte dos métodos de quantificação em análises experimentais, para o RT-qPCR a escolha das abordagens de quantificação também pode ser absoluta ou relativa. O método de quantificação absoluta, está diretamente relacionado ao número de cópias ou produtos da PCR detectados, baseados em uma correlação com a curva padrão desenhada na reação (ROCHA; SANTOS; PACHECO, 2015).

A definição de curva padrão baseia-se na relação absorbância/ concentração. A aplicação no RT-qPCR o *Ct* torna-se o valor base de cálculo, porém é dependente de um conhecimento prévio dos padrões em uso que devem ser identificados por métodos independentes. Desta forma, o *Ct* “desconhecido” é comparado ao padrão para determinar o número de cópias iniciais da reação, que podem variar entre amostras de plasmídeo para o gene de interesse ou oligonucleotídeo sintético de cadeia simples (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Em relação a análise relativa, ela tem como objetivo avaliar o padrão de expressão gênica em comparação à uma amostra e a um gene referência, sendo assim denominado Método CT comparativo. A escolha por esta metodologia de análise é iniciada a partir da escolha adequada e validação dos genes endógenos a serem usados como controle de reação. Questões como tratamento e as vias que podem integrar a resposta devem ser

priorizadas para que este gene controle não tenha a sua expressão afetada pelo tratamento. A próxima etapa para à análise baseia-se no controle do experimento, que muitas vezes mimetiza situações em que a expressão do gene em estudo tenha um acréscimo de destaque (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Passados estes passos a quantificação relativa baseia-se no método de limiar comparativo (método 2-Ct), na qual o nível de expressão do gene alvo (ΔCt) é calibrado pelo controle endógeno Ct da “amostra” -Ct do gene calibrador, na qual o gene calibrador exerce o papel de “limpeza” da reação retirando o que seria esperado como uma expressão basal. Exemplos como Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), beta-actina e Proteína Ribossômica S18, são exemplos de controles endógenos bem estabelecidos e citados nos trabalhos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Passados esta etapa, a expressão do gene de interesse é calibrada com o controle da reação experimental obtendo-se assim o $\Delta\Delta Ct$, seguido do cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Tabela 2).

	Gene Calibrador	Gene Alvo	ΔCt <i>Ct Alvo – Ct Calibrador</i>	ΔCt Médio	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct \text{ Alvo} - \Delta Ct \text{ Calibrador}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Controle da reação no experimento	17.93	22.42	4.49			
	17.97	22.34	4.37	4.39 ± 0.09	0 ± 0.09	¹ (0.9 – 1.1)
	17.95	22.26	4.31			
	20.87	19.48	-1.39			
Experimento Teste	20.91	19.44	-1.47	$-1.36 \pm 0,13$	$-5,75 \pm 0,13$	53.82 (49.18 – 58.89)
	20.85	19.63	-1.22			

Tabela 2. Explicação metodologia para quantificação relativa baseada no 2- $\Delta\Delta Ct$

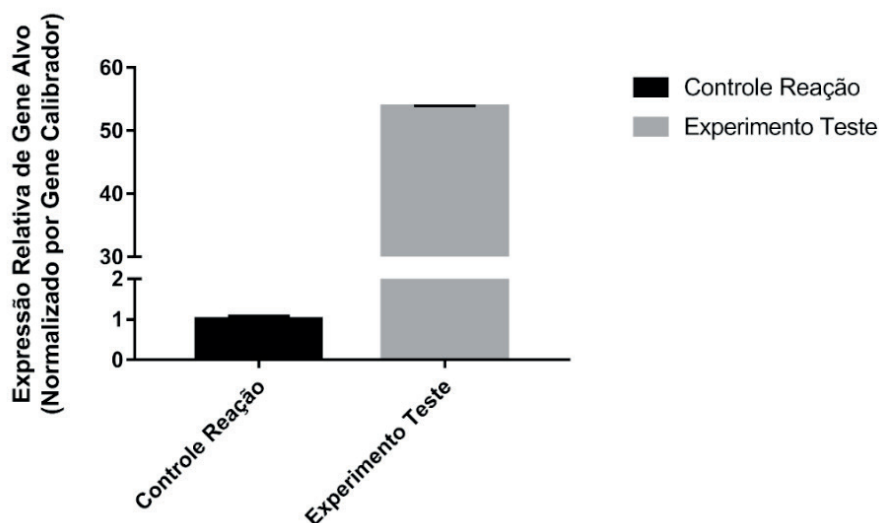


Figura 6. Representação gráfica dos resultados apresentados na Tabela 2.

6 | CONCLUSÃO

O entendimento sobre o DNA e RNA bem como as correlações baseadas no controle da expressão gênica permanecem entre os principais alvos de estudo na clínica médica e áreas correlatas. O aprofundamento sobre a genética molecular trouxe avanços no entendimento sobre síndromes, mutações, rastreo genético, desenvolvimento de doenças, patógenos etc. As metodologias de estudo baseadas na PCR permanecem sendo essenciais como ferramenta de estudo e de diagnóstico. Nesse sentido, o RT-qPCR possibilitou a abordagem quantitativa dos dados, por meio da inserção dos fluorocromos, e tornou os experimentos e testes mais reprodutíveis, com acréscimos metodológicos na sensibilidade, precisão e acurácia dos testes.

REFERÊNCIAS

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide To Performing Relative Quantitation of Genes Expression**. Using Real-Time Quantitative PCR, Foster City, California, 2004.

BUSTIN, S.A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays**. J Mol Endocrinol., v.25, n.2, p.169-193, 2000.

DE PAULA, S.O.; LIMA, C.M.; TORRES, M.P.; et al. **One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches**. J Clin Virol., v.30, n.4, p. 297-301, 2004

DING, C.; CANTOR, C.R. **Quantitative analysis of nucleic acids - the last few year sof progress**. J Biochem Mol Biol., v.37, n.1, p.1-10, 2004.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. **A novel method for real time quantitative RT-PCR**. Genome Res., v.6, n.10, p. 995-1001, 1996.

GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. **Synthesis of cDNA Probes from mRNA Using Random Oligonucleotide Primers.** Cold Spring Harb Protoc., v.2019, n.7, 2019.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; et al. **Real time quantitative PCR.** Genome Res., v.6, n.10, p.986-993, 1996.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; et al. **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** Proc Natl Acad Sci USA, v.88, n.16, p. 7276-7280, 1991.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; et al. **The real-time polymerase chain reaction.** Mol Aspects Med. v.27, n.2-3, p.95-125, 2006.

LI, K.; BROWNLEY, A. **Primer design for RT-PCR.** Methods Mol Biol., v. 630, p. 271-299, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)).** Method. Methods., v.25, n.4, p. 402-408, 2001.

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTEWER, C.T. **Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.** BioTechniques., v.24, n.6, p.954-962, 1998.

NAKAMURA, T.; SCORILAS, A.; STEPHAN, C.; et al. **Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues.** Br J Cancer., v.88, n.7, 2003.

RASHED-UL ISLAM, S.M.; JAHAN, M.; TABASSUM, S. **Evaluation of a Rapid One-step Real-time PCR Method as a High-through put Screening for Quantification of Hepatitis B Virus DNA in a Resource-limited Setting.** Euroasian J Hepatogastroenterol., v.5, n.1, p.11-15, 2015.

ROCHA, D.J.; SANTOS, C.S.; PACHECO, L.G. **Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis.** Meta-Analysis. Antonie Van Leeuwenhoek., v.108, n.3, p.685-693, 2015.

SANDERS, R.; BUSTIN, S.; HUGGETT, J.; MASON, D. **Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR.** Biomol Detect Quantif., v.15, p. 13-17, 2018.

STANGEGAARD, M.; DUFVA, I.H.; DUFVA, M. **Reverse transcription using random pentadecamer primers in creases yield and quality of resulting cDNA.** Biotechniques, v.40, n.5, p.649-657, 2006.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; et al. **A practical approach to RT-qPCR - Publishing data that conform to the MIQE guidelines.** Methods., v.50, n.4, p.S1-S5, 2010.

TAYLOR, S.C.; MRKUSICH, E.M. **The state of RT-quantitative PCR: first hand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real time PCR experiments (MIQE).** J Mol Microbiol Biotechnol., v.24, n.1, p.46-52, 2014.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. **Real-time PCR for mRNA quantitation.** Biotechniques, v.39, n.1, p.75-85, 2005.

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br