

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 Cremo

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. Eloi 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. Fernando 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 Emidio 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 Miraniide 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 Andrezza 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 Krahl – 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 Lúvia 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. Biología Molecular. 2. Biotecnología. 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 ABREVIações E SIGLAS	1
CAPÍTULO 1.....	3
A EVOLUÇÃO 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 GERAÇÃO	
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
PRÍNCIPIOS BÁSICOS EM AMPLIFICAÇÃO 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 EXPRESSÃO GÊNICA	
Mayara Mota de Oliveira Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104065	
CAPÍTULO 6.....	58
FERRAMENTAS DE EDIÇÃO GÊNICA	
Joaquim Gasparini dos Santos Aline Ribeiro Borçoi	
DOI 10.22533/at.ed.7532104066	
CAPÍTULO 7.....	69
EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS	
Karolinni Bianchi Britto	

Greiciane Gaburro Paneto

DOI 10.22533/at.ed.7532104067

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

LISTA DE ABREVIÇÕES 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 Interspaçadas (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>)

PRÍNCIPIOS BÁSICOS EM AMPLIFICAÇÃO DO DNA E GENÔMICA DE CÉLULAS ÚNICAS

Data de aceite: 10/05/2021

Data de submissão: 14/04/2021

Bárbara Risse-Quaioto

Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade São Camilo-ES, Bacharela em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal do Espírito Santo e Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória - ES
<http://lattes.cnpq.br/7948833367111238>

Anderson Barros Archanjo

Farmacêutico, Doutor e Pós-Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO
Vitória - ES
<http://lattes.cnpq.br/5529149503714764>

RESUMO: A compreensão da heterogeneidade celular tem motivado o desenvolvimento tecnológico, resultando em diversos métodos poderosos para analisar o genoma de células únicas. O sequenciamento de célula única consiste em isolar uma única célula, extrair e amplificar seu DNA ou RNA para análises posteriores, envolvendo principalmente sequenciamento de nova geração. Dessa forma, objetivou-se descrever as principais técnicas utilizadas no método single-cell genomics, além de identificar os principais avanços e contribuições da técnica para estudos em biologia molecular. Os principais métodos para isolamento de células únicas incluem: Classificação Celular Ativada por Fluorescência (FACS); Classificação de Células Ativadas Magneticamente (MACS); Microdissecação de

Captura a Laser (LCM); Coleta Manual de Células ou Micromanipulação; e Microfluídicos. Além dos métodos de isolamento celular, existem métodos para isolamento direto do núcleo: Isolamento de Núcleos Marcados em Tipo Celular Específico (INTACT) e; Isolamento Descontínuo da Cromatina Específica de Tecido para Imunoprecipitação (BiTS-ChIP). Métodos de amplificação de genoma inteiro foram desenvolvidos para gerar quantidade de DNA suficiente para o posterior sequenciamento, sendo os três principais: Reação em Cadeia da Polimerase Iniciada por Oligonucleotídeo Degenerado (DOP-PCR); Amplificação de Deslocamento Múltiplo (MDA); e Múltiplos Ciclos de Amplificação Baseados em Anelamento e Loop (MALBAC). Os avanços nas análises de células únicas possibilitaram novas descobertas na biologia molecular, bem como na medicina. O sequenciamento genômico de células únicas ampliará cada vez mais o conhecimento a cerca da complexidade e heterogeneidade celular em organismos normais, bem como no desenvolvimento dos seres vivos e das doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia Molecular; Biotecnologia; Genômica.

BASIC PRINCIPLES IN DNA AMPLIFICATION AND SINGLE CELL GENOMICS

ABSTRACT: The understanding of cellular heterogeneity has motivated technological development, resulting in several powerful methods to analyze the genome of single cells. Single-cell genome sequencing consists of isolating a single cell, extracting and amplifying its DNA or RNA for further analysis, mainly involving new generation sequencing. Thus, the objective was to describe the main techniques used in the single-cell genomics method, in addition to identifying

the main advances and contributions of the technique to studies in molecular biology. The main methods for isolating single cells include: Fluorescence-activated cell sorting (FACS); Magnetic activated cell sorting (MACS); Laser capture microdissection (LCM); Manual cell collection or Micromanipulation; e Microfluids. In addition to cell isolation methods, there are methods for direct isolation of the nucleus: Isolation of nuclei in tagged cell types (INTACT); Isolation of tissue-specific chromatin for immunoprecipitation (BiTS-ChIP). Methods of whole genome amplification were developed to generate enough DNA for subsequent sequencing, the main three being: Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR); Multiple Displacement Amplification (MDA); e Multiple annealing and looping based amplification cycles (MALBAC). The advances of single-cell analysis enabled new discoveries in molecular biology as well as in medicine. Genomic sequencing of single cells will increasingly expand knowledge about the complexity and cellular heterogeneity in normal organisms, as well as in the development of living beings and diseases.

KEYWORDS: Molecular biology; Biotechnology; Genomics.

1 | INTRODUÇÃO

Quase todo o conhecimento sobre o genoma e sua regulação foi obtido através de estudos ao nível de população celular, geralmente analisando uma mistura de milhares ou milhões de células. Isso porque os métodos tradicionais de sequenciamento podem obter apenas a média de muitas células, o que gera a perda de informações de heterogeneidade celular (MACAULAY; VOET, 2014). Então, é importante considerarmos que os tecidos raramente são homogêneos, onde o genoma está sujeito a adquirir mutações genéticas e a variabilidade da expressão gênica está presente em todas as células, mesmo dentro de uma população fenotipicamente homogênea (HUANG, 2009).

Na última década, a compreensão da heterogeneidade celular tem motivado o desenvolvimento tecnológico, resultando em diversos métodos poderosos para analisar o genoma de células únicas (KALISKY; BLAINEY; QUAKE, 2011). A tecnologia de sequenciamento de DNA vem melhorando constantemente desde o seu surgimento, na década de 1970. Inicialmente a tecnologia de sequenciamento de células únicas teve seu uso restrito, devido ao alto custo. Porém, conforme o passar do tempo, novos métodos foram criados, permitindo a ampliação da utilização, sendo atualmente cada vez mais utilizada em vários campos (SHAPIRO; BIEZUNER; LINNARSSON, 2013). Em 2013, a técnica foi escolhida pela Nature Methods como a tecnologia do ano.

O sequenciamento de célula única consiste em isolar, em uma única célula, extrair e amplificar seu DNA ou RNA (dependendo do foco do estudo) para análises posteriores, envolvendo principalmente sequenciamento de nova geração.

Os desafios nos estudos com base em sequenciamento de célula única incluem o isolamento eficiente das células, a amplificação do genoma com obtenção de material suficiente para as posteriores análises, sequenciamento econômico para identificar variações, bem como a interpretação dos dados, levando em consideração possíveis erros durante essas etapas (GAWAD; KOH; QUAKE, 2016). A seguir, descreveremos as principais técnicas envolvidas na realização do isolamento de células únicas, bem como amplificação do seu genoma.

2 | MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE CÉLULA ÚNICA

A primeira etapa do estudo com células únicas requer o isolamento de células individuais. Para tanto, foram desenvolvidas diferentes tecnologias para isolamento celular, sendo as principais descritas mais a diante neste capítulo.

Os métodos de isolamento de célula única podem seguir dois tipos de amostragem, a imparcial ou a tendenciosa. A amostragem imparcial é realizada de forma aleatória, refletindo melhor a composição do tecido estudado. Já a amostragem tendenciosa é feita de maneira direcionada, onde é possível isolar tipos celulares raros ou específicos de interesse (SHAPIRO; BIEZUNER; LINNARSSON, 2013).

Os principais métodos para isolamento de células únicas incluem: 1) Classificação Celular Ativada por Fluorescência (FACS); 2) Classificação de Células Ativadas Magneticamente (MACS); 3) Microdissecção de Captura a Laser (LCM); 4) Coleta Manual de Células ou Micromanipulação; e 5) Microfluídicos (Figura 1).

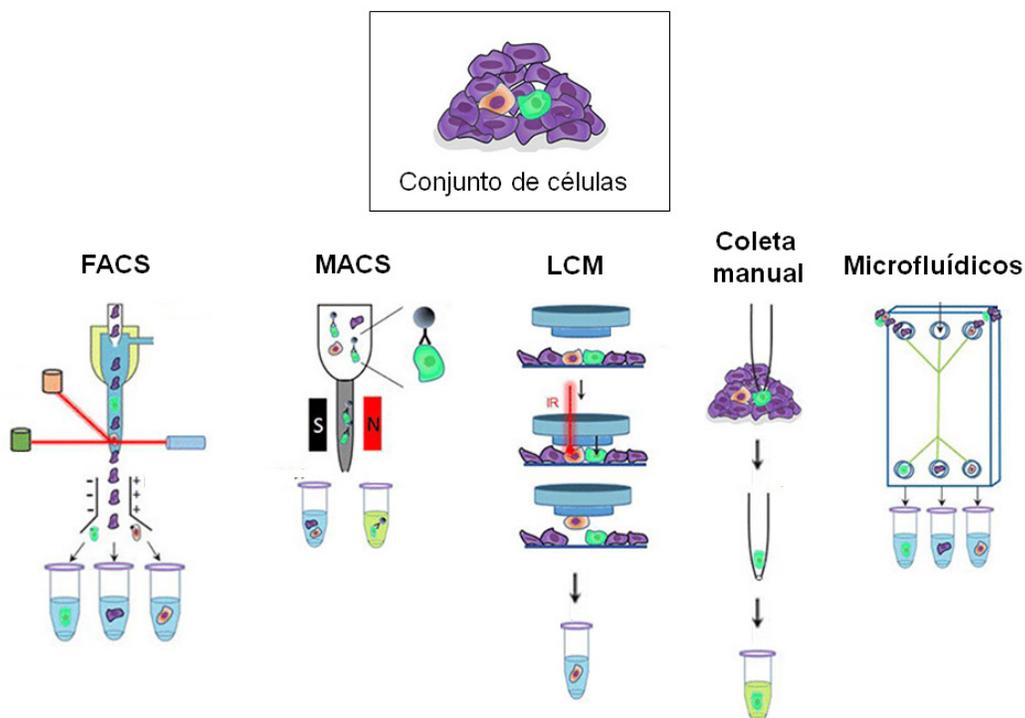


Figura 1. Visão geral das técnicas de isolamento celular. Fonte: Adaptado de Hu et al. (2016).

1) Classificação Celular Ativada por Fluorescência (FACS):

Este método é baseado em citometria de fluxo que utiliza a marcação de células alvo com sondas fluorescentes, como por exemplo, anticorpos monoclonais, que reconhecem marcadores específicos nas células. Conforme as células marcadas em

suspensão percorrem a citometria, um laser é emitido pelo aparelho, e dessa forma, as células podem ser separadas conforme características específicas (HERZENBERG; SWEET; HERZENBERG, 1976).

2) Classificação de Células Ativadas Magneticamente (MACS):

A separação de células através deste método é baseada na separação por carga, utilizando anticorpos, enzimas, lectinas ou estreptavidinas associadas a esferas magnéticas para ligar proteínas específicas nas células-alvo. Posteriormente a esta marcação, as células são colocadas em um campo magnético externo e as esferas magnéticas ativadas. Consequentemente, células marcadas com as esferas magnéticas polarizam e as demais são lavadas (MILTENYI et al., 1990).

3) Microdissecção de Captura a Laser (LCM):

O método LCM permite a separação de células a partir de amostras de tecido principalmente sólidas em uma lâmina de microscópio. É utilizado um microscópio invertido com um sistema de captura a laser infravermelho ou ultravioleta. A partir da visualização e reconhecimento da célula alvo, o laser é emitido a fim de derreter um fino filme termoplástico (polímero de acetato de etileno e vinil) acima da célula, fundindo-o a ela. A remoção do filme permite também a remoção da célula, enquanto o restante do tecido permanece na lâmina (EMMERT-BUCK et al., 1996).

4) Coleta Manual de Células ou Micromanipulação:

Este método é frequentemente utilizado, em virtude do baixo custo e do simples processo. A técnica consiste na utilização de um microscópio invertido combinado com micropipetas, onde o pesquisador visualiza o conjunto de células e isola-as de forma imparcial.

5) Microfluídicos:

Existem diferentes categorias dentro deste método, no qual a técnica baseada em cromatografia de afinidade celular é a mais utilizada. Utiliza-se um chip modificado com anticorpos específicos, capazes de ligar-se ao antígeno na superfície celular das células de interesse. À medida que a amostra flui através de microcanais, as células alvo são ligadas ao chip através da interação antígeno-anticorpo e são imobilizadas, enquanto as outras células fluem normalmente. Este método é geralmente associado à FACS ou MACS, por exemplo.

Além dos métodos de isolamento celular descritos acima, existem métodos para isolamento direto do núcleo. A seguir iremos descrever rapidamente os dois principais métodos: 1) Isolamento de Núcleos Marcados em Tipo Celular Específico (INTACT) e; 2) Isolamento Descontínuo da Cromatina Específica de Tecido para Imunoprecipitação (BiTS-ChIP) (Figura 2).

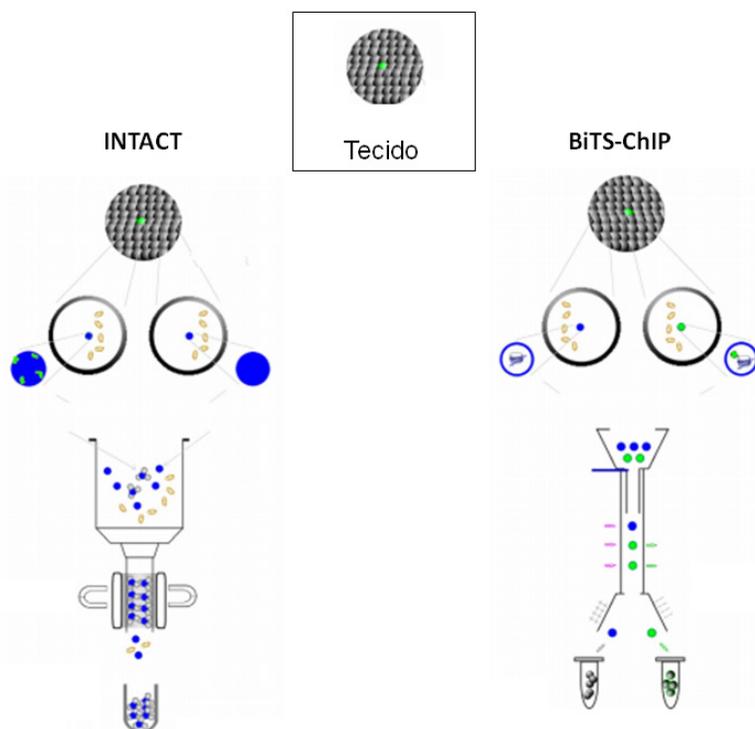


Figura 2. Visão geral das técnicas de isolamento de núcleos. Fonte: Adaptado de Zeb et al. (2019).

1) Isolamento de Núcleos Marcados em Tipo Celular Específico (INTACT):

INTACT é um método para isolar núcleos de células específicas, baseado em afinidade. O método utiliza marcação de núcleos com biotina a partir de uma proteína de fusão direcionada ao envelope nuclear externo. A purificação dos núcleos marcados é realizada com o auxílio de esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (DEAL; HENIKOFF, 2010).

2) Isolamento Descontínuo da Cromatina Específica de Tecido para Imunoprecipitação (BiTS-ChIP):

Esta técnica é realizada marcando com fluorescência uma proteína nuclear expressa no tipo celular de interesse. Os núcleos fluorescentes são classificados através de FACS e posteriormente a cromatina é cortada e extraída. O corte da cromatina possibilita a imunoprecipitação do DNA associado à proteína de interesse (BONN et al., 2012).

3 | AMPLIFICAÇÃO DO DNA E SINGLE-CELL GENOMICS

Quando trabalhamos com metodologias de amplificação do DNA, seja por técnicas convencionais ou por métodos de célula única, a qualidade e a quantidade do DNA genômico extraído são fundamentais. Uma célula humana diplóide, por exemplo, contém aproximadamente 7 pg de DNA genômico e para realizarmos as diversas análises é necessária à sua amplificação (MACAULAY; VOET, 2014).

Dessa forma, muitos métodos de amplificação de genoma inteiro foram desenvolvidos para gerar quantidade de DNA suficiente para o posterior sequenciamento. Os três principais métodos de amplificação do genoma incluem: Reação em Cadeia da Polimerase Iniciada por Oligonucleotídeo Degenerado (DOP-PCR); Amplificação de Deslocamento Múltiplo (MDA); e Múltiplos Ciclos de Amplificação Baseados em Anelamento e Loop (MALBAC).

Os métodos possuem diferentes vantagens e desvantagens, as quais devem ser levadas em consideração na hora do pesquisador escolher o melhor método para sua pesquisa. Bourcy e colaboradores (2014) comparando quantitativamente o desempenho dos métodos MDA e MALBAC na amplificação de todo o genoma concluíram que nenhum método apresenta total desempenho em todos os critérios (uniformidade da cobertura, taxas de erro e nível de contaminação). Dessa forma, a escolha do método deve obedecer ao objetivo do experimento.

1) *Reação em Cadeira da Polimerase Iniciada por Oligonucleotídeo Degenerado (DOP-PCR):*

A PCR é uma técnica bastante utilizada na biologia molecular com a finalidade de amplificar uma região do DNA, sendo capaz de gerar milhares a milhões de cópias após vários ciclos da reação. Este método é dependente da enzima Taq DNA polimerase e de primers específicos para a região de interesse.

O método DOP-PCR foi proposto em 1992 por Telenius e colaboradores, utilizando primers degenerados (Figura 3). Sabe-se que o código genético é degenerado, ou seja, um mesmo aminoácido pode ser codificado por diferentes códons. Considerando isso, para que todas as possibilidades de códons sejam expressas, primers degenerados não são formados por uma sequência específica e única, mas sim por um conjunto de sequências, de acordo com as possíveis bases em determinadas posições.

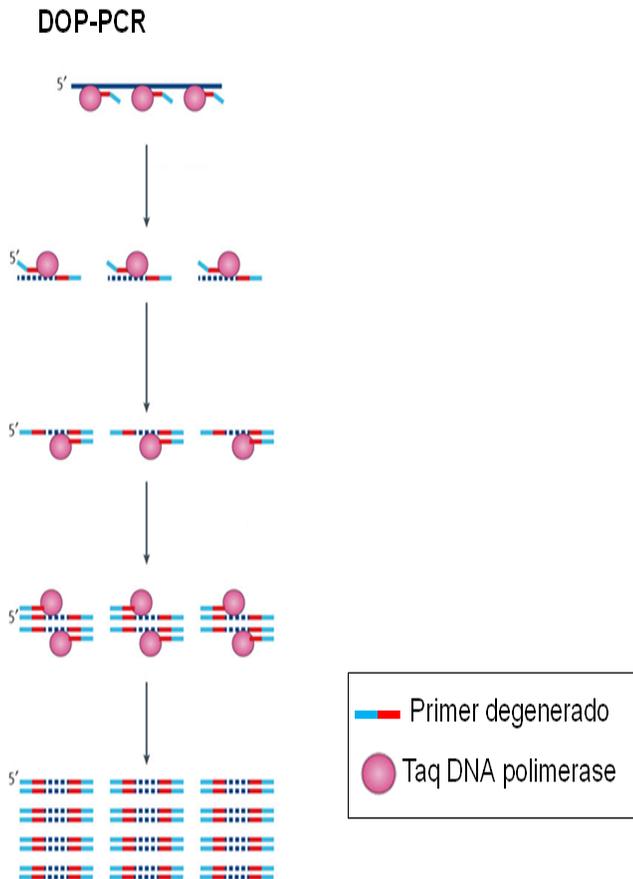


Figura 3. Visão geral da técnica DOP-PCR. A dupla fita de DNA é desnaturada para permitir o anelamento dos primers degenerados às fitas simples. Posteriormente, a Taq DNA polimerase inicia a amplificação da fita simples de DNA. Depois de repetidos ciclos, existem várias cópias do mesmo DNA, e as fitas simples se unem por complementariedade. Fonte: Adaptado de Gaward, Koh e Quake (2016).

O princípio do método DOP-PCR é a utilização do primer degenerado. A reação inicia-se com o processo de pré-amplificação, onde ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA, seguida do anelamento do primer a uma temperatura inicial baixa. A pré-amplificação é seguida pela amplificação por PCR das fitas de DNA. Após vários ciclos, o DNA molde é então amplificado em várias cópias.

Para uma amplificação eficiente, os autores indicam dois pontos fundamentais, que incluem uma baixa temperatura inicial, a fim de permitir ao primer iniciar o processo a partir de sequências alvo curtas, e utilização de primer degenerado. Com relação ao rendimento, fatores limitantes incluem a concentração do primer utilizado e da Taq polimerase, pois, diferente da PCR convencional, a DOP-PCR busca amplificar o maior número possível de locais (TELENIUS et al., 1992).

2) Amplificação de Deslocamento Múltiplo - MDA

Diferente dos métodos baseados em PCR que utilizam a Taq DNA polimerase para a polimerização de novas fitas de DNA, Dean e colaboradores descreveram o método MDA em 2002, utilizando a enzima polimerase replicativa do fago *Bacillus subtilis* phi29 (phi29 DNA polimerase).

A phi29 DNA polimerase além de realizar o processo de polimerização, é capaz de produzir deslocamento da fita recém-sintetizada (BLANCO et al., 1989). Dessa forma, polimerizações secundárias são iniciadas a partir de produtos primários (Figura 4).

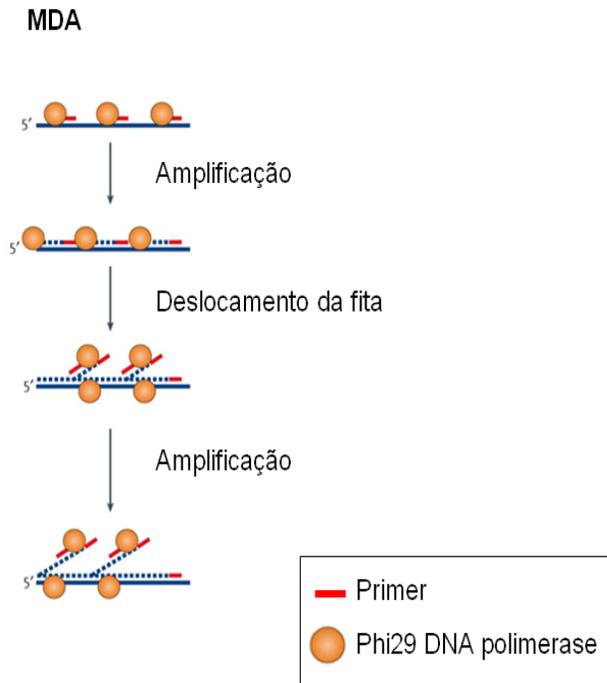


Figura 4. Visão geral da técnica de MDA. Após anelamento do primer, a Phi29 DNA polimerase inicia a amplificação do DNA. A fita recém-sintetizada é deslocada ainda pela Phi29 DNA polimerase, permitindo novos anelamentos de primers e amplificações secundárias. Fonte: Adaptado de Gaward, Koh e Quake (2016).

O processo do método é semelhante à PCR, ocorrendo desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento do primer e sintetização de novas fitas. Porém, como a polimerase em questão possibilita além a amplificação, o deslocamento da fita recém-sintetizada, amplificações secundárias são realizadas nessas fitas, gerando maior rendimento.

MDA é uma técnica simples, a qual pode ser feita com uma variedade de amostras biológicas e seu produto de DNA gerado é maior que 10 kb. O método é eficiente para diversas aplicações, como análise de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e hibridação comparativa de genoma. Além disso, o MDA não depende de elevada temperatura para a desnaturação da dupla fita de DNA, dessa forma, as chances de degradação do DNA são reduzidas, e a especificidade

da amplificação da sequência melhora (DEAN et al., 2002).

3) Múltiplos Ciclos de Amplificação Baseados em Anelamento e Loop – MALBAC

Em 2012, Zong e colaboradores descreveram um novo método de amplificação, denominado MALBAC. Este é um método híbrido, onde inicialmente ocorre amplificação com a phi29 DNA polimerase, seguida de amplificação por PCR com a Taq DNA polimerase. (Figura 6).

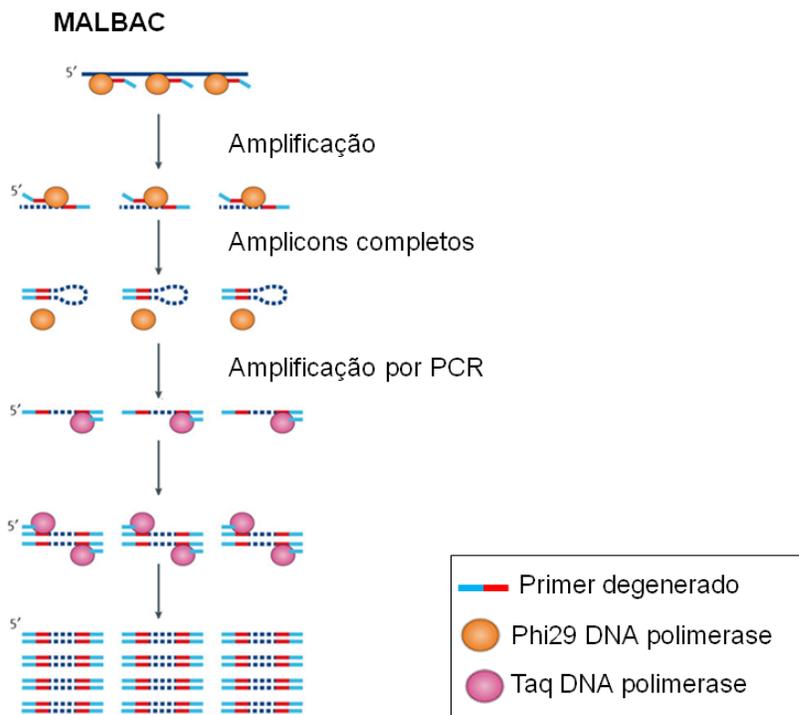


Figura 6. Visão geral da técnica MALBAC. O método híbrido inicia com anelamento do primer degenerado e amplificação e deslocamento da fita pela Phi29 DNA polimerase. Essa primeira amplificação dá origem a semiamplicons. Ocorre outra amplificação originando amplicons completos que possuem a extremidade 3' complementar à extremidade 5'. Essas extremidades complementares se unem, gerando um DNA em loop. Os amplicons completos são amplificados pela Taq DNA polimerase em uma reação de PCR, permitindo a formação de diversas cópias do mesmo DNA. Fonte: Adaptado de Gaward, Koh e Quake (2016).

A amplificação pela Phi29 DNA polimerase gera semiamplicons. Posteriormente, ocorre uma segunda amplificação nestes semiamplicons, gerando amplicons denominados completos, que por possuírem sua extremidade 3' complementar à sequência na extremidade 5', formam uma estrutura de DNA em loop. Após repetidos ciclos de amplificação e deslocamento, os amplicons completos são encaminhados para a amplificação por PCR pela Taq DNA polimerase.

O método garante maior uniformidade na cobertura do genoma, chegando a uma cobertura de até 93% do genoma, bem como detecção mais precisa de variações no número de cópias e polimorfismos de nucleotídeo único (ZONG et al., 2012).

4 | APLICAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços nas tecnologias de análises de células únicas possibilitaram novas descobertas na biologia molecular, bem como na medicina. Tecnologias unicelulares podem direcionar o desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente imunoterápicos contra o câncer (YOFE; DAHAN; AMIT, 2020).

As pesquisas com câncer foram muito beneficiadas com os avanços nas análises de célula única, uma vez que tumores são complexos e apresentam grande heterogeneidade celular. Entender o ambiente intratumoral possibilita melhores respostas aos tratamentos propostos. Além disso, ressalta-se o grande potencial de tecnologias unicelulares na detecção de lesões pré-neoplásicas, contribuindo no diagnóstico da doença (BASLAN; HICKS, 2017).

O sequenciamento genômico de célula única também contribuiu para o avanço em diversas outras áreas da biologia molecular, incluindo a identificação de variações cromossômicas, como número de cópias e variações de nucleotídeo único, evolução de tumores, gênese dos gametas, mosaicismos somáticos, o que se reflete na heterogeneidade genômica entre uma população de células (HU et al., 2016).

Percebe-se o crescente progresso nos últimos tempos nos métodos de análise de células únicas. Ainda existem limitações a serem superadas, como o aumento na taxa de rendimento do isolamento celular, bem como melhorias na amplificação do DNA. Fato é que o sequenciamento genômico de células únicas ampliará cada vez mais o nosso conhecimento acerca da complexidade e heterogeneidade celular em organismos normais, bem como no desenvolvimento dos indivíduos e das doenças.

REFERÊNCIAS

BASLAN, T.; HICKS, J. **Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing.** *Nature Reviews Cancer.* v. 17, p. 557–569. 2017.

BOURCY, C. F. *et al.* **A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods.** *PloS one.* v. 9, n. 8, p 1-9. 2014.

BLANCO, L. *et al.* **Highly efficient DNA synthesis by the phage phi29 DNA polymerase.** *The journal of biological chemistry.* v. 264, p. 8935-8940. 1989.

BONN, S. *et al.* **Cell type-specific chromatin immunoprecipitation from multicellular complex samples using BiTS-ChIP.** *Nature Protocols.* v. 7, n. 5, p. 978-994. 2012.

DEAL, R. B.; STEVEN, H. **A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue.** *Developmental Cell.* v. 18, p. 1030–1040. 2010.

DEAN, F. B. *et al.* **Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 99, n. 8, p. 5261–5266. 2002.

EMMERT-BUCK, M. R. *et al.* **Laser capture microdissection.** Science. v. 274, p. 998-1001. 1996.

GAWARD, C.; KOH, W.; QUAKE, S. R. **Single-cell genome sequencing: current state of the science.** Nature Reviews Genetics. v. 17, p.175–188. 2016.

GROSS, A. *et al.* **Technologies for Single-Cell Isolation.** International journal of molecular sciences. v. 16, n. 8, p. 16897–16919. 2015.

HERZENBERG, L. A.; SWEET, R. G.; HERZENBERG, L. A. **Fluorescence-Activated Cell Sorting.** Scientific American. v. 234, n. 3, p. 108–117. 1976.

HUANG, L. *et al.* **Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications.** Annual Review of Genomics and Human Genetics. v. 16, p. 79-102. 2015.

HUANG, S. **Non-genetic heterogeneity of cells in development: more than just noise.** Development. v. 136, p. 3853–3862. 2009.

HU, P. *et al.* **Single Cell Isolation and Analysis.** Frontiers in cell and developmental biology. v. 4, p. 1-12. 2016.

KALISKY, T.; BLAINEY, P.; QUAKE, S. R. **Genomic analysis at the single-cell level.** Annual review of genetics. v. 45, p. 431–445. 2011.

MACAULAY, I.C.; VOET, T. **Single cell genomics: advances and future perspectives.** PLoS Genetics. v. 30, p. 1-9. 2014.

MILTENYI, S. *et al.* **High gradient magnetic cell separation with MACS.** Cytometry. v. 11, p. 231-238. 1990.

SHAPIRO, E.; BIEZUNER, T.; LINNARSSON, S. **Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science.** Nature Reviews Genetics. v. 14, p. 618–630. 2013.

TELENIUS, H. *et al.* **Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer.** Genomics. v. 13, p. 718-725. 1992.

Method of the Year 2013. Nature Methods. v.11, n. 1, p. 1. 2014.

YOFE, I.; DAHAN, R.; AMIT, I. **Single-cell genomic approaches for developing the next generation of immunotherapies.** Nature Medicine. v. 26, p. 171–177. 2020.

ZEB, Q. *et al.* An Overview of Single-Cell Isolation Techniques. In: BARH, D.; AZEVEDO, V. **Single-Cell Omics: Technological Advances and Applications.** 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2019. cap. 6, p. 101-135.

ZONG, C. *et al.* **Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell.** Science. v. 338, p. 1622–1626. 2012.

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 @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