

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
 Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
 Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília
 Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
 Prof^a Dr^a 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
 Prof^a Dr^a 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
 Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
 Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
 Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
 Prof^a Dr^a Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
 Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof^a Dr^a 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
 Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof^a Dr^a 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
 Prof^a Dr^a Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof^a Dr^a 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
 Prof^a Dr^a 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
 Prof^a Dr^a Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
 Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
 Prof^a Dr^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
 Prof^a Dr^a 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 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 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 Krahel – 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 EVOLUÇÄO DA BIOLOGIA MOLECULAR E AS ÖMICAS	
Tamires dos Santos Vieira Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104061	
CAPÍTULO 2	14
GENÖMICA E OS SEQUENCIADORES DE PRÖXIMA GERAÇÖO	
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 AMPLIFICAÇÖO DO DNA E GENÖMICA DE CÉLULAS ÚNICAS	
Bárbara Risse-Quaioto Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104064	
CAPÍTULO 5	46
RT-qPCR: ESTUDOS DE EXPRESSÖO GÊNICA	
Mayara Mota de Oliveira Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104065	
CAPÍTULO 6	58
FERRAMENTAS DE EDIÇÖO GÊNICA	
Joaquim Gasparini dos Santos Aline Ribeiro Borçoi	
DOI 10.22533/at.ed.7532104066	
CAPÍTULO 7	69
EXPRESSÖO 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>)

GENÔMICA E OS SEQUENCIADORES DE PRÓXIMA GERAÇÃO

Data de aceite: 10/05/2021

Data de submissão: 15/04/2021

Paola Cerbino Doblás

Licenciada em Ciências Biológicas e Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).
<http://lattes.cnpq.br/4830901683783673>

Iuri Drumond Louro

Graduado em Medicina pela UFES, PhD em Biochemistry and Molecular Genetics e Pós-Doutorado em Cancer Genetics pela (UAB), Professor Titular da UFES e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UFES.
<http://lattes.cnpq.br/3817361438227180>

RESUMO: A genômica é um campo que surgiu para estudar a estrutura, a função e a expressão dos genes nos genomas dos organismos. Contudo, para estudar os genes é preciso ferramentas adequadas, como os sequenciadores de próxima geração (NGS). Estes passaram por diversas melhorias ao longo da história, possibilitando um sequenciamento mais preciso, mais automatizado, e mais rápido. Com isso, esta revisão tem como objetivo auxiliar os pesquisadores na escolha da plataforma adequada para sua pesquisa, demonstrando as diferentes características entre os sequenciadores de próxima geração, e suas principais vantagens e desvantagens. Com os NGSs é possível detectar variantes gênicas e, em alguns casos, variações no número de cópias. Através dos NGS, é possível sequenciar o DNA de qualquer organismo, tendo atualmente uso na prática médica, forense, estudos evolutivos e

em biotecnologia. O sequenciamento por meio dos NGSs necessita de quatro ou cinco etapas dependendo da plataforma, sendo elas, a etapa de extração do DNA, construção de uma biblioteca de fragmentos de DNA, amplificação dos fragmentos, leitura das sequências, e análise dos dados. Nesta revisão são citadas as plataformas: Roche, Illumina, Solid, IonTorrent, PacBio e Nanopore. A escolha da plataforma adequada depende dos objetivos e recursos de cada usuário.

PALAVRAS-CHAVE: NGS, sequenciamento, DNA.

GENOMICS AND NEXT GENERATION SEQUENCERS

ABSTRACT: Genomics is a field created to study the DNA structure, function and gene expression of any organism. However, when studying genes, one must have access to the appropriate tools, such as Next Generation Sequencers. These have undergone several improvements throughout history, enabling a more accurate, automated and faster sequencing. Thus, this review aims to assist researchers in choosing the appropriate platform for their research, showing different characteristics among next-generation sequencers along with their main advantages and disadvantages. With NGSs, it is possible to observe genetic variants and, in some cases, copy number variations. NGS are capable of sequencing DNA from any organism. They are currently used in clinical practice, forensic, evolutionary studies and biotechnology. NGS sequencing requires four or five steps, depending on the platform: DNA extraction, DNA fragment library construction, amplification, sequencing and data analysis. The platforms cited in this review are: Roche Illumina, Solid, IonTorrent, PacBio and Nanopore. Choosing the right platform depends on

the purpose and resources of each user.

KEYWORDS: NGS, sequencing, DNA.

1 | A HISTÓRIA DO SEQUENCIAMENTO DO DNA

Com a descoberta da estrutura tridimensional do DNA, em 1953, os pesquisadores começaram a despertar ainda mais interesse por esta molécula, surgindo assim um novo campo na ciência, a genômica.

A genômica é a ciência que estuda a estrutura, a função e a expressão dos genes nos genomas dos organismos (HORGAN; LOUISE, 2011; SALZANO, 2014). Embora os pesquisadores conhecessem as estruturas presentes no DNA, sequenciá-lo ainda era uma tarefa difícil. Somente na década de 70, novas técnicas para o sequenciamento do DNA começaram a ser desenvolvidas (FIETTO; MACIEL, 2015; HEATHER; BENJAMIN, 2016).

Na época, dois grupos trabalhavam em desenvolver técnicas de sequenciamento: Alan Maxam e Walter Gilbert, do qual o princípio da técnica era marcar o DNA de interesse e depois quebrá-lo, com reagentes químicos, em pequenos fragmentos que podem ser lidos em gel de poliácridamida; Frederick Sanger e Alan Coulson, utilizaram a técnica baseada em reações enzimáticas, como a da DNA polimerase. Ambos faziam uso de marcadores radioativos. Em 1977, Sanger aperfeiçoou sua técnica utilizando didesoxinucleotídeos, e assim se deu início ao sequenciamento de primeira geração (HEATHER; BENJAMIN, 2016; SALZANO, 2014). Ao longo do tempo, as tecnologias avançaram e com isso a técnica de Sanger foi aprimorada e automatizada, até surgirem novas formas de sequenciamento.

Na década de 90, os sequenciadores trouxeram grandes feitos para a ciência, marcando a história dos sequenciadores. Em 1990, foi iniciado o Projeto Genoma Humano, que teve como objetivo obter toda a sequência do genoma humano em 15 anos, e em 2003 o projeto foi concluído (COLLINS; MORGAN; PATRINOS, 2003). Diversos fatores influenciaram para a que a leitura fosse realizada em menos tempo, como a automatização das técnicas de PCR e de Sanger, grandes avanços da bioinformática, além da melhoria do sequenciamento pela técnica de *Shotgun Sequencing*.

Em 1995, a técnica de *Shotgun Sequencing* possibilitou o sequenciamento completo dos genomas das espécies: *Hameophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*. Ela acabou sendo revolucionária para o projeto genoma humano, pelo fato de permitir o sequenciamento em paralelo, e sem precisar do conhecimento prévio das sequências adjacentes. A técnica consiste em fragmentar o DNA aleatoriamente com enzimas de restrição, construir uma biblioteca de fragmentos em vetores de sequenciamento, e posterior alinhamento das sequências. (LOMAN; PALLÉN, 2015; SALZANO, 2014; VENTER et al., 1998). Ao longo do tempo as tecnologias permitiram o surgimento de novos sequenciadores, conhecidos como Sequenciadores de Próxima Geração (NGSs).

A técnica de Sanger é utilizada até hoje e tem grande importância, principalmente para confirmar as variantes encontradas pelos NGSs, isso ocorre, pois há limitações em suas técnicas. Contudo, os NGSs permitem uma maior agilidade no sequenciamento, e geram maiores informações. Os NGSs, apesar de serem bem diferentes entre si em relação a leitura da sequência do DNA, possuem características semelhantes, como a necessidade

da construção de uma biblioteca de fragmentos, leitura em paralelo e repetitiva e a ausência do uso de gel. Esta revisão tem como objetivo auxiliar os pesquisadores na escolha da plataforma adequada para suas pesquisas, demonstrando as principais diferenças entre os sequenciadores de próxima geração, e suas principais vantagens e desvantagens.

2 | APLICAÇÕES DOS NGSS

Os NGSS são eficazes para observar variantes gênicas, como mutações e polimorfismos, inserções e deleções pequenas (*indels*), e dependendo do pipeline utilizado, podem detectar variações no número de cópias. São eficientes para estudos genômicos, metagenômico e epigenômicos. Estes sequenciadores são capazes de sequenciar qualquer DNA, como o de cloroplastos, mitocôndrias ou DNA nuclear de células germinativas ou somáticas, e de quaisquer organismos, como vírus, bactérias e humanos (VOELKERDING; DAMES; DURTSCHI, 2009; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Devido à sua ampla capacidade de leitura e geração de dados, os NGSS são usados na prática médica. Com a leitura gênica é possível identificar alterações genéticas hereditárias ou não, como deficiências, síndromes, cegueira, surdez, entre diversos distúrbios renais, neurológicos, do tecido conjuntivo, entre outros. Na oncologia, o sequenciamento de determinados genes pode ajudar a entender se o câncer é hereditário ou somático, assim como definir opções de tratamento. É possível também verificar predisposição ao câncer por meio de painéis genéticos (BEHJATI; TARPEY, 2013; YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Estes painéis também podem ser estabelecidos para outras doenças genéticas, como doenças cardiovasculares, neurológicas, hematológicas, etc. Os testes genéticos podem ajudar a tomar medidas preventivas (JÚNIOR et al., 2019; KALAYINIA et al., 2017).

Como os NGSS são eficientes para quaisquer organismos, na medicina, eles ajudam a identificar patógenos como vírus, bactérias e outros. O sequenciamento dos genomas desses organismos facilita o diagnóstico, e ajudam no desenvolvimento de vacinas e remédios.

Em meio a pandemia do coronavírus em 2020, o sequenciamento rápido do vírus SarsCov-2 permitiu verificar as variações genéticas importantes para o desenvolvimento de possíveis vacinas e drogas. Conhecer a sequência gênica também facilitou para o desenvolvimento de diagnósticos por RT-PCR ou sorologia, ajudou a identificar outros microorganismos associados, além de possibilitar a identificação de cepas variantes (DIAS et al., 2020; TANG et al., 2020).

Na área forense, as sequências de repetições curtas em tandem (STR) são as mais usuais para identificação do DNA coletado. Os NGSS permitem a amplificação de amostras degradadas e com pouca quantidade de DNA (ALVAREZ-CUBERO et al., 2017).

Os novos sequenciadores também ajudam a reconstruir as filogenias e com isso fazer inferências evolutivas. Nos diferentes organismos há muitas regiões homólogas e regiões com polimorfismo ou mutações, com os NGSS estas regiões e as variações gênicas puderam ser melhor observadas (KADLEC, 2017).

3 I SEQUENCIADORES DE PRÓXIMA GERAÇÃO (NGS)

Os sequenciadores de próxima geração, também são conhecidos como sequenciadores massivamente paralelos. Receberam esse nome pelo salto na sua capacidade de sequenciamento quando comparados a tecnologias previamente existentes, ou seja, são capazes de sequenciar um número ainda maior de fragmentos de DNA simultaneamente (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; NARCISO; BEVITORI, 2014; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Serão apresentados neste capítulo as seguintes plataformas: Roche, Illumina, Solid e IonTorrent PacBio e Nanopore

A leitura por meio dos NGSs necessita de quatro ou cinco etapas: 1-Extração do DNA de interesse; 2- construção de uma biblioteca de sequenciamento; 3- amplificação dos fragmentos a serem sequenciados; 4- leitura das sequências; 5- Análise dos dados (YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

3.1 Extração do DNA

Existem diferentes protocolos para extração de DNA, da qual a escolha depende do tipo de material biológico e da pesquisa. Para o sequenciamento, o método de extração não terá influência, desde que a extração apresente uma boa qualidade e uma quantidade razoável de DNA. Como os NGS são bem sensíveis, não necessitam de grandes quantidades. A verificação da qualidade e quantidade do DNA podem ser medidas pelos equipamentos Nanodrop ou gel de agarose e Qubit ou picogreen (SIMBOLO et al., 2013; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Existem protocolos de extração mais baratos como os realizados por fenol e/ou clorofórmio ou etanol, porém são substâncias que podem agir como inibidores, por este motivo necessitam de várias etapas de lavagem, tornando a técnica mais demorada e mais suscetível a erros devido as diversas manipulações. Um alternativa seriam kits comerciais. Algumas empresas, como a Thermo Fisher Scientific, Kasvi, Qiagen ou Promega disponibilizam kits específicos para cada material biológico, com diferentes rendimentos dependendo do valor (SCHIEBELHUT et al., 2016).

3.2 Construção de uma biblioteca de sequenciamento

Há diversos protocolos e kits que permitem a construção da biblioteca, da qual se resume em fragmentar o DNA e adicionar adaptadores nas extremidades dos fragmentos (DIJK; JASZCZYSZYN; THERMES, 2014; FIETTO; MACIEL, 2015; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Como o NGS sequencia fragmentos menores que os de Sanger, o DNA é quebrado em fragmentos menores (*reads*). A quebra do DNA pode ser efetuada por métodos químicos, como o uso das enzimas de restrição, ou métodos físicos, como a sonicação (VAN DIJK; JASZCZYSZYN; THERMES, 2014; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Em seguida os adaptadores, que são oligonucleotídeos, são adicionados às extremidades dos fragmentos pelas enzimas ligases. Estes podem ter a função de ancorar o fragmento de DNA à superfície da plataforma em *beads* ou *flowcell*, complementar o

primer para anelamento, ou identificar os fragmentos por barcode ou índice em plataformas que permitam a multiplexação (GOETZE; PASSAIA; SPERB-LUDWIG, 2017; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Nas tecnologias mais atuais, adaptadores tipo *hairpin*, possuem a função de conectar um filamento de DNA a outro (Figura 1). A tecnologia Pacbio utiliza o adaptador *hairpin* em ambas as extremidades, enquanto a de nanopore, usa o adaptador *hairpin* em apenas uma das extremidades (GROHME et al., 2013).

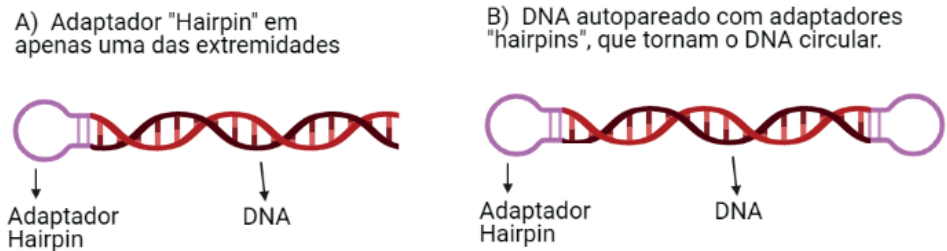


Figura 1. Adaptadores tipo *hairpin*. A) Adaptador *hairpin* em apenas uma extremidade, comum na tecnologia de nanopore. B) Adaptadores *hairpin* em ambas as extremidades, tornando o DNA um único filamento circular autopareado, usado na plataforma Pacbio. Fonte: Próprio autor.

Dependendo da tecnologia são adicionados adaptadores complementares para anelamento do primer somente em uma ou nas duas extremidades. Quando o sequenciamento ocorre em apenas um sentido, sequenciamento *single end*, é adicionado o adaptador (*forward*) em apenas uma extremidade (Figura 2). A maioria dos NGSs usam essa técnica, como a Roche, SOLID e Ion Torrent. O sequenciamento *paired end* é quando há o sequenciamento em ambos os sentidos do fragmento, sendo adicionado adaptadores em ambas as extremidades (*forward* e *reverse*), como ocorre na plataforma Illumina (ESCALONA; ROCHA; POSADA, 2016; GREH, 2018).

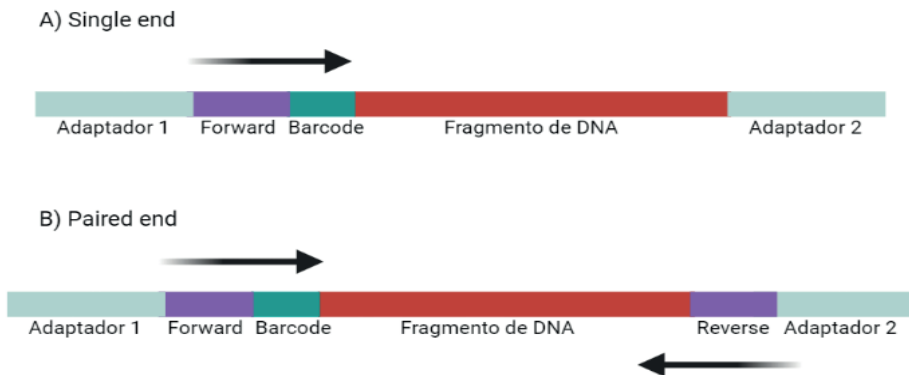


Figura 2. Adição dos adaptadores aos Fragmentos. As setas indicam o sentido da leitura. a) *Single end*: Leitura em apenas um sentido. b) *Paired end*: Leitura em ambos os sentidos. Fonte: Próprio autor.

O sequenciamento *mate-pair* são sequências mais longas (*scaffold*), que também permitem a leitura em ambos os sentidos. Sua construção é realizada adicionando biotina nas extremidades dos *scaffolds*. As biotinas se ligam formando um DNA circular, para que depois sejam fragmentados. Os fragmentos com biotina são selecionados e então são adicionados adaptadores nas extremidades (Figura 3) (NIEUWERBURGH et al., 2011). As plataformas como Roche e Solid são capazes de realizar este tipo de leitura (BERGLUND; KIILAINEN; SYVÄNEN, 2011).

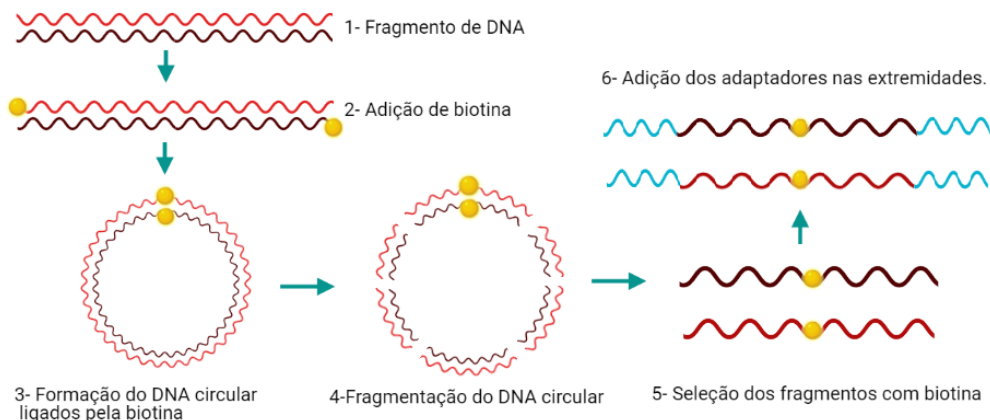


Figura 3. Construção da biblioteca de sequenciamento a partir de *scaffolds*, para sequenciamento *mate-pair*. Fonte: Próprio autor

Após a construção da biblioteca de sequenciamento o fragmento está disponível para a próxima etapa, podendo ser amplificado ou sequenciado.

3.3 Amplificação do fragmento

É muito comum que haja amplificação dos fragmentos selecionados, porém alguns equipamentos atuais como a da tecnologia de PacBio ou Nanopore não necessitam dessa etapa. A amplificação também é conhecida como enriquecimento, pois gera uma maior quantidade de DNA adaptados. A amplificação pode ser feita por PCR, na qual os fragmentos podem ser ancorados em microesferas (*beads*) ou em placa de vidro (*flow cell*) (VAN DIJK; JASZCZYSZYN; THERMES, 2014; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

A amplificação em *beads* ocorre em uma solução aquosa com óleo, conhecido como PCR em Emulsão. Da qual cada microgota aquosa com um *bead* fica imersa em uma solução oleosa. Para a multiplicação dos fragmentos são necessários os reagentes de PCR e os fragmentos adaptados. As microesferas possuem adaptadores por toda sua superfície, que se ligam aos fragmentos em uma de suas extremidades, fixando-os na superfície. E assim o *primer* pode se anelar à outra extremidade do fragmento para que ocorra a amplificação. As plataformas Roche 454, Solid e Ion torrent utilizam esta amplificação (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; FIETTO; MACIEL, 2015).

A plataforma Illumina faz uso da amplificação por pontes em *flowcell* que são cobertas por primers *forward* e *reverse*. O fragmento de interesse se liga, em uma de suas extremidades ao primer complementar presente na placa (*forward*), enquanto a

outra extremidade se liga ao primer complementar mais próximo na placa (*reverse*). Os nucleotídeos são adicionados formando uma dupla fita em forma de ponte. Quando há o processo de desnaturação, as fitas se separam e apenas uma das extremidades ficará fixada e a outra ficará livre, permitindo que no próximo ciclo haja o anelamento com outros primers mais próximos na *flowcell*, havendo um aumento do número de fragmentos (FIETTO; MACIEL, 2015; KNETSCH et al., 2019).

3.4 Sequenciamento

O sequenciamento do DNA depende de cada equipamento. A leitura pode ocorrer em poços como os equipamentos da Roche 454 e Ion Torrent ou em placas como da Illumina e a SOLID (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Nos equipamentos atuais costuma-se utilizar a nanotecnologia como nanoporos em células de fluxo na tecnologia *Oxford Nanopore Technologies* ou matriz nanofotônica ZMW (*zero-mode waveguide*) utilizada pela Pacbio (FENG et al, 2015; HEATHER; BENJAMIN, 2016).

A maioria das plataformas, para fazer a leitura, utilizam a enzima DNA polimerase, da qual é adicionado nucleotídeos à cadeia (FIETTO; MACIEL, 2015). A tecnologia Pacbio, apesar de fazer uso da DNA polimerase, sua enzima é específica e necessita de ficar imobilizada na superfície próxima ao detector ZMW (EID et al., 2009). A tecnologia SOLID, por sua vez, não utiliza a DNA polimerase, pois faz uso de sondas que são ligadas pela enzima DNA ligase (FIETTO; MACIEL, 2015). A tecnologia da *Oxford Nanopore* não necessita da construção de uma nova fita para detecção, dessa forma, a leitura ocorre quando o fragmento de interesse passa pelo nanoporo (FENG et al, 2015).

Para detectar qual nucleotídeo ou sonda está sendo incorporado as tecnologias podem fazer uso de fluorescência, pirofosfato ou voltagem. Na tecnologia da Roche 454 a detecção da incorporação nucleotídica ocorre pela liberação de um pirofosfato. A plataforma Illumina é semelhante à de Sanger, do qual a detecção nucleotídica ocorre por fluorescência emitida a cada nucleotídeo terminal reversível incorporado.

Outras plataformas como a SOLID e a Pacbio também fazem uso de fluorescência. As tecnologias que utilizam a voltagem são: Ion torrent e *Oxford Nanopore*. A tecnologia Ion Torrent faz detecção pela mudança de pH gerada pela incorporação de cada nucleotídeo (CHRISTOFF, 2017), enquanto a da *Oxford Nanopore* à medida que cada nucleotídeo passa pelo nanoporo, há uma mudança na corrente elétrica, gerando uma voltagem diferente respectiva a cada base (LEGGETT; CLARK, 2017).

3.5 Análise dos dados

Cada plataforma irá gerar um gráfico segundo sua tecnologia de detecção. A plataforma Roche 454 e de Ion Torrent, por exemplo, devido a dispensação nucleotídica ser de apenas um tipo de base nitrogenada, conhecida pelo programa, cada nucleotídeo incorporado gera um pico de acordo com a quantidade incorporada, formando um gráfico (pirograma) no caso da Roche 454 ou um gráfico de voltagem como no equipamento Ion Torrent (FIETTO; MACIEL, 2015; GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

As tecnologias que utilizam a fluorescência também geram um tipo de gráfico, comumente chamado de cromatograma, pois cada base nitrogenada possui uma cor específica. Dessa forma, o programa consegue visualizar qual nucleotídeo foi incorporado

(CHRISTOFF, 2017). O mesmo ocorre com a tecnologia de Nanopore, que apesar de não ser por fluorescência, cada nucleotídeo que passa pelo nanoporo irá gerar uma voltagem específica, formando um gráfico.

Para que seja possível compreender os resultados apresentados nos gráficos, e interpretar a grande quantidade de dados gerados, os softwares realizam uma análise, traduzindo os gráficos em palavras (*string*) para que assim seja possível obter a sequência. Os resultados passam por uma série de processos, chamados de *pipelines* de análises genômicas, que são programas sequenciais dependentes uns dos outros (MELO, 2009; YOHE; THYAGARAJAN, 2017).

Algumas plataformas por permitirem a multiplexação, ou seja, a mistura de amostras, necessitam da etapa de desmultiplexação, que é quando o programa identifica e separa as amostras (ALEXANDER et al, 2012; YOHE; THYAGARAJAN, 2017). A sequência interpretada pelos softwares precisa ser salva na forma de texto ou binária em formatos que variam entre plataformas, como FASTA, FASTQ, SFF, BAM ou SAM, entre outros (ESCALONA; ROCHA; POSADA, 2016; YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Assim, obtendo-se a sequência é possível verificar variantes e realizar inferências genômicas.

3.6 Vantagens e desvantagens de cada técnica

3.6.1 Roche 454

A grande vantagem de utilizar esta tecnologia é a redução do tempo e a capacidade de fazer leitura de *reads* mais longas com 600pb. Contudo existe uma maior chance de gerar *indels* (inserção e deleção), isso ocorre principalmente nas regiões homopolímeras, que são sequências de um mesmo nucleotídeo. Outro fator importante é o custo mais elevado devido a grande quantidade de reagentes para o pirosequenciamento. Tendo em vista suas vantagens e desvantagens ele é mais usual para sequenciamento de genomas de organismos menores como vírus e bactérias e ideal para verificar mutações pontuais, porém sua tecnologia não tem sido mais comercializada (FIETTO; MACIEL, 2015; LEDERGERBER; DESSIMOZ, 2011; CHRISTOFF, 2017; ZHANG et al., 2011; ZHOU et al., 2010).

3.6.2 Illumina/Solexa

A vantagem dessa técnica é o alto rendimento e possibilidades de multiplex. Além disso, devido ao seu bloqueio para adicionar mais de um nucleotídeo por vez, não há dificuldade em sequenciar regiões homopolímeras. Por outro lado, o equipamento é extremamente caro e pode haver erros de incorporação das bases. São ideais para aplicações genômicas e metagenômicas, RNAs, detecção de mutações somáticas, testes pré-natais e aplicações forenses (CHRISTOFF, 2017; SHENDURE; JI, 2008).

3.6.3 Solid

A principal vantagem dessa técnica é a qualidade dos dados. Entretanto, sua técnica é mais lenta que as demais. São bastante usados para genomas complexos, detecção de

mutações e polimorfismos, além de permitir multiplex (CHRISTOFF, 2017).

3.6.4 *Ion Torrent*

Devido à semelhança com a plataforma Roche, as vantagens e as desvantagens da plataforma Ion costumam ser as mesmas. Seus equipamentos são mais baratos, capazes de ler *reads* mais longos e o sequenciamento é mais rápido se comparado à outras plataformas. Porém tem problemas com as regiões homopoliméricas, e o sequenciamento de um genoma completo pode ainda ser um problema. São ideais para detectar variações como polimorfismos e mutações pontuais. A plataforma tem se voltado muito para área clínica, com equipamentos voltados para diagnóstico como a Ion Personal Genome Machine (PGM) e Ion S5 (CHRISTOFF, 2017; GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

3.6.5 *Pacific Biosciences*

A plataforma possui vantagens como por exemplo o sequenciamento ser mais rápido que outros métodos, isso é possível pois não há processo de amplificação e nem etapas de lavagens. Outra vantagem é o comprimento das *reads*, que podem chegar até 60kb. O problema está no custo que ainda é elevado e a taxa de erros que é considerada alta. A leitura por CCS diminui a taxa de erro devido a quantidade de vezes que o fragmento é sequenciado gerando uma maior precisão. A tecnologia é ideal para sequenciamento de genomas, transcriptomas e até mesmo epigenomas de organismos complexos (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; YOHE; THYAGARAJAN, 2017; ZOLET et al., 2017).

3.6.6 *Nanopore*

As principais vantagens do nanopore é leitura de longas sequências em menos tempo, detecções de variantes, e a possibilidade de transportar o equipamento. Ideais para estudos genômicos, metagenômicos e epigenômicos, tem sido amplamente utilizado para detecção de patógenos. Apesar de apresentar altas taxas de erro, a plataforma tem investido em diminuí-los, aumentando cada vez mais a precisão do sequenciamento, porém ainda não é o ideal para leitura de sequenciamento de novos genomas (CHRISTOFF, 2017; JAIN et al., 2016).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sequenciar o DNA tem grande importância para as práticas na área da saúde, na biotecnologia, forense, agropecuária entre outras. Os Sequenciadores novos podem ajudar e muito a otimizar o trabalho. É preciso analisar as vantagens e desvantagens de cada técnica. Desta forma, a escolha da plataforma vai depender do objetivo e dos recursos de cada usuário.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, C. *et al.* **HighSSR: High throughput SSR characterization and locus development from next gen sequencing data.** Oxford University Press, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Peter_Houde/publication/230810081_HighSSR_High-throughput_SSR_characterization_and_locus_development_from_next-gen_sequencing_data/links/560d4fb508ae6cf68153e93c.pdf. Acesso em: 07 de jul de 2020.
- ALVAREZ-CUBERO, M. J. *et al.* **Next generation sequencing: an application in forensic sciences.** *Annals of human biology*, v. 44, n. 7, p. 581-592, 2017.
- BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. **What is next generation sequencing?** *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, v. 98, n. 6, p. 236-238, 2013.
- BERGLUND, E.C.; KIIALAINEN, A.; SYVÄNEN, A.C. **Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics.** *Investig Genet.* v.2, n.23, p.2-15, 2011.
- CHRISTOFF, A.P. **Genômica e sequenciamento de nova geração.** In TURCHETTO-ZOLET, *et al.* **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p.21-50. Disponível em: https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf#page=22. Acesso em: 5 de jul de 2020.
- COLLINS, F. S.; MORGAN, M.; PATRINOS, A. **The Human Genome Project: lessons from large-scale biology.** *Science*, v. 300, n. 5617, p. 286-290, 2003.
- DIAS, V.M.C.H *et al.* **Orientações sobre Diagnóstico, Tratamento e Isolamento de Pacientes com COVID-19.** *J Infect Control*, v. 9, n. 2, p. 1-20, 2020.
- EID, J. *et al.* **Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.** *Science*, v. 323, n. 5910, p. 133-138, 2009.
- ESCALONA, M.; ROCHA, S.; POSADA, D. **A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data.** *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 8, p. 459, 2016.
- FENG, *et al.* **Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology.** *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.* v. 13, n.1, p.4-16, 2015.
- FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L.M. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações.** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. v. 1, p. 27–64. Disponível em: <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%AAnciando%20genomas.pdf>. Acesso em: 5 de jul de 2020.
- GOETZE, M.; PASSAIA, G.; SPERB-LUDWIG, F. Marcadores moleculares baseados em restrição: AFLP e suas variações. In TURCHETTO-ZOLET, *et al.* **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p.60-76.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. **Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies.** *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 6, p. 333, 2016.
- GREHL, C. *et al.* **How to design a whole-genome Bisulfite sequencing experiment.** *Epigenomes*, v. 2, n. 4, p. 21, 2018.
- GROHME, M. A. *et al.* **Microsatellite marker discovery using single molecule real-time circular consensus sequencing on the Pacific Biosciences RS.** *BioTechniques*, v. 55, n. 5, p. 253-256, 2013.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. **The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA**. Genomics, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. **‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics**. The Obstetrician & Gynaecologist, v. 13, n. 3, p. 189-195, 2011.

JAIN, M. *et al.* **The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community**. Genome Biology, v. 17, n. 239, p. 1-11, 2016.

LAMOUNIER JÚNIOR, A. *et al.* **Importância do Teste Genético na Miocardiopatia Dilatada: Aplicações e Desafios na Prática Clínica**. Arquivos brasileiros de cardiologia, v. 113, n. 2, p. 274-281, 2019.

KADLEC, M. *et al.* **Targeted NGS for species level phylogenomics: “made to measure” or “one size fits all”?**. PeerJ, v. 5, 2017.

KALAYINIA, S. *et al.* **Next generation sequencing applications for cardiovascular disease**. Annals of medicine, v. 50, n. 2, p. 91-109, 2018.

KNETSCH, C. W. *et al.* DNA sequencing. In: VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN LEEUWEN, W.B.; TE WITT, R. **Molecular Diagnostics**. Singapore: Springer, 2019. p. 339-360. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-1604-3_8. Acesso em: 07 de jul de 2020.

LEDERGERBER, C.; DESSIMOZ, C. **Base-calling for next-generation sequencing platforms**. Briefings in bioinformatics, v. 12, n. 5, p. 489-497, 2011.

LEGGETT, R. M.; CLARK, M. D. **A world of opportunities with nanopore sequencing**. Journal of Experimental Botany, v. 68, n. 20, p. 5419-5429, 2017.

LOMAN, N. J.; PALLAN, M.J. **Twenty years of bacterial genome sequencing**. Nature Reviews Microbiology, v. 13, n. 12, p. 787-794, 2015.

MELO, H. V. F. *et al.* **Desenvolvimento de um pipeline para análise genômica e transcriptômica com base em web services**. 108f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2009.

NARCISO, M. G.; BEVITORI, R. **Utilização de ferramentas computacionais para análise de expressão de genes**. Embrapa (INFOTECA-E), p.8, 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1003470/1/ct219.pdf>. Acesso: 07 de jul de 2020.

NIEUWERBURGH, F.P. *et al.* **Illumina mate-paired DNA sequencing-library preparation using Cre-Lox recombination**. Nucleic Acids Research, v.4, n3, p. 24, 2011.

VENTER, J.C. *et al.* **Shotgun Sequencing of the Human Genome**. Science, v. 280, p. 1540-1542, 1998.

VOELKERDING, K. V.; DAMES, S. A.; DURTSCHI, J. D. **Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics**. Clinical chemistry, v. 55, n. 4, p. 641-658, 2009.

SALZANO, F.M. **Genômica e Evolução: moléculas, organismos e sociedade**. São Paulo. Oficina de Textos, 2012. p.272.

SCHIEBELHUT, L. M. *et al.* **A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses**. Molecular ecology resources, v.17, n.4, p.721-729, 2016.

SHENDURE, J.; JI, H. **Next-generation DNA sequencing**. Nature biotechnology, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SIMBOLO, M. *et al.* **DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples**. PloS one, v. 8, n. 6, 2013.

STRÖHER, P. R. **Sequenciamento de nova geração e entomologia: Novas perspectivas para antigos questionamentos**. Revista da Biologia. v. 18, n.1, p.6-16, 2018.

TANG, X. *et al.* **On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2**. National Science Review . v.7, ed. 6, p. 1012-1023, 2020.

VAN DIJK, E. L.; JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. **Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias**. Experimental cell research, v. 322, n. 1, p. 12-20, 2014.

YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. **Review of clinical next-generation sequencing**. Archives of pathology & laboratory medicine, v. 141, n. 11, p. 1544-1557, 2017.

ZHANG, J. *et al.* **The impact of next-generation sequencing on genomics**. Journal of genetics and genomics, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZHOU, X. *et al.* **The next-generation sequencing technology: A technology review and future perspective**. Ciência China Life Sciences , v. 53, n. 1, p. 44-57, 2010.

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