

# SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) POR NANOPOROS: COMO FUNCIONA A TÉCNICA

*Data de aceite: 01/12/2023*

### **Luisa Padaratz Mendes**

Bolsista PROBIC, Acadêmica da 8ª fase de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Santa Catarina, Brasil

### **Ketrianne Mota de Souza Lourenço**

Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pelo curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Santa Catarina, Brasil

### **Carla Ivane Ganz Vogel**

Professora Associada do Departamento de Produção Animal e Alimentos do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Santa Catarina, Brasil.

Com o passar dos anos, o desenvolvimento científico possibilitou descobertas antes inimagináveis. Não só é possível explorar o que ficou no passado, como material genético de dinossauros, preguiças gigantes e mamutes, mas

também o que está ocorrendo em tempo real e ainda prever o que virá no futuro no âmbito da saúde humana, animal e ambiental, a partir do mapeamento de genomas de vírus e outros agentes ainda pouco conhecidos. Atualmente, o sequenciamento de DNA em larga escala permite que os pesquisadores analisem, cataloguem e utilizem os dados obtidos para desenvolver medicamentos, vacinas, experimentos e muitos outros recursos que beneficiam as populações ao redor do mundo. Devido à pandemia de COVID-19, a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) tornou-se mais difundida, uma vez que o sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 auxiliou em diferentes estratégias de combate à pandemia. Entre os exemplos estão a detecção de variantes circulantes e a utilização dos dados obtidos através do sequenciamento na produção de vacinas.

O sequenciamento do genoma viral é um processo meticuloso e complexo, com inúmeras etapas, necessitando de ferramentas específicas (Fig. 1).

Primeiramente, é necessário coletar a amostra (saliva ou fluido nasofaríngeo, por exemplo) e extrair dela o material genético presente. Como o material genético do vírus SARS-CoV-2 é RNA (aproximadamente 30.000 bases, fita simples), antes do sequenciamento ser realizado utiliza-se uma técnica para transformar esse RNA em cDNA (por meio da ação da enzima Transcriptase Reversa). Após isto, o cDNA é submetido à PCR multiplex, uma técnica que possibilita a produção de várias cópias de diferentes regiões deste cDNA. As três etapas principais da técnica de PCR são a desnaturação da fita de DNA, o anelamento dos primers (iniciadores) e a extensão da fita pela polimerase. Ao final desse processo, utiliza-se a eletroforese em gel de agarose para observar se houve amplificação de material genético. Resumidamente, essa técnica consiste na separação de moléculas de DNA pelo seu tamanho, a partir da criação de um campo elétrico que força essas moléculas a se movimentarem, no gel, do polo negativo em direção ao polo positivo. Compara-se o tamanho dos amplicons com um marcador de peso molecular para identificar se a amostra de DNA foi corretamente amplificada por meio da PCR multiplex. Os amplicons resultantes da PCR multiplex são então submetidos aos próximos passos do protocolo de sequenciamento com o objetivo de prepará-los para serem adicionados em um dispositivo de sequenciamento por nanoporos (MinION) da Oxford Nanopore Technologies. Em seu interior, instala-se uma *flow cell* e, nela, há inúmeros nanoporos, pelos quais as fitas do (agora) DNA do SARS-CoV-2 são lidas – esse é o processo de sequenciamento.

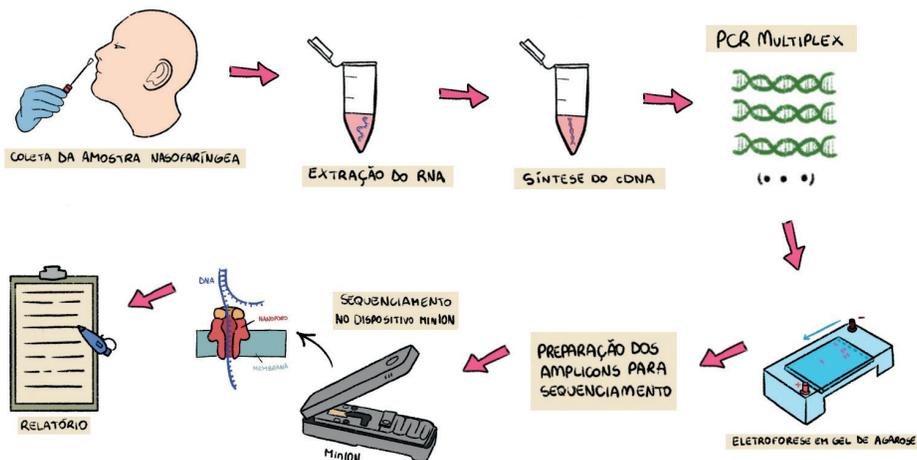


Figura 1: Fluxograma apresentando um exemplo de processo de sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 por nanoporos. Ilustração por Beatriz Padaratz Mendes.

Finalizado o sequenciamento, os dados são reunidos em alguns arquivos, em uma pasta no computador conectado ao MinION. Esses arquivos podem ser anexados diretamente na plataforma EPI2ME – ela é baixada diretamente do site da Oxford Nanopore

Technologies. No programa, seleciona-se “Iniciar nova análise” e anexa-se os arquivos que contêm o resultado da leitura do DNA. Depois, indica-se qual o protocolo se quer usar para a análise. Para amostras de SARS-CoV-2, um dos protocolos utilizados é o protocolo Fastq QC + ARTIC + NextClade. Em seguida, em alguns minutos, o *software* realiza todo o reconhecimento dos dados, gerando um relatório completo sobre o sequenciamento da amostra. Esse relatório apresenta qual a linhagem e variante do vírus, quantas leituras de DNA foram realizadas (cada leitura indica uma passagem de fita de DNA por um poro do equipamento), como ficou a cobertura dos pares de bases contidos na amostra, em que regiões desse DNA encontram-se mutações, quais são elas e em qual troca de aminoácidos elas resultam, entre vários outros dados.

Através do sequenciamento de DNA, é possível identificar a variante do SARS-CoV-2 de cada amostra submetida ao sequenciamento. Além do mais, os dados analisados também permitem observar as mutações e mudanças ocorridas em comparação às outras cepas e ao genoma referencial, descoberto no final do ano de 2019. A saúde pública como um todo é beneficiada com técnicas como a de sequenciamento. Com os sucessivos avanços tecnológicos e científicos, uma enorme quantidade de patologias e agentes etiológicos pode ser estudada, elucidada e combatida com as técnicas de sequenciamento. Desta forma, o sequenciamento pode auxiliar na produção de vacinas, medicações e terapias eficazes, não só no contexto de enfermidades humanas, mas também no que concerne a Medicina Veterinária, a partir do estudo de zoonoses, doenças animais importantes para a produção animal, para a fauna silvestre e para os *pets*.

## REFERÊNCIAS

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. **Quantitative real-time RT-PCR – a perspective**. *Journal of Molecular Endocrinology*, Londres, v. 34, ed. 3, p. 597-601, 2005. DOI <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>. Disponível em: <<https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/34/3/0340597.xml>>. Acesso em: 28 ago. 2023.

CORRALES, Guillermo. **PCR - Polymerase Chain Reaction (IQOG-CSIC)**. YouTube, 20 abr. 2014. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>>. Acesso em: 28 ago. 2023.

Oxford Nanopore Technologies. **Introduction to Oxford Nanopore Technologies - The Company**. Disponível em: <[https://community.nanoporetech.com/nanopore\\_learning/courses/introduction-to-nanopore-sequencing/lessons/oxford-nanopore-technologies](https://community.nanoporetech.com/nanopore_learning/courses/introduction-to-nanopore-sequencing/lessons/oxford-nanopore-technologies)>. Acesso em: 26 ago. 2023.

Oxford Nanopore Technologies. **Introduction: Nanopore sequencing**. Disponível em: <[https://community.nanoporetech.com/nanopore\\_learning/courses/artic-protocol-course/lessons/introduction-to-nanopore-sequencing](https://community.nanoporetech.com/nanopore_learning/courses/artic-protocol-course/lessons/introduction-to-nanopore-sequencing)>. Acesso em: 1 set. 2023.

Oxford Nanopore Technologies. **SARS-CoV-2: Classic ARTIC protocol**. Disponível em: <[https://community.nanoporetech.com/nanopore\\_learning/courses/artic-protocol-course/lessons/sars-cov-2-classic-artic-protocol](https://community.nanoporetech.com/nanopore_learning/courses/artic-protocol-course/lessons/sars-cov-2-classic-artic-protocol)>. Acesso em: 6 set. 2023.

Oxford Nanopore Technologies. **SARS-CoV-2: Course Introduction**. Disponível em: <[https://community.nanoporetech.com/nanopore\\_learning/courses/arctic-protocol-course/lessons/sars-cov-2-course-introduction](https://community.nanoporetech.com/nanopore_learning/courses/arctic-protocol-course/lessons/sars-cov-2-course-introduction)>. Acesso em: 2 set. 2023.

Oxford Nanopore Technologies. **SARS-CoV-2: The ARTIC protocol and how it works**. Disponível em: <[https://community.nanoporetech.com/nanopore\\_learning/courses/arctic-protocol-course/lessons/sars-cov-2-how-it-works](https://community.nanoporetech.com/nanopore_learning/courses/arctic-protocol-course/lessons/sars-cov-2-how-it-works)>. Acesso em: 6 set. 2023.

PAVÃO, Ana Luiza; JANOTTI, Letícia; MOURA, Maria de Lourdes; GOUVÊA, Carla; GRABOIS, Victor. **Nota Técnica: Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil**. Observatório Covid-19, [s. l.], 27 jul. 2020. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/documento/nota-tecnica-consideracoes-sobre-o-diagnostico-laboratorial-da-covid-19-no-brasil>>. Acesso em: 2 set. 2023.

ROEHE, Paulo Michel; CAMPOS, Fabrício Souza; SANTOS, Helton Fernandes dos. Aula 4: **Virologia Veterinária – Técnicas Moleculares**. LabVir – ICBS – UFRGS, [s. l.], 2015. Disponível em: <<https://ptdocz.com/doc/1196516/aula-pr%C3%A1tica--teoria--4---t%C3%A9cnicas-moleculares>>. Acesso em: 28 ago. 2023.

VIEIRA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. Instituto de Medicina Tropical - USP, [s. l.], 2015. Disponível em: <<https://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/protocolos/aula1.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2023.