



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS**

**SELEÇÃO DE GENES HOUSEKEEPING PARA ANÁLISE DE PCR  
QUANTITATIVO DO GENE *GSTM1***

**RÔMULO JORGE BATISTA PEREIRA**

Santarém, PA  
Fevereiro/2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS**

**SELEÇÃO DE GENES HOUSEKEEPING PARA ANÁLISE DE PCR**  
**QUANTITATIVO DO GENE *GSTM1***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biodiversidade e Florestas da Universidade Federal do Oeste do Pará para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.  
Orientando: Rômulo Jorge Batista Pereira  
Orientadora: Heloisa do Nascimento de Moura Meneses

Santarém, PA  
Fevereiro/2019

RÔMULO JORGE BATISTA PEREIRA

**SELEÇÃO DE GENES HOUSEKEEPING PARA ANÁLISE DE PCR  
QUANTITATIVO DO GENE *GSTM1***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biodiversidade e Florestas da Universidade Federal do Oeste do Pará para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora

---

Flavia Garcez da Silva

---

Carlos Ivan Aguilar Vildoso

---

Heloísa do Nascimento de Moura Meneses (Presidente)

Santarém, PA

Fevereiro/2019

Dedico este trabalho aos meus pais Matias e  
Doriceles, aos meus irmãos e à minha  
namorada Marie

O único destino escrito, está no DNA, isso chama-se  
genética, o resto você pode mudar tudo.

*(Cello Vieira)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela saúde e força que me deu novamente para eu conseguir chegar até aqui.

Gostaria de agradecer ao meu pai Matias Jorge por ser o meu maior exemplo de vitória nessa vida e por ter me ensinado todos os valores éticos e morais que conheço, que me apoiou e propiciou meios para que eu pudesse chegar até onde cheguei.

Gostaria de agradecer à minha mãe Maria Doriceles pela paciência e apoio que me deu para que eu pudesse seguir com os meus objetivos.

Gostaria de agradecer aos meus avós Ernesto Benedito e Maria Jovem por sempre se preocuparem, mesmo à distância, com meus estudos e trabalhos.

Gostaria de agradecer à minha família que sempre me apoiou e torceu por mim para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Gostaria de agradecer à minha namorada Marie Juliana, que é sem dúvida o amor da minha vida, por ser minha companheira e pela paciência que teve neste momento em que eu não pude estar presente. Te amo demais lua da minha vida.

Gostaria de agradecer à minha orientadora a Prof. Heloísa do Nascimento por ter me aceitado em suas pesquisas e por ter me orientado e me guiado no meu caminho, e sem dúvida, pelo aprendizado e conhecimento compartilhado.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e colegas que trabalham comigo no laboratório por terem me ajudado e auxiliado durante todo esse tempo de permanência em que trabalhamos juntos.

Gostaria de Agradecer às minhas melhores amigas Viviane Mota e Andréia Góes por sempre terem me apoiado e ajudado nos meus momentos de maior dificuldade, e por sempre me abençoarem com as suas amizades. Espero que possamos mantê-la por muito tempo.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cinética da reação de PCR.....	17
Figura 2. Ilustração da cinética de uma PRC. Fases da PCR: exponencial, em que a quantidade de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo; linear, em que a eficiência de amplificação é reduzida; platô, fase final em que não há mais amplificação.....	18
Figura 3. Representação de um corante de ligação. O corante SYBR Green I é um exemplo de um repórter fluorescente, quando está livre no meio não apresenta fluorescência, entretanto, quando está ligado a uma molécula de DNA, sua fluorescência pode aumentar em até 1000 vezes .....	20
Figura 4. Repórteres específicos.....	22
Figura 5. Princípio da detecção de fluorescência e detecção da concentração de qPCR .....	23
Figura 6. Cálculo do $\Delta C_t$ usando o método do $\Delta\Delta C_t$ .....	27
Figura 7. Box plot referente a variação da comparação do gene <i>ACTB</i> .....	37
Figura 8. Box plot referente a variação da comparação do gene <i>GAPDH</i> .....	38
Figura 9. Box plot referente a variação da comparação do gene <i>18S</i> .....	39
Figura 10. Box plot referente a variação da comparação do gene <i>B2M</i> .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos métodos de PCR convencional e em tempo real .....	19
Tabela 2: Primers para sete genes de referência .....	30
Tabela 3: Diluição seriada para a curva padrão .....	31
Tabela 4: $\Delta C_t$ para pares de genes .....	34
Tabela 5: Média do desvio padrão dos genes de referência . .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Asn – Asparagina**

**cDNA – DNA complementar ao RNA mensageiro**

**Ct – Ciclo de Quantificação**

**dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados formados por uma base azotada**

**GPx – Glutathione Peroxidase**

**GR – Glutathione Redutase**

**GSH – Glutathione**

**GSSG – Glutathione Dissulfeto**

**GST – Glutathione S-Transferase**

***GSTM1* – Gene da Superfamília Glutathione S-Transferase da Classe Mu**

**H<sub>2</sub>O – Água**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio**

**Hg – Mercúrio**

**Hg<sup>0</sup> – Mercúrio elementar**

**Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup> ou Hg<sup>2+</sup> – Mercúrio inorgânico**

**Lys - Lisina**

**MAPEG – *Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism***

**MeHg – Metilmercúrio**

**MeHg-GSH – Complexo Metilmercúrio Glutathione**

**MIQE – Informação Mínima para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real**

**mRNA – RNA mensageiro**

**NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina**

**OMS – Organização Mundial de Saúde**

**pb – Pares de Base**

**PCR – Reação da Polimerase em Cadeia**

**qPCR – PCR quantitativa**

**qRT-PCR ou RT-qPCR – PCR em Tempo Real Quantitativa**

**RT – Transcriptase Reversa**

**SH – Tióis**

**SNC – Sistema Nervoso Central**

**SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único**

**UNEP – Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. JUSTIFICATIVA .....	13
1.2. OBJETIVO GERAL .....	14
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	15
2.2. AMPLIFICAÇÃO DA PCR.....	16
2.3. PCR EM TEMPO REAL.....	18
<b>2.3.1. Repórteres não específicos</b> .....	20
<b>2.3.2. Repórteres específicos</b> .....	21
2.4. FUNCIONAMENTO DO ENSAIO DE QPCR.....	22
2.5. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	25
<b>2.5.1. Quantificação absoluta</b> .....	25
<b>2.5.2. Quantificação relativa</b> .....	25
2.5.2.1. Método do Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) .....	26
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	28
3.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	28
3.2. EXTRAÇÃO DO RNA .....	28
<b>3.2.1. Lise das células do sangue</b> .....	28
<b>3.2.2. Extração com ácido-fenol: Clorofórmio</b> .....	28
<b>3.2.3. Tratamento com DNase I</b> .....	29
3.3. SÍNTESE DE DNA E QPCR .....	29
3.4. CURVA PADRÃO.....	31
3.5. NORMALIZAÇÃO DO GENE .....	31
<b>4. RESULTADOS</b> .....	32
4.1. SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA .....	32
4.2. PADRONIZAÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA .....	32
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	41
5.1. EFICIÊNCIA DA CURVA PADRÃO .....	41
5.2. ESCOLHA DO GENE NORMALIZADOR .....	42
5.3. EIXO PROBLEMATIZADOR .....	44
<b>5.3.1. Exposição ambiental ao mercúrio</b> .....	44
<b>5.3.1. Mercúrio e glutathione</b> .....	45
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	47
<b>ANEXO I</b> .....	
<b>ANEXO II</b> .....	

## RESUMO

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) é uma técnica que combina o sistema de amplificação exponencial de um fragmento de DNA com a captação de dados no momento em que ocorre a reação de amplificação por meio de medidas de fluorescência. A qPCR tornou-se uma das técnicas mais utilizadas quando se trata da análise de expressão gênica devido a sua precisão, ampla faixa dinâmica, sensibilidade e reprodutibilidade. Ao se realizar a comparação de expressão gênica entre amostras e/ou tecidos diferentes, é de suma importância considerar os aspectos da variação experimental decorrente da quantidade de material de partida, extração de RNA e eficiências de transcrição reversa. Para eliminar essas variações é necessário o uso de um gene normalizador para garantir a precisão dos níveis de expressão do ensaio qPCR. Diante disso, o objetivo do presente trabalho é selecionar genes de referência para ensaios de análise de expressão gênica do gene da família *GSTM1*. Foram coletadas amostras de sangue periférico (5mL) de indivíduos expostos e não exposto ao Mercúrio (Hg). Foi realizado a extração do RNA, seguida da síntese do cDNA e realizado a qPCR para sete genes normalizadores (*ACTB*, *GAPDH*, *18S*, *HPRT1*, *B2M*, *GUSB* e *TBP*). Para a análise da normalização dos genes de referência foi aplicado a técnica desenvolvida por Silver e colaboradores (2006) denominado “pares de genes”. Os resultados do presente trabalho demonstram que os genes *ACTB*, *GAPDH* e *B2M* apresentaram melhores estabilidade para serem utilizados como genes de referência para estudos do gene *GSTM1*.

**Palavra chaves:** PCR quantitativa; Genes normalizadores; *GSTM1*.

## ABSTRACT

Quantitative real-time PCR (qPCR) is a technique that combines the exponential amplification system of a DNA fragment with the capture of data at the moment the amplification reaction occurs by means of fluorescence measurements. The qPCR became one of the most widely used techniques when it comes to gene expression analysis because of its precision, wide dynamic range, sensitivity, reproducibility. When it's compared the gene expression between different samples and / or tissues, it is paramount to consider the aspects of the experimental variation resulting from the amount of starting material, RNA extraction and reverse transcription efficiencies. In order to eliminate such variations it's necessary to use a normalizing gene to ensure the accuracy of the levels of expression of the assay qPCR. Therefore, this study aims to select reference genes for gene expression analysis assays of the *GSTM1* family *gene*. It was collected peripheral blood samples (5 mL) from exposed individuals and not exposed ones to Mercury (Hg). The RNA extraction was performed, then cDNA synthesis and qPCR for seven normalizing genes (*ACTB*, *GAPDH*, *18S*, *HPRT1*, *B2M*, *GUSB* and *TBP*). For the analysis of normalization of the reference genes, It was applied the technique developed by Silver et al. (2016) called "gene pairs". The results of the present work demonstrate that the *ACTB*, *GAPDH* and *B2M* genes presented better stability to be used as reference genes for *GSTM1* gene studies.

**Key words:** quantitative PCR; Normalizing genes; *GSTM1*.

## 1. INTRODUÇÃO

O princípio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) consiste em replicar, *in vitro*, um fragmento específico de DNA desejável, que pode ser de fita simples ou dupla, por meio de duplicação exponencial obtendo, assim, uma quantidade de cópia de DNA da ordem de até 10000 vezes que a concentração inicial. A visualização do produto da técnica é por meio de corridas de eletroforese em gel de agarose através da detecção do DNA amplificado com um corante capaz de intercalar no DNA e fluorescer sob exposição à luz ultra-violeta, tal como o brometo de etídio (MULLIS; FALOONA, 1987).

O surgimento da técnica de PCR foi um marco histórico para análises moleculares do DNA e RNA, que logo foram surgindo variantes da técnica com melhor capacidade de análise que a PCR não conseguiu abordar. Neste cenário surgiu a técnica de PCR em tempo real que possui o mesmo princípio da técnica PCR convencional, entretanto, o que difere ambas as técnicas é a captação de dados no momento em que ocorre a reação de amplificação por meio de medidas de fluorescência. O método é mais sensível, robusto e com boa reprodutibilidade para determinação quantitativa de DNA ou RNA (MORGANTE; BLAWID, 2016).

Assim, técnica de PCR em tempo real pode ser aplicada para quantificação da expressão de um determinado gene de interesse, permitindo, inclusive, uma análise comparativa da expressão de genes em diferentes amostras e/ou tecidos concomitantemente (HIGUCHI *et al.*, 1993).

### 1.1.JUSTIFICATIVA

A PCR quantitativa em tempo real tornou-se uma das técnicas mais utilizadas quando se trata da análise de expressão gênica devido a sua precisão, ampla faixa dinâmica, sensibilidade e reprodutibilidade. Ao se realizar a comparação de expressão gênica entre amostras e/ou tecidos diferentes, é de suma importância considerar os aspectos da variação experimental decorrente da quantidade de material de partida, extração de RNA e eficiências de transcrição reversa. Para eliminar essas variações, a precisão do qPCR depende da normalização por um controle interno, muitas vezes referido como gene de referência ou gene normalizador (*housekeeping gene*). As características que um gene normalizador deve

apresentar é ser expresso ubiquamente em todas as células e mostrar mínima variabilidade na expressão entre amostras e sob as condições experimentais utilizadas.

Genes normalizadores ideais e universais não existem e a busca pelos genes apropriados de forma estável deve ser realizada para cada sistema experimental. Logo, a investigação de gene normalizadores requer etapas minuciosas e precisas para que os resultados sejam validados, e além do mais, nenhum trabalho na literatura foi realizado abordando a expressão gênica do gene *GSTM1* para ensaios de qPCR, tão logo associando o gene sob o contexto da exposição ao mercúrio. Logo, faz-se necessário a busca por estes genes normalizadores para a seleção do gene mais estável visando a aplicação de ensaio de expressão genica para o gene *GSTM1*.

## 1.2.OBJETIVO GERAL

Selecionar genes de referência para ensaios de análise de expressão gênica do gene da família *GSTM1*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

O advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) revolucionou a maneira em como se detectava e analisava o DNA e RNA. Até meados de 1980, as técnicas utilizadas na Biologia Molecular estavam restritas a clonagem e detecção através de sondas marcadas para determinar uma sequência-alvo, mesmo em pequenas quantidades (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Em 1985, surge uma técnica de multiplicação em grandes quantidades a partir de uma região do genoma, traduzindo em redução do tempo de execução dos experimentos, no custo e na complexidade. A técnica de PCR como conhecemos hoje foi desenvolvida pelo químico americano Kary Mullis quando trabalhava com a síntese de oligonucleotídeos (MATIOLI; FERNANDES, 2012; PASSARGE, 2011).

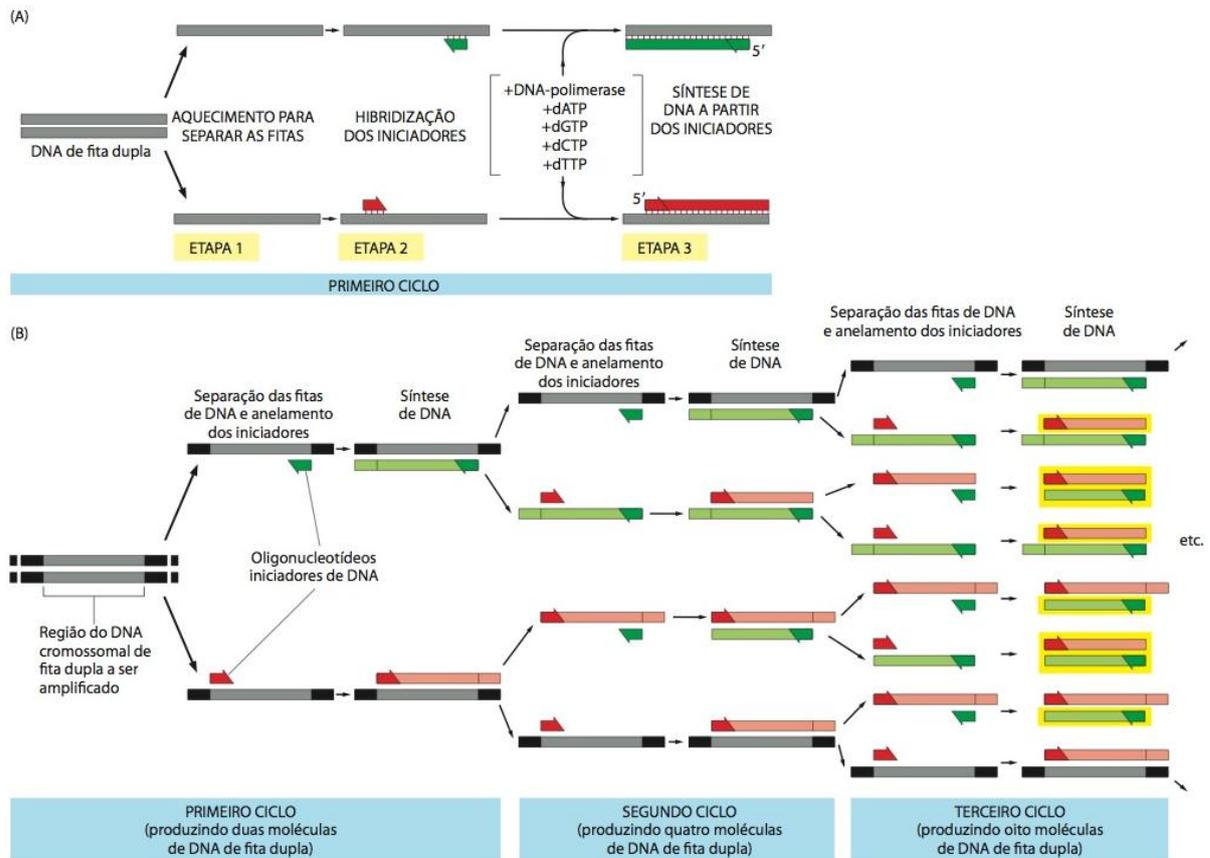
A amplificação através da PCR envolve a hibridização de primers (ou oligonucleotídeos iniciadores), os quais possuem uma sequência específica, que flanqueiam a região alvo de interesse, e com a ajuda da enzima DNA polimerase (enzima responsável para realizar a extensão da nova cadeia de DNA a partir do DNA-molde) sintetizam as novas cadeias de DNA. Este processo de síntese de novas cadeias de DNA *in vitro* é análogo ao que ocorre *in vivo*, entretanto, a PCR acontece através de sucessivos ciclos de desnaturação em alta temperatura para a síntese de uma maior quantidade de produto final. Antes da padronização por Mullis, a enzima utilizada no processo era a DNA polimerase I de *Escherichia coli* (*E. coli*), a qual possuía uma limitação: a enzima não suportava a alta temperatura do processo, e a cada novo ciclo, uma nova concentração de DNA polimerase I precisava ser adicionada ao meio a uma temperatura que não interferia em sua atividade. Este processo se repetia até obter uma boa concentração de produto amplificado e refletia em custos e propensão a erros no final do processo (MULLIS; FALOONA, 1987).

O grande avanço realizado por Mullis foi a substituição da DNA polimerase I de *E. coli*, por uma DNA polimerase purificada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq), que pode suportar incubação prolongada a uma temperatura de até 95°C, eliminando, assim, a necessidade de reestabelecimento da enzima a cada ciclo (AZEVEDO *et al.*, 2003; SAIKI *et al.*, 1988).

## 2.2.AMPLIFICAÇÃO DA PCR

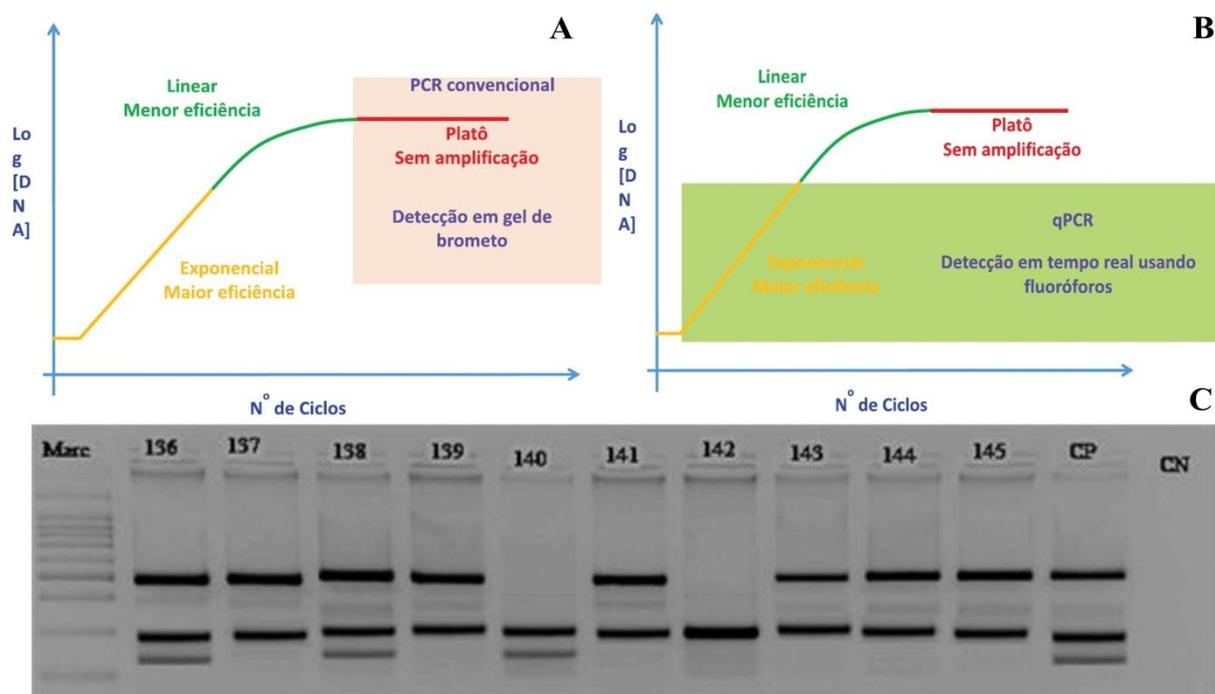
O princípio da técnica consiste em replicar, *in vitro*, um fragmento específico de DNA desejável, que pode ser de fita simples ou dupla, por meio de duplicação exponencial a partir de três etapas básicas de modo sucessivas e consecutivas, utilizando a DNA-polimerase termoestável para regular o processo. Se faz necessário a utilização de um par de oligonucleotídeos que flanqueiam a sequência alvo específica, os dNTP (trifosfatos dos quatro Desoxiribonucleotídeos A; T; C; G de uma reação de PCR necessários para a síntese) e íons de magnésio no tampão.

As três etapas básicas são: a) Desnaturação térmica do DNA alvo a ser amplificado, que ocorre aproximadamente a 90-95°C para separar os filamentos de DNA helicoidal duplo a fim de que os desoxirribonucleotídeos estejam livres para o processo; b) Anelamento dos oligonucleotídeos para início de reação de síntese das novas cadeias de DNA que ocorre aproximadamente a 50-60°C e se ligarão as bases nitrogenadas livres; c) Polimerização das novas fitas de DNA por incorporação dos dNTPs a 70-75°C (Figura 1A) (AZEVEDO *et al*, 2003; PASSARGE, 2011). Ao final do primeiro ciclo da reação, duas novas cadeias de DNA alvo são geradas. Para o próximo ciclo, as duas cadeias de DNA são utilizadas como molde para gerar quatro cópias do DNA alvo, e assim sucessivamente para cada ciclo (aproximadamente 35 a 40 ciclos) gerando um crescimento exponencial da síntese de DNA alvo. Ao final da reação, uma única molécula de DNA pode resultar em aproximadamente  $10^5$  fragmentos de DNA (Figura 1B) (MULLIS; FALOONA, 1987).



**Figura 1:** Cinética da reação de PCR. (A) Etapa de cada ciclo de reação. (B) Amplificação exponencial da reação de PCR (ALBERTS *et al.*, 2011)

No que tange a análise dos dados de uma PCR convencional os dados utilizados são retirados do *endpoint* (Figura 2A), ou seja, após a finalização de todos os ciclos da reação. Um fator limitante da PCR convencional é que por volta dos últimos ciclos da reação já começa a se observar um platô, que corresponde a uma estagnação na reação, ou seja, devido ao consumo de reagentes, ao surgimento de inibidores ou degradação do DNA que podem ocorrer à medida que os ciclos de reação vão aumentando, não se observa mais aumento de produto amplificado a partir deste platô. Logo, como os dados são coletados ao final da reação, a aplicação da PCR convencional é apenas para ensaios que consigam discriminar a presença ou ausência de uma determinada sequência alvo de interesse na amostra (Figura 2C).



**Figura 2:** Ilustração da cinética de uma PRC. Fases da PCR: exponencial, em que a quantidade de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo; linear, em que a eficiência de amplificação é reduzida; platô, fase final em que não há mais amplificação. (A) a detecção da quantidade de moléculas é realizada ao final da reação, enquanto que na qPCR (B), a detecção é realizada em tempo real, a cada ciclo da reação, na fase exponencial (C) observação do gene em gel de agarose (Adaptado de AGILENT TECHNOLOGIES, 2012).

Diante dessas limitações novas variações da técnica surgiram para que pudesse ser aplicado para ensaios quantitativos de análise do DNA, como o número de moléculas de DNA ou nível de expressão de um determinado gene. Neste contexto, surge então a técnica de PCR em tempo real.

### 2.3.PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real possui o mesmo princípio da técnica PCR convencional, pois apresenta as fases de desnaturação, anelamento e alongação, entretanto, o que difere ambas as técnicas é a captação de dados no momento em que ocorre a reação de amplificação por meio de medidas de fluorescência (qPCR). O método é mais sensível, robusto e com boa reprodutibilidade para determinação quantitativa em relação a PCR convencional (Tabela 1), pois a fluorescência emitida é detectada durante a fase exponencial onde os reagentes ainda não são limitantes, bem como, não há o acúmulo de inibidores da reação (Figura 2B). A fluorescência detectada está diretamente ligada com a quantidade de produto amplificado, portanto, quanto maior for a quantidade de amplicons durante os ciclos, maior será o sinal

emitido que será captado pelo equipamento e irá gerar os resultados que poderão ser analisados no momento que termina as reações, sem a necessidade de preparos e processamentos pós reacionais por isso o nome “em tempo real” (MORGANTE; BLAWID, 2016).

**Tabela 1:** Características dos métodos de PCR convencional e em tempo real

<b>Características</b>	<b>PCR convencional</b>	<b>PCR em tempo real</b>
Equipamentos necessários	Três (termociclador; sistema de eletroforese: cuba+fonte de alimentação; sistema de fotodocumentação)	Um único equipamento (amplificação e detecção simultânea)
Especificidade	Menor especificidade em relação à PCR em tempo real	Maior especificidade em relação à PCR convencional devido à presença de uma sonda
Sistema	Não-automatizado	Automatizado
Resultados	Não são expressos em números	São expressos em números
Interpretação dos resultados	Baseado na observação de banda em gel de agarose	Baseado em valores de Ct, determinados por um software
Quantificação do DNA	Não permite	Permite
Geração de resíduos tóxicos	Sim	Não
Tempo de execução	6 a 8 horas	2 a 3 horas
N. amostras por corrida	Depende da capacidade do termociclador	42 amostras em duplicata + controles
Custo	Menor em relação ao PCR em tempo real	Maior em relação ao PCR convencional

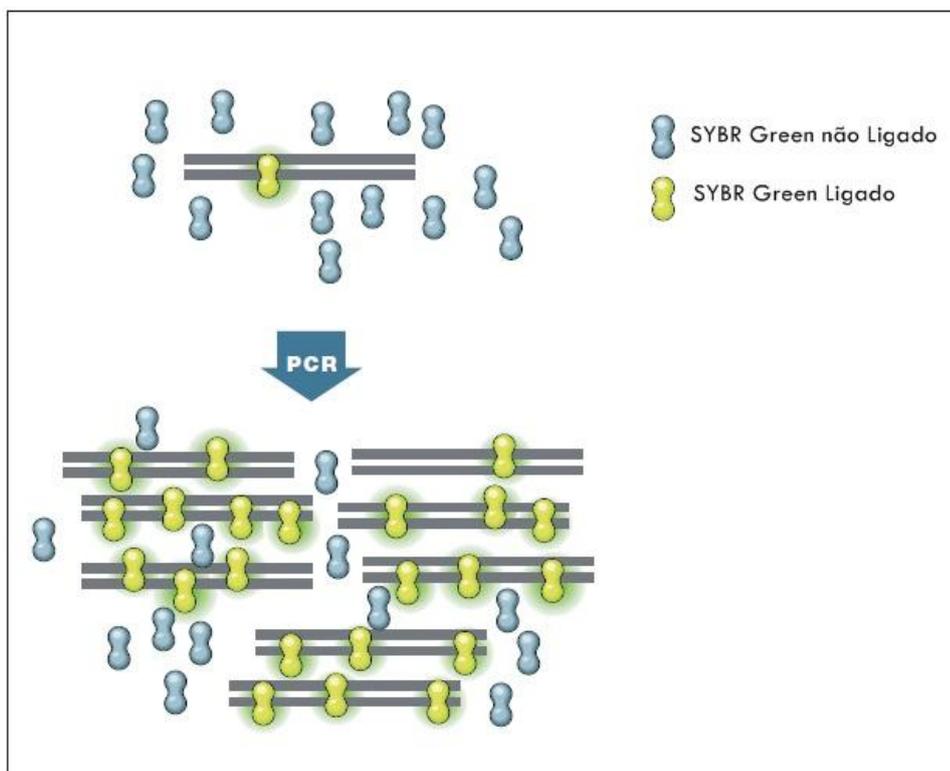
Fonte: BEPA 2007

A primeira vez a ser descrita foi em 1993 por Higuchi e seus colaboradores onde construíram um sistema capaz de detectar e registrar o aumento da fluorescência durante a reação devida adição de brometo de etídeo que possui propriedades intercalante de DNA de cadeia dupla e verificaram a fluorescência deste corante. A cada ciclo da PCR uma imagem era gerada e, ao final da reação, as imagens eram analisadas por um software que media a intensidade luminosa média emitida por cada tubo e gerava os gráficos de amplificação. (HIGUCHI *et al.*, 1993).

Com o tempo, a qPCR foi se tornando cada vez mais sofisticada em termos de monitoramento dos ciclos de reação, pois o brometo de etídeo era uma molécula radioativa e tornava a técnica limitante. Assim, novas moléculas foram desenvolvidas para emissão do sinal fluorescente, que são os repórteres fluorescentes responsáveis por se ligar ao produto final e gerar o sinal da reação. Os repórteres fluorescentes são classificados em específicos e não específicos (KUBISTA *et al.*, 2006).

### 2.3.1. Repórteres não específicos

O repórter não específico é um corante marcado com um composto fluorescente intercalante que será responsável por se ligar a moléculas de DNA de fita duplas (dsDNA). Este repórter possui a característica de se ligar de forma não específica a qualquer molécula de dupla fita. O repórter apresenta pouca fluorescência quando não está ligado a uma molécula de DNA, mas ao decorrer do ensaio de PCR as quantidades crescentes de fitas duplas de DNA aumentam e consequentemente os corantes se ligam gerando o sinal de fluorescência que será monitorado ao final de cada ciclo, o sinal de fluorescência será proporcional a concentração de moléculas presentes no meio (Figura 3) (BUSTIN, 2005).



**Figura 3:** Representação de um corante de ligação. O corante SYBR Green I é um exemplo de um repórter fluorescente, quando está livre no meio não apresenta

fluorescência, entretanto, quando está ligado a uma molécula de DNA, sua fluorescência pode aumentar em até 1000 vezes (Adaptado de Real-Time PCR Applications Guide da *BIO-RAD LABORATORIES*, 2006).

As vantagens de utilizar repórteres não específicos são: capacidade de se testar múltiplos genes, design de ensaio simples, menor custo inicial e capacidade de realizar curva de difusão ou curva de Melting, para verificar a especificidade da reação da amplificação. Entre as desvantagens estão a sua falta de especificidade, isto é, a ligação de corantes a dímeros não específicos da reação o que influencia na fluorescência total da reação. A outra desvantagem é que não podem ser usados em ensaio multiplex, pois os sinais de amplicons diferentes se misturariam e não seria possível realizar a distinção dos sinais (BUSTIN, 2005).

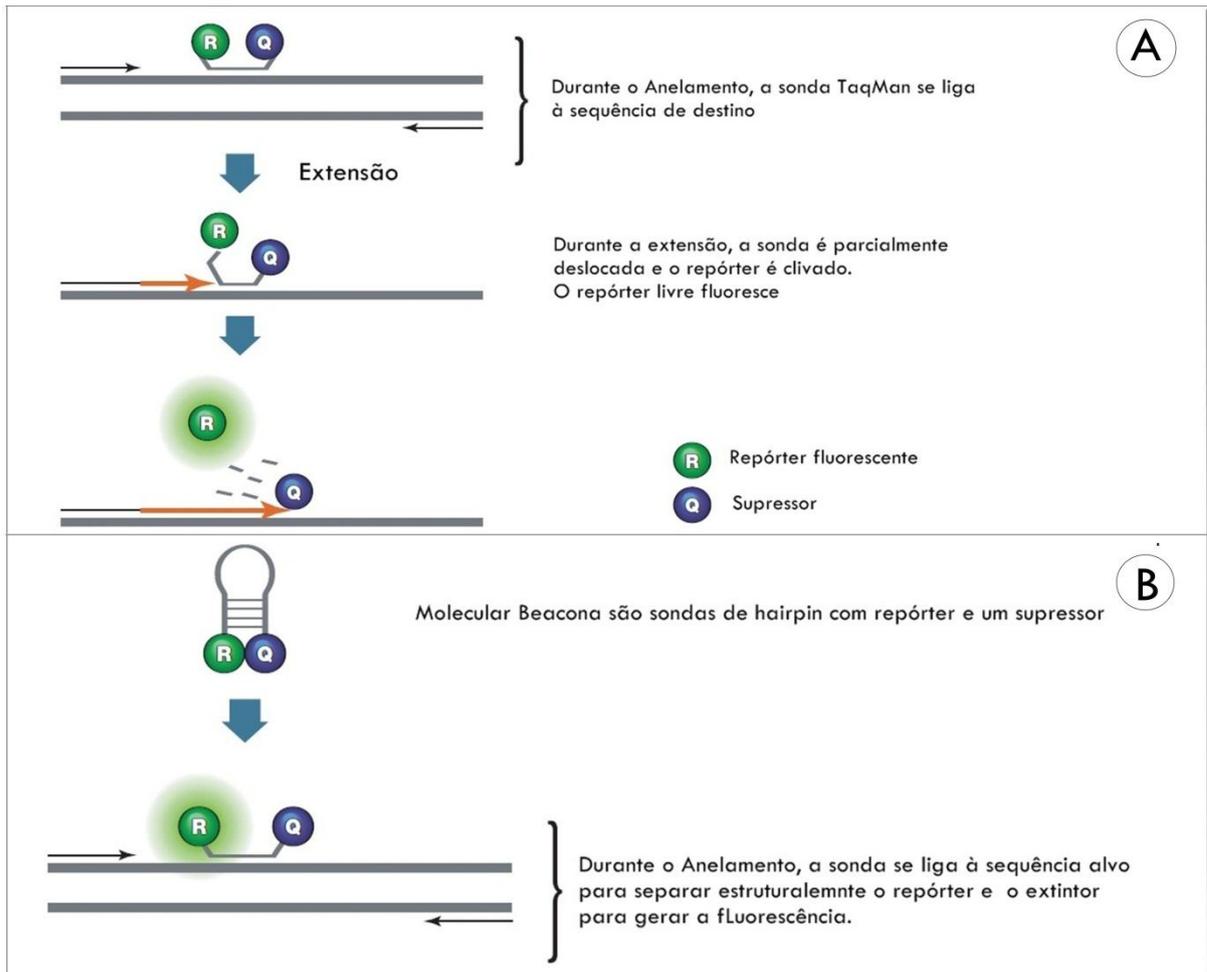
### **2.3.2. Repórteres específicos**

Os repórteres específicos podem ser sondas ou oligonucleotídeos iniciadores que possuem um marcador fluorescente e uma molécula supressora na mesma estrutura cujo principal função é inibir a emissão de fluorescência e garantir que a fluorescência seja emitida apenas quando se hibridizar no alvo amplificado. Para isso, quando o repórter não está ligado a um alvo específico, o supressor inibe a emissão da fluorescência próxima, ao momento que o repórter se liga ao alvo específico, o supressor é clivado e deixa de atuar na inibição da fluorescência, e assim é obtido o sinal. Em outras palavras, os repórteres apenas apresentarão sinal de fluorescência quando o alvo desejado é amplificado, ao contrário dos repórteres inespecíficos que podem se ligar a qualquer outra molécula. Eles são repórteres específicos por se tratar de sondas ou oligonucleotídeos que possuem uma sequência específica de acordo com o ensaio desejado (BUSTIN, 2005).

Os repórteres específicos podem ser lineares ou estruturais. Na classe dos lineares está o repórter TaqMan, que é do tipo sonda e é um dos mais utilizada para os ensaios de q PCR. Possui um marcador fluorescente além de dois oligonucleotídeos específicos na sequência. A sonda quando intacta não apresenta fluorescência devido a inibição pela molécula supressora, mas ao se hibridizar com a molécula alvo durante a fase de extensão, o supressor é clivado da sonda TaqMan pela *Taq* Polimerase, e uma vez não possuindo o supressor na estrutura para extinguir a fluorescência, o sinal será emitido (Figura 4A) (HOLLAND *et al.*, 1991).

Outro repórter utilizado é a sonda oligonucleotídica Molecular Beacons, do tipo estrutural, que apresenta um marcador fluorescente e um supressor ligado nas extremidades de

uma estrutura denominada *Hairpin* (Gancho). Esta conformação aproxima o fluoróforo do supressor inibindo, assim, a fluorescência. Durante o anelamento, o oligonucleotídeo Molecular Beacons se hibridiza com a sequência alvo separando supressor do fluoróforo gerando o sinal de fluorescência, pois o supressor não consegue inibi-la (Figura 4B) (TAN *et al.*, 2004)

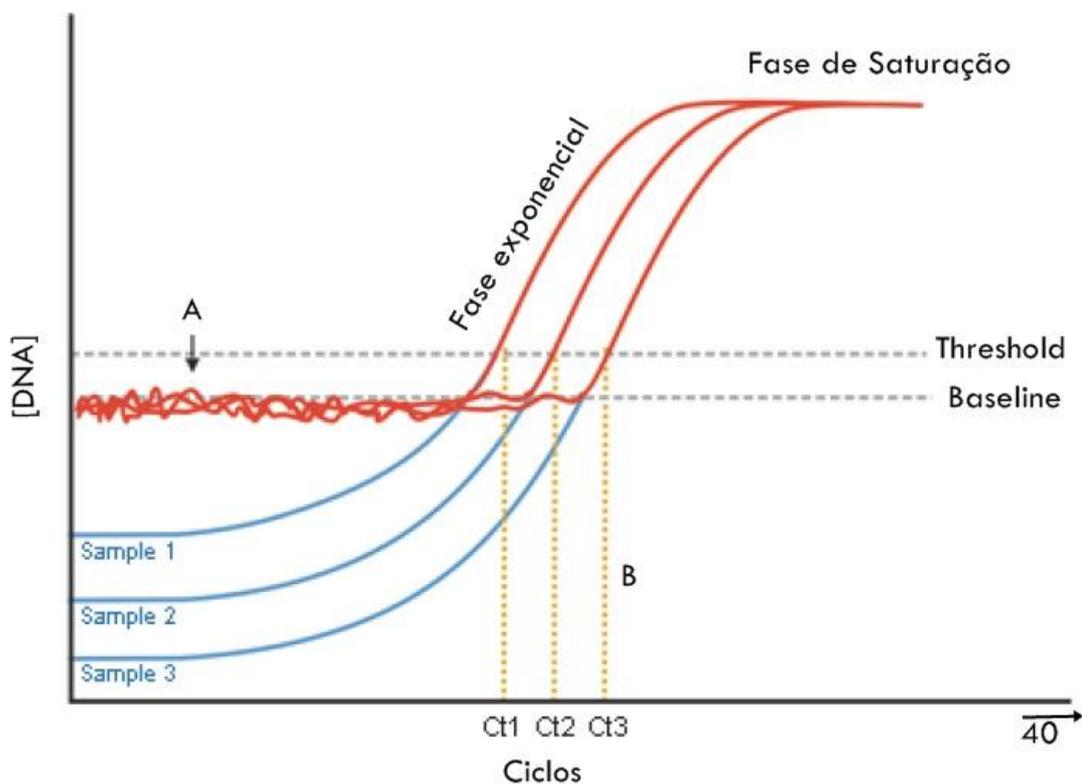


**Figura 4:** Repórteres específicos. (A) Cinética de atuação da sonda TaqMan. (B) Cinética de atuação da sonda oligonucleotídica Molecular Beacons (Adaptado de Real-Time PCR Applications Guide da *BIO-RAD LABORATORIES*, 2006).

#### 2.4. FUNCIONAMENTO DO ENSAIO DE QPCR

Após a reação do ensaio e emissão do sinal fluorescente, o equipamento irá detectar este sinal e gerará uma curva em resposta que reflete a quantidade de produto formado durante os ciclos da reação. Conforme a Figura 5, *Baseline* ou linha de base refere-se aos ciclos iniciais de fluorescência onde não há presença de variação do sinal, e é tida como o

ponto de partida para a quantificação da fluorescência, pois todo o sinal acima desta linha é referente a amplificação da fluorescência da molécula alvo. O *Threshold* é o valor em que a linha intercepta a fase exponencial do crescimento acima do *Baseline*. Normalmente este valor é um ponto definido pelo próprio software do equipamento. Valor de Ciclo de quantificação ou ciclos do *Threshold* (Ct) é uma medida primordial para a análise dos dados. Refere-se ao número de ciclos em que o sinal da fluorescência oriunda da amplificação do modelo foi capaz de cruzar a linha *Threshold* na fase de amplificação exponencial. O valor de Ct está diretamente ligado ao número de moléculas presentes no ensaio para amplificação, portanto, quanto maior o número de moléculas inicial, menor será o número de ciclos Ct, quanto menor o número inicial, maior o número de ciclos Ct (MORGANTE; BLAWID, 2016).



**Figura 5:** Princípio da detecção de fluorescência e detecção da concentração de qPCR. (Vermelho) amplificação da fluorescência. (Azul) amplificação do modelo. (A) Fluorescência mínima ou ruído do *Background*. (B) Detecção de diferentes tipos de ciclos Ct refletindo em diferenças entre amostras. (Adaptado de Introduction to quantitative PCR Methods and applications Guide da *AGILENT TECHNOLOGIES*, 2012).

O gráfico de amplificação de fluorescência é gerado plotando a concentração do DNA alvo em relação ao número de ciclos do PCR. Nos ciclos iniciais da PCR, a fluorescência é

mínima e permanece abaixo da *Baseline* denominada de *Background* (fluorescência de fundo). Essa fluorescência não é detectada pelo sistema e não faz parte do processo de quantificação. Durante a fase exponencial, quando o produto amplificado tende a aumentar a sua concentração é onde começam a surgir os primeiros sinais de fluorescência detectável, ou seja, o sinal fluorescente acima da *Baseline*, e onde a linha *Threshold* toca a curva de amplificação é o momento exato de obtenção do valor de Ct. Após a amplificação, o sinal estabiliza e satura no mesmo nível, devido a falta de reagentes, diferentemente da PCR convencional que a saturação é em vários níveis após a fase de platô. As curvas de respostas são separadas na fase de amplificação da reação permitindo quantificar as diferenças entre cada amostra nas suas quantidades iniciais de modelos de forma precisa e confiável, pois neste ponto não há a limitação de reagentes ou a presença de inibidores.

A seguir um resumo dos termos utilizados em qPCR (Quadro 1):

**Quadro 1:** Termos básicos utilizados na qPCR

Termo	Descrição
Linha de base (ou baseline)	Refere-se à fluorescência de fundo ou ruído. É detectada nos primeiros ciclos da reação, nos quais há pouca variação do sinal. Esse valor deve ser desconsiderado na análise. Somente valores de quantificação da fluorescência acima da linha de base são considerados como referentes à amplificação da molécula alvo. A linha de base pode ser calculada automaticamente pelo programa de análise ou determinada manualmente pelo usuário
Fluorescência repórter	É aquela emitida pelo fluoróforo escolhido para detecção do aumento da quantidade de moléculas a cada ciclo
Threshold	Linha que intercepta o gráfico de amplificação acima da linha de base (ou <i>baseline</i> ), na fase exponencial da reação. Ela pode ser ajustada manualmente, mas de modo geral é calculada de forma automática pelo equipamento de qPCR, levando em consideração valores de Rn dos ciclos iniciais da reação
Ciclo de quantificação	Refere-se ao número do ciclo da qPCR no qual o sinal da fluorescência gerada pela amplificação da molécula alvo cruza a linha de <i>threshold</i> na fase de amplificação exponencial da reação. É também referido com Ct (ciclo do <i>threshold</i> )

## 2.5. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida no DNA será transformada em outro tipo de informação. Primeiramente será codificado em um RNA mensageiro (mRNA) onde o seu código será responsável pela construção de proteínas (DRLICA, 2005). A quantificação de expressão gênica através da qPCR utiliza como molde o mRNA, pois o número de cópia de um transcrito de mRNA reflete o nível de expressão de um determinado gene. Logo, para análise de expressão gênica, o RNA é convertido a DNA pela técnica de transcriptase reversa originando um cDNA (sequência de DNA complementar ao RNA) que será amplificado na etapa de qPCR e submetido ao processamento pelo software para detecção do sinal (BUSTIN, 2005).

Existem dois métodos de quantificação dos resultados de acordo com o objetivo do ensaio realizado: Quantificação Absoluta em que se determina a quantidade exata da sequência alvo em valores absolutos de número de moléculas, cópia ou concentração; e quantificação relativa em que se pretende determinar as alterações da expressão gênica de uma amostra teste comparando-a a uma amostra calibradora (MORGANTE; BLAWID, 2016).

### 2.5.1. Quantificação absoluta

O método de quantificação absoluta permite a determinar a quantidade de moléculas, cópias ou a concentração de uma determinada molécula de interesse de forma precisa. É uma quantificação que utiliza uma curva padrão constituída de uma série de diluições da concentração de uma amostra conhecida do número de cópia do alvo inicial. A eficiência da reação será calculada a partir de uma curva de regressão linear que plota a função da quantidade logarítmica do número de molécula alvo em função dos valores de Ct, assim, os números de cópia das amostras desconhecidas são calculados a partir da regressão linear dessa curva padrão (BUSTIN, 2005).

### 2.5.2. Quantificação relativa

O método de quantificação relativa é capaz de determinar as diferenças do nível de expressão gênica de um determinado alvo entre várias amostras. Os dados não são expressos em números absolutos e sim em número de vezes, a mais ou a menos, que um determinado gene é expresso em relação a um gene calibrador ou também denominado gene de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A normalização dos genes de referência é um procedimento imprescindível para o sucesso do experimento, pois é utilizado para manutenção e controle da variação que eventualmente pode ocorrer de amostra para amostra desde que não seja devido a efeito biológicos do próprio gene. Entende-se por efeitos não biológicos variações nos procedimentos da técnica de extração, na técnica de transcriptase reversa, na própria eficiência da reação, e diferenças de quantidade de cDNA entre amostras e dentre outros (HUGGETT *et al.*, 2005). Para essa regulação são utilizados genes de referência do tipo *housekeeping* que são genes de expressão constante em qualquer tipo de célula. Geralmente são utilizados genes que possuem funções primordiais para o funcionamento das células (EISENBERG; LEVANON, 2013). A quantificação relativa pode ser calculada pelo método de Ct comparativo.

#### 2.5.2.1. Método do Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

O método do Ct comparativo foi proposto por Livak e Schmittgen (2001) para calcular a expressão gênica de um determinado gene. O método assume que o gene alvo e o gene de referência, apresentam uma eficiência de amplificação de 100% durante o ensaio. Após a validação da eficiência, o cálculo pode ser realizado utilizando as seguintes etapas:

- a) Primeiramente é necessário calcular a variação dos valores de Ct ( $\Delta Ct$ ) para amostra teste e para amostra calibradora.

$$(\Delta Ct_{(Teste)}) = Ct_{(Alvo, Teste)} - Ct_{(Referência, Teste)} \quad (\Delta Ct_{(Calibrador)}) = Ct_{(Alvo, Calibrador)} - Ct_{(Referência, Calibrador)}$$

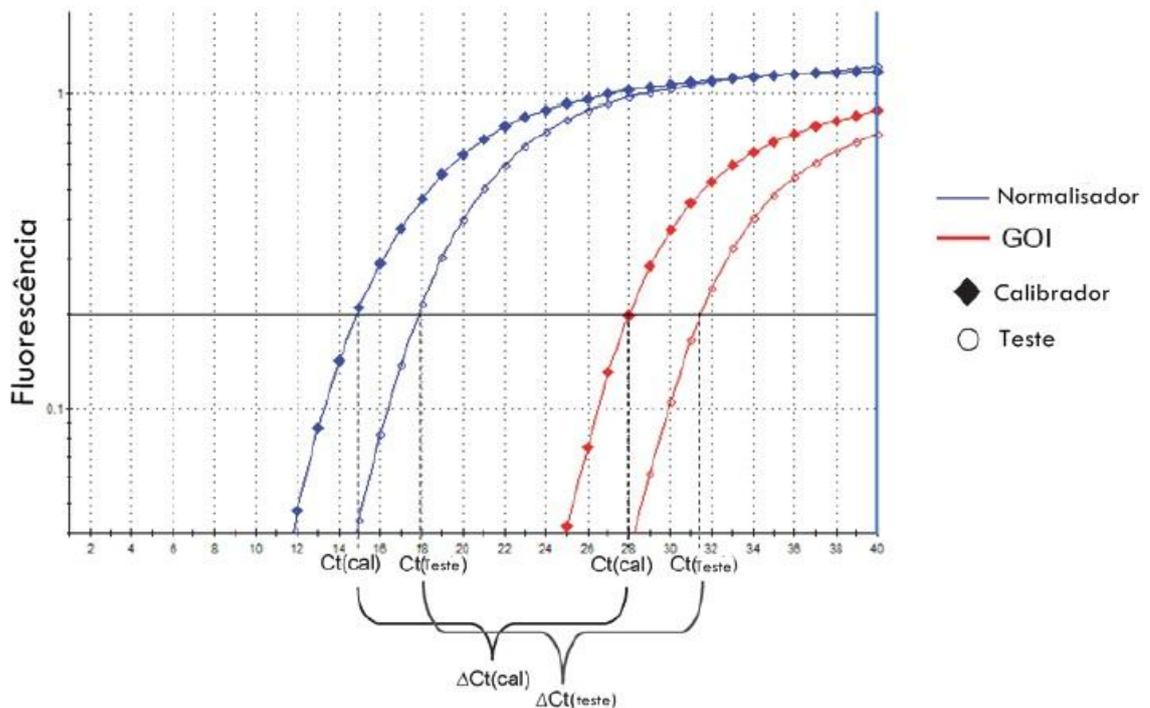
- b) Posteriormente a normalização dos valores de  $\Delta Ct$  do teste pelos valores de  $\Delta Ct$  do calibrador;

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Teste}) - \Delta Ct(\text{Calibrador})$$

c) Assim, temos;

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Razão da expressão normalizada}$$

Os valores de Ct da amostra alvo e o Ct da amostra calibradora são comparados produzindo um valor relativo e corrigido representando apenas o produto específico do mRNA alvo, e assim podendo ser comparado ao Ct de outras amostras. O resultado obtido é o aumento ou diminuição do gene alvo da amostra teste (amostra desconhecida) e amostra calibradora (amostra que possui a característica a ser analisada). Todos os pontos de Ct utilizados nas equações podem ser observados na Figura 6.



**Figura 6:** Cálculo do  $\Delta Ct$  usando o método do  $\Delta\Delta Ct$ . (GOI) Gene de interesse (Adaptado de Introduction to quantitative PCR Methods and applications Guide da *AGILIENT TECHNOLOGIES*, 2012).

### 3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Epidemiologia e Molecular (LEPiMol), na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). O presente trabalho faz parte de um projeto de pesquisa aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade do Estado do Pará (UEPA) sob o parecer de 1.127.108 (ANEXO I) e todos os participantes envolvidos no referente trabalho foram previamente esclarecidos sobre a natureza da pesquisa e foram convidados a assinar, de forma voluntária, o termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

#### 3.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas amostras de sangue periférico (5mL) e armazenados em tubos contendo 1,3mL de *RNA later* e misturado manualmente várias vezes e armazenar a -20°C até o momento da extração.

#### 3.2. EXTRAÇÃO DO RNA

##### 3.2.1. Lise das células do sangue

Extração de RNA foi realizada através do kit RiboPure™-Blood de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras armazenadas contendo o *RNA later* foi centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm e removido todo o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 800µL de *Lysis Solution* e 50µL de *Sodium Acetate Solution* e homogeneizado em vortex para lisar as células do sangue e transferido para um novo tubo.

##### 3.2.2. Extração com ácido-fenol: Clorofórmio

No tubo contendo o lisado celular foi adicionado 500µL de ácido-fenol: Clorofórmio, homogeneizado e encubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foi centrifugado a 13000rpm por 5 minutos, e a fase aquosa (que contém o RNA) foi transferido para um novo tubo e adicionado 600µL de etanol 100% seguida de homogeneização novamente. A amostra foi então filtrada em um Fliter Cartridge e adicionado

700 µL de solução de lavagem 1 ao conjunto do cartucho de filtro e centrifugado por cerca de 10 segundos e descartado o sobrenadante. O mesmo processo foi repetido para a solução de lavagem 2/3 duas vezes seguidas. Por fim, foi adicionado 50 µL de solução de eluição pré-aquecido a 75°C e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado por 30 segundos na velocidade máxima para recuperar o RNA. O mesmo processo foi realizado novamente. O RNA recuperado e armazenado a -20°C até que seja utilizado.

### 3.2.3. Tratamento com DNase I

As amostras foram tratadas com DNase I para a remoção de DNA genômico contaminante do RNA eluído. Foi adicionado 5µL de 20x DNase Buffer e 1µL DNase I e incubar 30 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado 20 µL de DNase Inactivation Reagent, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto. Esta etapa foi realizada duas vezes seguidas.

## 3.3. SÍNTESE DE CDNA E PCR QUANTITATIVA

A análise de qPCR em tempo real foi realizada usando os primers mostrados na Tabela 1. A mistura reacional da transcriptase utilizada foi um volume de 20 µL que consistiu: 2,0µL de Buffer 10x, 0,8µL de dNTP, 20µL de primers oligo dT, 1,0µL de multiscribe, 3,2µL RNase e 10 µL de amostra de RNA. Na reação de qPCR foi utilizado um volume total de 10µL de mix de reação contendo 5,0µL de *Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix* (Biotium - Uniscience), 1,0µL de primer forward (10mM), 1,0µL de primer reverse (10mM), 2,0µL de água e 1,0 µL de cDNA. A amplificação dos ciclos foi realizada nas seguintes condições: 25°C a 10 minutos, 37°C a 12° minutos 85°C a 5 minutos. O equipamento utilizado foi *RealTime PCR System* (Illumina – Uniscience). A análise dos resultados foi utilizando o *EcoStudy Software* (Illumina).

**Tabela 2:** Primers para sete genes de referência

Nome*	Foward	Reverso	Referencia
<i>TBP</i>	5'-TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA-3'	5'- TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC-3'	Maltseva <i>et al.</i> , 2013
<i>GUSB</i>	5'-CTCATTTGGAATTTTGCCGATT-3'	5'- CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTTA-3'	Maltseva <i>et al.</i> , 2013
<i>ACTB</i>	5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'	5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	Rho <i>et al.</i> , 2010
<i>GAPDH</i>	5'- TGCACCACCAACTGCTTA -3'	5'- GGATGCAGGGATGATGTTC-3'	Rho <i>et al.</i> , 2010
<i>HPRT1</i>	5'- AGACTTTGCTTTCCTTGGTCAG-3'	5'- TCAAGGGCATATCCTACAACAA-3'	Rho <i>et al.</i> , 2010
<i>B2M</i>	5'- ACTGAATTCACCCCACTGA-3'	5'- CCTCCATGATGCTGCTTACA -3'	Rho <i>et al.</i> , 2010
<i>18SrRNA</i>	5'- GTAACCCGTTGAACCCATT -3'	5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'	Rho <i>et al.</i> , 2010

\* *TBP* (proteína de ligação TATA Box). *ACTB* (Beta-Actina). *GAPDH* (Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase). *HPRT1* (Hipoxantina fosforribosil transferase 1). *B2M* (Beta-2-microglobulina). *18SrRNA* (18S ribosomal RNA).

### 3.4. CURVA PADRÃO

Para atestar a eficiência da reação de qPCR, foi realizada a diluição em série das amostras de cDNA de todos genes de normalização para a construção da curva padrão. A eficiência de amplificação de cada gene de normalização foi calculada a partir da inclinação da curva padrão de acordo com a equação de Eficiência ( $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ ) onde *slope* = O coeficiente angular da reta. A curva padrão plota o logaritmo (Log) do modelo de inicial versus número do ciclo de reação gerada pelo software. As diluições seriadas são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 3:** Diluição seriada para a curva padrão

Diluição	Tubos	cDNA
1:10	1	18,0µL H <sub>2</sub> O + 2,0µL cDNA
1:100	2	18,0µL H <sub>2</sub> O + 2,0µL cDNA (Tubo 1)
1:1000	3	18,0µL H <sub>2</sub> O + 2,0µL cDNA (Tubo 2)
1:10000	4	18,0µL H <sub>2</sub> O + 2,0µL cDNA (Tubo 3)

### 3.5. NORMALIZAÇÃO DO GENE

Para a análise da normalização dos genes de referência foi aplicado a técnica desenvolvida por Silver e colaboradores (2006) denominado “pares de genes”. A técnica trata da comparação da expressão relativa dos valores de  $\Delta C_t$  de cada gene em pares, comparando um ao outro em todas as proporções possíveis. A seleção do gene normalizador será em função do menor grau de variação do desvio padrão entre os genes significando a estabilidade dos genes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA

Primeiramente foi utilizado o gene *ACTB* para realizar um ensaio de diluição seriada e analisado em qPCR. Duas amostras (controles) foram selecionadas com base na quantidade de RNA (quantificação realizada no Fluorímetro “Quantus” da Promega). As duas amostras foram comparadas em relação ao kit de extração de RNA utilizado: amostras 3A e 9A, conservadas em RNA later e extraídas com o kit Ribopure e o amostras 3B e 9B, conservadas no tubo Tempus e extraídas com o kit Blood to Ct, para verificar se o tipo de extração interferia na eficiência da curva padrão. Os dados da eficiência foram plotados em uma curva padrão. Observou-se que a técnica de extração não influenciou na eficiência da curva padrão: ambos apresentaram eficiência acima de 0,9, sendo escolhida a amostra 9A que foi a que apresentou maior eficiência ( $R^2 = 0,997$ ).

Uma vez escolhida a amostra foi realizada uma curva padrão para o gene alvo (*GSTMI*) e para os genes de referência (*ACTB*, *GAPDH*, *18S*, *HPRT1*, *B2M*, *GUSB* e *TBP*). Os valores de  $R^2$  variaram entre alguns genes, conforme esperado. Os genes *ACTB* ( $R^2 = 0,097$ ), *GAPDH* ( $R^2 = 0,967$ ), *TBP* ( $R^2 = 0,992$ ) e *18S* ( $R^2 = 0,928$ ) apresentaram as melhores eficiências quando avaliados separadamente.

### 4.2. PADRONIZAÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

Os genes de referência precisam ser previamente padronizados para que possam ser utilizados para normalizar a quantificação relativa de genes de interesse. No presente trabalho foi utilizado o método do Delta Ct ( $\Delta Ct$ ), que compara a expressão relativa de pares de genes de uma mesma amostra. O valor de Ct significa que o sinal de intensidade de fluorescência é igual a fluorescência do limiar. Os valores de Ct correlacionam-se com a abundância de um transcrito e são convertidos para uma forma linear a fim de atestar a eficiência da reação de amplificação, e assim, estimar as alterações de expressão gênica.

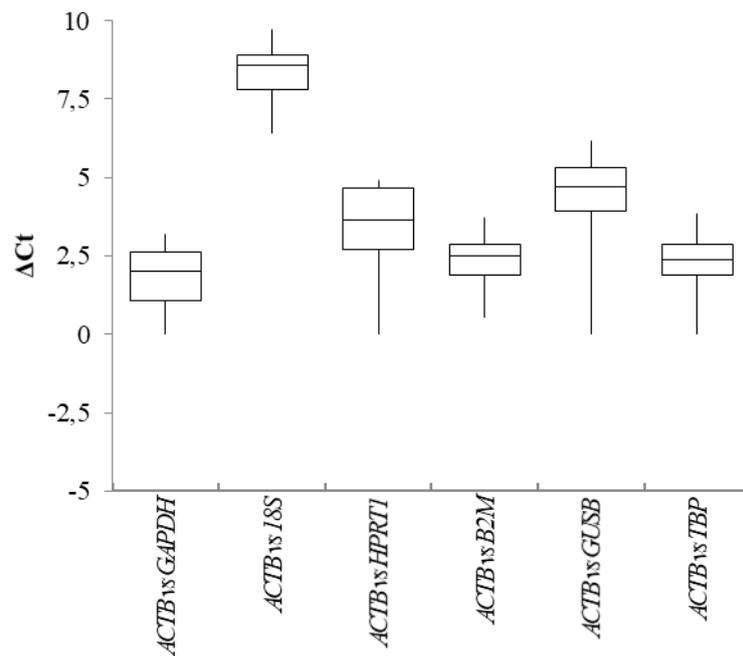
A seleção do gene de referência é baseada no valor do  $\Delta Ct$  de pares de genes, ou seja, se o valor do  $\Delta Ct$  entre dois genes permanece constante entre diferentes amostras, significa que ambos os genes estão sendo expressos de forma estável. Doutro modo, se houver diferenças nos valores de  $\Delta Ct$  entre dois genes, estes são, então, expressos de forma variada

entre as amostras. Para a seleção do gene de referência, faz-se necessário a análise com mais de um gene de comparação para fundamentar com melhor exatidão quais os genes que possuem menor variação entre as amostras: recomenda-se a padronização de 04 a 06 genes de referência, para que depois sejam escolhidos até 03 para os ensaios de qPCR com o gene alvo.

Foram realizados ensaios de qPCR para os sete genes normalizadores em duas amostras diferentes: controle vs exposta. A classificação da amostra foi realizada com base nos níveis de mercúrio (Hg), visto que a padronização dos genes de referências será utilizada para quantificar a expressão gênica do gene *GSTM1* em uma amostra já estudada anteriormente, cujos resultados mostraram uma associação entre o aumento dos níveis de Hg e a deleção do gene *GSTM1* (MENESES, 2016). A amostra normal apresentava nível de Hg abaixo de 10µg/L e a amostra exposta apresentava nível de Hg acima de 10µg/L.

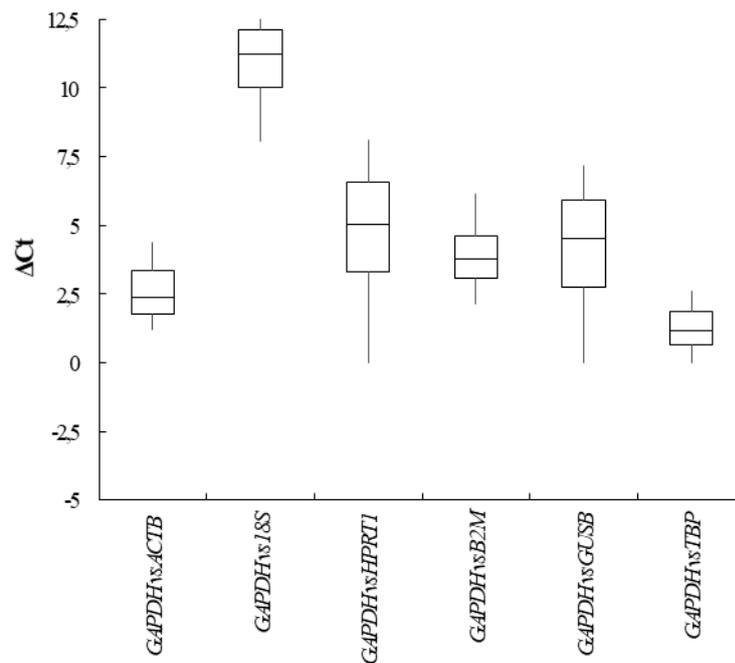
Foi calculado o  $\Delta Ct$  para cada par de genes. Cada valor da tabela corresponde a diferença entre o Ct da amostra normal para um gene de referência e o Ct da mesma amostra para outro gene de referência. O ensaio foi feito em triplicata. Também foram calculadas as médias, desvio padrão e mediana do  $\Delta Ct$  para todas as combinações de pares de gene (Anexo III).

A Figura 7 apresenta os resultados da comparação da expressão do gene *ACTB* com os demais genes. Quando comparamos *ACTB* e *GAPDH* observa-se um desvio baixo nos valores da  $\Delta Ct$ , assim como a comparação de *ACTB* à *18S* e *B2M* indicando uma expressão estável. Em contrapartida, quando é comparado *ACTB* à *HPRT1*, *GUSB* e *TBP* os valores da  $\Delta Ct$  aumentam indicando que os genes apresentam uma expressão variável.



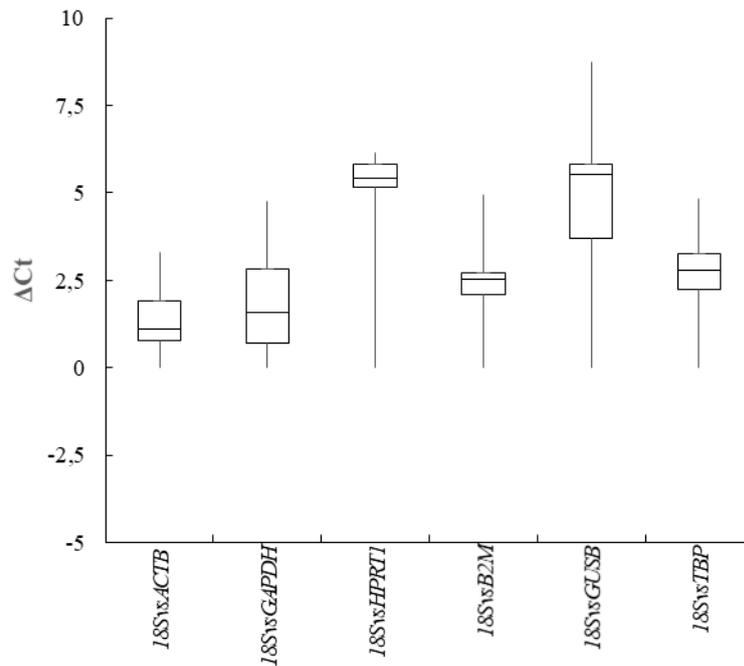
**Figura 7:** Box plot referente a variação da comparação do gene ACTB

A Figura 8 apresenta a variação da comparação da expressão do gene *GAPDH*. Como apresentado anteriormente, a comparação do gene *GAPDH* à *ACTB* apresentou expressão estável. Além deste, o *GAPDH* apresentou menor variação nos valores de  $\Delta C_t$  com os genes *TBP* e *B2M*. Os demais genes comparados apresentaram uma maior variação.



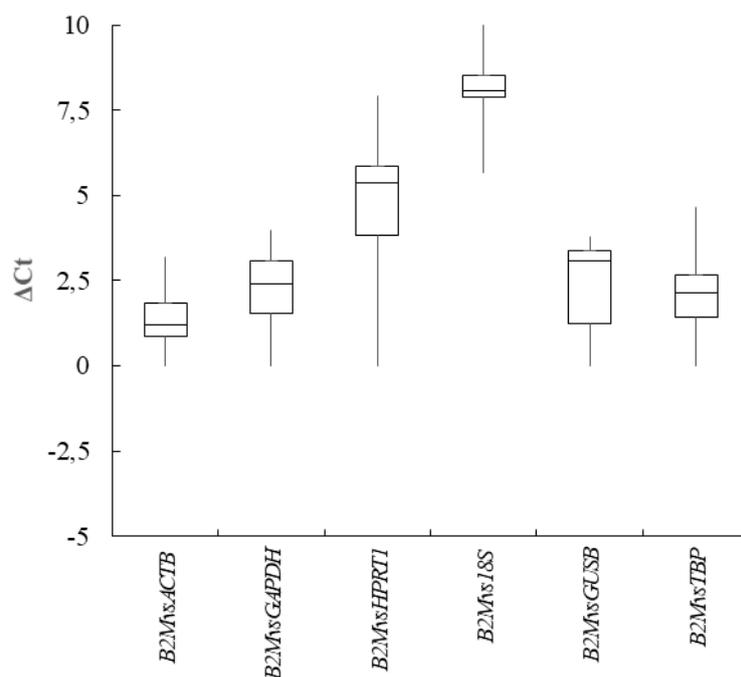
**Figura 8:** Box plot referente a variação da comparação do gene *GAPDH*

Para a análise do gene *18S* (Figura 9), este apresentou o mínimo de variação no desvio dos valores de  $\Delta Ct$  apenas para o gene *ACTB* apresentando melhor estabilidade do que com o gene *GAPDH* que é um gene utilizado em muitos trabalhos. A comparação com os demais genes apresentou uma variação discrepante nos valores de  $\Delta Ct$ .



**Figura 9:** Box plot referente a variação da comparação do gene *18S*

Quando comparado o gene *B2M*, os resultados indicam que houve menor variação dos valores de  $\Delta Ct$  apenas para os genes *ACTB* e *GAPDH*, como apresentados em comparações anteriores (Figura 10).



**Figura 10:** Box plot referente a variação da comparação do gene *B2M*

Os genes *HPRT1* e *GUSB* apresentaram um aumento nos desvios dos valores de  $\Delta C_t$  em todas as suas comparações, assim estes dois genes não apresentaram expressão estável com nenhum par de gene. A seleção do gene de referência foi realizada com base no valor da média do desvio padrão do  $\Delta C_t$ : baixo desvio padrão indica que o gene apresentou melhor estabilidade de expressão gênica (Tabela 5).

**Tabela 5:** Média do desvio padrão dos genes de referência

Média do desvio padrão	
<i>ACTB</i>	1,47
<i>GAPDH</i>	1,81
<i>18S</i>	1,90
<i>HPRT1</i>	2,63
<i>B2M</i>	1,66
<i>GUSB</i>	2,58
<i>TBP</i>	1,87

Com base na estabilidade da expressão, os resultados indicam que os genes *ACTB*, *GAPDH* e *B2M* são os genes mais adequados para o uso em ensaios de qPCR do gene *GSTM1*.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. EFICIÊNCIA DA CURVA PADRÃO

A maioria das questões científicas relacionadas com a técnica da expressão gênica pode ser respondida com precisão e reprodutibilidade medindo-se a concentração do gene de interesse que se pretende estudar em amostras desconhecidas correlacionando-a, sempre, à medição da concentração de um gene conhecido, o gene de referência ou gene normalizador. O termo *Housekeeping* vem do inglês, gene de limpeza, pois com a utilização desse gene garante uma limpeza, ou uma minimização, da variação da técnica desde que não seja devido a efeitos biológicos da própria amostra (SOUSA, 2016). Os efeitos não biológicos que podem causar um mau desempenho em um ensaio de qPCR são: (a) acondicionamento inadequado da amostra, preparação e qualidade do material selecionado. (b) Variação da técnica de Transcriptase Reversa (má seleção de iniciadores e sondas). (c) Dados inadequados e análises estatísticas, gerando resultados que podem ser altamente enganosos (BUSTIN *et al.*, 2009)

O MIQE (Informação Mínima para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real) determina que o gene de referência necessita de uma validação antes da experiência específica, para confirmar que a expressão gênica garanta relevância, precisão, interpretação correta, repetibilidade e reprodutibilidade (BUSTIN *et al.*, 2009). A integridade e concentração do RNA para garantir a precisão da seleção do gene normalizador é um dos trabalhos iniciais. Muitos trabalhos na literatura realizam a quantificação da concentração de RNA utilizando espectrofotometria ou em gel eletroforese em gel capilar. Entretanto, conforme SILVER *et al.* (2006), descreve que nem sempre é satisfatório confiar na precisão e reprodutibilidade do RNA. Uma forma de validar ainda mais os resultados é através da curva de amplificação, a eficiência da reação é um passo confiável na comparação entre amostras (PFAFF, 2004). Neste trabalho, as amostras de RNA foram selecionadas de acordo com a sua quantificação. A abundância de transcrito não variou de acordo com o método de extração utilizado e sim com a característica próprias da amostra. Para validar a amostra escolhida, a curva padrão apresentou eficiência de amplificação para alguns genes de interesse. Este resultado demonstra que as etapas iniciais como extrações, pipetagem ou concentrações de amostras não interferiram na eficiência da amplificação dos genes de referência.

Os dados da curva padrão demonstram uma ótima eficiência da reação, apenas os genes *B2M*, *GUSB* e *HPTR1* não apresentaram uma boa eficiência de amplificação. Os genes

*ACTB* ( $R^2 = 0,097$ ), *GAPDH* ( $R^2 = 0,967$ ), *TBP* ( $R^2 = 0,992$ ) e *18S* ( $R^2 = 0,928$ ) apresentaram as melhores eficiências quando avaliados separadamente. Amostras individuais podem gerar interferência na expressão gênica final da qPCR, apesar do processo de normalização, pequenas diferenças entre o alvo e a referência pode resultar em uma taxa de expressão falsa (PFAFF, 2004). Portanto, os genes normalizadores mais estáveis encontrados pelo método proposto podem ser utilizados com base nas eficiências de amplificação dos genes.

## 5.2.ESCOLHA DO GENE NORMALIZADOR

Um gene normalizador é um gene cuja sua expressão é constitucional em todas as células nucleadas, uma vez que se trata de genes necessários para a sobrevivência da própria célula. Logo, os genes de normalização tendem a serem expressos em todas as amostras do ensaio. Esta característica é o mecanismo que fornece a comparação da expressão de genes de interesse em amostras desconhecidas de forma eficiente. Em linhas gerais, se o objetivo é identificar, usando a finalidade deste trabalho, os níveis de expressão do gene *GSTM1* em um grupo de amostras desconhecidas, o resultado da expressão gênica será confiável somente com o uso do gene normalizador, pois as diferenças de expressão gênica entre genes normalizadores, tanto na amostra controle (gene conhecido) quanto na amostra de interesse, serão subtraídos (normalizados) restando apenas os resultados da diferença da expressão gênica do gene *GSTM1*. Para isso, os genes normalizadores devem apresentar variação mínima entre as amostras para garantir a precisão dos níveis de expressão do ensaio (THELLIN, 1999).

Entretanto, a seleção de genes normalizadores não é uma tarefa fácil, pois a sua expressão pode apresentar variação em decorrência da utilização do tipo de tecido e sua fase de desenvolvimento (VANDESOMPELE *et al.*, 2007). Logo, o MIQUE sugere que diferentes genes normalizadores sejam utilizados a fim de transpor prováveis limitações que um dos genes venha apresentar (BUSTIN *et al.*, 2009).

Os genes estudados no presente trabalho são: O *GAPDH*, localizado na região p13.31 do cromossomo 12. O gene é codificador da enzima gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase que catalisa diversas funções dentro da célula como catalisador a produção de energia no metabolismo de carboidratos ou a fosforilação oxidativa reversível do gliceraldeído-3-fosfato na presença de fosfato inorgânico e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). (ERCOLANI *et al.*, 1988). O *B2M* (Beta-2-microglobulina) localizado

no cromossomo 15 na região q21.1. O gene codifica uma proteína sérica e participa na associação com o complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC) (GUSSOW *et al.*, 1987). A *HPRT1* (Hipopoxantina fosforibosil transferase 1), localizado no cromossomo X na região q26.1. Este gene codifica uma enzima que possui um papel central na síntese de nucleotídeos de purinas (JOLLY *et al.*, 1983). A *ACTB* (Beta Actina) localizado no cromossomo 7 na região p22.1. Este gene codifica uma das seis proteínas diferentes de actinas que são responsáveis pela motilidade celular, estrutura, integridade e sinalização intercelular (HABETS *et al.*, 1998). *18SrRNA*, gene localizado no cromossomo 22, codificador da subunidade ribossômica. *GUSB* (Beta-D-Glucuronidase), localizado no gene 7 na região q11.21. Este gene codifica uma enzima que se encontra no lisossomo e possui a atividade de hidrolisar glicosaminoglicanos (OSHIMA *et al.*, 1987). *TBP*, é um gene que transcreve a proteína de ligação à caixa TATA. Esta proteína age como reguladora do DNA, pois se liga a uma região do DNA conhecida como caixa TATA, geralmente encontrada próxima ao início dos genes. Uma vez ligada a caixa TATA ela serve como sinalização para outras enzimas realizarem a leitura do gene (KAO *et al.*, 1990).

Os resultados demonstram que alguns genes apresentaram uma alta variação na comparação nos valores de  $\Delta C_t$  com base na média do desvio padrão, como é o caso do gene *HPRT1* e *GUSB* onde a expressão é relativamente baixa, portanto, inadequado para a utilização como um gene normalizador. Conforme VANDESOMPELE *et al.*, (2002) ao comparar a expressão de dois genes normalizadores, a seleção apropriada dos genes é quando apresentam expressão idêntica em todas as amostras, condições experimentais ou tipo de células. Variação nos níveis de expressão entre os dois genes retrata que, um ou ambos os genes não possuem expressão estável, por conseguinte, o aumento da variação dos genes *HPRT1* e *GUSB* indica que eles não são estáveis.

Os genes que apresentaram melhor estabilidade foram o *ACTB*, *GAPDH* e *B2M* apresentando mínima variação nos valores de  $\Delta C_t$ . O gene *ACTB* apresentou a melhor estabilidade na comparação com todos os genes, com exceção *HPRT1* e *GUSB*, e o *GAPDH* o segundo melhor. A seleção destes genes está em acordo com a literatura, pois estes dois genes são os mais utilizados para avaliação de genes normalizadores para os outros sistemas biológicos (ZHANG *et al.*, 2018; MENGMENG *et al.*, 2017; LÓPEZ-LANDAVERY *et al.*, 2014; SILVER *et al.*, 2006). A estabilidade do gene *GAPDH* corrobora os achados de LOPA *et al.* (2016) onde analisou a estabilidade do gene *GAPDH* em células humanas. CHEN *et al.*, (2011) utilizando o método  $\Delta C_t$  encontrou a expressão estável do gene *ACTB* e *GAPDH* em

células de cancro da mama. SILVER *et al.* (2006) avaliou a estabilidade do gene *GAPDH* e avaliou que o gene *B2M* como um gene normalizador a ser evitado em células de reticulócitos humano. Entretanto, como pode haver variação de um tipo de tecido a outro em genes normalizadores, e como nenhum trabalho envolvendo amostras expostas ao Hg para análise da expressão gênica do gene *GSTMI* foi publicado até o momento, os resultados obtidos corroboram a utilização do gene *B2M* como gene normalizador. Estudos com em outros sistemas biológicos demonstraram a estabilidade do gene *B2M* (GONG *et al.*, 2016; RHO *et al.*, 2010; MATSUZAKI *et al.*, 2015).

Este método aplicado é uma abordagem simples, fácil e sem os cálculos complexos quando comparado a outras abordagens baseada em análise por software (BestKeeper, Normfinder e Genorm), pois não necessita de análise rigorosa do RNA e calcula a eficiência da técnica através da comparação do  $\Delta Ct$  e não necessita de muitas amostras de RNA para a análise (SILVER *et al.*, 2006). Muito esforços são medidos para a seleção de genes normalizadores. O presente estudo é o primeiro a investigar a estabilidade de genes de referência para o gene *GSTMI*.

### 5.3. EIXO PROBLEMATIZADOR

#### 5.3.1. Exposição ambiental ao mercúrio

O elemento mercúrio (Hg) é um metal pesado no maior nível de toxicidade, e sua forma orgânica, o Metilmercúrio (MeHg), é considerado a espécie mais tóxica para a saúde humana, pois o principal efeito que o Hg pode causar no corpo humano, é o ataque direto ao sistema nervoso central (SNC) (LACERDA; MALM, 2008) (CLARKSON, 1997).

Na Amazônia, a demanda crescente pela mineração de ouro despejou toneladas de Hg para os estuários amazônicos tornando, assim, o Hg biodisponível a ser incorporado na biota aquática através da sua forma orgânica que e tende a acumular os níveis de Hg nas musculaturas dos peixes. O ser humano se expõe ao MeHg quando consome pescados com altos níveis de Hg nas suas musculaturas (CLARKSON, 1997).

A Organização Mundial da Saúde preconiza que níveis acima de 10 $\mu$ g/g o indivíduo é considerado ambientalmente exposto ao Hg. Na bacia do Rio Tapajós, apesar do declínio da mineração, muitos trabalhos foram realizados a fim de estimar o nível de exposição ambiental dos indivíduos residentes na região de rios Amazônicos através do nível

de Hg encontrados em peixes. CASTRO *et al.* (2016) verificaram exposição ao Hg através da alimentação de peixes contaminados com altos níveis de Hg na bacia Amazônica. Outro trabalho identificou níveis de mercúrio total (Hg-T) nos peixes que são comercializados no Mercado Ver-o-Peso em Belém, Pará e observaram uma contaminação de Hg-T próxima ao limite recomendado pela OMS (AMARO, 2014). NEVADO *et al.* (2010) demonstrou que as populações habitantes de regiões próximas a garimpos, estão sofrendo exposição crônica ao Hg com níveis de concentração de até acima (20µg/g) do estipulado pela OMS.

### 5.3.2. Mercúrio e glutathiona

Uma vez dentro do corpo humano, a bioquímica do Hg é regida pela alta afinidade com as ligações de grupamentos tióis, mais especificamente enxofre (-SH), principalmente em proteínas e moléculas de baixo peso molecular como a Glutathiona (GSH) uma das principais moléculas responsável pela dinâmica do Hg através do complexo MeHg-GSH (FARINA *et al.*, 2011).

A Glutathiona (GSH) é uma enzima que desempenha um papel primordial para o metabolismo do Hg, participando principalmente da mobilidade do MeHg no meio intracelular através do complexo MeHg-GSH. (HAYES *et al.*, 2005). Entretanto, a eficiência da mobilidade do MeHg no organismo depende intimamente de outra classe de proteínas, a Glutathiona S-Transferase (GST) cuja principal função é catalisar o ataque nucleofílico da enzima GSH a uma variedade de compostos químicos exógenos e endógenos, como o MeHg, para promover a sua eliminação. GST é altamente multigênica e polimórfica e existem três famílias principais de enzimas. Uma delas é a GST citosólica humana que apresenta dezesseis genes que estão subdivididos em oito classes separadas. Dentre essas classes encontra-se o gene Mu (PARL, 2005).

A classe Mu possui 5 genes que estão situados em um cluster de 100Kb no cromossomo 1p.13.3 que codifica GSMT1 a GSTM5. O gene *GSTM1* possui alelos distintos, são eles o *GSTM1*\*A e *GSTM1*\*B que codificam a enzima *GSTM1* funcional com atividade normal; e o alelo *GSTM1*\*0, denominado alelo nulo, onde ocorre a deleção do gene, e, portanto, a perda da função da enzima *GSTM1* (MCILWAIN *et al.*, 2006). A perda da funcionalidade da enzima reflete diretamente na eliminação do Hg, pois a enzima perde a capacidade de catalisar a conjugação do complexo MeHg-GSH (XU *et al.*, 2008).

O material biológico escolhido para a realização do trabalho foi o sangue, pois é indicativo de uma exposição recente ao Hg, que se dá principalmente através do consumo de peixe. MENESES (2016) encontrou uma associação positiva entre o aumento dos níveis de Hg e a deleção do gene *GSTM1* na população de Santarém. Portanto, o objetivo deste trabalho sucedeu-se no intuito de selecionar genes normalizadores para ensaio de qPCR para o gene *GSTM1* a fim de se verificar se a mesma associação pode ser comprovada através dos níveis de expressão gênica.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foram selecionados os genes *ACTB*, *GAPDH* e *B2M* para serem utilizados como genes de referência para estudos do gene *GSTM1*. Os genes normalizadores selecionados podem fornecer aos estudos confiabilidade nos ensaios que serão realizados posteriormente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGILENT TECHNOLOGIES **Introducion to Quantitative PCR: Methods and Application Guide**, 2012. Disponível em <[www.agilent.com/genomics](http://www.agilent.com/genomics)> acessado em Agosto de 2018.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Celula**, 5ª edição. ArtMed, 2011.
- BIO RAD LABORATORIES: **Real-Time PCR Applicatons Guide**. 2006
- Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa). **Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz**. v. 4, n. 40. Disponível em <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v4n40/v4n40a03.pdf>> acesso dia 24 de outubro de 2018.
- BUSTIN, S. A. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005.
- BUSTIN, S. A., *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CASTRO, N. S. S. *et al.* Mercury in fish and sediment of purus river, Acre state, Amazon. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 294-300, 2016.
- CHEN, I *et al.* Selection of reference genes for RT-qPCR studies in blood of beluga whales (*Delphinapterus leucas*). **Peerj**, v. 4, 2016.
- CLARKSON, T. W. The Toxicology of mercury. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, n. 4, p.369-403, jan. 1997.
- EISENBERG, E.; LEVANON, E. Y. Human housekeeping genes, revisited. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 569–574, 2013.
- ERCOLANI L, J. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. **Biol Chem**, v. 263, n. 30, p. 15335-15341, 1988.
- FARINA, M. *et al.* Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol.**; v. 256, n. 3, p. 405-17, 2011.
- GONG, H. *et al.* Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.
- GUSSOW *et al.* The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. **Journal of Immunology**, n. 139, v. 9, p. 3132-8, 1987.
- HABETS, G. G. M., *et al.* Sublocalization of an invasion-inducing locus and other genes on human chromosome 7. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 60, n 3-4, p. 200–205, 1992.

HAYES, J. D.; STRANGE, R. C. Glutathione S-Transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 154–166, 2000.

HIGUCHI, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026–1030, 1993.

HOLLAND, P. M. *et al.* Biochemistry detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -\* 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 7276-7280, 1991.

HUGGETT, J. *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–284, 2005.

JOLLY, D. J. *et al.* Isolation and characterization of a full-length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyl transferase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 80, n. 2, p. 477-481, 1983.

KAO, C. C. *et al.* Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. **Science**, v. 248, n. 4963, p. 1646–1650, 1990

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, 2001.

LOPA, S. *et al.* Stability of housekeeping genes in human intervertebral disc, endplate and articular cartilage cells in multiple conditions for reliable transcriptional analysis. **European Cells and Materials**, v. 31, p. 395-406, 2016.

López-Landavery, E. A. *et al.* Selection of reference genes as internal controls for gene expression in tissues of red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca, Vetigastropoda; Swainson, 1822). **Gene**, v. 549, n. 2, p. 258–265, 2014.

MALTSEVA, D. V. *et al.* High-throughput identification of reference genes for research and clinical RT-qPCR analysis of breast cancer samples. **Journal of Clinical Bioinformatics**, v. 3, n. 1, 2013.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e evolução**. Ribeirão Preto, Editora Holos, ed. 2. 2012.

MATSUZAKI, Y. *et al.*  $\beta$ 2-Microglobulin is an appropriate reference gene for RT-PCR-based gene expression analysis of hematopoietic stem cells. **Regenerative Therapy**, v. 1, p.91-97, 2015.

MCILWAIN, C. C. *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene**, v. 25, n. 11, 1639–1648, 2006.

MENESES, H. N. M. **EFEITO DO GENE DA FAMÍLIA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM UMA POPULAÇÃO DO BAIXO AMAZONAS AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO MERCÚRIO**. 2016. 112 F. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2016.

MENGMENG, L. *et al.* Selection of reference genes for gene expression studies in heart failure for left and right ventricles. **Gene**, v. 620, p.30-35, 2017.

MORGANTE, C. V. BLAWID, R. **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Recombinant DNA Methodology**, p. 189–204. (1987 ).

NEVADO, J. J. B. *et al.* Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International**, v. 36, n. 6, p.593-608, 2010.

OSHIMA, A. *et al.* Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human beta-glucuronidase. **Proc Natl Acad Sci EUA**, v. 84, n. 3, p. 685-689, 1987.

PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, v. 221, n. 2, p.123-129, 2005.

PASSARGE, E. **Genética; texto e atlas**. 3 ed. Porto Alegre, editora Artmed, 2011.

PFÄFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. in: LA JOLLA, **A-Z of quantitative PCR**. International University Line (IUL); CA, USA, 2004. cap. 3, p. 87-112.

RHO, H. *et al.* Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. **Bmc Cancer**, v. 10, n. 1, 2010.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p.487-491, 1988.

SILVER, N. *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **Bmc Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p.33, 2006.

SOUSA, Fabiana Cristina Belchior de. **SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDOS DE CODORNAS**. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2016.

TAN, W. *et al.* Molecular beacons. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 547–553, 2004.

THELLIN, *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 291–295, 1999.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. 2002.

XU, S. *et al.* Characterization of the human class mu glutathione-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3517–3527, 1998.

ZHANG, J. *et al.* Selection of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in yellow-feathered broilers. **Italian Journal Of Animal Science**, v. 17, n. 2, p.540-546, 2017.

## ANEXO I

CENTRO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -  
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de marcadores moleculares do estresse oxidativo para avaliar a contaminação por mercúrio na região do Baixo Amazonas

**Pesquisador:** Heloisa do Nascimento de Moura Meneses

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 38962714.0.0000.5168

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Oeste do Pará

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal do Oeste do Pará

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.127.108

**Data da Relatoria:** 01/07/2015

#### Apresentação do Projeto:

Na região amazônica muitos estudos já comprovaram a presença de mercúrio metálico e formas orgânicas deste metal no meio físico e em diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos. A biodisponibilidade do mercúrio no meio ambiente predispõe as populações humanas dessa região ao risco de contaminação. Dentre os principais mecanismos envolvidos na intoxicação causada pelo mercúrio está o estresse oxidativo e seu efeito sobre enzimas antioxidantes. Se o dano for severo demais as enzimas responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante deixarão de funcionar ou irão funcionar de forma inadequada. Diante disso, torna-se necessário um estudo sobre os efeitos deste metal, ao nível de DNA, e suas consequências para a saúde humana.

Sendo assim, este projeto tem como objetivo principal investigar os efeitos danosos de exposição ao mercúrio sob os aspectos da saúde humana buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular de populações afetadas com vistas à ações mitigatórias para a diminuição dos riscos potenciais a saúde coletiva humana. A população de estudo consiste em 100 a 200 indivíduos, residentes no município de

**Endereço:** Av. Plácido de Castro, 1399  
**Bairro:** Aparecida **CEP:** 68.040-090  
**UF:** PA **Município:** SANTAREM  
**Telefone:** (93)3512-8013 **Fax:** (91)3276-8052 **E-mail:** mgotyst@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.127.108

Santarém-Pará. Será realizada extração de DNA e RNA de todos os indivíduos (casos e controles) e em cada grupo será realizada genotipagem de SNPs (HRM) e quantificação de mRNA (RT-qPCR). Os dados de genotipagem e expressão gênica serão correlacionados, através de análise de Covariância (ANCOVA), a fim de se determinar se existe associação entre genótipo e fenótipo. Ou seja, verificar se alterações nos níveis de expressão gênica das enzimas antioxidantes (aumento ou redução dos níveis de mRNA) estão associadas a SNPs presentes nos genes que codificam estas mesmas enzimas. Será elaborado ainda um questionário a fim de se obter dados que permitam traçar um perfil sócio-econômico dos indivíduos participantes da pesquisa, além de dados referentes a sua saúde com a finalidade de traçar um perfil epidemiológico. Assim poderão ser obtidos informações e subsídios que possam promover a saúde e o bem-estar desses indivíduos. Desse modo, as informações levantadas a partir deste projeto permitirão o avanço do conhecimento sobre os mecanismos genético-moleculares envolvidos nas respostas fisiológicas de combate ao estresse oxidativo provocado pelo mercúrio.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Investigar os efeitos danosos de exposição ao mercúrio sob os aspectos da saúde humana por meio de abordagem interdisciplinar buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular de populações afetadas com vistas à proposição de estratégias para a diminuição dos riscos potenciais a saúde coletiva humana.

##### Objetivo Secundário:

- Caracterizar o perfil epidemiológico e identificar possíveis efeitos da exposição ao mercúrio em três populações da bacia do rio Tapajós;
- Verificar se existe associação entre SNPs em genes que codificam as enzimas do sistema antioxidante e a contaminação mercurial;
- Verificar se existe associação entre atividade das enzimas do sistema antioxidante (quantificação do mRNA) e contaminação mercurial;
- Verificar se existe e como se dá a correlação entre os níveis de mRNA (expressão gênica) e SNPs;
- Verificar se existe e como se dá.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: na punção venosa, há a possibilidade de dor ou edema local. Tais riscos serão minimizados pela coleta realizada por profissionais especializados. Benefícios: informar se houver alguma atividade enzimática ou expressão gênica anormal, ou nível do mercúrio fora dos padrões estipulados pela OMS, para fazer investigação médica a critério do participante.

Endereço: Av. Plácido de Castro, 1399  
Bairro: Aparecida CEP: 68.040-090  
UF: PA Município: SANTAREM  
Telefone: (93)3512-8013 Fax: (91)3276-8052 E-mail: mgotyof@gmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -  
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA



Continuação do Parecer: 1.127.108

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

pesquisa de grande relevância social e científica necessitando ainda de aprimoramento na apresentação da proposta.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram apresentados.

**Recomendações:**

Todas as pendências apontadas pelo relator foram atendidas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A pesquisadora deve anexar na Plataforma Brasil os relatórios parcial e final do projeto.

SANTAREM, 26 de Junho de 2015

---

Assinado por:  
Maria Goreth Silva Ferreira  
(Coordenador)

Endereço: Av. Plácido de Castro, 1399  
Bairro: Aparecida CEP: 68.040-090  
UF: PA Município: SANTAREM  
Telefone: (93)3512-8013 Fax: (91)3276-8052 E-mail: mgotysf@gmail.com

## ANEXO II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os critérios da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde)

Caro(a) senhor(a), você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Estudo de marcadores moleculares do estresse oxidativo para avaliar a contaminação por mercúrio na região do Baixo Amazonas.

#### **JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E PARTICIPAÇÃO DO VOLUNTÁRIO**

Na região amazônica muitos estudos já comprovaram a presença de mercúrio metálico e formas orgânicas deste metal no meio físico e em diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos. A biodisponibilidade do mercúrio no meio ambiente predispõe as populações humanas dessa região ao risco de contaminação. Dentre os principais mecanismos envolvidos na intoxicação causada pelo mercúrio está o estresse oxidativo e seu efeito sobre enzimas antioxidantes. Se o dano for severo demais as enzimas responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante deixarão de funcionar ou irão funcionar de forma inadequada. Diante disso, torna-se necessário um estudo sobre os efeitos deste metal, ao nível de DNA, e suas consequências para a saúde humana. Sendo assim, este projeto tem como objetivo principal investigar os efeitos danosos de exposição ao mercúrio sob os aspectos da saúde humana buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular de populações afetadas com vistas à ações mitigatórias para a diminuição dos riscos potenciais a saúde coletiva humana. A população de estudo consiste em até 700 indivíduos, residentes no município de Santarém-Pará. A participação do voluntário consiste em responder ao questionário e fornecer amostra de sangue para as análises de atividade enzimática, expressão gênica e quantificação de mercúrio.

#### **RISCOS E BENEFÍCIOS**

Riscos: na punção venosa, há a possibilidade de dor ou edema local. Tais riscos serão minimizados pela coleta realizada por profissionais especializados. Benefícios: informar se houver alguma atividade enzimática ou expressão gênica anormal, ou nível do mercúrio fora dos padrões estipulados pela OMS, para fazer investigação médica a critério do participante.

## **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO**

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. O TCLE será aplicado em duas vias e se tiver mais de uma página todas deverão ser rubricadas. Uma cópia deste consentimento informado será fornecida a você.

## **CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS**

A participação no estudo não acarretará custos para o(a) senhor(a). Todos os exames serão realizados pelo Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e o(a) senhor(a) poderá receber ressarcimento ou indenização, segundo as normas legais, para qualquer situação que se sinta lesado(a).

## **DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE**

Eu, \_\_\_\_\_ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sendo assim, autorizo a coleta, depósito, armazenamento e utilização do material biológico coletado que está atrelado ao projeto de pesquisa a que se refere este TCLE, segundo Resolução CNS 441/11 e Portaria MS 2.201/11. Estou ciente que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar.

Em caso de dúvidas poderei contatar a doutoranda Heloísa do Nascimento de Moura Meneses no telefone (93) 9140-9627 ou no Laboratório de Genética e Biodiversidade – UFOPA - Campus Tapajós - Av. Vera Paz, s/nº - Santarém – Pará - CEP: 68.040-060 - Fone: (93) 2101-4943 ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UEPA/STM.

Universidade do Estado do Pará - UEPA, Av. Plácido de Castro, 1399 - Bairro de Aparecida, CEP: 68040-090, fone: (93) 3512- 8000 e 3512-8013.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

---

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

---

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

### ANEXO III

Tabela com os valores de  $\Delta C_t$  para pares de genes

	<i>ACTB X GAPDH</i>	<i>ACTB X 18S</i>	<i>ACTB X HPRT1</i>	<i>ACTB X B2M</i>	<i>ACTB X GUSB</i>	<i>ACTB X TBP</i>
	-3,00	7,34	-8,27	0,93	-8,59	-11,73
	-3,81	7,06	-7,70	1,43	-8,41	-9,94
	-2,03	7,60	-7,84	-0,78	-13,78	-8,77
	-0,62	8,32	-12,60	2,40	-9,95	-7,87
	-1,57	6,19	-9,62	0,42	-9,56	-9,50
	-1,08	5,02	-9,99	1,57	-7,61	-9,23
<b>Média</b>	-2,02	6,92	-9,34	1,00	-9,65	-9,51
<b>Desvio Padrão</b>	1,20	1,16	1,85	1,10	2,19	1,30
<b>Mediana</b>	-1,80	7,20	-8,95	1,18	-9,07	-9,36

	<i>GAPDH x ACTB</i>	<i>GAPDH x 18S</i>	<i>GAPDH X HPRT1</i>	<i>GAPDH X B2M</i>	<i>GAPDH X GUSB</i>	<i>GAPDH X TBP</i>
	3,00	10,34	-5,27	3,93	-5,59	-8,73
	3,81	10,87	-3,89	5,24	-4,60	-6,13
	2,03	9,63	-5,82	1,24	-11,75	-6,74
	0,62	8,94	-11,98	3,02	-9,33	-7,25
	1,57	7,76	-8,05	1,99	-7,99	-7,93
	1,08	6,10	-8,90	2,66	-6,52	-8,14
<b>Média</b>	2,02	8,94	-7,32	3,01	-7,63	-7,49
<b>Desvio Padrão</b>	1,20	1,77	2,93	1,42	2,63	0,96
<b>Mediana</b>	1,80	9,28	-6,93	2,84	-7,25	-7,59

	<i>18S X ACTB</i>	<i>18S X GAPDH</i>	<i>18S X HPRT1</i>	<i>18S X B2M</i>	<i>18S X GUSB</i>	<i>18S X TBP</i>
	-7,34	-10,34	-15,61	-6,41	-15,93	-19,07
	-7,06	-10,87	-14,76	-5,63	-15,47	-17,00
	-7,60	-9,63	-15,44	-8,38	-21,38	-16,37
	-8,32	-8,94	-20,93	-5,92	-18,27	-16,19
	-6,19	-7,76	-15,82	-5,77	-15,75	-15,69
	-5,02	-6,10	-15,00	-3,44	-12,62	-14,24
<b>Média</b>	-6,92	-8,94	-16,26	-5,93	-16,57	-16,43
<b>Desvio Padrão</b>	1,16	1,77	2,32	1,58	2,96	1,59
<b>Mediana</b>	-7,20	-9,28	-15,53	-5,85	-15,84	-16,28

	<i>HPRT1 X ACTB</i>	<i>HPRT1 X GAPDH</i>	<i>HPRT1 X 18S</i>	<i>HPRT1 X B2M</i>	<i>HPRT1 X GUSB</i>	<i>HPRT1 X TBP</i>
	8,27	5,27	15,61	9,20	-0,32	-3,46
	7,70	3,89	14,76	9,13	-0,71	-2,24
	7,84	5,82	15,44	7,06	-5,93	-0,93
	12,60	11,98	20,93	15,00	2,65	4,73
	9,62	8,05	15,82	10,04	0,07	0,12
	9,99	8,90	15,00	11,56	2,38	0,76
<b>Média</b>	9,34	7,32	16,26	10,33	-0,31	-0,17
<b>Desvio Padrão</b>	1,85	2,93	2,32	2,71	3,10	2,85
<b>Mediana</b>	8,95	6,93	15,53	9,62	-0,13	-0,40

	<i>B2M X ACTB</i>	<i>B2M X GAPDH</i>	<i>B2M X HPRT1</i>	<i>B2M X 18S</i>	<i>B2M X GUSB</i>	<i>B2M X TBP</i>
	-0,93	-3,93	-9,20	6,41	-9,52	-12,66
	-1,43	-5,24	-9,13	5,63	-9,84	-11,37
	0,78	-1,24	-7,06	8,38	-12,99	-7,99
	-2,40	-3,02	-15,00	5,92	-12,35	-10,27
	-0,42	-1,99	-10,04	5,77	-9,98	-9,92
	-1,57	-2,66	-11,56	3,44	-9,18	-10,80
<b>Média</b>	-1,00	-3,01	-10,33	5,93	-10,64	-10,50
<b>Desvio Padrão</b>	1,10	1,42	2,71	1,58	1,61	1,56
<b>Mediana</b>	-1,18	-2,84	-9,62	5,85	-9,91	-10,54

	<i>GUSB x ACTB</i>	<i>GUSB X GAPDH</i>	<i>GUSB x 18S</i>	<i>GUSB X B2M</i>	<i>GUSB X HPRT1</i>	<i>GUSB X TBP</i>
	8,59	5,59	15,93	9,52	0,32	-3,14
	8,41	4,60	15,47	9,84	0,71	-1,53
	13,78	11,75	21,38	12,99	5,93	5,01
	9,95	9,33	18,27	12,35	-2,65	2,08
	9,56	7,99	15,75	9,98	-0,07	0,06
	7,61	6,52	12,62	9,18	-2,38	-1,62
<b>Média</b>	9,65	7,63	16,57	10,64	0,31	0,14
<b>Desvio Padrão</b>	2,19	2,63	2,96	1,61	3,10	2,97
<b>Mediana</b>	9,07	7,25	15,84	9,91	0,13	-0,74

	<i>TBP x ACTB</i>	<i>TBP X GAPDH</i>	<i>TBP x 18S</i>	<i>TBP X B2M</i>	<i>TBP X HPRT1</i>	<i>TBP X GUSB</i>
	11,73	8,73	19,07	12,66	3,46	3,14
	9,94	6,13	17,00	11,37	2,24	1,53
	8,77	6,74	16,37	7,99	0,93	-5,01
	7,87	7,25	16,19	10,27	-4,73	-2,08
	9,50	7,93	15,69	9,92	-0,12	-0,06
	9,23	8,14	14,24	10,80	-0,76	1,62
<b>Média</b>	9,51	7,49	16,43	10,50	0,17	-0,14
<b>Desvio Padrão</b>	1,30	0,96	1,59	1,56	2,85	2,97
<b>Mediana</b>	9,36	7,59	16,28	10,54	0,40	0,74