

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RICARDO CORDEIRO LYRA JÚNIOR

**VALIDAÇÃO DE INICIADORES E OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA ESTUDO DO
GENE IRS1 DE HUMANOS**

Manaus/AM
2017

RICARDO CORDEIRO LYRA JÚNIOR

**VALIDAÇÃO DE INICIADORES E OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA ESTUDO DO
GENE IRS1 DE HUMANOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Licenciado em Ciências Biológicas da
Universidade do Estado do Amazonas.

Orientadora: M.Sc. Lucivana Prata de Souza
Mourão

Co-orientador: Dr. Adolfo José da Mota

Manaus/AM
2017

Lyra Junior, Ricardo Cordeiro
L992v Validação de iniciadores e otimização da PCR para
estudo do gene IRS1 de humanos : / Ricardo Cordeiro
Lyra Junior. 2017
48 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: M.Sc. Lucivana Prata de Souza Mourão
Coorientador: Dr. Adolfo José da Mota
TCC de Graduação (Licenciatura em Ciências Biológicas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. gene IRS1. 2. iniciadores. 3. PCR. 4. otimização. 5.
validação. I. Mourão, M.Sc. Lucivana Prata de Souza II.
Universidade do Estado do Amazonas III. Título

RICARDO CORDEIRO LYRA JÚNIOR

**VALIDAÇÃO DE INICIADORES E OTIMIZAÇÃO DA PCR PARA ESTUDO DO
GENE IRS1 DE HUMANOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas da Universidade do
Estado do Amazonas.

Manaus, 11 de Novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. M.Sc. Lucivana Prata de Souza Mourão
Universidade do Estado do Amazonas

Profa. Dra. Ieda Hortêncio Batista
Universidade do Estado do Amazonas

M.Sc. Lincoln Rayath Lima Fernandes
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Dedico este trabalho à minha mãe, a minha avó e ao meu irmão, pela paciência, ajuda e amparo durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e perseverança para a superação das dificuldades.

À Universidade do Estado do Amazonas, a direção da Escola Normal Superior e ao corpo docente do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, em especial ao Prof. Raimundo Sousa, à Profa. Ieda Batista, à Profa. Larissa Kirsch, à Profa. Astrid Liberato e à Prof. Maria Clara Forsberg por todo o conhecimento e vivências compartilhados durante estes cinco anos.

À minha mãe e a minha avó Sandra que durante toda a minha vida sempre estiveram ao meu lado, me dando todo o apoio possível nesta trajetória, aconselhando e confortando nas horas difíceis. Ao meu irmão que posso sempre confiar e me apoiar.

Aos meus tios David e Daniel pelos ensinamentos e incentivos para correr atrás dos meus sonhos, além da paciência de sempre ajudar à minha mãe educando a mim e meu irmão.

Ao meu pai e avós paternos pelos bons momentos de carinho e suporte nos momentos decisivos.

À minha companheira Gabrielle que há mais de dois anos admiro pela dedicação, paciência e afeto, sendo essa grande pessoa que pude contar sempre durante esta caminhada, compartilhando os bons e maus momentos.

À minha orientadora e amiga, a Professora Lucivana Prata de Souza Mourão que é esta pessoa iluminada e paciente, a quem devo todo o meu respeito e carinho, pois foi a melhor mãe-científica que eu poderia ter nesta rotina quase que diária de laboratório, onde aprendi um pouco mais sobre como ser uma pessoa mais consciente e responsável, além do aprendizado sobre como é ser pesquisador e ainda por cima geneticista.

Ao meu estimado co-orientador, o Prof. Adolfo José da Mota, com quem tive a chance de conhecer e aprender sobre os mais diversos assuntos em seus questionamentos.

Às minhas colegas de laboratório, Samára, Cláudia, Sabrina, Marjory, Suelen e Alessandra, pela ajuda mais que necessária durante todo esse tempo que as conheci e pela amizade que há de ficar para sempre.

Aos meus colegas de turma, Joicyeny, Juliana, Rodrigo, Rebeca, Fábio e Stephanie, que conheci nestes cinco anos e nunca me abandonaram nos momentos

difíceis que todos enfrentamos, sempre enfrentando as dificuldades como uma oportunidade de melhorar cada vez mais.

Aos meus dois amigos de longa data, Kleison e Mari, que escutam as minhas angustias, lamentos e risadas desde 2009, com quem compartilho algumas das melhores lembranças.

A todos vocês que me acompanharam em alguma parte desta longa estrada que só está começando, me faltam palavras além das que já foram ditas, mas o sentimento de gratidão sempre será eterno!

“Eu não vivo por viver, sou uma locomotiva hereditária, transportando a evolução genética dos meus antepassados, semeando seus genes lendo e escrevendo um novo capítulo até meu desgaste e substituição”

Rogério Apice Pleno

RESUMO

A Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizada por defeitos na secreção e atividade da insulina e suas complicações que geralmente estão associadas à disfunção de diferentes órgãos como coração e rins. Dentre os tipos de DM, a tipo 2 é a mais frequente na população, tem padrão de herança poligênica onde também há a interação de fatores ambientais. Uma das causas desencadeantes da DM2 pode ser a perturbação das vias de sinalização da insulina. Estudos genéticos em diferentes populações, mostram que alterações no gene IRS1 que produz o substrato receptor de insulina 1 e cria sítios de reconhecimento de moléculas para o transporte intracelular da glicose, pode alterar essa sinalização. A PCR é uma técnica de biologia molecular que amplifica um fragmento específico de DNA e, portanto, possibilita o estudo de genes. Fatores como sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento, concentração do íon Magnésio e DNA molde interferem na eficiência da PCR. O objetivo deste trabalho foi desenhar e validar iniciadores, bem como padronizar protocolos de amplificação para o estudo do gene IRS1 em humanos. A construção dos iniciadores foi feita a partir de uma Sequência Referência para o gene em estudo disponível na plataforma *GenBank*. Foram definidos 3 novos pares de iniciadores, analisados pelos programas *PrimerQuest* e *Oligoanalyser*. Para a validação e otimização foi realizada a análise das condições ideais da PCR onde foram adaptados do protocolo inicial a Temperatura de anelamento (T_a), a enzima *Taq* DNA polimerase, a concentração de $MgSO_4$ e DNA molde. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% em conjunto com o marcador molecular *DNA Ladder* 1Kb e visualizados em fotodocumentador. Através dos resultados obtidos foi possível constatar que os pares de iniciadores F1/R1, F2/R2 e F3/R3 são adequados para o estudo do gene IRS1, assim como estabelecer protocolos de amplificação referentes à concentração dos reagentes e o termociclo para cada par de iniciadores. O presente estudo permitirá trabalhos posteriores para amplificação e/ou sequenciamento do gene IRS1 em humanos, contribuindo para melhor compreensão da genética da DM2.

Palavras-chave: gene IRS1, iniciadores, PCR, otimização, validação.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by defects in insulin secretion and activity and its complications that are usually associated with dysfunction of different organs such as heart and kidneys. Among types of DM, type 2 is the most frequent in the population, it has polygenic inheritance pattern where there is also the interaction of environmental factors. One of the triggering causes of DM2 may be the disruption of insulin signaling pathways. Genetic studies in different populations show that changes in the IRS1 gene that produces the insulin receptor substrate 1 and creates molecule recognition sites for the intracellular transport of glucose may alter this signaling. PCR is a technique of molecular biology that amplifies a specific fragment of DNA and therefore enables the study of genes. Factors such as primer sequence, annealing temperature, magnesium salt concentration and template DNA interfere with the efficiency of PCR. The objective of this work was to design and validate primers, as well as to standardize amplification protocols for the study of the IRS1 gene in humans. The construct of the primers was made from a Reference Sequence for the gene under study available on the GenBank platform. Three new pairs of primers were defined, analyzed by the PrimerQuest and Oligoanalyser programs. For the validation and optimization, the analysis of the ideal conditions of the PCR was carried out where the annealing temperature (T_a), the Taq DNA polymerase enzyme, the concentration of $MgSO_4$ and template DNA were adapted from the initial protocol. PCR products were applied on 1% agarose gel in conjunction with the molecular marker DNA Ladder 1Kb and visualized on photodocumentator. The results show that the F1/R1, F2/R2 and F3/R3 pairs of primers are suitable for the study of the IRS1 gene, as well as to establish amplification protocols for the concentration of reactants and the thermocycle for each pair of initiators. The present study will allow further work on amplification and / or sequencing of the IRS1 gene in humans, contributing to a better understanding of the genetics of DM2.

Key words: IRS1 gene, *primers*, PCR, optimization, standardization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema simplificado das etapas de sinalização intracelular desde a ligação da insulina até a ativação do transporte de glicose..... 15
- Figura 2 - Localização do gene IRS1 humano no cromossomo 2, na posição 2q36 (indicada pela seta em vermelho). 16
- Figura 3. Representação esquemática dos pares de iniciadores e respectivos tamanhos dos segmentos gerados na amplificação do éxon 1 do gene IRS1 humano.22
- Figura 4. Processo de otimização da PCR utilizado para os três iniciadores deste estudo.24
- Figura 5. Representação do marcador de massa molecular conhecida DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen) em gel de agarose 1,0%.24
- Figura 6. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados do par de iniciadores F1/R1. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = Controle Taq Pfx (1); 3 = Taq Pfx (1) 50 ng de DNA; 4 = Taq Pfx (1) 75 ng de DNA; 5 = Controle negativo Taq Pfx (2); 6 = Taq Pfx(2)) 50 ng de DNA; 7 = Taq Pfx (2) 75 ng de DNA; 8 = Controle negativo Taq High Fidelity; 9 = Taq High Fidelity 50 ng de DNA; 10 = Taq High Fidelity 75 ng de DNA.....26
- Figura 7. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados e otimizados com o par de iniciadores F1/R1. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1 Kb; 2 = Controle negativo 57°C; 3 = 57°C com 50 ng de DNA; 4 = Controle negativo 58°C; 5 = 58°C com 50 ng de DNA; 6 = Controle negativo 59°C; 7 = 59°C com 50 ng de DNA.....27
- Figura 8. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados do par de iniciadores F2/R2. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = Controle negativo; 3 = 1,0 mM de MgSO₄; 4 = Controle negativo; 5 = 1,5 mM de MgSO₄; 6 = Controle negativo; 7 = 2,0 mM de MgSO₄.....28
- Figura 9. Resultado de dos produtos amplificados e otimizados com par de iniciadores F2/R2, com a enzima HF. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 1 = amostra controle; 3 = amplificação com os primers F2/R2 59°C; 4 = amostra controle.29
- Figura 10. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% com amplificação do par de iniciadores F3/R3. 1 = marcador de massa molecular 1Kb; 2 = Controle

negativo; 3 = 1,0 mM de MgSO₄ e 50 ng de DNA; 4 = Controle negativo; 5 = 1,0 mM de MgSO₄ e 75 ng de DNA; 6 = Controle negativo; 7 = 1,0 mM de MgSO₄ e 100 ng de DNA.....31

Figura 11. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% com amplificação do par de iniciadores F3/R3. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = 1,5 mM de MgSO₄ e 54°C; 3 = Controle negativo; 4 = 1,5 mM de MgSO₄ e 55°C; 5 = 1,5 mM de MgSO₄ e 56°C; 6 = 2,0 mM de MgSO₄ e 54°C; 7 = 2,0 mM de MgSO₄ e 55°C; 8 = Controle negativo; 9 = 2,0 mM de MgSO₄ e 56°C; 10 = 1,5 mM de MgSO₄ e 54°C; 11 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 12 = 2,5 mM de MgSO₄ e 55°C; 13 = 2,5 mM de MgSO₄ e 56°C; 14 = Controle negativo.31

Figura 12. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados e otimizados com o par de iniciadores F3/R3. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = Controle negativo enzima Taq polimerase Pfx; 3 = DNA molde com enzima Taq polimerase Pfx; 4= Controle negativo enzima Taq DNA polimerase High Fidelity; 5 = DNA molde com enzima Taq DNA polimerase High Fidelity.....32

Figura 13. Resultado de eletroforese da reação de amplificação otimizada com a enzima Taq DNA polimerase High Fidelity dos 3 pares de iniciadores F1/R1, F2/R2 e F3/R3. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = iniciadores F1/R1; 3 = iniciadores F3/R3.....34

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Sequência dos iniciadores desenhados para amplificação do éxon 1 do gene IRS-1 humano e regiões internas..... | 21 |
| Tabela 2. Volume e concentração final dos reagentes utilizados na PCR inicial. | 22 |
| Tabela 3. Termociclos utilizados para as reações em cadeia da polimerase padrão para cada par de iniciadores do éxon 1 do gene IRS1. | 23 |
| Tabela 4. Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de iniciadores F1/R1. | 27 |
| Tabela 5. Termociclo utilizado para a PCR otimizada para o par de iniciadores F1/R1. | 28 |
| Tabela 6. Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de iniciadores F2/R2. | 30 |
| Tabela 7. Termociclo utilizado para a PCR otimizada para o par de iniciadores F2/R2. | 30 |
| Tabela 8. Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de iniciadores F3/R3. | 33 |
| Tabela 9. Termociclo utilizado para a PCR otimizada para o par de iniciadores F3/R3. | 33 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. Objetivo geral | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 19 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Obtenção da amostra controle | 20 |
| 3.2. Extração, quantificação e padronização da amostra | 20 |
| 3.3. Desenho dos iniciadores | 20 |
| 3.4. Validação dos iniciadores e protocolo para a reação em cadeia da polimerase (PCR) | 21 |
| 3.5. Otimização do ensaio de PCR..... | 23 |
| 3.6. Análise dos produtos de PCR..... | 24 |
| 4. RESULTADOS | 26 |
| 4.1. Otimização da PCR dos iniciadores F1/R1. | 26 |
| 4.2. Otimização da PCR dos iniciadores F2/R2. | 28 |
| 4.3. Otimização da PCR dos iniciadores F3/R3. | 30 |
| 4.4. Protocolos de PCR otimizados para o gene IRS1 humano | 33 |
| 5. DISCUSSÃO | 35 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 38 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| 8. APÊNDICES..... | 42 |
| 8.1. Apêndice A | 42 |

1. INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos cuja característica é a hiperglicemia proveniente de defeitos na secreção e/ou atividade da insulina, um hormônio anabólico responsável pela homeostase da glicose. Frequentemente, está associada com a disfunção de diferentes órgãos, especialmente coração e rins (BERNÁ et al., 2014).

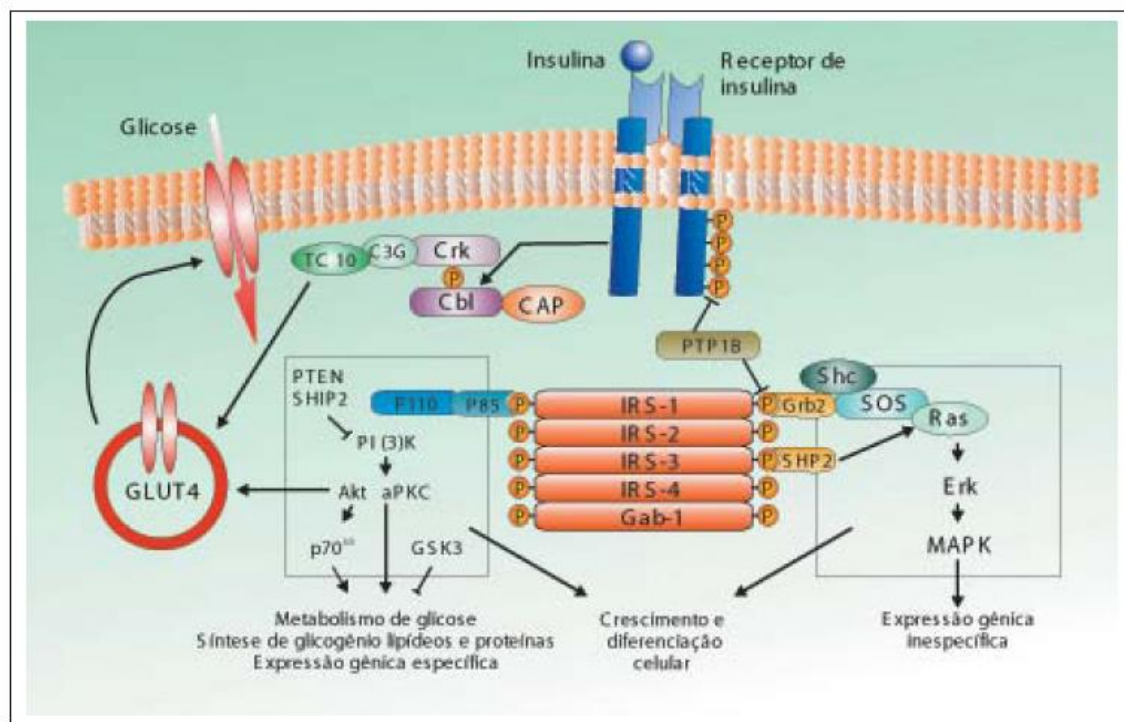
A DM pode ser classificada com base na sua etiologia. A Organização Mundial de Saúde (OMS), Associação Americana de Diabetes (ADA) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) divide a DM em quatro classes clínicas: Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), Diabetes Mellitus gestacional e outros tipos específicos de Diabetes Mellitus. A Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é o tipo clínico mais recorrente entre os casos de diabetes entre 90% a 95%. É diagnosticada em média aos 40 anos, mas não há restrição de idade. O tratamento com insulina exógena pode ser necessário para haver uma regulação do metabolismo. (SBD 2014-2015).

Conforme Maraschin et al. (2009), o desencadeamento da DM2 tem um padrão de herança poligênica, envolvendo fatores ambientais como a obesidade, o sedentarismo e a alimentação excessiva, interagindo com os fatores genéticos.

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta à ingestão da glicose por meio da indução de sua absorção e armazenando seu excedente. Além de agir na manutenção da homeostase de glicose sanguínea, esse hormônio desempenha papel fundamental tanto no metabolismo lipídico, quanto na diferenciação e crescimento celular (CARVALHEIRA, ZECCHIN & SAAD, 2002).

Na Figura 01 de Zecchin, Carvalheira & Saad (2004), observa-se as etapas, fatores e estruturas envolvidas nas vias de sinalização intracelular da insulina. Quando a insulina, secretada pelas células β -pancreáticas, chega aos tecidos periféricos, é ativado o receptor de insulina (IRS), uma proteína transmembrana importante para a entrada de glicose nas células. Na sua ativação, o seu papel é fosforilar as proteínas citoplasmáticas IRS1 e IRS2, que criam sítios de reconhecimento para moléculas citosólicas, que ativam a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), assim estimulando o aumento da fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) que resulta na translocação da proteína GLUT-4 para a membrana da célula por meio de vesículas, culminando no transporte intracelular por difusão facilitada da glicose.

Figura 1 - Esquema simplificado das etapas de sinalização intracelular desde a ligação da insulina até a ativação do transporte de glicose



Fonte: ZECCHIN, CARVALHEIRA & SAAD, 2004

De acordo com Carvalheira, Zecchin & Saad (2002), há dez substratos do receptor de insulina identificados, destes, quatro são proteínas da família dos substratos do receptor da insulina (IRS). As funções fisiológicas de receptores IRS foram elucidadas devido a modelos experimentais knockout com camundongos sem os genes que as codificam. Em camundongos sem o gene IRS1, houve a manifestação da resistência à insulina e retardo de crescimento, mas sem a hiperglicemia. Camundongos sem expressão do IRS2, há hiperglicemia acentuada, por razão das anormalidades na ação da insulina em tecidos periféricos, a redução significativa da massa e falência da atividade secretora das células B pancreáticas. No entanto, obteve-se crescimento e metabolismo de glicose quase normal nos camundongos que não expressão os genes IRS3 e IRS4.

A compreensão da sinalização metabólica da insulina é importante para o entendimento fisiopatológico da DM2, pois um de seus fatores desencadeantes é o estado metabólico de resistência à insulina.

De acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014-2015),

a resistência à insulina (RI) é uma perturbação das vias de sinalização, nas quais a insulina é a mediadora, resultando em uma resposta biológica subnormal a uma concentração normal do hormônio.

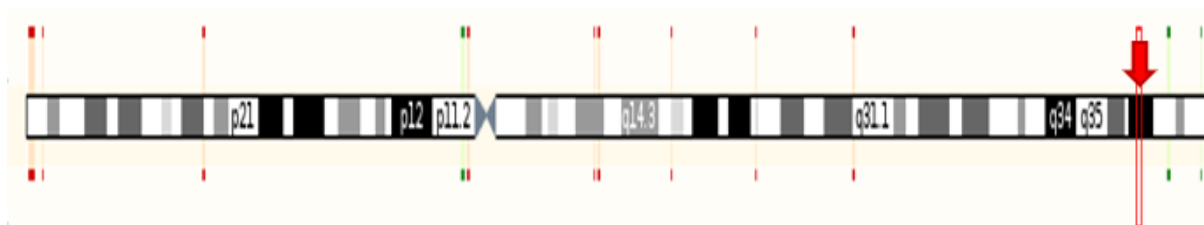
A RI é um estado patológico prevalente na população humana, e de alta relevância capaz de induzir aumento da morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2009). O desenvolvimento de resistência à insulina, na maioria das pessoas, ocorre ao longo de um período de tempo, com influência de fatores ambientais, cuja contribuição e importância ainda não foi totalmente esclarecida (SCHOFIELD & SUTHERLAND, 2012).

As falhas no sistema de sinalização da insulina podem ser melhor compreendidas a partir de estudos moleculares nos substratos envolvidos no reconhecimento e resposta a esse hormônio.

De acordo com Ali (2013), em algumas populações foram encontrados polimorfismos em genes que estão relacionados com a diminuição da sensibilidade e resistência à insulina, e o posterior desenvolvimento da Diabetes Mellitus tipo 2. Dentre estes genes está o gene IRS1, cujo produto é o substrato IRS1. Outros estudos associam variações próximas a esse gene com a resistência à insulina e a hiperinsulinemia (YOSHIUCHI, 2013; RUNG et al., 2009).

Conforme consulta nas plataformas NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e e!Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), o gene IRS1 na espécie *Homo sapiens* está localizado na posição 2q36 no cromossomo 2 (Figura 02), contendo 74.474 pares de base (pb) e possui éxons com 3.728 pb.

Figura 2 - Localização do gene IRS1 humano no cromossomo 2, na posição 2q36 (indicada pela seta em vermelho).



Fonte: plataforma e!Ensembl.

Estudos em genética humana e clínica mostram que alguns genes sofrem variações conhecidas como polimorfismo gênico. Em alguns casos estas variações podem prejudicar a expressão de um gene e assim a produção e funcionamento de

uma proteína (FONSECA, 2012; COLLINS et al., 1998).

Um dos polimorfismos mais estudados no gene IRS1 é o Polimorfismo de Base Única (SNP) que consiste na variação de uma base em um alelo. No estudo realizado por Rung et al. (2009), foi identificado, em indivíduos da população francesa, o SNP rs2943641 localizado 500.000 pb acima do gene IRS1, na posição 226801989, como um fator genético de risco para a resistência à insulina, a hiperinsulinemia e DM2. Jellema *et al.* (2003) fizeram um levantamento de 27 trabalhos onde a variante Gly972Arg (G972R) foi identificada no gene IRS1 e a partir destes dados concluiu que os portadores deste SNP tem um risco aumentado em 25% de ter DM2 em comparação com os não portadores, também foi observado que os sintomas da doença tiveram início prematuro e que não se pode esquecer da influência de outros genes sobre o fenótipo.

Para McGettrick, Feeners & Kahn (2004), que estudaram o mecanismo molecular do polimorfismo G972R a partir da clonagem desta variação em um organismo recombinante, então foi possível estabelecer que a proteína produzida por este SNP reduziu ou inibiu algumas reações culminantes da ativação da proteína IRS1, assim contribuindo para a ocorrência da resistência à insulina.

A análise de polimorfismos em genes é de grande importância para a compreensão dos fatores genéticos que contribuem para o desencadeamento de doenças em humanos. Dentro das técnicas moleculares disponíveis para este fim, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é essencial para a amplificação seletiva do gene a ser analisado.

De acordo com Haas & Torres (2016), a PCR é uma técnica de biologia molecular utilizada para amplificar um fragmento específico de DNA, ou seja, faz-se um processo de replicação de DNA "in-vitro". Os reagentes necessários para a PCR são: H₂O, DNA molde, as bases nitrogenadas dNTP (dGTP, dATP, dTTP e dCTP), iniciadores forward e reverse (oligonucleotídeos de um determinado fragmento de DNA), enzima termoestável Taq DNA polimerase, tampão de reação e composto de magnésio (cofator para enzima Taq DNA polimerase).

Para a enzima Taq DNA polimerase desencadear a reação, é preciso definir ciclos de temperatura e tempo em alguns passos básicos, sendo eles: desnaturação (rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas da molécula de DNA), anelamento (estabelecimento das pontes de hidrogênio do DNA alvo desnaturado com iniciadores) e extensão (síntese da sequência do DNA a ser

amplificada).

Segundo Brent et al. (1994), para o sucesso e eficiência da reação em cadeia da polimerase é necessário analisar alguns pontos críticos como: os iniciadores, a concentração do íon composto de magnésio e a temperatura de anelamento durante o termociclo (T_a).

Conforme Garibyan & Avashia (2013), os iniciadores ou primers são oligonucleotídeos complementares a uma sequência específica de DNA. Com a desnaturação do DNA molde, esses iniciadores localizam as suas sequências complementares servindo como ponto inicial para a extensão pela enzima Taq DNA polimerase.

Ao desenhar um iniciador é preciso considerar algumas características, como: o tamanho entre 15 a 30pb, a porcentagem de GC deve estar entre 40 e 60, testar para dímeros e hairpin, não selecionar iniciadores com grande diferença entre suas Temperaturas de anelamento. Esta temperatura é definida pelo tamanho e estrutura do iniciador, sendo a partir dela são feitos ajustes para obter uma reação otimizada (LORENZ, 2012).

A concentração de íon Mg^{2+} presente na reação é muito importante para o funcionamento correto da enzima, pois ele é um cofator da DNA polimerase. A baixa concentração de magnésio durante a reação de PCR pode afetar a intensidade do fragmento amplificado durante a visualização (SILVEIRA NETO, 2010).

As reações de PCR com melhor performance são padronizadas a partir de modificações específicas no seu protocolo que permitiram otimização do produto obtido e suas posteriores aplicações como diagnóstico por corrida em gel de agarose.

A complexidade metabólica e fisiológica da Resistência à insulina como fator predisponente para o desencadeamento da DM2 vislumbra a necessidade de estudos em genes envolvidos na sinalização da insulina e, portanto, a otimização de protocolos moleculares. Conhecimentos destes processos contribuem para melhor compreensão da fisiopatologia, aplicações na prática clínica com estudos de riscos genéticos e nas pesquisas farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Validar iniciadores e padronizar um protocolo de amplificação do gene IRS1 em humanos.

2.2. Objetivos específicos

- Desenhar iniciadores para amplificação por PCR do gene IRS1;
- Validar os iniciadores a partir da padronização da concentração ideal de reagentes como magnésio ($MgSO_4$) e DNA molde para a reação em cadeia da polimerase;
- Definir o padrão da temperatura de anelamento (T_a) para cada par de iniciadores deste estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção da amostra controle

Para a padronização das condições ótimas de amplificação do gene IRS1, foram obtidas amostras de sangue venoso de um indivíduo saudável. Este foi esclarecido sobre os objetivos a serem alcançados pelo estudo e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A presente pesquisa tem parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob o número CAAE 40094114.0.0000.5016 (Apêndice A).

Os procedimentos para coleta de amostras biológicas seguiram as recomendações e legislações vigentes, as quais asseguram a qualidade da coleta e os procedimentos de biossegurança.

Através do uso de seringa e agulha estéril, coletou-se 2 mL de sangue venoso, divididos em alíquotas em microtubos de 1,5mL, mantidas em baixa temperatura, em caixa apropriada para coleta de sangue, até o transporte e processamento no Laboratório de Diagnóstico Molecular Humano do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

3.2. Extração, quantificação e padronização da amostra

Para controle e organização, as amostras foram divididas em denominações diferentes, sendo elas: C001, C002, C003, C004, C005, C006, C007, C008, C009, C010 e C011. A extração de DNA total foi feita com os reagentes Purilink® Genomic DNA (*Invitrogen™, Thermo*) com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A amostra de DNA extraído foi visualizada com auxílio de eletroforese em gel de agarose 1% e quantificada em espectrofotômetro NanoDrop2000c (*Thermo Fischer Scientific*). Para uso da amostra na PCR, o DNA genômico extraído foi padronizado em concentração de 10 ng/μL.

3.3. Desenho dos iniciadores

A construção dos iniciadores foi feita a partir da análise de uma Sequência Referência para o gene IRS-1 humano registrada na plataforma *GenBank* (NG015830.1, 2017) utilizando a ferramenta *PrimerQuest (Integrated DNA*

Tecnologies, Inc.). Devido à extensão deste fragmento, foram definidos 3 pares de iniciadores, visando-se possibilitar o sequenciamento em estudos posteriores.

Os modelos de iniciadores foram submetidos a testes pela ferramenta *Oligoanalyser* (*Integrated DNA Technologies, Inc.*) para: self-dimer, hetero-dimer, NCBI Blast, Tm *mismatch* e *hairpin*.

Os iniciadores foram definidos como: F1, F2, F3 (*forward*) e R1, R2 e R3 (*reverse*). Na Tabela 1 podem ser observados dados como as sequências dos iniciadores e posições dos oligonucleotídeos no gene da Sequência Referência, assim como a porcentagem de GC do iniciador e a Temperatura de anelamento (Ta) sugerida pelo fabricante.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores desenhados para amplificação do éxon 1 do gene *IRS-1* humano e regiões internas

| Iniciador | Sequência do iniciador | Início | Fim | GC | Ta | -ΔG |
|-----------|----------------------------|--------|------|------|----|------|
| F1 | 5' GGTTTCTGCTGCCTCCA 3' | 4934 | 4951 | 58.8 | 60 | 3,14 |
| R1 | 5' TGAATGTAAGAGTCCCGTGT 3' | 8920 | 8939 | 45 | 60 | 6,34 |
| F2 | 5' AAGACCATCAGCTTCGTG 3' | 5620 | 5637 | 50 | 58 | 3,61 |
| R2 | 5' GAGTAGGAGTCGTCGGA 3' | 8157 | 8174 | 58.8 | 59 | 3,14 |
| F3 | 5' AGTTCCTTCCGCAGTGTCA 3' | 6370 | 6388 | 52.6 | 62 | 3,14 |
| R3 | 5' CTAAGAAGGAGAAGGTGGTC 3' | 7468 | 7488 | 50 | 58 | 1,6 |

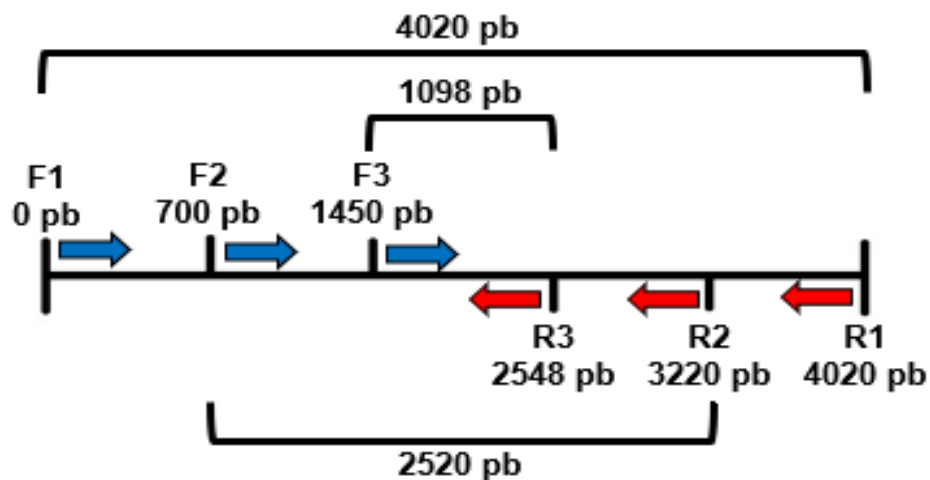
Ta = temperatura de anelamento sugerida pelo fabricante (°C), ΔG = energia livre necessária para quebrar a estrutura.

3.4. Validação dos iniciadores e protocolo para a reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após o desenho e síntese dos primers, procedeu-se a validação, procedimento que possibilita verificar a eficiência de anelamento dos iniciadores. Convencionou-se para a presente pesquisa a validação dos seguintes pares:

- F1/R1 – amplificação de um segmento de 4020 pb
- F2/R2 – amplificação de um segmento de 2520 pb
- F3/R3 – amplificação de um segmento de 1098 pb

Figura 3. Representação esquemática dos pares de iniciadores e respectivos tamanhos dos segmentos gerados na amplificação do éxon 1 do gene *IRS1* humano.



Fonte: Ricardo Lyra, 2017.

Junto a validação, foi realizada a análise das condições ideais da PCR. Para estes fins determinou-se um protocolo inicial para o estudo de otimização da PCR para os três pares de iniciadores deste estudo (Tabela 2) e a partir deste foram adaptados os seguintes fatores: a concentração de $MgSO_4$, a concentração de DNA molde, a Temperatura de anelamento (T_a) e a enzima Taq DNA polimerase.

Tabela 2. Volume e concentração final dos reagentes utilizados na PCR inicial.

| Reagente | Volume (25 μ L) | Concentração final |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------|
| H ₂ O MilliQ | 7,45 μ L | - |
| Tampão (10x) | 2,5 μ L | 1X |
| dNTP (10 mM) | 0,5 μ L | 0,2 mM de cada |
| Iniciador <i>forward</i> (10 μ M) | 0,5 μ L | 0,2 μ M |
| Iniciador <i>reverse</i> (10 μ M) | 0,5 μ L | 0,2 μ M |
| DNA polimerase <i>Pfx</i> | 0,3 μ L | 3U/reação |
| $MgSO_4$ (50mM) | 0,75 μ L | 1,5 mM |
| DNA molde (10ng/uL) | 10,0 μ L | 100 ng |
| Enhancer | 2,5 μ L | 1X |

Os perfis de termociclo que foram inicialmente utilizados para cada par de iniciadores na PCR estão dispostos na Tabela 3. O tempo de extensão foi ajustado de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, considerando que a eficiência

de extensão da enzima DNA polimerase é de 1000pb por minuto.

Tabela 3. Termociclos utilizados para as reações em cadeia da polimerase padrão para cada par de iniciadores do éxon 1 do gene IRS1.

| Ciclos | F1/R1 | | F2/R2 | | F3/R3 | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | T (°C) | Tempo | T (°C) | Tempo | T (°C) | Tempo |
| 1 | 95 | 03:00 | 95 | 03:00 | 95 | 03:00 |
| 30 | 95 | 00:30 | 95 | 00:30 | 95 | 00:30 |
| | 58 | 00:30 | 54 | 00:30 | 58 | 00:30 |
| | 68 | 04:00* | 68 | 02:30* | 68 | 01:10* |
| 1 | 68 | 10:00 | 68 | 10:00 | 68 | 10:00 |
| 1 | 4 | ∞ | 4 | ∞ | 4 | ∞ |

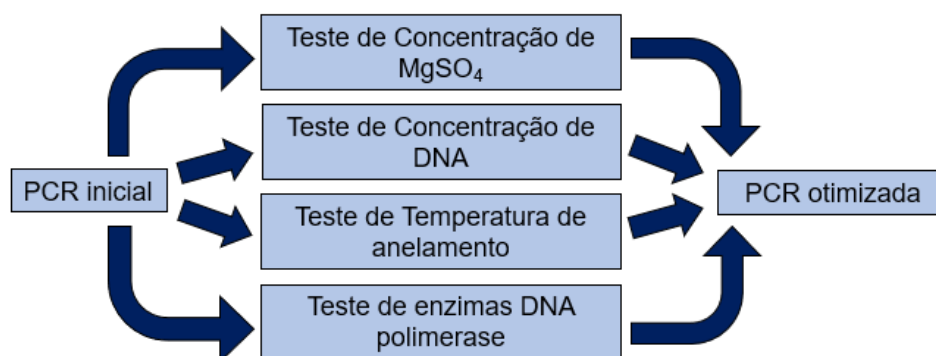
T = Temperatura; * Tempo de extensão de acordo com o tamanho do segmento a ser amplificado.

3.5. Otimização do ensaio de PCR

Visando otimizar o protocolo de amplificação foram realizados testes para MgSO₄, concentração de DNA, Temperatura de anelamento e DNA Polimerase.

As concentrações de MgSO₄ utilizadas para o processo de otimização deste protocolo variou entre 0,8mM, 1,0mM, 1,5mM, 2,0mM e 2,5mM do íon de Magnésio. As concentrações de DNA molde utilizadas para este estudo foram 50ng, 75ng e 100ng. As temperaturas de anelamento (Ta) de cada par de primers utilizadas na otimização foram calculadas a partir da Tm sugerida pelo fabricante. As duas enzimas utilizadas para otimizar a reação foram a Platinum™ Pfx DNA Polimerase e a Platinum® Taq DNA polimerase *High Fidelity* (FIGURA 4).

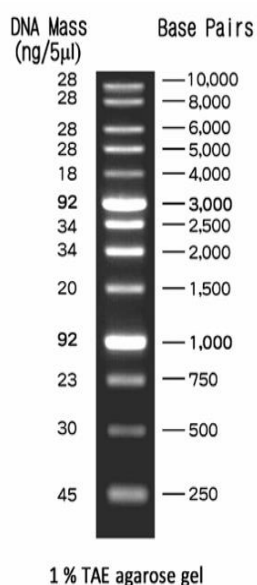
Figura 4. Processo de otimização da PCR utilizado para os três iniciadores deste estudo.



3.6. Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% (Agarose NA – *Amersham Biosciences*) em tampão TBE1X e corado utilizando brometo de etídio a 0,1 µg/mL para analisar se houve a amplificação dos fragmentos de interesse em conjunto com o marcador de massa molecular conhecida *DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen)*, que está representado na Figura 5. Foi aplicado o volume de 5 µL do produto de PCR e 2 µL de corante de corrida, homogeneizados, em cada poço do gel.

Figura 5. Representação do marcador de massa molecular conhecida *DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen)* em gel de agarose 1,0%.



A documentação dos resultados foi feita utilizando o fotodocumentador de gel

(*Vilber Lourmat*), visualizadas e armazenadas pelo *software* de processamento de imagem *PhotoCapt (Vilber Lourmat)* em arquivos do formato JPG.

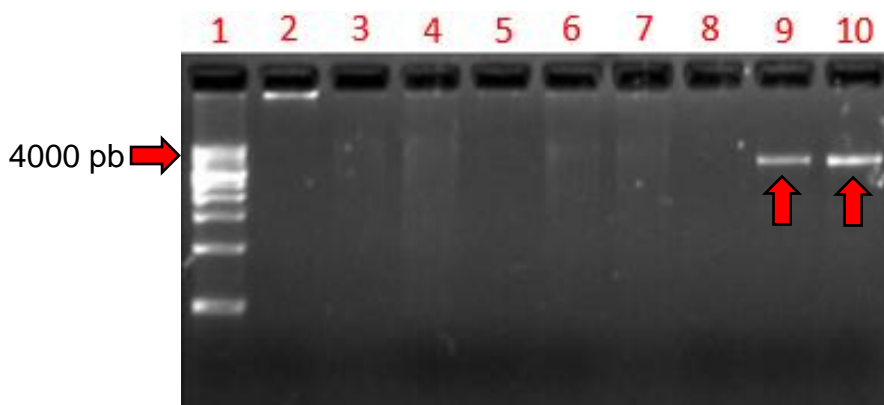
4. RESULTADOS

4.1. Otimização da PCR dos iniciadores F1/R1

Para obter-se amplificação do gene IRS1, a partir do protocolo de PCR inicial para os iniciadores F1/R1 testou-se para o DNA molde as concentrações de 50 ng e 75 ng, utilizando a concentração de MgSO₄ de 1,5 mM. Observou-se que essas concentrações foram adequadas para o estudo do gene (Figura 6).

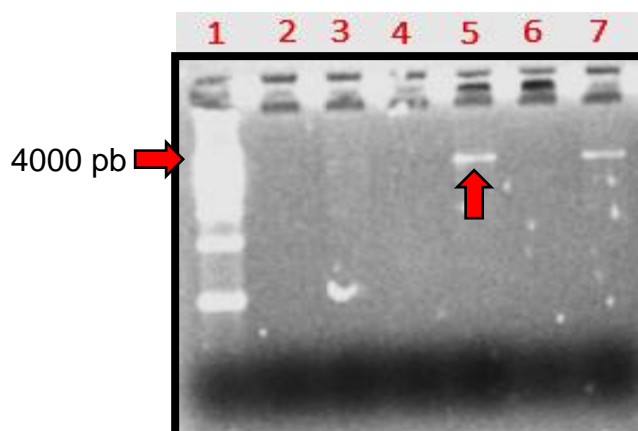
O teste para as enzimas de DNA polimerase utilizadas para otimização mostrou que a Platinum® Taq DNA polimerase *High Fidelity* teve melhor eficiência que a enzima Platinum™ Pfx DNA Polimerase, na amplificação deste fragmento (Figura 6).

Figura 6. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados do par de iniciadores F1/R1. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = Controle Taq Pfx (1); 3 = Taq Pfx (1) 50 ng de DNA; 4 = Taq Pfx (1) 75 ng de DNA; 5 = Controle negativo Taq Pfx (2); 6 = Taq Pfx(2) 50 ng de DNA; 7 = Taq Pfx (2) 75 ng de DNA; 8 = Controle negativo Taq High Fidelity; 9 = Taq High Fidelity 50 ng de DNA; 10 = Taq High Fidelity 75 ng de DNA.



Submeteu-se o par de iniciadores a testes de Temperatura de anelamento (56°C, 57°C, 58°C, 59°C e 60°C), sendo 60°C a média das Ta dos iniciadores, segundo os programas de análise de iniciadores. A reação com melhor resultado foi a de 58°C e 59 °C (FIGURA 7).

Figura 7. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados e otimizados com o par de iniciadores F1/R1. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1 Kb; 2 = Controle negativo 57°C; 3 = 57°C com 50 ng de DNA; 4 = Controle negativo 58°C; 5 = 58°C com 50 ng de DNA; 6 = Controle negativo 59°C; 7 = 59°C com 50 ng de DNA.



Nas Tabela 4 e 5 estão dispostos, respectivamente, a concentração final dos reagentes e o termociclo utilizado na PCR otimizada para os iniciadores F1/R1, onde foi amplificado um fragmento de 4020 pb referente ao éxon 1 do gene IRS1 humano.

Tabela 4. Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de iniciadores F1/R1.

| Reagente | Concentração final |
|--|--------------------|
| H ₂ O MilliQ | - |
| Tampão (10x) | 1X |
| dNTP (10mM) | 0,2 mM de cada |
| Iniciador F1 | 0,2 µM |
| Iniciador R1 | 0,2 µM |
| <i>Taq</i> polimerase <i>High Fidelity</i> | 1,5 U/reação |
| MgSO ₄ (50mM) | 1,5 mM |
| DNA molde (10ng/µL) | 50 ng |
| Enhancer | 1X |
| Volume final | 25ul |

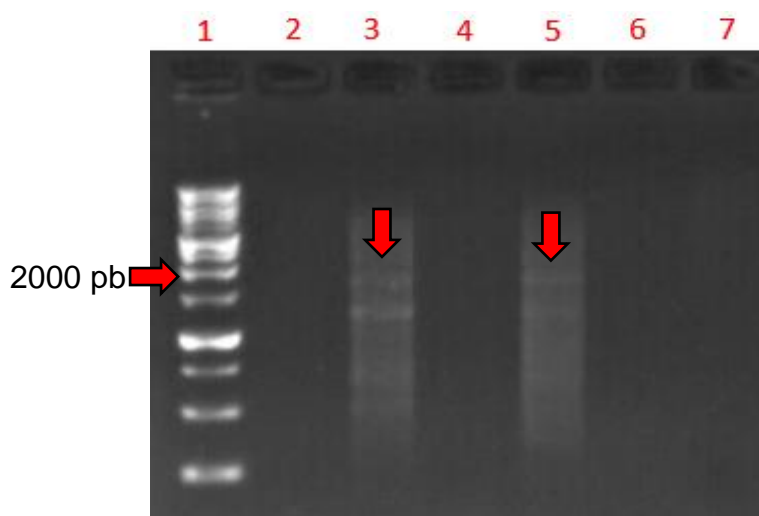
Tabela 5. Termociclo utilizado para a PCR otimizada para o par de iniciadores F1/R1.

| | F1/R1 | |
|--------|------------------|-------|
| Ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
| 1 | 95 | 03:00 |
| 30 | 95 | 00:30 |
| | 58 | 00:30 |
| | 68 | 04:00 |
| 1 | 68 | 10:00 |
| 1 | 4 | ∞ |

4.2. Otimização da PCR dos iniciadores F2/R2

Com base na amplificação dos iniciadores F2/R2, com localização interna no gene IRS1, a partir do protocolo inicial de reação, testou-se a concentração de DNA, sendo a melhor 75ng. Com esta concentração de DNA foi realizado teste para 1,0; 1,5 e 2,0mM de MgSO₄, sendo os melhores resultados para 1,0 e 1,5 mM (Figura 8), apesar de fragmentos inespecíficos terem sido amplificados, o que pode ocorrer no caso de uma baixa Ta aplicada na reação (54°C).

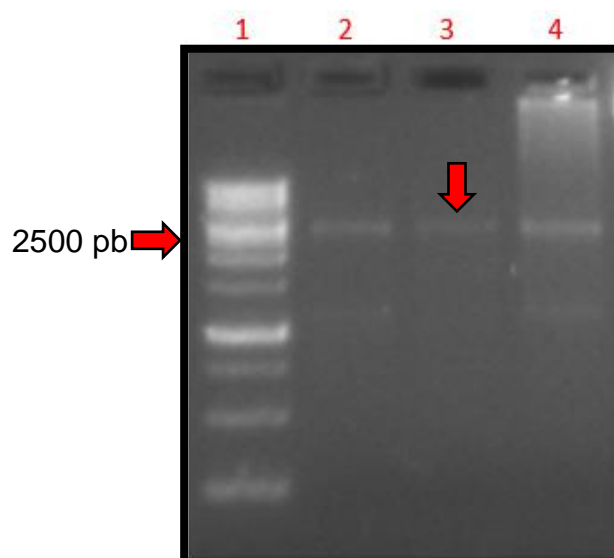
Figura 8. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados do par de iniciadores F2/R2. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = Controle negativo; 3 = 1,0 mM de MgSO₄; 4 = Controle negativo; 5 = 1,5 mM de MgSO₄; 6 = Controle negativo; 7 = 2,0 mM de MgSO₄.



No teste de Ta, as temperaturas as quais foram submetidas as reações foram as seguintes: 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 62°C,

64°C, 65°C, 66°C e 67°C, sendo que a média das T_a dos iniciadores F2/R2 é 58,5°C, mas a temperatura ideal e onde não houve amplificação inespecífica foi a 59°C. A enzima que demonstrou o melhor desempenho na reação de amplificação do fragmento de interesse destes iniciadores foi a Platinum® *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (HF) (FIGURA 9).

Figura 9. Resultado de dos produtos amplificados e otimizados com par de iniciadores F2/R2, com a enzima HF. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 1 = amostra controle; 3 = amplificação com os primers F2/R2 59°C; 4 = amostra controle.



Na Tabela 6 está organizada a concentração final dos reagentes, enquanto na Tabela 7 está o termociclo utilizados na PCR otimizada para os iniciadores F2/R2, onde foi amplificado um fragmento de 2520 pb referente a uma região interna do éxon 1 do gene IRS1 humano.

Tabela 6. Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de iniciadores F2/R2.

| Reagente | Concentração final |
|--|--------------------|
| H ₂ O MilliQ | - |
| Tampão (10x) | 1X |
| dNTP (2,5mM) | 0,2 mM de cada |
| Iniciador F2 | 0,2 µM |
| Iniciador R2 | 0,2 µM |
| <i>Taq</i> polimerase <i>High Fidelity</i> | 1,5 U/reacção |
| MgSO ₄ (50mM) | 1,5 mM |
| DNA molde (10ng/ul) | 75 ng |
| Enhancer | 1X |
| Volume final | 25ul |

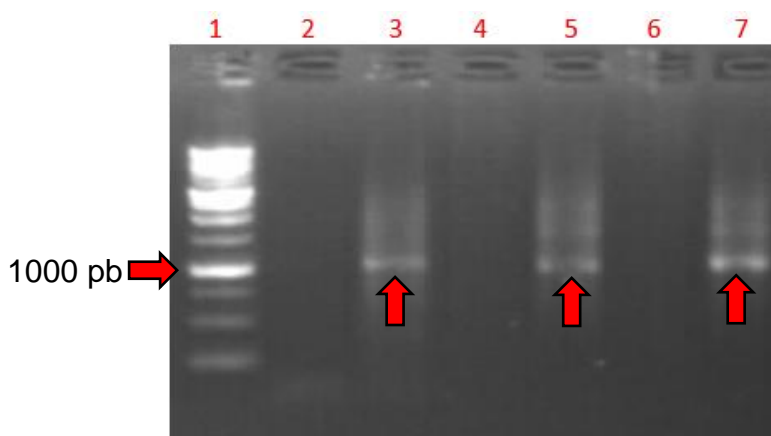
Tabela 7. Termociclo utilizado para a PCR otimizada para o par de iniciadores F2/R2.

| Ciclos | F2/R2 | |
|--------|------------------|-------|
| | Temperatura (°C) | Tempo |
| 1 | 95 | 03:00 |
| 30 | 95 | 00:30 |
| | 59 | 00:30 |
| | 68 | 02:30 |
| 1 | 68 | 10:00 |
| 1 | 4 | ∞ |

4.3. Otimização da PCR dos iniciadores F3/R3

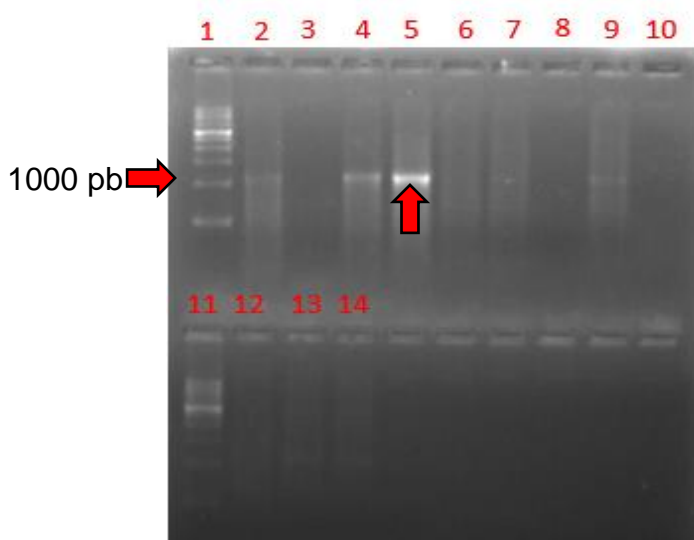
Adequou-se o protocolo inicial para otimizar a reacção utilizando os iniciadores F3/R3. Para os ensaios foram estabelecidas concentrações DNA molde para 50 ng, 75 ng e 100 ng. Dentre estes ensaios todas as concentrações de DNA testadas apresentaram eficiência de amplificação (Figura 11), apesar de ter ocorrido amplificações inespecíficas cuja presença pode ser atribuída a vários fatores como Ta e eficiência da enzima.

Figura 10. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% com amplificação do par de iniciadores F3/R3. 1 = marcador de massa molecular 1Kb; 2 = Controle negativo; 3 = 1,0 mM de $MgSO_4$ e 50 ng de DNA; 4 = Controle negativo; 5 = 1,0 mM de $MgSO_4$ e 75 ng de DNA; 6 = Controle negativo; 7 = 1,0 mM de $MgSO_4$ e 100 ng de DNA.



As Ta testadas para este par de iniciadores foram as seguintes: 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C e 62°C. A Ta média estipulada para este par foi de 60°C, mas a Ta otimizada foi de 56°C. As concentrações de $MgSO_4$ testadas foram de 1,5; 2,0 e 2,5 mM, sendo a reação com melhor resultado a de concentração 1,5 mM (Figura 12).

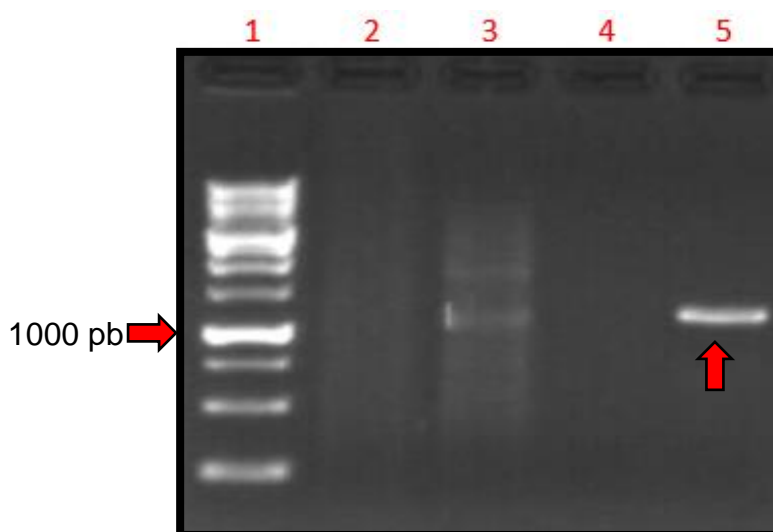
Figura 11. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% com amplificação do par de iniciadores F3/R3. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = 1,5 mM de $MgSO_4$ e 54°C; 3 = Controle negativo; 4 = 1,5 mM de $MgSO_4$ e 55°C; 5 = 1,5 mM de $MgSO_4$ e 56°C; 6 = 2,0 mM de $MgSO_4$ e 54°C; 7 = 2,0 mM de $MgSO_4$ e 55°C; 8 = Controle negativo; 9 = 2,0 mM de $MgSO_4$ e 56°C; 10 = 1,5 mM de $MgSO_4$ e 54°C; 11 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 12 = 2,5 mM de $MgSO_4$ e 55°C; 13 = 2,5 mM de $MgSO_4$ e 56°C; 14 = Controle negativo.



A enzima Platinum® Taq DNA polimerase *High Fidelity* foi a que alcançou o melhor resultado para estas condições, onde não ocorreu inibição ou amplificação

inespecífica dos fragmentos de interesse (FIGURA 12). Durante o teste com a enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* a concentração de 1,0 mM de $MgSO_4$ foi escolhida pois teve uma amplificação satisfatória em outros ensaios, o que pode ser atribuído a outros fatores que contribuem para a estrigência da PCR.

Figura 12. Resultado de eletroforese dos produtos amplificados e otimizados com o par de iniciadores F3/R3. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = Controle negativo enzima *Taq* polimerase Pfx; 3 = DNA molde com enzima *Taq* polimerase Pfx; 4= Controle negativo enzima *Taq* DNA polimerase High Fidelity; 5 = DNA molde com enzima *Taq* DNA polimerase High Fidelity.



A concentração final dos reagentes (Tabela 8) e o termociclo (Tabela 9) utilizados para a PCR otimizada com os iniciadores F3/R3 cujo fragmento de 1098 pb obtido é referente a uma região interna do éxon 1 do gene IRS1.

Tabela 8. Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de iniciadores F3/R3.

| Reagente | Concentração final |
|--|--------------------|
| H ₂ O MilliQ | - |
| Tampão (10x) | 1X |
| dNTP (10mM) | 0,2 mM de cada |
| Iniciador F3 | 0,2 µM |
| Iniciador R3 | 0,2 µM |
| <i>Taq</i> polimerase <i>High Fidelity</i> | 1,5 U/reação |
| MgSO ₄ (50mM) | 1,0 mM |
| DNA molde (10ng/ul) | 100 ng |
| Enhancer | 1X |
| Volume final | 25ul |

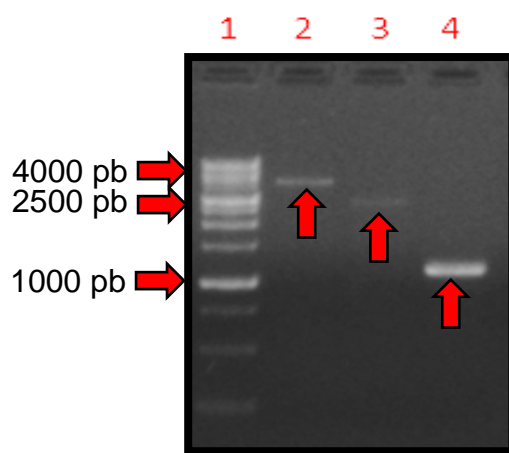
Tabela 9. Termociclo utilizado para a PCR otimizada para o par de iniciadores F3/R3.

| Ciclos | F3/R3 | |
|--------|------------------|-------|
| | Temperatura (°C) | Tempo |
| 1 | 95 | 03:00 |
| 30 | 95 | 00:30 |
| | 56 | 00:30 |
| | 68 | 01:10 |
| 1 | 68 | 10:00 |
| 1 | 4 | ∞ |

4.4. Protocolos de PCR otimizados para o gene IRS1 humano

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados na presente pesquisa, permitem validar os iniciadores desenhados e obter protocolos de amplificação adequados para o gene IRS1, bem como regiões internas deste gene (FIGURA 13).

Figura 13. Resultado de eletroforese da reação de amplificação otimizada com a enzima Taq DNA polimerase High Fidelity dos 3 pares de iniciadores F1/R1, F2/R2 e F3/R3. 1 = marcador de massa molecular conhecido 1Kb; 2 = iniciadores F1/R1; 3 = iniciadores F3/R3.



5. DISCUSSÃO

De acordo com Haas & Torres (2016) as enzimas termoestáveis DNA polimerases tem como cofator o íon de Mg^{2+} . Na presente pesquisa, foi utilizado $MgSO_4$ por ser mais efetivo em regiões ricas em GC. Segundo Persing (1993), existe um limite para a concentração deste íon na reação, visto que ele contribui para a estringência da mesma e se há menos magnésio que a reação demanda podem ocorrer bandas inespecíficas ou até mesmo a pouca ou não formação fragmentos amplificados, sendo assim a enzima não pode realizar a reação de forma significativa.

Em Fernandes (2005) foi feito um estudo de desenvolvimento e otimização de iniciadores para detecção de *Tritrichomonas foetus* e durante os testes, as concentrações de íons magnésio ($MgCl_2$) 2,0 e 3,0 mM foram as ideais para a reação otimizada, sendo que a última teve a banda mais intensa.

Na presente pesquisa a padronização das concentrações de $MgSO_4$ para os pares de iniciadores F1/R1, F2/R2 foi 1,5 mM e para F3/R3 1,0 mM. A comparação dos resultados obtidos em comparação com o da literatura mostra a necessidade de testar a melhor concentração de íons Magnésio para uma efetiva amplificação na técnica de PCR.

As temperaturas de anelamento definidas através da otimização da PCR utilizando os três pares de iniciadores deste estudo foram: 58°C (F1/R1), 59°C (F2/R2) e 56°C (F3/R3).

Tanto em Lorenz (2012) quanto em Persing (1993), os produtos com fragmentos inespecíficos amplificados ocorrem quando a estringência da PCR está baixa, causando um efeito de *ladder* na visualização de eletroforese em gel de agarose.

O aumento da T_a pode diminuir este efeito e aumentar a capacidade específica da reação de amplificação, conforme foi observado durante o processo de otimização da PCR dos iniciadores F2/R2, enquanto os outros dois pares de primers foram otimizados com T_a abaixo da T_a recomendada pelo fabricante e obtida por meio de calculadoras específicas para este fator como o OligoAnalyser. Sendo necessário considerar que a quantidade de íon magnésio, dNTP, o tamanho e complexidade da região de interesse quando for feito este cálculo e não somente a quantidade de bases A+T e C+G.

No estudo de Silveira Neto (2010), os resultados obtidos com *Leishmania*

chagasi para os pares de iniciadores LCL1/LCL3 e LCL2/LCL3 não conseguiram eliminar ampliações de fragmentos inespecíficos apesar do aumento da T_a , mas para os pares de iniciadores LCL1/LCL4 e LCS1/LCS3 foi otimizada uma reação em que não houve ampliações inespecíficas, sendo que neste último foi somente necessário o aumento em 1°C na T_a .

No trabalho desenvolvido por Fernandes (2005) com o par de iniciadores TEF/TGR, a T_a do iniciador *forward* (57°C) e T_a média entre os dois iniciadores (54°C) obtiveram resultados parecidos em relação à amplificação do fragmento de interesse e T_a do iniciador *reverse* (51°C) não foi satisfatória para obter um fragmento mais concentrado.

A concentração de DNA molde padronizada que deve ser utilizada para obter um produto de PCR otimizado com estes iniciadores são: 50 ng (F1/R1), 75 ng (F2/R2) e 100 ng (F3/R3).

Para Lorenz (2012) a qualidade de DNA molde utilizado na PCR precisa ter um alto grau de pureza nas medições, pois contaminantes que podem não ter sido removidos durante o processo de extração como RNA, proteínas e reagentes do próprio processo são inibidores comuns da reação em cadeia da polimerase. A quantidade de DNA molde é importante uma vez que é o principal componente da PCR e a partir dele são gerados os fragmentos de interesse, sendo necessária uma massa de $50\text{ ng}/\mu\text{L}$. Segundo Roux (2009), caso tenha pouco ou não tenha produto de PCR, uma das sugestões seria aumentar a quantidade de DNA e verificar se existe a presença de inibidores.

Conforme os manuais de uso, a enzima Platinum[™] Pfx DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific) possui uma performance média em PCR cujo áreas de interesse são ricas em GC, sendo este o caso das regiões de amplificação dos fragmentos dos três pares de iniciadores deste estudo. O uso de *enhancer* desta enzima é recomendado para as seguintes situações: iniciadores com alta especificidade, para altas concentrações de magnésio e altos parâmetros de T_a . Para sequências que possuem tamanhos maiores que 2.000 pb é recomendado que se aumente a temperatura de extensão para 1 min/kb e diminua a temperatura de extensão para 68°C .

Os parâmetros estabelecidos pelo fabricante da enzima recombinante Platinum® Taq DNA polimerase High Fidelity para regiões ricas em GC são: T_a entre 55 a 65°C , concentração de magnésio entre 1 e 4 mM (funcionando melhor com

MgSO₄ do que MgCl₂) ao invés de 2 mM sugerido para regiões menos problemáticas como regiões ricas em GC. Estes fatores podem esclarecer a razão de os três pares de iniciadores otimizados neste estudo terem obtido um melhor rendimento de reação ao ser utilizada esta enzima.

Conforme Lorenz (2012) explicou, a enzima apropriada pode ajudar na obtenção do produto de amplificação de interesse, neste caso a *Taq* DNA polimerase é preferível à *Pfx* DNA polimerase pois suas características foram as de melhor resultado para estes iniciadores para o éxon 1 do gene IRS1 humano.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos durante o estudo de otimização realizado e as condições em que o trabalho foi desenvolvido, conclui-se que os iniciadores desenvolvidos para este estudo, F1/R1, F2/R2 e F3/R3, são adequados para o estudo do gene IRS1, assim como os protocolos otimizados para amplificação deste gene.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALI, O. Genetics of type 2 diabetes. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 4, p. 114-123, 2013.
2. BERNÁ, G. et al. Nutrigenetics and nutrigenomics insights into diabetes etiopathogenesis. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 5338–5369, 2014.
3. BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; SEIDMAN, J. G.; STRUHL, K.; AUSUBEL, F. M.; CHANDA, V. B.; MOORE, D. D. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, 1994, 1600 p.
4. CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
5. COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.E; CHAKRAVARTI, A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. **Genome Res**, v. 8: 1229-1231, 1998.
6. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015/Sociedade Brasileira de Diabetes; (organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio). – São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.
7. FERNANDES, P. R. Construção de primers e otimização de ensaios de PCR e de *nested*-PCR para a detecção específica de *Tritrichomonas foetus*. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
8. FONSECA, A. M. D. S. (2012). Estudo de polimorfismos de base única (SNPs) no gene STK17A (Serine/threonine protein kinase 17A) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde) – Centro de Ciências Biológicas do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

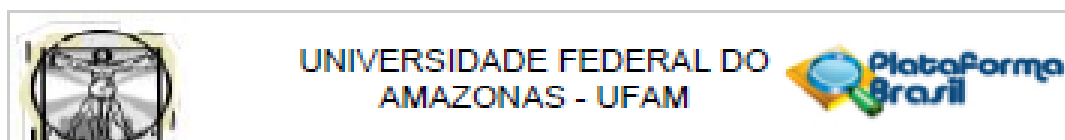
9. GARIBYAN, L.; & AVASHIA, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e. 6. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.1>, 2013
10. HAAS, J. D.; TORRES, C. D. A. Aplicações das Técnicas de PCR no Diagnóstico de Doenças Infecciosas dos Animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 26, p. 1679–7353, 2016.
11. JELLEMA, A. et al. Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: A meta-analysis of 27 studies. **Diabetologia**, v. 46, n. 7, p. 990–995, 2003.
12. LIFE TECHNOLOGIES. PureLink ® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. n. 25, p. 1–48, 2013.
13. LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 1–15, 2012.
14. MARASCHIN, J. DE F. et al. Classificação do diabete melito. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 2, p. 40–46, 2010.
15. MCGETTRICK, A. J.; FEENER, E. P.; KAHN, R. R. Human insulin receptor substrate-1 (IRS-1) polymorphism G972R causes IRS-1 to associate with the insulin receptor and inhibit receptor autophosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6441–6446, 2005.
16. PERSING, D. Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T. J. *Diagnostic molecular microbiology – principles and applications*. Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, cap.4, 1993, p.88-104.

17. ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 4, p. 1–7, 2009.
18. RUNG, J. et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1110–1115, 2009.
19. SCHOFIELD, C. J.; SUTHERLAND, C. Disordered insulin secretion in the development of insulin resistance and Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 8, p. 972–979, 2012.
20. SILVEIRA NETO, Osvaldo José da. Otimização de ensaios de PCR para a detecção específica de *Leishmania chagasi*. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
21. SHAN, Z. et al. Interactions between zinc transporter-8 gene (SLC30A8) and plasma zinc concentrations for impaired glucose regulation and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1796–1803, 2014.
22. YOSHIUCHI, I. Evidence of selection at insulin receptor substrate-1 gene loci. **Acta Diabetologica**, v. 50, n. 5, p. 775–779, 2013.
23. ZECCHIN, H.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Mecanismos Moleculares de resistência à insulina na Síndrome Metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574–589, 2004.

8. APÊNDICES

8.1. Apêndice A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL BIOQUÍMICO E ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS GENES IRS1 E IRS2 ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA À INSULINA EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 EM MANAUS.

Pesquisador: Lucivana Mourão

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 60172416.8.0000.5020

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.869.211

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta do projeto apresentado por Lucivana Mourão, doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - REDE BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas. O projeto foi classificado na Grande Área 2. Ciências Biológicas e na Área Temática Especial Genética Humana; (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Objetivo da Pesquisa:

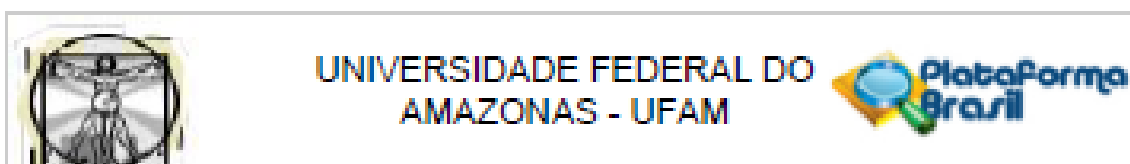
Objetivo Primário:

Detectar indivíduos que apresentem condições de risco que justificam o rastreamento do Diabetes Mellitus tipo 2, tais como hiperglicemia, dislipidemias, excesso de peso, entre outros e analisar o polimorfismo nos genes IRS1 e IRS2 envolvidos na resistência à insulina em indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2 em Manaus.

Objetivo Secundário:

Caracterizar o perfil clínico e conhecer possíveis fatores ambientais predisponentes em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2.

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adlonópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.888.311

Relacionar a existência de polimorfismos de base única ou outros tipos de mutações nos genes IRS1 e IRS2, que comprometam a expressão desses genes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nesta resposta, a pesquisadora atualizou a redação de riscos no projeto completo:

Os riscos que envolvem dor, formação hematomas, punção em local errado serão reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas. Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%. As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações que visem tranquilizar o paciente. Garantimos que todos os seus dados sempre serão mantidos em sigilo e nenhuma publicação decorrente do projeto terá sua identificação. Para garantir o sigilo, os dados obtidos por questionário, assim como este documento, serão guardados em armário com chave, com acesso exclusivo pela pesquisadora responsável pelo projeto, e as amostras biológicas identificadas por um código numérico.

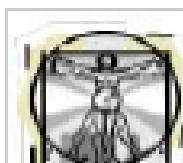
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pacientes incluídos na pesquisa serão avaliados a partir de questionários simples para anamnese e fatores predisponentes associados a DM2, tais como: IMC, patologias associadas, uso de medicamentos para controle da patologia, atividades físicas e recorrência na família. Os dados obtidos serão analisados a partir da estatística descritiva.

A amostra prevista é de 200 participantes, será composta por indivíduos previamente diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Os indivíduos serão recrutados pela médica endocrinologista KETTYUSCIA OLIVEIRA (CRM – AM 4030) que atende na POLICLÍNICA RAIMUNDO FRANCO DE SÁ, na cidade de Manaus.

A coleta de material dos indivíduos participantes e a aplicação do questionário serão realizados no próprio local da consulta, e, portanto, não haverá necessidade de deslocamento do paciente para participar da pesquisa. Os indivíduos indicados pela médica, serão convidados a participar da pesquisa, que se fará após esclarecimento e aceitação devidamente documentadas com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

| | |
|------------------------------|--|
| Endereço: Rua Teresina, 4950 | |
| Bairro: Adrianópolis | CEP: 69.057-070 |
| UF: AM | Município: MANAUS |
| Telefone: (92)3305-5130 | Fax: (92)3305-5130 E-mail: csp@ufam.edu.br |



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 1.009.211

A composição da amostra ocorrerá no período de fevereiro a dezembro de 2017 podendo este ser estendido de acordo com a necessidade. Os dados serão mantidos em sigilo e nenhuma publicação decorrente do projeto terá identificação dos participantes da pesquisa. Para garantir o sigilo, os dados obtidos por questionário serão guardados em armário com chave, com acesso exclusivo pela pesquisadora responsável pelo projeto, e as amostras biológicas coletadas serão identificadas por um código numérico.

As amostras biológicas serão obtidas de pacientes participantes e então serão processadas para realização de exames bioquímicos e estudo genético. Os procedimentos para coleta de amostras biológicas seguirão as recomendações e legislações vigentes, as quais irão assegurar a qualidade da coleta, sendo executados procedimentos de biossegurança durante todo procedimento de coleta, tais como a higienização das mãos do responsável pelas coletas, antissepsia do local de punção/coleta, uso de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual), tais como luvas, jaleco, gorro, sapatos fechados, máscara, etc. O tipo de amostra que pretende-se coletar dos pacientes

corresponde ao sangue venoso, que se fará através do uso de seringas e agulha estéril, que possibilitará obter 10ml de sangue, que serão distribuídos em tubos de coleta para obtenção de soro sanguíneo (tubos de tampa amarela ou vermelha) e sangue total (tubos de tampa roxa, contendo EDTA) destinados à análise bioquímica e microtubos para análise genética.

A análise bioquímica será realizada para triagem dos participantes, que possibilitará confirmar ou detectar alterações que indiquem fatores de risco associado à Diabetes Mellitus, tais como hiperglicemia e dislipidemias.

ANÁLISE GENÉTICA: Para a análise de polimorfismo em genes envolvidos na sinalização celular da insulina, será extraído DNA total a partir de 1mL de sangue venoso periférico coletado com sistema de seringa e agulha estéreis. Para a extração de DNA será utilizado Kit Purify® Genomic DNA (Invitrogen™, Thermo), seguindo as recomendações do fabricante. Para a análise, os éxons de cada gene serão amplificados com iniciadores estabelecidos com a ferramenta Primer3web, versão 4.00. Para a reação de amplificação será usado o conjunto de reagentes Taq DNA polimerase pfx ou sistema compatível para reduzir os erros inerentes ao processo *in vitro*. Os amplicons serão sequenciados com o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™, Thermo) e as sequências serão determinadas em um analisador genético automático ABI 3500XL (Applied Biosystems™, Thermo).

Endereço: Rua Teresina, 4050
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 1.889.211

A. Critério de Inclusão: Indivíduos previamente diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) ou aqueles que apresentarem condições de risco que justifique o rastreamento do DM2 tipo 2, maiores de 18 anos. **Critério de Exclusão:** Indivíduos previamente diagnosticado como portador de outras Diabetes Mellitus que não a DM2 ou que não apresentarem condições de risco que justifique o rastreamento do DM2 serão excluídos da composição da amostra.

A pesquisadora informou que **NÃO** haverá retenção de amostras para armazenamento em banco.

Cronograma: Adequado. A etapa de Coleta e processamento das amostras está prevista para início em 01/02/2017 a 29/12/2017.

O apoio financeiro indicado é da Universidade Federal do Amazonas. O orçamento está detalhado e no valor de R\$ 63.000,00 e foi informado que já existe equipamentos e material de consumo destinados a presente pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: ADEQUADA. *Folha_de_rosto.pdf*, 01/12/2016 16:42:18. Foi assinada pela pesquisadora responsável e pelo Coordenador Regional da REDE BIONORTE.

Termo de Anuência: ADEQUADO. Foram apresentadas as anuências da Diretora da Policlínica e da médica recrutadora (*Anuencia_Policlinica.pdf*, 01/12/2016 16:58:59); Anuência do Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM, assinado pelo Dr. Spartaco Filho (*Anuencia_Laboratorio.pdf*, 01/12/2016 16:58:28) e Anuência da SEMSA (*Anuencia_SEMSA.pdf*, 01/12/2016 16:59:2)

Instrumento de coleta de dados: ADEQUADO. O questionário foi apresentado em *Questionario.pdf*, 01/12/2016 17:07:11, nesta resposta.

TCLE – ADEQUADO. O modelo corrigido foi apresentado em *TCLE_paciente_corrigido.pdf*, 01/12/2016 16:50:38.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo atendeu as pendências apontadas no parecer anterior.

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

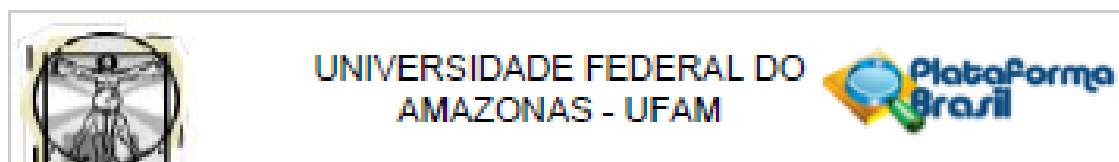
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.668.211

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|---|------------------------|-----------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | FB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_705616.pdf | 01/12/2015 17:17:29 | | Aceito |
| Outros | Questionario.pdf | 01/12/2015 17:07:11 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Corrigido_CEP.pdf | 01/12/2015 17:06:11 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Carta_esclarecimento_resposta.pdf | 01/12/2015 17:03:45 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Anuencia_SEMSA.pdf | 01/12/2015 16:59:21 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Anuencia_Foliclinica.pdf | 01/12/2015 16:58:59 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Anuencia_Laboratorio.pdf | 01/12/2015 16:58:28 | Lucivana Mourão | Aceito |
| TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCE_paciente_corrigido.pdf | 01/12/2015 16:50:39 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Curriculo_Lattes_Ricardo_Lyra.pdf | 01/12/2015 16:43:51 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto.pdf | 01/12/2015 16:42:18 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Curriculo_Lattes_Vanda_Santana_Quirroz_Dini.pdf | 25/08/2015 13:20:45 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Curriculo_Lattes_Lucivana_Mourao.pdf | 25/08/2015 13:20:08 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Curriculo_Lattes_Ana_Paula_Miranda_Bastos.pdf | 25/08/2015 13:18:40 | Lucivana Mourão | Aceito |
| Outros | Curriculo_Lattes_Adolfo_Jose_da_Mota.pdf | 25/08/2015 13:15:56 | Lucivana Mourão | Aceito |

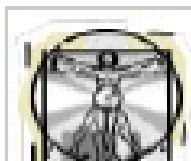
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação de Processo: 1.009.211

MANAUS, 15 de Dezembro de 2016

Assinado por:

Elilana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br