

Portfólio de Biologia Molecular

ProfA: Tainah Galdino



Alunos: Anna Leão, Isadora Dias, Karine Araújo e Lucas Goldenberg

EPSJV
3º ANO DE BIOTECNOLOGIA

Aula 1

Fundamentos em Biologia molecular

A biologia molecular é a área que estuda a estrutura e a função do material genético. Nesta aula vimos como a biologia molecular surgiu e seus conceitos básicos, como por exemplo as características e a estrutura do DNA e a tudo o que compõe o nucleotídeo. Ainda nessa aula vimos que o código genético também conhecido como degenerado é composto por tripletos de bases nitrogenadas (códon). O código genético recebe esse segundo nome porque as vezes sequências diferentes de códon geram o mesmo aminoácido.

Essa aula é de suma importância pois a partir dela entendemos toda a estrutura do DNA e esse conhecimento será importante para entendermos as técnicas futuras como replicação, transcrição e tradução.

A partir desses conhecimentos sobre o DNA pode-se desenvolver técnicas de diagnósticos mais eficazes, como por exemplo a PCR.

Aula 2

Replicação, transcrição e tradução

1. Conceito;

A replicação, transcrição e tradução são processos que podem ser caracterizados pela síntese. Sendo elas: Replicação, entendida como a síntese de uma nova fita de DNA, a partir da fita molde. Transcrição, a síntese de uma fita de RNA, a partir de uma fita molde de DNA. E a tradução, é a síntese de uma proteína a partir de uma "mensagem" transmitida por uma fita de RNA mensageiro.

2. Destaque da aula;

Este conteúdo é muito importante também por servir como base de conhecimento para outras futuras técnicas que foram trabalhadas em aulas posteriormente na disciplina, como por exemplo, a importância de se reconhecer o processo de replicação e transcrição reversa, para ter a compreensão da PCR e da RT-PCR. Sem contar que todos esses processos de replicação, transcrição e tradução falam sobre síntese. Para a replicação, temos a síntese de uma nova fita de DNA, para a transcrição, temos a síntese de uma nova fita de RNA e para a tradução temos a síntese de uma proteína.

Link do vídeo do processo de síntese proteica:

<https://www.youtube.com/watch?v=7UcgXvjXJDs>

Aula 3

Extração de ácidos nucleicos e eletroforese

- **Extração de ácidos nucleicos**

O protocolo de extração de ácidos nucleicos consiste basicamente na lise celular, desproteinização, precipitação e reidratação.

A lise celular tem como objetivo quebrar a membrana para expor o DNA e para isso ocorrer é necessário o uso de detergentes (SDS). Um ponto necessário que foi tocado durante a explicação da lise celular é que é de extrema importância trabalhar com um pH apropriado, pois caso ao contrário, pode ocorrer a degradação do material. Ao romper a membrana além do DNA ficar exposto, proteínas, lipídeos e restos celulares também ficam, e por isso é necessário a realização da purificação (além de outras etapas) para eliminar os restos indesejados e deixar apenas o material em bastante quantidade e boa qualidade.

A precipitação é uma etapa em que o material é separado do restante dos componentes celulares. Para isso, é utilizado o etanol ou o isopropanol e através da centrifugação o álcool é retirado formando um sedimento (pellet). Da parte de precipitação achamos importante ressaltar que o protocolo determina se o material deve ser precipitado na centrífuga ou na mão (verter).

A reidratação ocorre, porque durante a precipitação o material fica seco e grudado no tubo de ensaio. Para essa técnica deve ser utilizada uma água ultra pura, livre de DNase e RNase, pois caso haja um desses componentes o material será destruído.

A espectrofotometria é uma técnica feita através de um espectrofotômetro que permite a comparação da radiação absorvida quando um feixe de luz é adicionado à amostra. Quanto maior a quantidade de DNA e RNA em uma amostra, maior será a absorbância lida. Existe uma razão (260/280) que determina se o material está puro ou não. Se o resultado estiver 1,75 e 1,80 significa que a amostra está em boas condições, caso contrário é necessário a realização de um novo processo de purificação. A maior importância observada neste tópico foi que a espectrofotometria nos proporciona uma boa noção da quantidade do material em mg. Porém, a técnica não indica se a amostra contém apenas DNA ou RNA.

Sobre a escolha da metodologia achamos importante ressaltar que 'A pergunta é fundamental', pois mediante a pergunta da proposta de trabalho é que vai ser determinado o melhor kit, equipamento e ferramenta que deverá ser usado.

- **Eletrorese**

A eletroforese consiste em separar as macromoléculas através do uso de um gel junto de um campo elétrico. Essas moléculas são separadas pela sua eletronegatividade e peso molecular. Em um polo fica a carga positiva e no outro a negativa, com isso o material genético corre de um pólo para outro através de um gel que auxiliará na separação das moléculas. Os géis utilizados são os de **agarose** e **poliacrilamida**.

O **gel de agarose** é formado apenas por agarose, e dependendo da sua concentração haverá diferenças no gradiente de separação. Quanto mais concentrado o gel for menor os poros serão, resultando em uma maior retenção de moléculas.

Diferente do gel de agarose, o **gel de poliacrilamida** é formado por dois compostos: acrilamida e bisacrilamida. Dependendo da concentração ele apresentará poros maiores ou menores influenciando no resultado.

1. Aplicações:

Com essa técnica é possível a realização da análise forense, teste de paternidade. E a extração e purificação do RNA facilitam os estudos que envolvam a análise da expressão gênica e caracterização de transcritos.

Aula 4

Regulação da expressão gênica

1. Conceito:

A regulação da expressão Gênica, é um mecanismo que ocorre tanto em organismos procariotos e eucariotos, e é importantíssimo para estes, pois ela regula as expressões dos genes de acordo com o que é requerido pelas células, desta forma evitando o consumo de energia.

2. Destaques da aula:

A maior importância observada neste conteúdo foi que a regulação da expressão gênica seria uma forma de regular a expressão dos genes de acordo com a necessidade dos produtos requeridos pelas células, logo, é importante este processo para que haja menor consumo de energia por parte das células, já que com a regulação da expressão gênica não há a necessidade de se ter múltiplas expressões desnecessárias ativas.

Uma aplicação possível utilizando este conteúdo seria por meio de uma indução in vitro, fazer com que uma célula produzisse um gene de interesse para aquele que realiza uma pesquisa, por exemplo. Seja com interesses de observação da expressão gênica daquela célula ou para que ela faça a síntese de um produto de interesse para o pesquisador.

Aula 5

PCR

- **Parte I - Reação da Cadeia Polimerase**

A PCR é um método de amplificação rápida de segmentos específicos de DNA ou cDNA. Acreditamos importante destacar que essa técnica tem como objetivo fazer cópias do DNA 'in vitro', usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA (bases nitrogenadas, DNA polimerase). E possui como produto os amplicons (cópias do DNA).

A PCR depende de:

1. Iniciadores (primers) que se ligarão nas extremidades das fitas de DNA que serão amplificadas, marcando o início (Iniciador Senso -Forward- se liga na linha 3'-5') e o fim (Iniciador Antissenso -Reverse- se liga na fita 5'-3') da sequência e impedirão que as duas fitas se liguem novamente.
2. Taq* DNA Polimerase evita que a enzima sofra degradação.
Taq - nome proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* encontrada em geisers, são resistentes a altas temperaturas.

A PCR ela ocorre em um ciclo que possui 3 etapas:

1. Desnaturação, onde as fitas são separadas através do aquecimento
 2. Anelamento, ligação dos primers a regiões específicas do DNA através da formação de pontes de hidrogênio
 3. Extensão, onde a polimerase adiciona dNTP realizando a extensão da nova fita
- Entender os conceitos básicos dessa técnica é de suma importância para entender as suas aplicações dentro do laboratório e suas variações.

- **Parte II - Variações da Técnica**

A PCR possui 13 variações, porém acreditamos importante destacar 3 delas que são:

1. Nested PCR, que possui como objetivo amplificar algo bem pequeno em uma região grande. Para isso serão necessários 2 pares de primers (internos e externos), e dividir a técnica em dois blocos. No primeiro será utilizado o primer externo e no segundo primer interno com o produto anterior.

O Nested PCR é uma boa técnica pois aumenta a especificidade da amplificação do DNA.

2. RT - PCR, consiste na utilização da enzima transcriptase reversa (por isso RT) para extrair da amostra o RNA que será transformado em cDNA.
3. Real Time PCR - qPCR, permite que o cientista visualize o aumento da quantidade de DNA à medida que ele é amplificado. A real time PCR conta com um termociclador que varia a temperatura e o tempo de cada etapa para realizar a técnica. Além do resultado

em tempo real (que dispensa a eletroforese) ela também apresenta a carga viral. Devido a todos os fatores apresentados anteriormente, a qPCR está sendo bastante utilizada para a testagem do COVID.

Link: <https://coronavirus.saude.mg.gov.br/blog/70-pcr-rt-para-coronavirus>



Aula 6

Clonagem de DNA e transformação bacteriana

- **Parte I**

A clonagem molecular é o processo de construção do DNA recombinante e sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitem a seleção do gene de interesse. E para ela acontecer é necessária a presença de células competentes (células bacterianas ou de leveduras) que permitirão a entrada do DNA através de sua membrana que ao se dividir, dividirá também o material de interesse.

A clonagem possui 6 etapas que são:

1. Preparação do DNA vetor (escolha do vetor)
2. Preparação do inserto
3. Ligação
4. Transformação
5. Multiplicação das células e dos clones recombinantes
6. Seleção e identificação de clones recombinantes

Link do vídeo com as etapas do processo de clonagem:

<https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/v/dna-cloning-and-recombinant-dna>

Achamos que um dos tópicos de maior relevância citados na aula foi o de vetores de clonagem, porque ele nos mostrou a importância de saber a quantidade de DNA (pares de base) que cada um recebe para identificar durante um trabalho qual vetor deverá ser comprado.

• Parte II

Um ponto importante dessa aula é a etapa de seleção das colônias. É nesse momento que vemos se o plasmídeo está ou não com gene e para descobrir basta observar se a colônia ficou azul ou branca. Essa coloração ocorre devido a uma enzima Lac Z que codifica a enzima β -gal, esta enzima degrada a X-gal. Quando as etapas de ligação e transformação são bem-feitas e dão certo, a enzima Lac Z é inibida e as colônias ficam na coloração branca, quando essas etapas não dão certo as colônias ficam azul.

Ter esse conhecimento é importante para saber quais colônias estão com o gene a ser estudado e quais não.

Na manchete e link abaixo vemos a técnica de clonagem sendo utilizada para a obtenção de novas células-tronco, sendo uma esperança de cura de doenças degenerativas.

Link para ler a notícia:

<https://veja.abril.com.br/ciencia/pesquisadores-usam-tecnica-de-clonagem-para-criar-celulas-tronco-embrionarias-humanas/>



The screenshot shows a web browser window displaying a news article on the 'veja' website. The article title is 'Pesquisadores usam técnica de clonagem para criar células-tronco embrionárias humanas'. The sub-headline reads: 'Estudo consegue, pela primeira vez, criar células-tronco embrionárias a partir de células de um ser humano. Descoberta reacende debates éticos e traz a esperança de novos tratamentos contra uma série de doenças'. The byline is 'Por Guilherme Rosa e Mariana Janjacomo Atualizado em 6 Maio 2016, 16h20 - Publicado em 15 Maio 2013, 20h51'. Below the text is a large image showing a microscopic view of cells, with some cells highlighted in red. The browser's address bar shows the URL: 'veja.abril.com.br/ciencia/pesquisadores-usam-tecnica-de-clonagem-para-criar-celulas-tronco-embrionarias-humanas/'. The Windows taskbar at the bottom shows the date '20-11 01/04/2021'.

Aula 7

CRISPR

1. Conceito:

Antes de falarmos das inúmeras aplicações da CRISPR e de sua importância, vamos falar sobre seu funcionamento. O sistema CRISPR/ cas9 é um sistema de defesa que as células bacterianas possuem, ou seja, uma forma de sistema imunológico bacteriano onde a enzima Cas9 corta pedaços de DNA exógenos (que são obtidos quando um vírus invade a bactéria) e introduzem no locus CRISPR, uma região genômica específica da bactéria. Na próxima invasão, a enzima Cas9 já vai obter a informação necessária (RNA do vírus) para desativar o genoma do vírus quando ele invadir a bactéria, clivando o RNA viral.

2. Aplicações:

No link abaixo podemos observar 10 coisas incríveis que a CRISPR nos proporcionou. Grande destaque para o quinto tópico, onde a CRISPR consegue ser enxergada até como uma futura solução para o HIV.

1. Exemplo:

Luta contra o HIV

“Pela primeira vez, a edição de genes foi utilizada para remoção do HIV de organismos vivos. Usando a CRISPR, cientistas eliminaram o material genético do vírus tanto em infecções agudas quanto em infecções latentes em três modelos animais.”

Link: <https://profissaobiotec.com.br/10-coisas-incriveis-que-crispr-nos-proporcionou-ate-ago-2017/>

Aula 8

Sequenciamento Genético

1. Conceito;

O sequenciamento genômico, é uma técnica onde, a análise dos nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA é feita de forma precisa, já que a técnica consiste em caracterizar a sequência dos nucleotídeos a partir de métodos que caracterizam cada nucleotídeo (Adenina, Citosina, Guanina, Timina ou Uracila).

2. Destaques da aula;

Um ponto importante que foi tocado ao decorrer das aulas é como ao passar do tempo, houveram evoluções na técnica de sequenciamento, por isso nomeamos as técnicas de sequenciamento de primeira geração, que seriam as primeiras técnicas de Maxam e Gilbert, assim como o Sanger também, que se estende até a terceira e quarta geração , como o 454. É importante observar que nestas evoluções houveram a perda de algumas etapas, o que aumentou a eficiência das novas gerações de sequenciamento , possibilitando realizar sequenciamentos mais rápido ou até em locais mais variados como vamos observar no tópico de "aplicações", onde será possível realizar o sequenciamento até no espaço.

3. Aplicações;

O sequenciamento do genoma é um método que vai ter o seu destaque na obtenção de informações sobre o gene que está sendo sequenciado, já que este método é um método de análise, no geral. Sendo ele um método analítico, podemos destacar alguns exemplos destas análises na prática, e demonstrar o quão importante essas análises podem ser para a humanidade. Veja a seguir os

exemplos da utilização do sequenciamento em momentos extremamente essenciais para a humanidade:

1. Exemplo:

As brasileiras Ester Cerdeira Sabino e Jaqueline Goes de Jesus com ajuda de sua equipe conseguiram realizar o sequenciamento do vírus Covid-19 em apenas 48 horas em que foi confirmado o primeiro caso da doença no Brasil , segundo a Revista científica "Galileu". Desta forma elas sequenciaram todo o genoma do vírus e puderam identificar as características genéticas dele, o que futuramente poderia auxiliar na produção de uma vacina contra a doença.



The screenshot shows a mobile interface for the Galileu magazine. At the top, there is a black navigation bar with a hamburger menu icon on the left, the word "GALILEU" in white capital letters in the center, and a magnifying glass search icon on the right. Below the navigation bar, a blue pill-shaped button contains the word "CIÊNCIA" in white. The main headline is "As brasileiras que lideraram o sequenciamento do novo coronavírus" in bold black text. Below the headline is a short summary: "Equipe conseguiu divulgar sequência completa do genoma viral apenas 48 horas após a confirmação do primeiro caso da doença no Brasil; estudo ajudará no desenvolvimento de vacinas". Underneath the summary is a rounded rectangular button with a clock icon and the text "2 min de leitura". Below the button are four circular social media sharing icons: WhatsApp, Facebook, Twitter, and a plus sign for more options. At the bottom of the screenshot, it says "Redação Galileu" and "01 Mar 2020 - 11h10 | Atualizado em 01 Mar 2020 - 17h38".

Link: <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/noticia/2020/03/brasileiras-que-lideraram-o-sequenciamento-do-novo-coronavirus.html>

2. Exemplo:

Com o avanço das gerações de sequenciamento, já foi possível realizá-lo até no espaço , e desta forma , é possível determinar os genomas de microorganismos presentes na estação espacial a partir do sequenciamento. Logo , é possível a detecção/diagnóstico de doenças, detectar o crescimento de microorganismos no meio e até identificar novas formas de vida da própria estação espacial.

Link:<https://www.nasa.gov/image-feature/one-billion-base-pairs-sequenced-on-the-space-station>

