

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**UDESC – CAMPUS OESTE**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**TAÍS REGINA SCZESNY**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO: GENÔMICA DE SUÍNOS E  
AVES – EMBRAPA – CNPSA.**

**CHAPECÓ, SC**  
**2016**

**TAÍS REGINA SCZESNY**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DE CONCLUSÃO DE CURSO:  
GENÔMICA DE SUÍNOS E AVES – EMBRAPA – CNPSA**

Relatório de Estágio Supervisionado de Conclusão apresentado ao Curso de Zootecnia – Ênfase em Produção Animal Sustentável, da Udesc – Campus Oeste, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Dr. Diego de Córdova Cucco  
Supervisor: Dra. Mônica Corrêa Ledur

**CHAPECÓ, SC**

**2016**

TAÍS REGINA SCZESNY

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DE CONCLUSÃO DE CURSO:  
GENÔMICA DE SUÍNOS E AVES – EMBRAPA – CNPSA**

Relatório de Estágio de Conclusão apresentado ao Curso de Zootecnia – Ênfase em Produção Animal Sustentável, do centro Campus Oeste, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Banca examinadora:

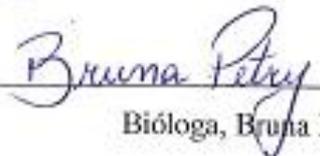
Orientador:

  
Dr. Diego de Córdova Cucco (UDESC- Oeste).

Membro:

  
PhD. Lenita de Cássia Moura Stefani (UDESC-Oeste).

Membro:

  
Bióloga, Bruna Petry.

Aprovado em: 23/06/16

CHAPECÓ, SC

2016

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus passos.

Aos meus pais Germano e Selia.

À minhas manas por todo apoio e motivação ao estudo.

Ao meu namorado Diego pelo carinho, companheirismo, atenção, divisão de sonhos e compartilhamento de conhecimento profissional.

As minhas amigas Adrieli, Andréia, Bruna, Iara, Julvane, Kaine, Maiara, Stefania e minha estrelinha que brilha no céu Ana Paula. Por serem pessoas especiais e fundamentais para chegar até aqui.

À equipe do laboratório de genética da Embrapa Suínos e Aves por toda paciência, conhecimento compartilhado e demonstração de que o trabalho em grupo é realmente valioso e motivacional.

A pesquisadora Dra. Mônica Corrêa Ledur, pela oportunidade de estágio.

Ao Prof. Dr. Diego de Córdova Cucco pela orientação e pelo grande exemplo de profissionalismo.

Ao grupo de melhoramento genético animal – GMG UDESC pela oportunidade de fazer parte deste.

Aos professores da minha graduação, em especial Aleksandro S. da Silva, Diego de C. Cucco, Marcel M. Boiago e Maria L. Zotti que tive oportunidade de trabalhar durante a graduação.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) Departamento de Zootecnia, tenho orgulho de concluir minha graduação nesta instituição.

## RESUMO

O Estágio Supervisionado de Conclusão de Curso foi realizado junto a Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves – CNPSA, em Concórdia-SC, na área de genômica, com o objetivo de aperfeiçoar e complementar os conhecimentos adquiridos ao longo da formação acadêmica e possibilitar o contato com uma instituição de pesquisa reconhecida na área agropecuária. O período de permanência na instituição foi de 18 de Fevereiro a 29 de Abril de 2016, totalizando 300 horas de atividades realizadas. No estágio foram desenvolvidas as seguintes atividades: visita a granja de melhoramento genético animal da Embrapa Suínos e Aves; necrópsia de animais de estudo para coleta de material; extração de DNA e RNA; quantificação de ácidos nucleicos; rotinas de laboratório de genética animal, PCR convencional, além da técnica de sequenciamento. A convivência com profissionais experientes e qualificados da área de genética e melhoramento animal foi fundamental para adquirir e ampliar o conhecimento do acadêmico na atuação profissional.

**Palavras-chave:** Biologia molecular. Embrapa Suínos e Aves. Genômica. Laboratório. Melhoramento Animal.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– A: Local de descanso pré-abate; B: Local de insensibilização.....	16
Figura 2– Pesagem .....	16
Figura 3– Coleta de materiais para estudo.....	17
Figura 4– Armazenamento de material em criotubo. ....	17
Figura 5– Curva de concentração de RNA no Qubit® .....	19
Figura 6– microtubo inserido no equipamento Qubit® .....	20
Figura 7– Equipamento BioDrop µLite® .....	21
Figura 8– Equipamento Agilent Bioanalyzer 2100® com chip para limpeza dos eletrodos com RNase Away .....	23
Figura 9– Estação do chip com a seringa encaixada na parte superior e o chip de RNA encaixado na parte inferior. ....	24
Figura 10– Eletroferograma de amostra de RNA, obtida no Bioanalyzer®. ....	24
Figura 11– Resultado em banda de amostra de RNA, obtida no Bioanalyzer®.....	24
Figura 12– Termociclador Veriti® .....	26
Figura 13– Ciclos da PCR em Termociclador Veriti®.....	27
Figura 14– Gel de agarose com marcador no 1º poço e demais poços amostras com corante, dentro da cuba com tampão (TBE). ....	29
Figura 15– Fotodocumentador L–Pix ex .....	29
Figura 16– Visualização das bandas fluorescentes por eletroforese em gel de agarose .....	30
Figura 17– Programação da reação de sequenciamento em termociclador Veriti® .....	32
Figura 18– Eletroferograma da leitura do sequenciamento. Abrange-se os nucleotídeos da região específica de estudo.....	32
Figura 19– Coluna DNeasy Mini colocada num microtubo de 2 mL. ....	40
Figura 20– Maceração de tecido em nitrogênio líquido. ....	42
Figura 21– Adição de clorofórmio (incolor) e trizol (rosa).....	42
Figura 22– Separação de fases após centrifugação. ....	42

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Código genético.....	11
Quadro 2– Efeito multiplicador .....	13
Quadro 3– Quantidade de agarose, devido ao volume e concentração do gel de agarose. ....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
OD	Densidade óptica
RNase	Ribonuclease
DNase	Desoxirribonuclease
Pb	Par de bases nitrogenadas.
Kb	Quilo pares de bases nitrogenadas
Gpb	Giga pares de bases nitrogenadas
V	Volts
UV	Radiação ultra violeta.
Nm	Nanômetro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
Mix	Mistura
mM	Mili molar
g	Gramma
mg	Miligramma
μg	Microgramma
ng	Nanogramma
°C	Grau Celsius
rpm	Rotação por minuto da centrífuga
xg	Força g da centrífuga

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
1.1	OBJETIVOS .....	9
1.1.1	Objetivo Geral .....	9
1.1.2	Objetivo Específico.....	9
1.2	JUSTIFICATIVA .....	9
<b>2</b>	<b>ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....</b>	<b>10</b>
2.1	DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA MOLECULAR .....	10
2.2	GRANJA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE AVES.....	11
2.3	PROJETOS DE PESQUISA .....	13
2.3.1	Hérnia umbilical e escrotal em suínos .....	13
2.3.2	Gene Halotano em suínos.....	13
2.3.3	Criptorquidismo em suínos .....	14
2.3.4	Gene da Distrofina (DMD).....	15
2.4	COLETA DE MATERIAL .....	15
2.5	EXTRAÇÃO DE DNA.....	17
2.6	EXTRAÇÃO DE RNA.....	18
2.7	QUANTIFICAÇÃO DE DNA E RNA .....	18
2.7.1	Fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen™) .....	19
2.7.2	Biodrop µLite ® .....	20
2.7.3	Agilent Bioanalyzer 2100®.....	22
2.8	PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	25
2.9	PCR CONVENCIONAL .....	25
2.10	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	27
2.11	SEQUENCIAMENTO .....	30
2.11.1	Sequenciamento didesoxi ou por terminação da cadeia.....	30
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>39</b>
5.1	PROTOCOLO: PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL A PARTIR DE TECIDOS ANIMAIS (CENTRIFUGAÇÃO–COLUNA) QIAGEN®.....	39

5.2	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDOS COM TRIZOL® (INVITROGEN®) (ADAPTADO DE CHOMCZYNSKI E SACCHI, 1987) + LIMPEZA DE RNA UTILIZANDO RNEASY MINI KIT (QIAGEN® - Nº DE CATÁLOGO: 74104 OU 74106).....	41
-----	--	----

## 1. INTRODUÇÃO

A Genômica é o estudo do genoma, sendo este o material genético dos seres vivos que é transmitido à sua prole, constituído pelo ácido desoxirribonucleico (DNA). Seu estudo, objetiva entender como os genes e a informação genética estão organizados dentro do genoma e como essa organização determina a sua função. Além disso, estuda questões complexas da genética molecular como, a manifestação do fenótipo para características quantitativas, que é o caso da maioria das características de produção (LEDUR; PEIXOTO, 2015?a).

A biologia molecular é o ramo da ciência que estuda a biologia a nível de moléculas, ou seja, trabalha com a formação, estrutura e a função dos ácidos nucleicos: DNA e RNA, e das proteínas. Os ácidos nucleicos constituem o material genético, e as proteínas os produtos de expressão (NICIURA, 2007), sendo importantes no estudo do genoma.

Segundo CHENG (1997), o genoma da galinha é constituído por 78 cromossomos (2n), que são divididos em 38 pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais (Z e W), sendo a fêmea heterogamética (ZW) e o macho homogamético (ZZ). Esta foi a primeira espécie de animal doméstico a ter a sequência do genoma publicada. Seu genoma com 1,25 Gpb foi obtido a partir do DNA proveniente de uma única fêmea de *Gallus gallus* (*Red Jungle Fowl*), o ancestral da galinha doméstica (HILLIER et al., 2004).

O sequenciamento do genoma da galinha abriu possibilidades de se identificar genes que controlam a variação de características fenotípicas de interesse para a avicultura. Essa é uma das principais linhas de pesquisa realizadas em genômica pela Embrapa Suínos e Aves. Para tal, algumas linhagens desenvolvidas pela Embrapa são utilizadas como modelo nos estudos de genômica em parceria com várias instituições nacionais e internacionais. Atualmente a granja de melhoramento de aves da Embrapa Suínos e Aves, detém material genético de 5 linhagens puras de aves de corte e 6 linhagens puras de postura que hoje fazem parte de um Núcleo de Conservação de Material Genético Nacional de Aves.

No período do estágio realizado na instituição Embrapa Suínos e Aves foram acompanhados projetos de pesquisa desenvolvidos na área de genômica, entre outras rotinas laboratoriais. Além de, visita a granja de melhoramento genético de aves.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Cumprir requisito da graduação. Além de, ampliar e complementar o conhecimento na área de genética e melhoramento animal para futura atuação profissional em Zootecnia, possibilitando a troca de experiência com profissionais da área.

### 1.1.2 Objetivo Específico

- a) Verificar através do contato com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA identificação com a área de pesquisa.
- b) Compreender a origem dos avanços na genética e melhoramento animal e suas aplicações.
- c) Conhecer e praticar as técnicas aplicadas na área de genômica.
- d) Saber sobre os trabalhos de pesquisa que estão sendo desenvolvidos atualmente na área de genômica.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves – CNPSA ou Embrapa Suínos e Aves é uma das 47 unidades descentralizadas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Unidade foi criada em 13 de junho de 1975, no distrito de Tamanduá em Concórdia - Santa Catarina (EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2016).

O estágio foi realizado neste local por ser referência na área de pesquisa animal com aves e suínos que são animais de interesse de atuação profissional. Na área de genômica, pela curiosidade de aprendizado da origem dos princípios e técnicas utilizadas na genética e melhoramento animal, que resultaram em animais comerciais muito produtivos nos dias atuais. Além disso, é necessário conhecer o que está sendo pesquisado na área de genômica para identificar possíveis relações do melhoramento genético à problemas verificados a campo. O estágio foi realizado com a supervisão da Dra. Mônica Corrêa Ledur, Zootecnista e pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, renomada nacionalmente e internacionalmente na área de genética e melhoramento animal.

## 2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período do estágio foram realizadas atividades de rotina do laboratório de genética animal, participação conjunta com bolsistas em projetos de pesquisa em andamento na área de genômica e visita a granja de melhoramento genético de aves da Embrapa. Além disso, foram acompanhadas atividades de coleta de material biológico para pesquisa, extração e quantificação de DNA e RNA, PCR convencional, sequenciamento, e participação em atividades técnico-científicas promovidas pela Embrapa Suínos e Aves.

### 2.1 DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA MOLECULAR

O Dogma central da biologia molecular é de importância para a área de genômica, pois abrange o estudo da informação do DNA do indivíduo (material genético) até a síntese proteica. O conhecimento em biologia molecular auxilia os estudos de pesquisa a encontrarem explicações/soluções para melhorar espécies de interesse zootécnico, sendo isso uma ferramenta utilizada pela Embrapa Suínos e Aves. A seguir, demonstra-se informações que caracterizam o dogma central da biologia molecular.

A transmissão da informação necessária para a síntese de uma proteína (a expressão de um gene) é feita pelos processos de transcrição e tradução. A sequência das bases nitrogenadas no DNA determina a ordem de formação de 20 possíveis aminoácidos que irão constituir as proteínas. Como existem somente 4 nucleotídeos para formar 20 aminoácidos, a célula utiliza um códon (três nucleotídeos) para especificar cada aminoácido, esta sequência de bases nitrogenadas constitui o código genético, este código auxilia a ocorrência do posicionamento correto dos aminoácidos em uma proteína (ver Quadro 1). O códon responsável por sinalizar o início da cadeia é o ATG (metionina, chamado de START códon), o códon que sinaliza o final da síntese é conhecido como STOP códon (NICIURA, 2007).

De acordo com Griffiths (2008), a transcrição ocorre quando, a mensagem do DNA que está presente no núcleo da célula, é transportada pelo RNA mensageiro (mRNA) para o citoplasma, onde as proteínas são sintetizadas em organelas (ribossomos). A transcrição do mRNA pela enzima RNA polimerase tem início em um sítio específico do gene: o sítio promotor, que só existe em uma das fitas de DNA (*na fita sense*), enquanto a outra permanece sem função (*fita nonsense*). Além do mRNA, existem dois outros tipos de RNA: o RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA). O tRNA transporta os aminoácidos até os ribossomos e possui um anticódon que orienta o pareamento dos códons do mRNA para a formação de proteína. O rRNA, e outras proteínas, constituem o ribossomo e

auxilia no alinhamento do tRNA ao mRNA. Desta forma, sequências diferentes de bases de DNA especificam sequências diferentes de bases de mRNA (transcrição), e as sequências de bases no mRNA especificam a sequência de aminoácidos (tradução). Esse caminho da informação desde o DNA até a síntese proteica é conhecido como dogma central da biologia molecular (NICIURA, 2007).

Quadro 1– Código genético.

Primeira Base	Segunda Base				Terceira Base
	T	C	A	G	
T	Phe	Ser	Tyr	Cys	T
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	T
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	T
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (START)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	T
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

As bases são lidas da esquerda para a direita. A: adenina, G: guanina, C: citosina, T: timina (ou U: uracila, no RNA); Ala: alanina, Arg: arginina, Asp: asparagina, Asp: ácido aspártico, Cys: cisteína, Gln: glutamina, Glu: ácido glutâmico, Gly:glicina, His: histidina, Ile: isoleucina, Lys:lisina, Met: metionina, Phe: fenilalanina, Pro: prolina, Ser: serina, Thr: treonina, Trp: triptofano, Tyr: tirosina, Val: valina.

Fonte: Adaptado de NICIURA (2007).

## 2.2 GRANJA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE AVES

Durante o estágio foi realizada uma visita à granja de melhoramento genético de aves da Embrapa Suínos e Aves. Essa granja caracteriza-se por ser um núcleo de conservação de material genético nacional, que preserva animais de 5 linhagens puras de aves de corte, e 6 linhagens puras de aves de postura.

As aves são mantidas em gaiolas individuais com controle de pedigree e os ovos são marcados para possibilitar a identificação dos animais para a próxima geração. Por meio de inseminação artificial, é realizado o acasalamento das aves e uma vez por ano uma nova geração é estabelecida.

Na oportunidade de visitação, foram relatados pelo responsável da granja os cuidados com manejo, biossegurança, escrituração zootécnica, entre outros procedimentos padrões para manter o ambiente em condições adequadas de trabalho. As linhagens mantidas em conservação são utilizadas em pesquisa na área de genética e melhoramento, além das demais áreas de pesquisa da Embrapa Suínos e Aves.

Segundo Figueiredo (2015?), as raças puras mais antigas são apenas mantidas em estações experimentais. Sendo estas, o banco genético que é a fonte da diversidade e o combustível para os cruzamentos que dão origem aos híbridos modernos. Em frangos de corte as raças utilizadas são: Plymouth Rock Branca, New Hampshire, Cornish Branca e Sussex.

Ledur e Peixoto (2015?b), relatam que existe uma pirâmide na produção de aves, e esta apresenta três etapas complementares, no topo situam-se os rebanhos núcleo ou elite, responsáveis pelo melhoramento genético das linhas puras, via seleção intensiva das características economicamente importantes; na parte central os rebanhos multiplicadores, responsáveis pela produção da matrizes macho e fêmea, que incorpora os benefícios da complementaridade entre as linhas puras e aumenta a heterose; e na base da pirâmide os rebanhos comerciais, que são os indivíduos destinados ao abate ou a produção de ovos. Mais detalhes são fornecidos a seguir, de acordo com Figueiredo (2015?):

**Bisavós:** São linhas puras que necessitam de ganhos genéticos cumulativos e normalmente são reproduzidas por incubação (devido demandar elevado número de aves para a seleção) cuja os nascidos são da mesma constituição das linhas puras e selecionados dentro da linha transformando-se em Bisavós. Exemplo: Macho da raça 1 (M1) acasala com fêmeas da raça 1 (F1), Macho da raça 2 (M2) acasala com fêmeas da raça 2 (F2), respectivamente com as raças 3 e 4 (Quadro 2).

**Avós:** São produtos do cruzamento de bisavós (M1XF2) e (M3XF4), onde gera-se os galos nas linhas de macho e as galinhas nas linhas de fêmeas que serão os pais das matrizes e, chamados de avós (Quadro 2).

**Matrizes:** São os híbridos resultantes do cruzamento de avós. Por exemplo, a matriz macho (1-2) é produzida pelo cruzamento do avô paterno (galo 1) com a avó paterna (galinha 2) e a matriz fêmea (3-4) é produzida pelo acasalamento do avô materno (galo 3) com a avó materna (galinha 4).

**Aves comerciais:** São os híbridos resultantes do cruzamento das matrizes. Por exemplo, híbridos comerciais de frangos de corte (importadas): Ag Ross, Cobb Vantress, Hybro, Isa Vedette, MPK, Arbor Acres, Avian, Shaver e Hubbard. E híbridos comerciais de frangos de corte (nacionais): Embrapa 021, S-54.

Quadro 2– Efeito multiplicador

		<b>Cruzamento</b>			
<b>Tempo</b>	<b>Produto</b>	<b>Linha Macho</b>		<b>Linha Fêmea</b>	
Atual	Linha pura	M1 X F1	M2 X F2	M3 X F3	M4 X F4
1º ano	Bisavós	M1 X F1	M2 X F2	M3 X F3	M4 X F4
2º ano	Avós	M1 X F2		M3 X F4	
3º ano	Matrizes	M12 X F34			
4º ano	Aves comerciais	1234			

Fonte: Do autor, 2016.

### 2.3 PROJETOS DE PESQUISA

Os projetos de pesquisa acompanhados durante o estágio compreendem;

#### 2.3.1 Hérnia umbilical e escrotal em suínos

Segundo Girão (2009), as hérnias são consideradas uma protusão localizada na região dos anéis inguinais (hérnia inguinal ou escrotal) e umbilical (hérnia umbilical) que ocorre através de um canal pré formado (congênitas) ou adquirido. Acredita-se ser uma patologia hereditária, apesar de mencionada como condicionada em machos pelos genes autossômicos recessivos ‘h’, foi constatado que tal genótipo não afetava fêmeas (RUNNELLS, 2001, apud SANDOVAL, 2015).

De acordo com Zanchin (2015), as hérnias umbilicais geram perdas significativas à suinocultura mundial, destacando-se: mortes, menor ganho de peso, pior conversão alimentar, possibilidade de peritonite e contaminação da carcaça no abate (ruptura de intestino). Devido a estas e demais perdas produtivas, os estudos realizados na área de genômica da Embrapa Suínos e Aves, visam identificar regiões genômicas e genes candidatos envolvidos com a ocorrência dessa anomalia em suínos, comparando a expressão gênica através da técnica de RNAseq, utilizando o delineamento caso - controle, onde para cada caso há pelo menos um controle contemporâneo e que não apresenta histórico de hérnias na família.

#### 2.3.2 Gene Halotano em suínos

De acordo com o MAPA (2014), especialistas brasileiros investem na evolução genética há mais de 20 anos, fato que reduziu em 31% a gordura da carne, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando a carne suína brasileira mais magra e nutritiva, além de saborosa.

A busca por linhagens genéticas suínas com maior percentual de carne magra na carcaça trouxe como consequência, animais mais susceptíveis ao estresse suíno que ocasiona problemas de qualidade no produto final (LAVILLE et al., 2005).

Bridi et al. (2003) destaca que, a presença do gene halotano aumenta consideravelmente a porcentagem de carne na carcaça suína, mas exerce um efeito negativo sobre a qualidade da mesma, onde ocorre perda de líquido por gotejamento e queda de pH nas primeiras horas após abate, o que provoca um aumento na incidência de carne PSE (cor pálida, textura mole e exsudativa). Chagas et al. (2014), relatam que para evitar os efeitos danosos na qualidade da carne, a estratégia adotada pelos melhoristas tem sido a remoção de genes causadores do estresse, principalmente em algumas linhagens de Landrace que possuem maior desenvolvimento muscular.

O laboratório de genética molecular da Embrapa Suínos e Aves realiza o diagnóstico da síndrome do estresse térmico em suínos, para o gene do Halotano utilizando a técnica de PCR-RFLP.

### **2.3.3 Criptorquidismo em suínos**

O criptorquidismo é um transtorno na progressão do testículo, acomete um ou ambos os testículos, sendo que estes ficam retidos na cavidade abdominal ou parados no trajeto inguinal. E são considerados de etiologia genética (BENTO, 2006).

Basrur e Basrur (2004, apud TICIANELLI, 2011) relataram que os genes relacionados com a ocorrência do criptorquidismo ainda não estão completamente descritos, mas esta anomalia já foi descrita como característica autossômica, e pode ser manifestada também devido à mutação de dois genes provavelmente localizados no cromossomo sexual.

O projeto de estudo do criptorquidismo tem objetivo semelhante ao de hérnias; identificar regiões genômicas e genes candidatos envolvidos com a ocorrência dessa anomalia em suínos. O estudo pela Embrapa Suínos e Aves, será feito por comparação do sequenciamento do exôma (sequência de éxons). Utilizando animais caso–controle, em que para cada caso há pelo menos um controle contemporâneo e que não apresenta histórico de criptorquidismo na família.

### 2.3.4 Gene da Distrofina (DMD)

Historicamente, a mutação HAL-1843 no receptor rianodina 1 foi considerada responsável pela maior parte das perdas de suínos com peso para abate devido ao estresse no transporte. No entanto, o teste de DNA tem efetivamente eliminado esta mutação de rebanhos comerciais. Mas ainda foram identificados animais que morreram de sintomas aparentes de uma síndrome de estresse após o transporte. Descobriu-se então, que o gene da distrofina (DMD), também está associado com a síndrome do estresse, e isso ocorre quando há um defeito no gene da distrofina, ou seja, a ocorrência de um SNP que provoca a alteração de um aminoácido arginina por um triptofano (NONNEMAN et al., 2012)

Na década de 2000 foram identificadas mutações em vários genes, resultando na deficiência ou perda de função de diversas proteínas musculares de importância significativa para o bom funcionamento do músculo, dentre elas a distrofina. A distrofina é uma proteína cuja função ainda não é exclusivamente conhecida, mas pode desempenhar um papel na estabilidade da membrana plasmática e, ainda aceita-se que sua ausência pode romper o mecanismo normal da liberação controlada do cálcio, que é indispensável para a contração da fibra muscular (VAINZOF et al. 2005 e GOMES, 2011).

O objetivo de estudo deste gene da distrofina pela Embrapa Suínos e Aves é padronizar uma técnica de diagnóstico para um SNP utilizando a técnica de Sonda Taqman®.

## 2.4 COLETA DE MATERIAL

Todo resultado alcançado nos projetos de pesquisa, é consequência da qualidade do material coletado, ou seja, os ácidos nucleicos (DNA e RNA) que são a matéria prima para qualquer técnica, encontrados em diferentes células. Os materiais utilizados para estudo são o DNA e RNA, e estes são obtidos em: tecido sanguíneo, ósseo, cartilaginoso, muscular, entre outros. Dependendo do objetivo de estudo, os tecidos são coletados e armazenados de acordo com a extração para a técnica pretendida.

O ambiente de necropsia possui normas de funcionamento. Foi necessária a utilização de roupa e calçado adequado, além de desinfecção do calçado na entrada e saída do ambiente interno. Foram acompanhados procedimentos de coleta de material, para projetos de pesquisa relacionados a suínos, como o de hérnias e criptorquidismo.

Os animais permaneciam em baia na parte externa a área de necropsia, para um período de descanso pré-abate (Figura 1, A). Posteriormente eram transferidos para o local de

insensibilização, que era feita com choque elétrico (Figura1, B), e após perda de consciência procedia-se a pesagem (Figura 2), e em seguida a sangria.

Foi coletado tecido sanguíneo e tecido cartilaginoso da orelha (para projeto hérnias e projeto criptorquidismo) seguido de armazenamento em gelo para posterior extração de DNA, e também foram coletadas amostras de tecido do anel herniário (Figura 3) em criotubos (Figura 4), previamente identificados, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA. Consistiu-se em coleta de tecido de animais afetados (caso), e também de animais normais (controle), ou seja, dos animais com e sem problema.

Figura 1– A: Local de descanso pré-abate; B: Local de insensibilização.



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 2– Pesagem



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 3– Coleta de materiais para estudo



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 4– Armazenamento de material em criotubo.



Fonte: Do autor, 2016.

## 2.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA é o primeiro passo para utilizá-lo em técnicas moleculares. A maneira de coletar e acondicionar o tecido, assim como o estado do mesmo são fundamentais para o sucesso da extração. Neste aspecto, a qualidade e a integridade do DNA são fundamentais para as etapas posteriores. Existem diferentes protocolos de extração de DNA que variam em função da espécie animal e do tecido a ser utilizado. COSTA e MOURA (2001) relatam que um dos aspectos importantes a ser considerado é que a quantidade de DNA necessária varia em função da técnica molecular a ser utilizada.

Embora em termos físicos o DNA seja uma molécula muito grande com peso molecular de vários milhões, em termos químicos ela consiste de nucleotídeos. Cada nucleotídeo contém fosfato, um açúcar com cinco carbonos (desoxirribose) e um entre quatro

tipos de bases nitrogenadas. Duas bases são purinas (adenina e guanina) e duas são pirimidinas (timina e citosina). Quando uma purina (ou pirimidina) está ligada ao açúcar desoxirribose, a unidade é chamada de nucleosídeo. O fosfato, por sua vez, está ligado ao açúcar por uma ligação de éster e esta unidade nucleotídica se constitui na unidade fundamental do DNA. Desta forma, o DNA é um grande polímero contendo uma longa cadeia com cerca de 200.000 nucleotídeos (200 kb) chamada de polinucleotídeo (DEBUSK, 1971).

Em pesquisas que envolvem estudo da estrutura do gene, o DNA é o produto mais utilizado, este pode ser obtido inclusive de indivíduos que já morreram, pois é uma fonte que não sofre muita interferência do meio (WISCHRAL e GOMES FILHO, 2009).

A partir de tecido cartilaginoso da orelha armazenado em freezer (-20°C) as amostras foram processadas para extração de DNA do projeto de Criptorquidismo, seguindo o protocolo: Purificação de DNA total a partir de tecidos animais (centrifugação-coluna) Qiagen® (ver em anexo).

## 2.6 EXTRAÇÃO DE RNA

A composição química do RNA é bastante similar a do DNA e essa similaridade tem um significado em termos de tradução da informação na célula. O RNA difere-se do DNA em apenas três pontos principais: o açúcar ribose, a base pirimídica uracila e por ser fita simples (DEBUSK, 1971).

Em pesquisas relacionados com a expressão do gene, o mRNA é a principal fonte de estudo. Encontra-se no citoplasma das células e deve ser obtido do local onde pretende-se avaliar a sua expressão, pois a função gênica pode ser diferente em cada tecido/célula específico (WISCHRAL E GOMES FILHO, 2009).

As amostras para extração de RNA foram armazenadas em nitrogênio líquido desde a coleta. Foi processado tecido do anel herniário do projeto de hérnias, seguindo o protocolo: extração de RNA de tecidos com trizol (Invitrogen®) + limpeza de RNA utilizando RNeasy mini kit (Qiagen®) (ver em anexo).

## 2.7 QUANTIFICAÇÃO DE DNA E RNA

A concentração de DNA, RNA ou proteína nas amostras pode ser avaliada por técnicas de espectrofotometria ou fluorometria. Cada técnica depende de equipamentos e protocolos específicos para o material de estudo. A seguir são demonstrados alguns equipamentos e protocolos utilizados.

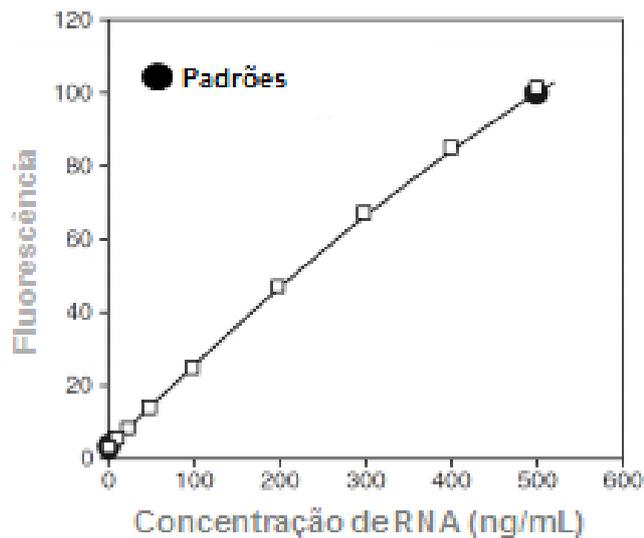
### 2.7.1 Fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen™)

O equipamento Qubit® 2.0 é um fluorímetro de bancada para a quantificação do DNA, RNA e proteínas, utiliza alta sensibilidade em ensaios de quantificação precisa a base de fluorescência Qubit™. Usa corantes seletivos para DNA, RNA e proteínas, que minimiza os efeitos de contaminantes em sua amostra que afetam a quantificação. Permite que use tão pouco quanto 1 µL e ainda obtenha altos níveis de precisão, mesmo com as amostras muito diluídas (MANUAL DO USUÁRIO QUBIT, 2010).

O fluorímetro Qubit® 2.0 gera dados de concentração com base na relação entre os dois padrões utilizados na calibração (três para o ensaio de proteína Qubit™) em uma curva de 0 a 100 ng (Figura 5). Os ensaios no Qubit devem ser realizados em temperatura ambiente de 22-28 °C, pois variações de temperatura podem influenciar a exatidão do ensaio (MANUAL DO USUÁRIO QUBIT, 2010).

No Qubit® os microtubos são inseridos no equipamento para analisar a concentração (Figura 6), o que difere do biodrop que se pipeta a amostra na porta de leitura.

Figura 5– Curva de concentração de RNA no Qubit®



Fonte: Manual do usuário Qubit®, 2010.

Abaixo, descrição de protocolo utilizado para quantificação de amostras de RNA do projeto Hérnias (foi realizado também quantificação de DNA para o projeto Halotano com o Qubit®):

1. Calibração dos padrões. 10 µL do ponto padrão 1 diluído em 190 µL de tampão e 10 µL do ponto padrão 2 diluído em 190 µL de tampão.

2. Confeção de mistura: 1,99 mL de tampão (Qubit™ dsRNA HS) para analisar 10 amostras (199 µL cada amostra) + 1 µL de marcador (Qubit™ dsRNA HS).
3. Para cada microtubo com 1 µL de amostra de RNA, adicionou-se 199 µL de mistura.
4. Análise no equipamento: inseriu-se o microtubo (mistura+RNA). Fechou-se a tampa. E analisou-se em ng/µL (opções). Incubou-se os microtubos após 2 minutos de mistura da amostra com a solução de trabalho, (após isso o sinal de fluorescência nos microtubos é estável até 3 horas) (MANUAL DO USUÁRIO QUBIT, 2010).
5. A análise tem como princípio a leitura da emissão de fluoróforo que determina a fluorescência do RNA e o quantifica em ng/µL.

Figura 6– microtubo inserido no equipamento Qubit®



Fonte: Do autor, 2016.

### 2.7.2 Biodrop µLite ®

O Biodrop® é um equipamento que quantifica a concentração e pureza de DNA, RNA e proteínas através de espectrofotometria em luz UV, entre dois comprimentos de onda de varredura definidos pelo usuário na faixa de 190-1100 nm com medição de absorvância ou absorvância (A) de amostras de menos de 1 µL (Manual do usuário Biodrop®, 2016)

1. Colocou-se um mínimo de 0,5 µL de referência padrão conhecida (amostra controle), na porta de leitura do equipamento. Efetuou-se referência (com amostra controle).

2. Quando a referência foi concluída, removeu-se a amostra, limpando com um pano sem fiapos na porta de leitura.

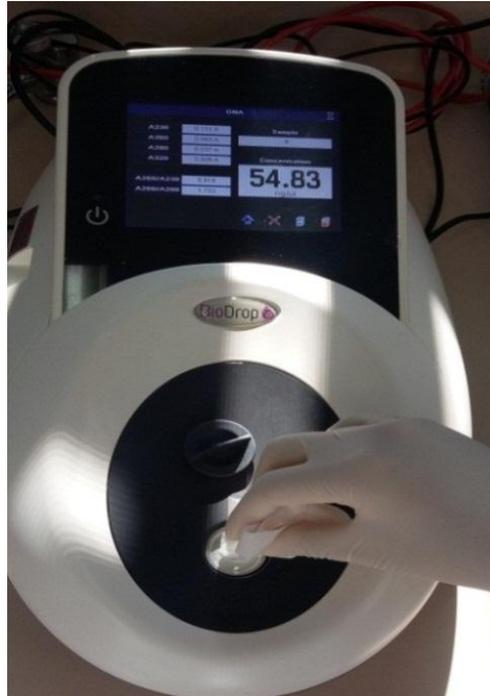
3. Selecionou-se efetuar medição com a amostra a ser analisada. (obtendo o valor de quantificação).

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para fazer a leitura no espectrofotômetro, utiliza-se uma diluição da amostra de ácidos nucleicos em água. As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína (REGITANO et al., 2009).

Para uma amostra de RNA puro tem-se a razão entre as medidas de absorbância à  $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$  a  $2,0$  (REGITANO et al., 2009). Para estimar a concentração de DNA e RNA utiliza-se a seguinte relação:  $1 OD_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$  de DNA dupla-hélice, e  $1 OD$  (densidade óptica) =  $40 \mu\text{g/mL}$  de RNA (fita simples) (SAMBROOK e RUSSEL, 2002).

O equipamento Biodrop  $\mu\text{Lite}$  fornece em seu visor a concentração e as razões calculadas (Figura 7). Durante o período de estágio foi realizada a quantificação de DNA para o projeto Halotano, DMD e Criptorquidismo, além de quantificação de RNA para o projeto de Hérnias.

Figura 7– Equipamento BioDrop  $\mu\text{Lite}$ ®



Fonte: Do autor, 2016.

### 2.7.3 Agilent Bioanalyzer 2100®

O equipamento Agilent Bioanalyzer 2100® baseia-se em tecnologia de eletroforese microfluídica para analisar Proteínas, DNA, RNA e células. É um equipamento rápido e simples, sendo uma alternativa melhor para a demorada e trabalhosa eletroforese em gel de agarose. Analisa até 12 amostras, sendo que os componentes da amostra como corantes fluorescentes passam por eletroforese e são detectados em imagens do tipo gel (bandas) e eletroferogramas (picos) traduzidos.

Foi realizado o Protocolo Agilent RNA 6000 Nano, para quantificação de RNA para o projeto Hérnias como descrito a seguir:

1. Descontaminação dos eletrodos: Colocou-se o chip de limpeza dos eletrodos (cinza) com 350 µL de RNase Away® por 1 minuto. E na sequência, outro chip de limpeza (cinza) com 350 µL de água livre de RNase, por no mínimo 10 segundos (Figura 8).

2. Preparou-se o gel:

– Deixando todos os reagentes à temperatura ambiente durante 30 minutos antes do uso

– Colocou-se 550 µL de RNA Agilent 6000 gel Nano matriz (tubo vermelho) dentro de um microtubo. Centrifugou-se durante 10 minutos a 4000 rpm.

– Foram feitas 4 divisões de 65 µL de gel filtrado em tubos de 0,5 mL livres de RNase. Armazenou-se as alíquotas a 4 °C e deve-se usá-las dentro de um mês de preparação.

3. Preparou-se o mix gel-corante:

– Vórtex de RNA 6000 Nano corante concentrado (tubo azul) por 10 segundos.

Adicionou-se 1 µL dentro de 65 µL do gel filtrado (vermelho).

– Vórtex da solução de gel + corante. E centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 xg.

4. Carregar o mix gel-corante:

– Colocou-se um novo chip de RNA Nano na estação de chip.

– Pipetou-se 9 µL de mix gel-corante, na marcação **G**

– Certificou-se de que o êmbolo estava posicionado em 1 mL e, em seguida, foi fechada a estação do chip. O bloqueio do trinco vai clicar quando a estação está fechada corretamente. Pressionou-se o êmbolo da seringa até a base durante 30 segundos. Soltou-se a seringa e deixou voltar a posição de 1 mL (Figura 10).

– Abriu-se a estação do chip e pipetou-se 9 µL de mix gel-corante em cada um dos poços marcados G.

5. Carregando o RNA 6000 Nano Marcador:

– Pipetou-se 5  $\mu\text{L}$  de RNA 6000 Nano marcador (tubo verde) no poço marcado com o símbolo de escada e cada um dos 12 poços de amostra.

6. Carregando a escada e as amostras:

– Pipetou-se 1  $\mu\text{L}$  de RNA marcador (tubo amarelo), no poço marcado “escada”.

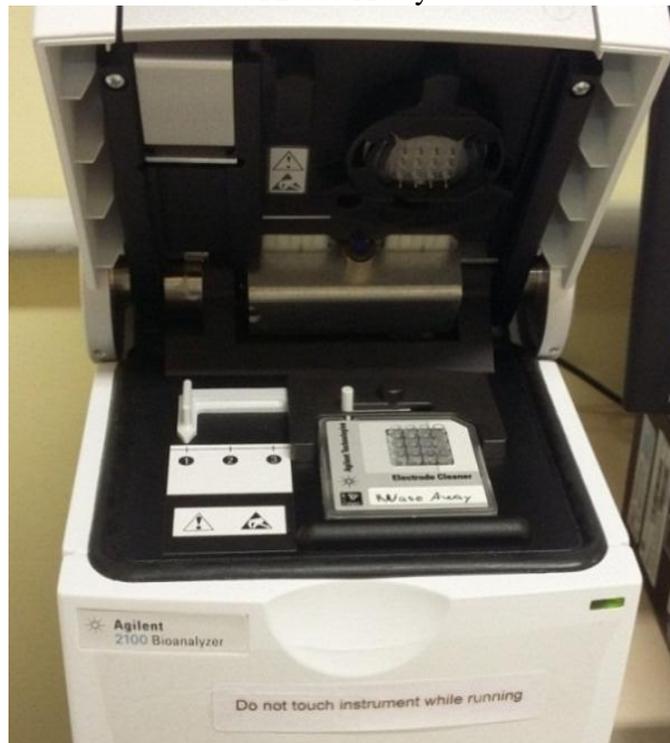
– Pipetou-se 1  $\mu\text{L}$  de amostras de RNA nos 12 poços de amostras.

Observação: Utilizar as amostras concentradas de RNA.

7. Análise do chip de RNA no Bioanalyzer 2100®.

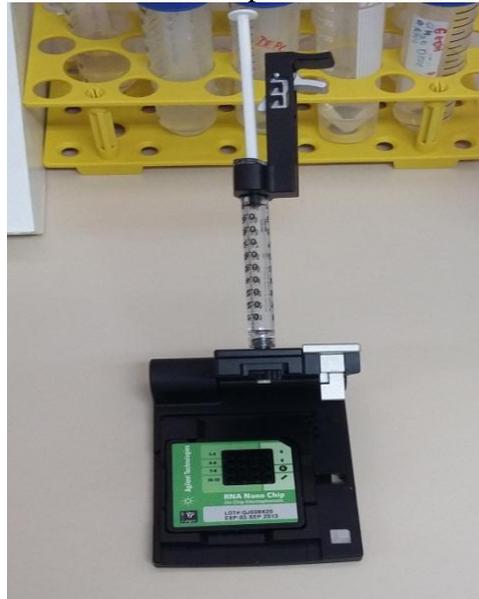
–A integridade das amostras de DNA, RNA e proteínas, são demonstrados em uma curva de (0-10). O 0 (zero) corresponde a uma qualidade menor e 10 (dez) qualidade maior/melhor (MANUAL DO USUÁRIO BIOANALYZER, 2013). Na Figura 10, demonstra-se por eletroferograma o resultado da quantificação e pureza de uma amostra de RNA do projeto Hérnias, que obteve integridade de 8.5 e concentração de 978  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Na Figura 11 é apresentada a visualização das quantidades de pares de bases presentes nas amostras de RNA através da representação por banda, também obtida no Bioanalyzer®.

Figura 8– Equipamento Agilent Bioanalyzer 2100® com chip para limpeza dos eletrodos com RNase Away



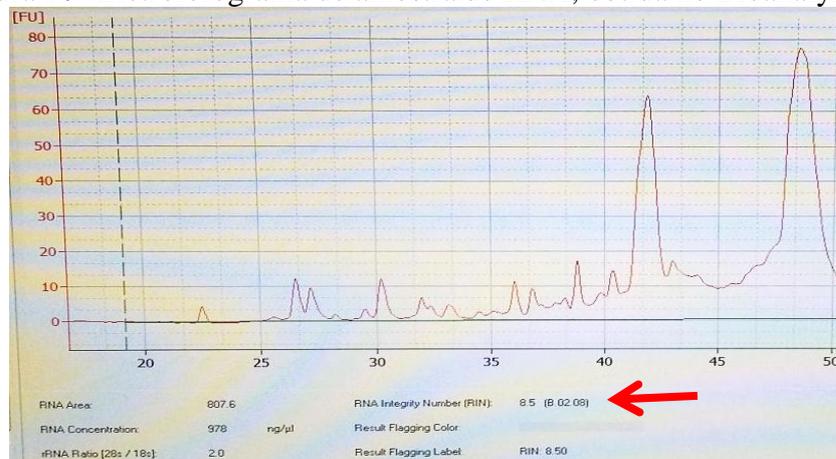
Fonte: Do autor, 2016.

Figura 9– Estação do chip com a seringa encaixada na parte superior e o chip de RNA encaixado na parte inferior.



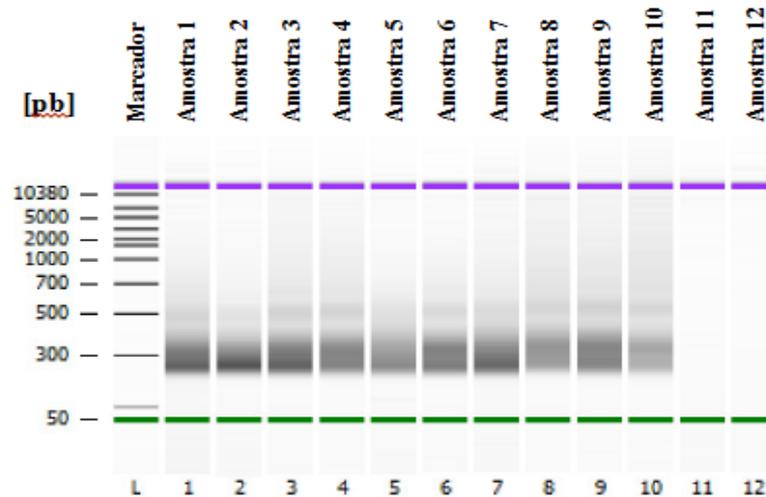
Fonte: Do autor, 2016.

Figura 10– Eletroferograma de amostra de RNA, obtida no Bioanalyzer®.



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 11– Resultado em banda de amostra de RNA, obtida no Bioanalyzer®.



Fonte: Do autor, 2016.

## 2.8 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.

Conhecida a quantidade de DNA ou RNA presente nas amostras é necessário padronizar a concentração e o volume final. Segundo Regitano et al. (2009) a fórmula para o cálculo de padronização é descrita abaixo:

<b>Fórmula: (C1) x (V1) = (C2) x (V2)</b>
---

Onde, Concentração inicial (C1), Volume inicial (V1), Concentração final (C2), Volume final (V2). Exemplo: Deseja-se obter uma concentração de 25 ng/μL e volume final de 50 μL em uma amostra quantificada em equipamento com concentração conhecida de 100 ng/μL.

Fórmula:  $100 \text{ ng}/\mu\text{L} \times V1 = 25 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 50 \mu\text{L}$ .

$V1 = 12,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de DNA

Resultando em: 37,5 μL de água livre de nuclease + 12,5 μL de DNA = volume final de 50 μL em concentração de 25 ng/μL.

## 2.9 PCR CONVENCIONAL

A reação em cadeia da polimerase, nada mais é do que a replicação *in vitro* do DNA (REGITANO et al., 2009). Dentre as técnicas utilizadas em biologia molecular é a mais básica, pois seu objetivo principal é a amplificação de uma sequência conhecida de DNA (WISCHRAL e GOMES FILHO, 2009).

Segundo Niciura (2007), o DNA estoca e transmite informações. A transmissão da mensagem hereditária para a próxima geração de células é feita por meio da produção de uma cópia idêntica (replicação) do DNA pela enzima DNA polimerase. A replicação é semi-conservativa, ou seja, cada fita original dará origem a uma nova fita dupla.

No período do estágio foi confeccionada a reação para PCR, para análise de amostras de DNA para o projeto DMD (e projeto Halotano) que é descrita abaixo:

– Formou-se uma mistura com volume total de 13 μL dos seguintes reagentes:

Go taq® Flexi Buffer (Tampão 5 X)
Mg Cl <sub>2</sub> 25nM (Cátions divalentes)
<i>Primer F</i> (primer <i>forward</i> )
<i>Primer R</i> (primer <i>reverse</i> )
dNTP (mix de desoxirribonucleotídeos fosfatados)
Taq (enzima: Taq DNA polimerase)
H <sub>2</sub> O (água livre de nuclease)

- Multiplicou-se a mistura para 32 amostras a serem amplificadas por PCR.
- Pipetou-se 13  $\mu\text{L}$  da mistura + 2  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) na placa de PCR de 96 poços.
- Adição de uma amostra controle negativo, contendo 13  $\mu\text{L}$  de mix de PCR + 2  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease. Em seguida, vedou-se a placa com selo térmico de alumínio.
- Transferiu-se a placa para o termociclador Veriti® (Figura 12), e ajustou-se ao programa adequado para o objetivo de cada estudo. Neste equipamento ocorre os ciclos da PCR que compreendem 3 etapas:

Etapa 1– Desnaturação da fita do DNA: onde o DNA genômico contendo a sequência a ser amplificada é desnaturada por aquecimento a 95°C por 30 segundos. A dupla fita é aberta (desnaturada), tornando-se duas fitas separadas, sem ligação das pontes de H<sup>+</sup>.

Etapa 2– Anelamento ou hibridização: Um par de iniciadores ou *primers* se anelam e complementam a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada. O molde é determinado pela posição dos iniciadores que se anelam a fita. Essa etapa ocorre geralmente a 60°C por 30 segundos.

Etapa 3– Extensão: Identificado o molde, a enzima DNA–polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita. Essa etapa ocorre a 72°C por 45 segundos.

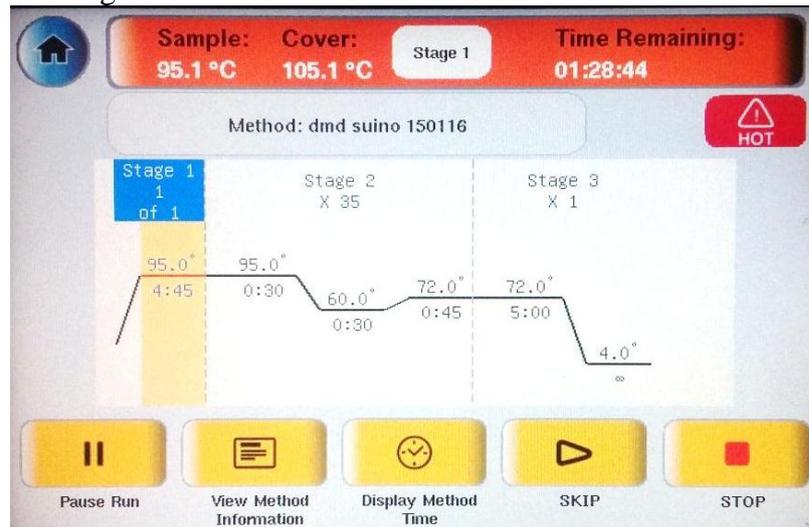
Ocorrem 35 ciclos destas três etapas (Figura 13), produzindo a replicação/amplificação exponencial da região específica de estudo do DNA. Resultando no produto da PCR que é chamado: DNA *template*.

Figura 12– Termociclador Veriti®



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 13– Ciclos da PCR em Termociclador Veriti®



Fonte: Do autor, 2016.

## 2.10 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose baseia-se no fato de que molécula de DNA possui carga negativa e quando aplicado ao gel de agarose e submetido a um campo elétrico, migram para o polo positivo. Essa técnica tem como objetivo verificar se ocorreu a amplificação de banda específica do DNA ou RNA. O protocolo para confecção do gel de agarose e análise das bandas de DNA por eletroforese encontra-se descrito abaixo:

- Arrumou-se o molde (caixa e pente) e a cuba para a quantidade necessária de amostras a serem processadas.
- Para a quantidade de 30 amostras analisadas, confeccionou-se o gel de agarose à concentração de 2% e volume de 100 mL de tampão TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0). A quantidade necessária de agarose foi de 2 g (Quando 3).
- Pesou-se a agarose, colocou-se em um Erlenmeyer. Adicionou-se o tampão TBE. A solução foi aquecida em micro-ondas e homogeneizou-se até dissolver completamente a agarose (não ferver, pois antecipa o processo de cristalização e dificulta a transferência do gel para a caixa molde).
- Esfriou-se em banho Maria. Quando a solução estava morna, pipetou-se o brometo de etídio conforme indicação: para cada 10 mL de tampão, 1µL de brometo. Cavalcante (2014) afirma que, o brometo é um corante que se intercala entre as bases do DNA, e quando submetido à luz UV observa-se os ácidos nucleicos em gel de agarose. Por ser um potente agente mutagênico, deve-se ter cuidado ao manipular os géis.
- Transferiu-se a solução para a caixa molde com os pentes já encaixados.

- Deixou-se o gel ficar firme.
  - Inseriu-se a caixa com o gel na cuba. Adicionou-se solução tampão até cobrir o gel.
  - No primeiro poço do gel pipetou-se 1  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular conhecido.
- Na sequência pipetou-se as amostras coradas com 1  $\mu\text{L}$  de corante (azul de metileno) em 3  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA (produto de PCR) para melhor visualização da corrida na banda de gel. No último poço é desejável e foi pipetada uma amostra controle negativo (Figura 14).
- Conectou-se os eletrodos nas extremidades da cuba (pólo positivo e negativo) e submeteu-se à voltagem de 100 V. Como os ácidos nucleicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica negativa (devido ao grupamento fosfato) eles sempre migrarão em direção ao pólo positivo (REGITANO et al., 2007).
  - Através do fotodocumentador (Figura 15), detecta-se sob iluminação UV as bandas no gel de agarose (Figura 16) e registra-se a imagem com uma câmera fotográfica digital acoplada ao fotodocumentador.

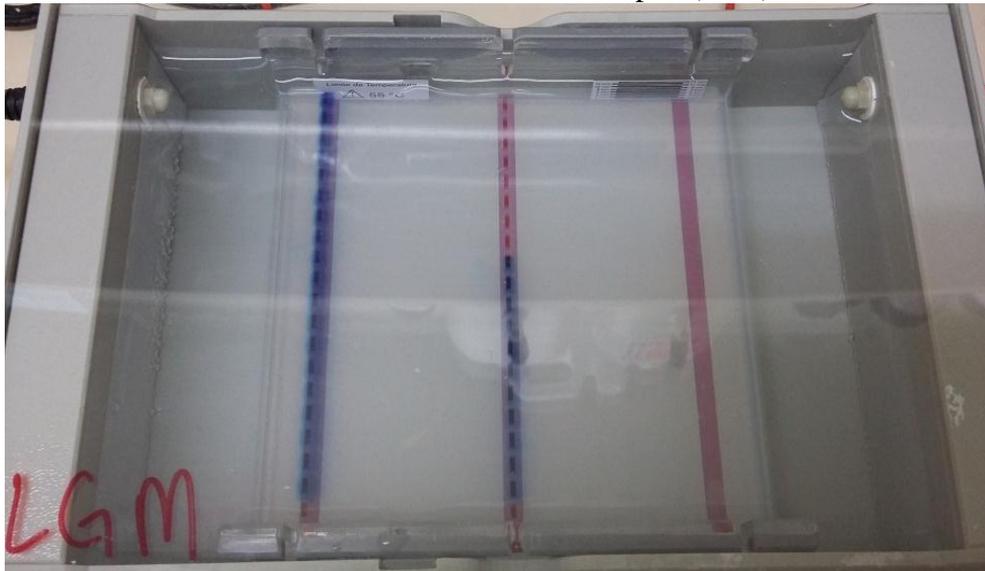
Quadro 3– Quantidade de agarose, devido ao volume e concentração do gel de agarose.

Volume (mL)	30	50	100	300
Concentração (%)	Quantidade de agarose (g)			
0,5	0,15	0,25	0,5	1,5
1,0	0,3	0,5	1	3
1,5	0,45	0,75	1,5	4,5
2,0	0,6	1	2	6
2,5	0,75	1,25	2,5	7,5
3,0	0,9	1,5	3	9
3,5	1,05	1,75	3,5	10,5
4,0	1,2	2	4	12

Fonte: Padronização realizada pela Embrapa Suínos e Aves.

Na leitura do gel de agarose por eletroforese no fotodocumentador (Figura 16), o marcador emitirá fluorescência no formato de régua que corresponde aos pares de bases (pb). Se as amostras fluorescerem, confirma-se que ocorreu a amplificação do DNA na PCR (Figura 21). O fator determinante da taxa de migração da fluorescência na banda será a massa da molécula (quando se fala em ácidos nucleicos, a massa é diretamente proporcional ao tamanho da molécula) (REGITANO et al., 2007), ou seja, a quantidade de pares de bases que a região amplificada apresenta.

Figura 14– Gel de agarose com marcador no 1º poço e demais poços amostras com corante, dentro da cuba com tampão (TBE).



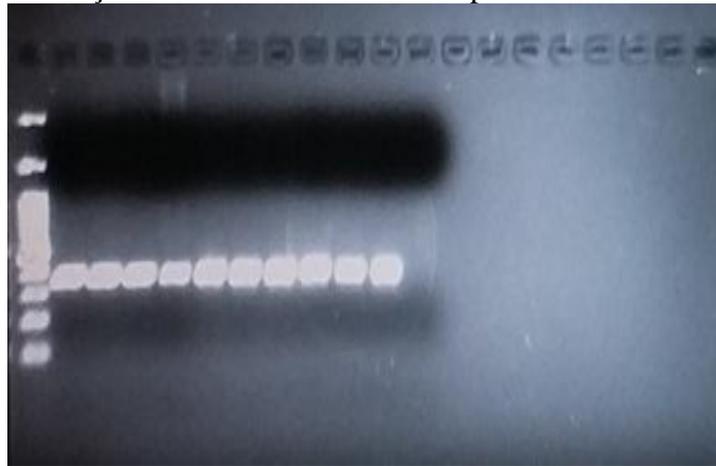
Fonte: Do autor, 2016.

Figura 15– Fotodocumentador L-Pix ex



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 16– Visualização das bandas fluorescentes por eletroforese em gel de agarose



Fonte: Do autor, 2016.

## 2.11 SEQUENCIAMENTO

As duas técnicas mais importantes para o sequenciamento de DNA são o método químico de degradação de bases desenvolvido por Allan Maxam e Walter Gilbert e o método didesoxi ou terminação da cadeia de Fred Sanger e colaboradores (REGITANO et al., 2007). Se comparado ao sequenciamento de Maxam e Gilbert, o método de terminação da cadeia de Sanger gera dados que são mais facilmente interpretados. Por isso, essa tem sido a técnica mais utilizada em Projetos Genoma (STERKY & LUNDEBERG, 2000).

### 2.11.1 Sequenciamento didesoxi ou por terminação da cadeia

É baseado na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse. Para a geração de fragmentos durante a reação de sequenciamento, quando os ddNTPs são adicionados, a extensão da cadeia é interrompida pois esses didesoxinucleotídeos não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3' necessário para a ligação do próximo desoxinucleotídeo e conseqüentemente marcada com o último didesoxinucleotídeo incorporado (REGITANO et al., 2007).

Foi realizado o acompanhamento do sequenciamento para o projeto DMD, seguindo o protocolo da reação de sequenciamento descrita a seguir:

- Retirou-se as amostras e os reagentes do freezer e os manteve em gelo. Quando totalmente descongelados;
- Preparou-se as seguintes misturas em microtubo de 1,5 mL, segundo padronização realizada no laboratório de genética molecular da Embrapa Suínos e Aves.

<b>MISTURA 1</b>	<b>X1</b>		<b>MISTURA 2</b>	<b>X1</b>
Tampão Save money®	<b>3 µL</b>		Tampão Save money®	<b>3 µL</b>
Fluoróforo BigDye®	<b>2 µL</b>		Fluoróforo BigDye®	<b>2 µL</b>
<i>Primer F</i>	<b>2 µL</b>		<i>Primer R</i>	<b>2 µL</b>
Água deionizada	<b>1 µL</b>		Água deionizada	<b>1 µL</b>
DNA <i>template</i>	<b>2 µL</b>		DNA <i>template</i>	<b>2 µL</b>
<b>Total</b>	<b>10 µL</b>		<b>Total</b>	<b>10 µL</b>

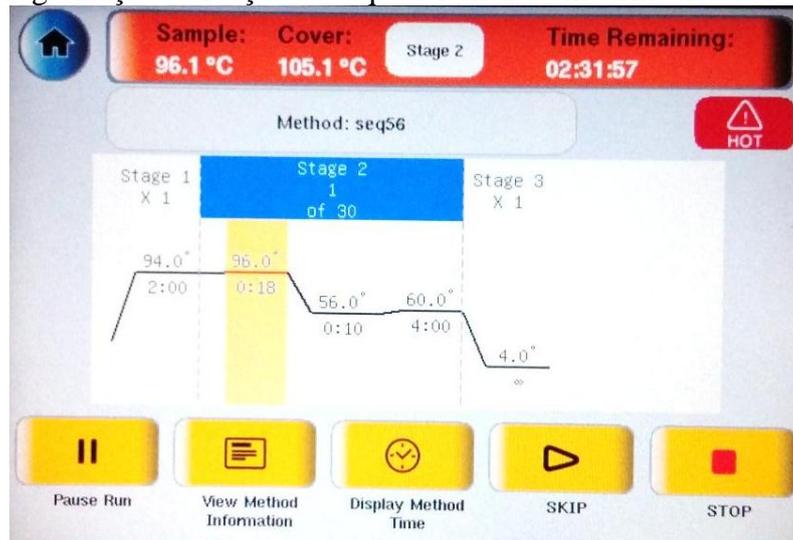
- Pipetou-se 10 µL da mistura nos poços da placa de sequenciamento.
- Levou-se a reação para o termociclador Veriti®.

A reação de sequenciamento compreende desnaturação inicial da dupla-fita de DNA à 96°C por 20 segundos, seguida por anelamento dos *primers* a 56 °C por 10 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos, totalizando 30 ciclos no termociclador Veriti® (Figura 17). No final de vários ciclos tem-se várias cadeias de DNA de diferentes tamanhos terminadas com diferentes ddNTPs que posteriormente serão identificados (lidos por eletroforese em sequenciador automático) (REGITANO et al., 2007).

Após retirar do termociclador, o próximo passo é fazer a precipitação e purificação da reação de sequenciamento. Adicionar 45 µL de SAM<sup>TM</sup> Solution e 10 µL de X-Terminator<sup>TM</sup> Solution. Deixar a placa de sequenciamento por 30 minutos em agitação no bloco de banho seco, recobrir com papel alumínio para não degradar a amostra.

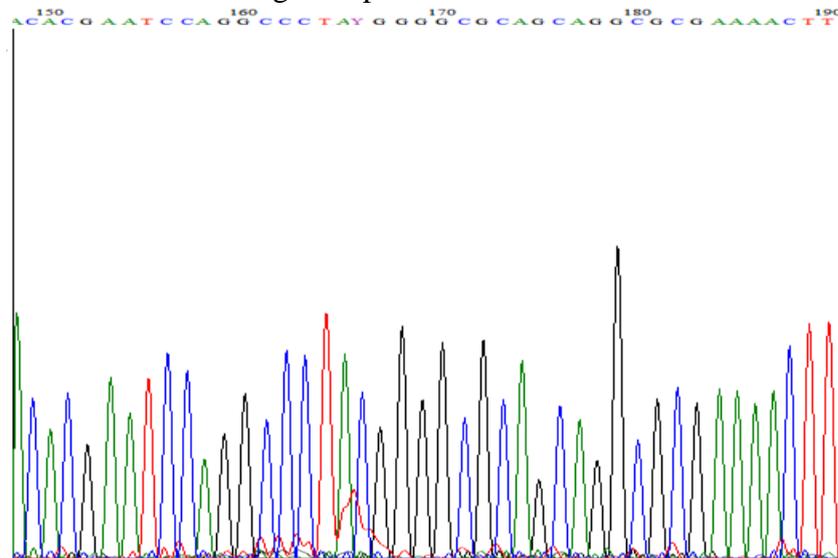
Aplicar a placa de sequenciamento em sequenciador automático 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O sequenciamento automático utiliza sequenciadores com eletroforese em capilar onde cada ddNTP possui marcação fluorescente diferenciada, que pode ser observada no eletroferogramas de sequenciamento (Figura 18) (REGITANO et al., 2007).

Figura 17– Programação da reação de sequenciamento em termociclador Veriti®



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 18– Eletroferograma da leitura do sequenciamento. Abrange-se os nucleotídeos da região específica de estudo.



Fonte: Do autor, 2016.

O sequenciamento para o projeto DMD visa identificar *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*), que não foram identificados em testes feitos pela Embrapa Suínos e Aves onde objetiva-se padronizar a utilização de sonda Taqman® para detectar os *SNPs* do gene DMD. Não se obteve sucesso em localizar o *SNP* de estudo nos testes realizados com sonda, então optou-se por sequenciar amostras de DNA do projeto DMD para localizar os *SNPs*, mas estes não foram localizados. Sugere-se que este *SNP* do gene distrofina não está presente nos animais avaliados, ou que o teste de padronização das sondas ainda precisa de ajustes para chegar ao ponto ideal de identificação do *SNP*. Os *SNPs* são polimorfismos de base única, ou seja, variação nas sequências do DNA que ocorre em uma posição individual e difere no

genoma entre membros da mesma espécie ou entre pares de cromossomos de um indivíduo, com frequência de pelo menos 1% em uma população (BROOKES, 1999).

Schmutz e Grimwood (2004) dizem que, a informação da sequência genômica favorece a compreensão de como a variação genética influencia a característica de interesse, por permitir mapear essa característica em local preciso no genoma. Segundo Coutinho et al. (2010), os sequenciamentos de genomas e de sequências expressas podem auxiliar na identificação da posição de genes e de vias metabólicas associadas à característica de interesse. Mas a etapas de obtenção de marcadores envolvem o conhecimento prévio de sequência do gene de interesse para o desenho dos *primers* e sondas específicas. Normalmente com essas informações são feitas etapas de amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes de interesse em diferentes indivíduos. As sequências obtidas são analisadas considerando os *SNPs* (FALEIRO, 2007).

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Exposta a complexidade do estudo da genômica, que abrange conhecimento em biologia molecular, genética e melhoramento genético, fica evidente a importância que os trabalhos de pesquisa desenvolvidos na Embrapa Suínos e Aves possuem para a agropecuária brasileira, e que contribuem para a obtenção da qualidade dos produtos de origem animal produzidos neste país. Através do uso de dados genômicos, é possível utilizá-los a favor do melhoramento de espécies animais de interesse econômico que é de fundamental importância no desenvolvimento de ciência e tecnologia para o nosso país e do mundo.

O estágio em um local de pesquisa renomado na área da agropecuária despertou o interesse pela área de pesquisa, devido ser observado a abrangente atuação do Zootecnista nesta área, e que há muito ainda a ser pesquisado pela ciência nacional. Além do crescimento em conhecimento pessoal e profissional que este estágio ofereceu.

#### 4 REFERÊNCIAS

BENTO, M. A. F.; BRONZATTO, A.; PYLES, M. D. Criptorquidismo em equino – relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Garça (SP), v. 3, n. 06, janeiro de 2006. Disponível em: <[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/YZcelj5n1CEqbPw\\_2013-5-20-15-44-7.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/YZcelj5n1CEqbPw_2013-5-20-15-44-7.pdf)>. Acesso em: 16 maio 2016.

BRIDI, A. M. et al. Efeito do genótipo halotano e de diferentes sistemas de produção na qualidade da carne suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1362-1370, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982003000600011&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982003000600011&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 25 junho 2016.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.

CAVALCANTE, A. G. Um Estudo do efeito do intercalante brometo de etídio em DNA condensado por polietileno-glicol via espectroscopia de força e eletroforese em gel. **Locus UFV**. Universidade de Federal de Viçosa, 2014. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7159>>. Acesso em: 25 junho 2016.

CHAGAS, D. C. A. **Estudo da Presença dos Genes Halotano e Rendimento Nápole em Suínos no Distrito Federal e Entorno**. Brasília, 2014. 48 p. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/16492/1/2014\\_DeboraCristinaAlvesdasChagas.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/16492/1/2014_DeboraCristinaAlvesdasChagas.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2016.

CHENG, H. H. Mapping the chicken genome. **Poultry Science**, Ithaca, v.76, p. 1101-1107, 1997.

COSTA, M. R.; MOURA, E.F. **Manual de Extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 24 p. 2001.

COUTINHO, L. L.; ROSARIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**. São Paulo, v. 24, n. 70, p. 123–147, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142010000300009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 02 de maio de 2016.

DEBUSK, A. G. **Genética Molecular**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Polígono, 1971. 166 p.

EMBRAPA SUÍNOS E AVES. **História**. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/historia>>. Acesso em: 10 maio 2016.

FALEIRO, F. G. **Marcadores Genéticos-Moleculares Aplicados a Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FIGUEIREDO, E. A. de. Raças/Linhagens genéticas. **Agência Embrapa de Informação**. Árvore do Conhecimento. Frango de Corte, [2015?]. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango\\_de\\_corte/arvore/CONT000fzh0oawf02wx5ok0cpoo6aby0siwl.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fzh0oawf02wx5ok0cpoo6aby0siwl.html)>. Acesso em: 4 maio 2016

GIRÃO, R. Hérnias na região inguinal: biomateriais. **Revista Portuguesa de Cirurgia**. 2 ed. n. 10. p. 59-64, Setembro, 2009.

GOMES, A. L. de O. Desempenho motor e funcional na Distrofia Muscular de Duchenne: estudo de um caso. **Journal of the Health Sciences Institute**, 2011. Disponível em: <[http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2011/02\\_abr-jun/V29\\_n2\\_2011\\_p131-135.pdf](http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2011/02_abr-jun/V29_n2_2011_p131-135.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2016.

GRIFFITHS, A. J. S. et al. **Introdução a genética**. Traduzido por Paulo A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed. 726 p. 2008.

HILLIER, L.W. et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v.432, p. 695–716, 2004.

LAVILLE, E. et al. Characterisation of PSE zones in semimembranosus pig muscle. *Meat Science*. v.70 n.1 p. 167–172, 2005.

LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J de O. Genômica. **Agência Embrapa de Informação**. Árvore do Conhecimento. Frango de Corte, [2015?a]. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango\\_de\\_corte/arvore/CONT000fy1j9mks02wx5ok0pvo4k32zisvd6.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fy1j9mks02wx5ok0pvo4k32zisvd6.html)>. Acesso em: 4 maio 2016.

LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J de O. Material Genético. **Agência Embrapa de Informação**. Árvore do Conhecimento. Frango de Corte, [2015?b]. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango\\_de\\_corte/arvore/CONT000fc66uyih02wx5eo0a2ndxyampko73.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fc66uyih02wx5eo0a2ndxyampko73.html)>. Acesso em: 4 maio 2016.

MANUAL DO USUÁRIO BIOANALYSER 2100 AGILENT®. 7. ed. 2013. 28 p. Disponível em: <[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034\\_RNA6000Nano\\_KG.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034_RNA6000Nano_KG.pdf)>. Acesso em: 29 abril 2016.

MANUAL DO USUÁRIO BIODROP® Cambridge (Reino Unido), v.2, modelo 1005366, 2012, 95 p. disponível em: <[https://www.denvillescientific.com/sites/default/files/Denville\\_BioDrop\\_Spectrophotometer\\_s\\_User\\_Manual\\_V2.pdf](https://www.denvillescientific.com/sites/default/files/Denville_BioDrop_Spectrophotometer_s_User_Manual_V2.pdf)>. Acesso em: 29 abril 2016.

MANUAL DO USUÁRIO FLUORÍMETRO 2.0 QUBIT®. Rev. Date: 4 October 2010. 41 p. MAN0003231 disponível em: <[http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2\\_Fluorometer\\_UserManual.pdf](http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2_Fluorometer_UserManual.pdf)>. Acesso em: 29 abril 2016.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Suínos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 10 maio 2016.

NICIURA, S. C. M. Aplicação de ferramentas de biologia molecular em produção animal. In: SEMANA DO ESTUDANTE, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/33350>>. Acesso em: 25 abril 2016.

NONNEMAN, D. J. et al. A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome. **BioMed Central Ltd**. Junho 2012. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-233>>. Acesso em: 15 maio 2016.

REGITANO, L. C. A. et al. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. São Carlos: Embrapa pecuária Sudeste. 2007. Disponível em: <<http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/e-book/LivroProtMol.pdf/view>>. Acesso em: 20 abril 2016.

REGITANO, L. C. A. et al. **Manual de Laboratório**: curso técnicas de biologia molecular aplicadas à produção animal. Embrapa pecuária sudeste. 2009.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2002.

SANDOVAL, L. M. et al. Hérnia inguinal em suíno – relato de caso. In: 42º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E 1º CONGRESSO SUL BRASILEIRO DA ANCLIVEPA. Curitiba. **Anais...** pg. 1654-1658. 2015. Disponível em:

<[http://www.infoteca.inf.br/conbravet/smarty/templates/arquivos\\_template/upload\\_arquivos/a cervo/610.pdf](http://www.infoteca.inf.br/conbravet/smarty/templates/arquivos_template/upload_arquivos/a cervo/610.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2016.

SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J. Genomes: Fowl Sequence. **Nature**, [New York]: v.432, p.679–680, 2004.

STERKY F, L. J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology** Amsterdam, v.76, n.1, p.1–31, 2000.

TICIANELLI, J. S. et al. Intersexo e outras anomalias do desenvolvimento do aparelho reprodutor nos animais domésticos e o auxílio da citogenética para o diagnóstico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 35, n.1, p.26-32, 2011.

VAINZOF, M. et al. Modelos animais ajudando a decifrar doenças neuromusculares humanas. Anais do V Simpósio Brasileiro de Hipertermia Maligna. **Revista Neurociências** v.13 n.3 jul/set, 2005. Disponível em: <[http://services.epm.br/dneuro/neurociencias/vol13/v\\_simposio\\_hipertermia\\_maligna.pdf](http://services.epm.br/dneuro/neurociencias/vol13/v_simposio_hipertermia_maligna.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2016.

WISCHRAL, A. e GOMES FILHO A. M. Aplicações da biologia molecular na reprodução animal. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 59 - 63, dez. 2009. Supl. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

ZANCHIN, F. **Diagnósticos Diferenciais de Hérnias Umbilicais em Suínos no Abate**. 2015. 54f. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/115189/000956645.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 maio 2016.

## 5 ANEXOS

### 5.1 PROTOCOLO: PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL A PARTIR DE TECIDOS ANIMAIS (CENTRIFUGAÇÃO-COLUNA) QIAGEN®.

Procedimentos antes de iniciar a extração:

–Usou-se o Kit DNeasy, usado para extrair DNA de amostras de sangue e tecido.

–Todos os passos de centrifugação realizou-se à temperatura ambiente (15–25 °C)

–O vórtex foi realizado por 5–10 segundos.

–Tampão ATL Qiagen® e tampão AL Qiagen® podem formar precipitados com o armazenamento. Se necessário, aquecer a 56 °C até que os precipitados tenham se dissolvido completamente.

–Tampão AW1 Qiagen® e tampão AW2 Qiagen® são fornecidos como concentrados. Antes de utilizá-los pela primeira vez, adicionar a quantidade apropriada de etanol (96–100%) como indicado no rótulo para obter uma solução de trabalho.

–Se o tecido estiver congelado, equilibrar a amostra até à temperatura ambiente. Evitar descongelamento e congelamento de amostras uma vez que isto reduzirá a quantidade de DNA.

Extração:

1. Foram cortados e colocados até 25 mg de tecido (mínimo 10 mg) em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 180 µL de tampão de ATL® (é altamente recomendável cortar o tecido em pedaços para permitir eficiente lise).

2. Adicionou-se 20 µL de proteinase K®. Misturou-se bem com vórtex e incubou-se a 56 °C em bloco de banho seco em agitação até o tecido ser completamente lisado (4 horas são suficientes). Após incubação, o lisado tornou-se viscoso, mas não gelatinoso, para não entupir a coluna DNeasy Mini.

3. Vórtex durante 15 segundos. Adicionou-se 200 µL de tampão AL® à amostra, e misturou-se bem com vórtex. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol (96–100%) e misturou-se novamente por vórtex (é essencial que a amostra, tampão AL e etanol sejam misturados imediatamente por pipetagem ou vórtex para se obter uma solução homogênea).

4. Pipetou-se a mistura (incluindo qualquer precipitado) para a coluna DNeasy Mini® colocada num microtubo de 2 mL (Figura 19). Centrifugou-se a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Descartou-se o eluato e microtubo.

5. Colocou-se a coluna de DNeasy Mini® em um novo microtubo de 2 mL, adicionou-se 500 µL de tampão AW1® e centrifugou-se durante 1 min. a 6000 xg (8000 rpm). Descartou-se o eluato e microtubo.

6. Colocou-se a coluna de DNeasy Mini® em um novo microtubo de 2 mL, adicionou-se 500 µL de tampão AW2®, e centrifugou-se durante 3 min. a 20.000 xg (14.000 rpm) para secar a membrana DNeasy®. Descartou-se o eluato e microtubo (é importante secar a membrana da coluna DNeasy Mini®, uma vez que o residual de etanol pode interferir com as reações subsequentes). Este passo de centrifugação assegura que nenhum etanol residual será transportado durante a próxima eluição.

7. Colocou-se a coluna de DNeasy Mini® em microtubo limpo de 1,5 mL e pipetou-se 200 µL de tampão AE® diretamente sobre a membrana DNeasy®. Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto, e em seguida centrifugou-se durante 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm) para eluir.

– A eluição com 100 µL (em vez de 200 µL) aumenta a concentração de DNA final em eluído, mas diminui o rendimento global de DNA.

**Nota:** Não deve-se eluir mais de 200 µL em um microtubo de 1,5 mL, porque a coluna DNeasy Mini irá entrar em contato com o fluído eluído.

8. Armazenou-se o fluído de DNA em microtubo em freezer.

Figura 19– Coluna DNeasy Mini colocada num microtubo de 2 mL.

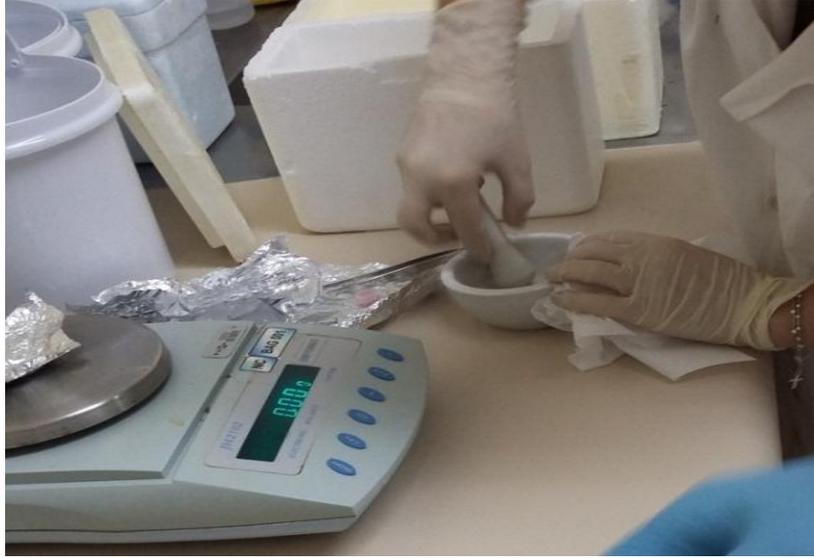


Fonte: Do autor, 2016.

5.2 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDOS COM TRIZOL® (INVITROGEN®) (ADAPTADO DE CHOMCZYNSKI E SACCHI, 1987) + LIMPEZA DE RNA UTILIZANDO RNEASY MINI KIT (QIAGEN® - Nº DE CATÁLOGO: 74104 OU 74106).

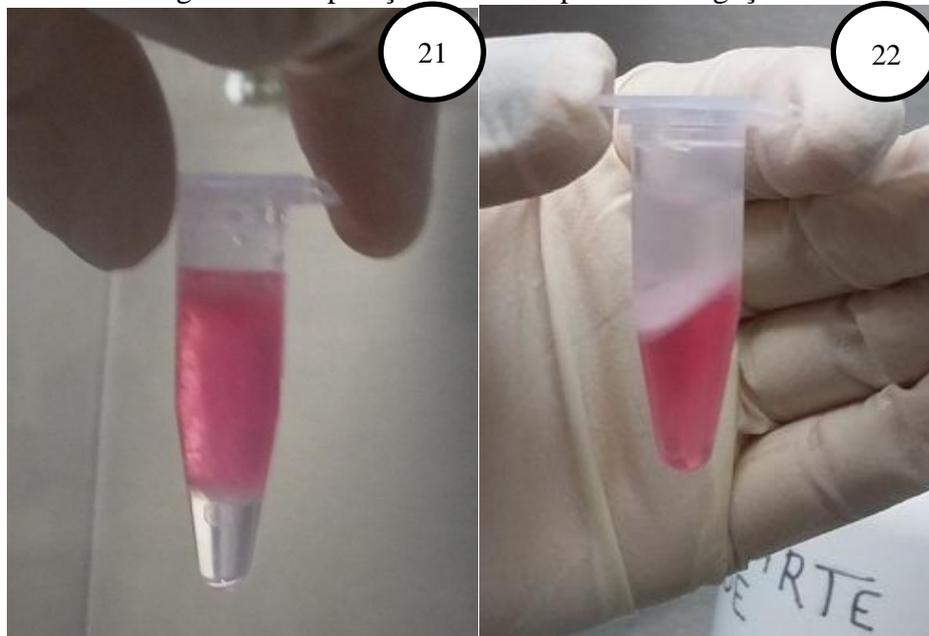
1. Macerou-se o tecido em nitrogênio líquido (Figura 20).
2. Para cada 50 a 100 mg de tecido, adicionou-se 1 mL de Trizol® (em microtubo de 1,5 mL). Homogeneizou-se em vórtex.
3. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente.
4. Acrescentou-se 200 µL de clorofórmio (Figura 21).
5. Agitou-se vigorosamente com as mãos por 15 segundos.
6. Incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente.
7. Centrifugou-se a 16.000 xg à 4°C durante 15 minutos.
8. Removeu-se a fase aquosa (incolor) (Figura 22) para microtubo limpo.
9. Adicionou-se 500 µL de isopropanol. Homogeneizou-se com as mãos.
10. Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente.
11. Centrifugou-se a 13.000 xg à 4°C por 10 minutos.
12. Descartou-se o sobrenadante.
13. Transferiu-se a amostra (700 µL) na coluna RNeasy Mini® em um tubo eppendorf de 2 mL. Fechou-se a tampa e centrifugou-se por 15 seg. à  $\geq 10.000$  rpm. Descartou-se o eluato. Reutilizou-se o microtubo no passo 14 (após a centrifugação, removeu-se a coluna com cuidado do microtubo para descartar o eluato).
14. Adicionou-se 500 µL de tampão RPE® à coluna de RNeasy Mini®. Fechou-se o microtubo, e centrifugou-se por 15 seg. a  $\geq 10.000$  rpm. Descartou-se o eluato. Reutilizou-se o microtubo no passo 15 (O tampão RPE é vendido concentrado, verificou-se se foi diluído antes de iniciar o uso).
15. Adicionou-se 500 µL de tampão RPE® à coluna RNeasy Mini®. Fechou-se o microtubo, e centrifugou-se por 2 minutos a  $\geq 10.000$  rpm. Descartou-se o eluato.
16. Centrifugou-se a coluna vazia no microtubo por 1 minuto para eliminar contaminação com etanol.
17. Transferiu-se a coluna para um novo microtubo de 1,5 mL / 2 mL.
18. Adicionou-se 30-50 µL de água ultra pura livre de RNase na coluna. Centrifugou-se por 1 minuto a  $\geq 10.000$  rpm para eluir o RNA.
19. Armazenou-se imediatamente o RNA extraído em freezer -80°C.

Figura 20– Maceração de tecido em nitrogênio líquido.



Fonte: Do autor, 2016.

Figura 21– Adição de clorofórmio (incolor) e trizol (rosa).  
Figura 22– Separação de fases após centrifugação.



Fonte: Do autor, 2016.