

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE DNA EM UMA POPULAÇÃO DA CIDADE SÃO PAULO E A SUA UTILIZAÇÃO COMO FERRAMENTA PARA O ENSINO DE GENÉTICA

Universidade Presbiteriana Mackenzie

Coordenadoria de Fomento à Pesquisa - Pró-reitoria de Pesquisa e
Pós-Graduação

Manuella Tonhi Bueno de Oliveira ¹
Apoio: PIVIC Mackenzie

Ana Paula Pimentel Costa ²

Graduanda curso de ciências biológicas CCBS ¹

Professor CCBS ²

<10403656@mackenzista.com.br>
<anapaula.costa@mackenzie.br>

RESUMO

Representando cerca de 10% do genoma humano, as sequências Alu são elementos transponíveis e podem gerar variabilidade genética nas populações, de forma a indicar ancestralidade. Além disso, essas sequências também podem ser usadas para exemplificação de fenômenos biológicos, uma vez que elas são hereditárias no padrão mendeliano. E devido as suas características, essas sequências tem sido utilizadas no ensino de genética e biologia molecular que, por ser considerado abstrato pelos alunos de graduação, vê-se a necessidade do desenvolvimento de ferramentas didáticas que facilitem a compreensão dessas disciplinas. Dessa maneira, no seguinte trabalho foi adaptada uma metodologia de extração de DNA para sua utilização em aulas de genética e biologia molecular. Ademais, foram realizadas amplificações por PCR da sequência APOA1 em uma população de São Paulo, de maneira a utilizá-las como exemplificação do padrão Mendeliano de herança e avaliação dessa sequência nesta população, os resultados foram observados em gel de agarose 1,5%.

Palavras-chave: Sequências Alu; APOA1; ensino de genética; extração de DNA.

ABSTRACT

Representing approximately 10% of the human genome, Alu sequences are transposable elements and can generate genetic variability in populations, indicating ancestral lineage. Furthermore, these sequences can also be used for exemplification of biological traits, as they are inherited according to the Mendelian pattern of inheritance. Due to their characteristics, these sequences have been used in teaching genetics and molecular biology, which, because they are considered abstract by undergraduate students, highlights the need for the development of teaching tools that facilitate understanding of these disciplines. Thus, in the following work, a DNA extraction methodology was adapted for use in genetics and molecular biology classes. Furthermore, PCR amplifications of the APOA1 sequence were performed in a population from São Paulo, to use them as an example of the Mendelian pattern of inheritance and to evaluate this sequence in this population. The results were plotted on a 1.5% agarose gel.

Keywords: Alu sequences; teaching genetics; DNA extraction.

1. INTRODUÇÃO

Os elementos transponíveis (TEs) são sequências móveis de DNA capazes de se mobilizarem dentro dos genomas, constituindo cerca de metade do genoma humano (Wells e Feschotte, 2020). Esta sua capacidade de mobilização pode gerar mutações e rearranjos cromossômicos, com consequências diversas, adaptativas, neutras ou deletérias. Já foram descritos diversos exemplos de elementos de transposição contribuindo para a funcionalidade dos genomas de eucariotos e procariotos (Jesus et al, 2017).

Os elementos Alu são os elementos transponíveis mais abundantes no genoma humano. Composto cerca de 10% do genoma humano, as sequências Alu são compostas por, aproximadamente, 300 pares de base (pb) (Ostertag et al, 2003). As duplicações, deleções, translocações e diferentes inserções desses elementos geram rearranjos cromossômicos e diferentes polimorfismos, contribuindo assim para a diversidade no genoma humano (Cordaux e Batzer, 2009; Elbarbary et al, 2016).

As sequências Alu tem uma distribuição frequente no genoma humano, desta maneira, podem ser utilizadas como eficazes marcadores genéticos. As inserções polimórficas das sequências Alu também são utilizadas para estudos de diferentes doenças, diversidade genética e evolução e análises forenses (Abeid et al, 2019).

Sabe-se, também, que muitos dos marcadores de loci polimórficos das inserções Alu são caracterizados como informativos de ancestralidade por apresentarem alto diferencial de frequência entre as populações (Rowold et al, 2000; Beaumont et al, 2023). Assim podem ser utilizadas em estudos sobre ancestralidade, padrões de migração, relações entre populações e genômica populacional (Rowold et al, 2000; Genetic Origins, 2019; Beaumont et al, 2023).

Vega-Requena et al (2020) realizou um estudo quantificando a miscigenação de diferentes povos (europeus, africanos e americanos nativos) presentes em uma população do Tacuarembó, uma cidade no Uruguai, utilizando sequências Alu. No Brasil, historicamente houveram muitas uniões interétnicas, o que contribuiu para a existência de grande variabilidade genética entre os indivíduos, refletindo desta maneira, na presença de diferentes polimorfismos Alu (Salzano e Sans, 2014). Com a formação de uma população miscigenada, espera-se que a frequência de qualquer locus, definidos como marcadores que apresentam frequências extremas e distintivas entre populações diferenciadas, por fatores étnicos ou geográficos, atinja valores diferentes ao encontrado nas populações parentais (Vega-Requena et al, 2020).

Com o objetivo de observar a presença de diferentes polimorfismos Alu, foram realizados alguns estudos com diferentes populações, incluindo assim populações do Brasil (remanescentes quilombolas e populações ameríndias/africanas e ameríndias/europeias), França, Congo e Senegal (Cotrim et al, 2004; Mendes-Junior e Simões, 2001; Santos et al, 2013). Porém, nota-se a falta de estudos recentes e por essa grande miscigenação que ocorreu na população brasileira, a tornando assim única, se torna importante ampliar as informações visando caracterizar geneticamente essa população.

Devido às suas características, as sequências Alu têm sido utilizadas como ferramentas no ensino de genética. Essas sequências são transmitidas de pais para filhos segundo o padrão mendeliano, sendo observadas inserções em determinados pares de cromossomos. Dessa forma, são definidos dois possíveis alelos: presença (+) e ausência (-). Essa abordagem, baseada na presença ou ausência da sequência em um determinado locus, permite o estudo da descendência (Deininger & Batzer, 1999).

Sabe-se que o ensino de genética e biologia molecular muitas vezes é considerado difícil e muito abstrato pelos alunos de graduação, sendo assim necessária a criação de meios didáticos que facilitem a compreensão dos estudantes (Fossey e Hancock, 2005; Klautau et al, 2009; Lorbiesk, 2010). Aulas práticas em laboratório podem facilitar a aprendizagem da biologia molecular e genética, uma vez que melhoram a compreensão de diferentes processos biológicos (Xavier e Cavalcanti, 2017), como frequências alélicas em uma população, polimorfismos e transmissão de caracteres hereditários.

Dessa maneira, a partir do desenvolvimento de um protocolo utilizando a análise do polimorfismo das sequências Alu, há a possibilidade de benefícios no entendimento dos conceitos teóricos de biologia molecular e genética, bem como capacitação nas atividades práticas experimentais e desenvolvimento de interpretação e análise de dados. Além disso, há uma maior identificação e um maior entusiasmo por parte dos alunos quando o DNA deles é utilizado em aulas para demonstração de diferentes conceitos (Xavier e Cavalcanti, 2017; Hearn e Arblaster, 2010).

Nesse contexto, com o intuito de utilizar a análise dos polimorfismos das inserções Alu como ferramenta para o ensino de genética/biologia molecular, foram realizados: análise do polimorfismo de inserções Alu em uma amostra de indivíduos da cidade de São Paulo, padronização das condições de ensaio visando adaptar um protocolo para aulas práticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Elementos de Transposição

Compondo aproximadamente 45% do genoma humano, os elementos de transposição (TEs) podem ser encontrados ao lado das regiões promotoras de genes, o que pode impactar na regulação da transcrição de genes adjacentes (Carareto et al, 2015; Lander et al, 2001).

Inicialmente identificados por Barbara McClintock e provadas suas capacidades de mobilização dentro do genoma em 1929 (Fedoroff, 1994), os TE são divididos em duas grandes classes, de acordo com seu modo de transposição: os de classe I ou retroelementos, que transpõem-se por meio de um RNA intermediário, usado como molde. Já os de classe II, os transposons de DNA (ou somente transposons), movem-se diretamente a partir de uma molécula de DNA. (Voytas et al, 1992; Feschotte et al, 2002 Carareto et al, 2015).

Os TEs mais conhecidos no genoma humano são o retrotransposon LINE (*long interspersed elements*), e SINE (*short interspersed elements*). O SINE são as versões não autônomas dos LINE, são menores, não autônomos e dependem da maquinaria enzimática dos LINEs para se moverem pelo genoma. Juntos constituem uma grande parte do DNA repetitivo nos genomas de muitos organismos, incluindo o humano (Bennetzen, 2000).

Esses elementos também podem influenciar o fenótipo dos indivíduos, ocorrendo em doenças como a hemofilia, a distrofia muscular de Duchenne e algumas formas de imunodeficiência (Kazazian e Goodier, 2002).

2.2 Sequências Alu

Correspondendo a aproximadamente 10% do genoma humano, as sequências Alu tem uma média de 300 pb (Ostertag et al, 2003; Stenger et al, 2001). Essas sequências são muito abundantes e estão presentes nos cromossomos humanos contabilizando mais de um milhão de cópias, tendo uma distribuição de 0,1Alu/kb e 1Alu/kb (Lander, 2001; Cardelli, 2006; Moysis, 1989).

Essas sequências contribuem para a diversidade do genoma humano, uma vez que a recombinação homóloga entre os elementos Alu (duplicações, deleções ou translocações, por exemplo) gera rearranjos cromossômicos (Cordaux e Batzer, 2009). Alguns estudos realizados indicam que esses elementos são ótimos marcadores para estudar a migração e evolução humana (Vega-Requena et al, 2019).

Cotrim et al (2004) analisaram as frequências alélicas de diferentes loci polimórficos das sequências Alu (APO, ACE, TPA25 e FXIIB) em populações com descendência africana

do Vale do Ribeira, no sudeste de São Paulo e observaram polimorfismos em todas as populações, tendo assim mais locos heterozigotos nas populações com descendência africana do que na população da cidade de São Paulo. Em outro estudo, foi analisada a presença de sequências Alu na população brasileira e foram observadas contribuições genéticas de diferentes populações. Sendo assim, foi notada a contribuição genética dos habitantes europeus para a composição da população de São Paulo (Santos et al, 2013).

E uma vez que a população brasileira historicamente passou por muitas uniões interétnicas, houve contribuições para a variabilidade genética dos brasileiros (Salzano e Sans, 2014). Portanto, essas sequências podem ser utilizadas para estudos em migração e evolução humana (Vega-Requena et al, 2019).

2.3 O Ensino de Genética e Biologia Molecular

Para alunos de graduação, o ensino de biologia molecular pode ser abstrato, uma vez que aborda tópicos pouco tangíveis, o que pode fazer com que os estudantes aprendam conceitos erroneamente (Fossey e Hancock, 2005). Além disso, para esses estudantes, a genética é a disciplina de mais difícil entendimento da área de Ciências Biológicas (Klautau et al, 2009), o que mostra a necessidade da criação de meios didáticos que facilitem a compreensão (Lorbiesk, 2010).

Na literatura, em muitos trabalhos, já foi descrita a utilização de diferentes protocolos de aulas práticas como recursos didáticos, como o uso do PCR para estudo de mutações utilizando o DNA da mucosa bucal ou de testes de paternidade fictícios (Barton e Lieberman, 1999; Casla e Zubiaga, 2010). Foram desenvolvidas diferentes aulas práticas que visavam facilitar a compreensão e o ensino de genética e biologia molecular, como a simulação de um caso de perícia criminal ou um protocolo que ilustra a manipulação do DNA (Silva e Garcia, 2024; Pavan, 2006).

Porém, foram notados alguns desafios técnicos, como na coleta das células para a realização do PCR, uma vez que a má qualidade dessas células pode afetar significativamente a técnica (Oliveira, 2008; Hearn e Arblaster, 2010). A prática de extração de DNA, por exemplo, permite a conexão entre conceitos teóricos abstratos e produtos visíveis. Além disso, os estudantes tendem a ficar mais entusiasmados quando fazem a extração de seu próprio DNA (Xavier e Cavalcanti, 2017; Hearn e Arblaster, 2010). Atividades práticas podem funcionar como ferramentas de ensino na biologia molecular e genética, uma vez que permitem uma melhor compreensão dos processos biológicos que ocorrem nos seres vivos.

3. METODOLOGIA

3.1 Caracterização da Amostra

O alvo de investigação desse estudo consistiu em indivíduos saudáveis da população presente na Universidade Presbiteriana Mackenzie e no seu entorno. Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da UPM (CAAE:80934524.7.0000.0084). Anteriormente a coleta de amostras de saliva e o estudo genético de cada amostra, foi realizada uma entrevista, em que os indivíduos preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, uma ficha de coleta, além de terem sido informados sobre a importância desse trabalho, sobre o procedimento e o destino da coleta, assim como do sigilo devido a ser aplicado.

3.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Para fins de padronização e comparação da metodologia foram utilizados dois métodos de extração: a metodologia padronizada por Abrão et al (2005) e o kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (250) Qiagen e duas formas de coleta das amostras, sendo escovas estéreis e hastes flexíveis estéreis (swab).

3.2.1 Extração de DNA utilizando kit comercial

A coleta foi realizada através da raspagem da face interna das bochechas com hastes flexíveis estéreis (swab) ou escovas estéreis. As porções externas das hastes foram cortadas, colocadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em geladeira por períodos de 2 a 30 dias antes da extração. Todas as amostras de DNA foram armazenadas a 4°C por até 2 dias ou a -20°C, num período de tempo maior, até a extração de DNA. A extração foi realizada segundo as instruções do fabricante.

3.2.2 Extração de DNA utilizando metodologia padronizada por Abrão et al (2005)

A coleta foi realizada através da raspagem da face interna das bochechas com hastes flexíveis estéreis (swab) ou escovas estéreis. As porções externas das hastes foram cortadas, colocadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em geladeira por períodos de 2 a 30 dias antes da extração. O DNA foi dissolvido em 50 µL de TE 10: 0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM). Todas as amostras de DNA foram armazenadas a 4°C por até 2 dias ou a -20°C, num período de tempo maior, até a extração de DNA. Para a retirada de células do swab, eles foram incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos ou à temperatura ambiente por 30 minutos,

com 1mL de solução água estéril. Foram realizados vários vórtex de 15 segundos, um vórtex final de 1 minuto e com o auxílio de uma pinça o swab foi retirado. A amostra foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante descartado, restando apenas o botão de células bucais no fundo do microtubo. Foram adicionados 200 μ L de TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; SDS 0,6%) e 2,5 μ L de proteinase K (20 mg/ml) aos tubos e estes foram incubados por 2 horas a 42°C. Feito isso, foram adicionados 42 μ L de NaCl saturado (6M), agitando manualmente. Essa amostra foi centrifugada por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 2 vezes o volume de etanol absoluto. A amostra foi incubada no freezer por 30 minutos. Os tubos foram agitados e centrifugados por 15 min a 15.000 x g. O etanol foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. Feito isso, a lavagem com etanol foi repetida e após desprezar o sobrenadante, os tubos permaneceram abertos por 30 minutos para evaporação do etanol residual. Após a ressuspensão do DNA em 50 μ L de tampão TE, a amostra foi incubada a 64°C por 10 minutos, sendo agitada manualmente com vigor a cada 5 minutos.

3.3 Análise amostras de DNA

As amostras de DNA obtidas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFisher) para quantificação e análise da pureza. Para a realização da leitura, foi utilizado 1 μ L de cada amostra.

A concentração de DNA é calculada a partir da absorbância a 260 nm. O grau de pureza dessas amostras foi analisado através do cálculo da razão entre a absorbância 260nm/280nm, sendo considerado puro um valor entre 1,8 e 2,0.

A partir dessa análise, foram selecionadas as amostras que tivessem concentração de DNA superior à 10ng/ μ L e valor da razão entre os picos 260nm/280nm entre 1,8 e 2,0 para a realização de PCR.

3.4 Análise dos loci Polimórficos da Inserção APOA1

Era prevista anteriormente, a análise de 5 loci polimórficos (ACE, APOA1, B65, PV92 e TPA25). Contudo, para melhor cumprir os objetivos iniciais deste projeto, os testes de padronização foram realizados com um dos loci mais representativo do Brasil (Mendes-Junior; Simões, 2001 e Batzer et al, 1996). Dessa maneira, foi analisado o loci APOA1.

Foi realizada reação de PCR com o primer APOA1, que tem como sequência F-5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' R-5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'. A temperatura de fusão (T_m) é de 60°C e a sequência tem tamanho de 400 pb e de 100 pb.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 20-100ng de DNA, 0,2 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, 50 mM KCl 0.5 U da enzima Taq polymerase, com 10 pmol de iniciadores de cada loci. As reações de PCR foram realizadas na seguinte ordem: desnaturação 3 minutos em 94°C, 45 segundos em 94°C, 45 segundos em 57,7°C e 1 minuto em 72°C, esse processo sendo repetido 34 vezes, seguido de extensão final 72°C por 5 minutos.

Todos os resultados da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, sendo utilizada a coloração com Syber Safe (Invitrogen) para visualização. Houve padronização de todas as condições da eletroforese do gel de agarose. Pode ser observado para cada locus, uma ou duas bandas de acordo com o tamanho da sequência amplificada esperada; a genotipagem sendo indicada, portanto, pela presença (+) ou ausência (-) dos fragmentos esperados pela amplificação por PCR.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Neste projeto foi feita a análise do polimorfismo de inserções Alu em uma amostra de indivíduos da cidade de São Paulo, visando desenvolver um protocolo para aulas práticas para o ensino de biologia molecular e genética, para tanto foram padronizadas as condições de ensaio desde a coleta de amostras até a análise dos polimorfismos.

Padronização da extração de DNA

Para a padronização da extração de DNA e elaboração de um protocolo para utilização do modelo Alu como ferramenta do ensino de genética foi realizada a extração de 8 amostras de DNA, utilizando a metodologia padronizada por Abrão et al (2005) com modificações. Primeiramente a coleta foi realizada através da raspagem da face interna das bochechas com hastes flexíveis estéreis (swab). A seguir foi analisada uma variação em relação ao tempo de incubação das amostras de 30 min a 2 horas.

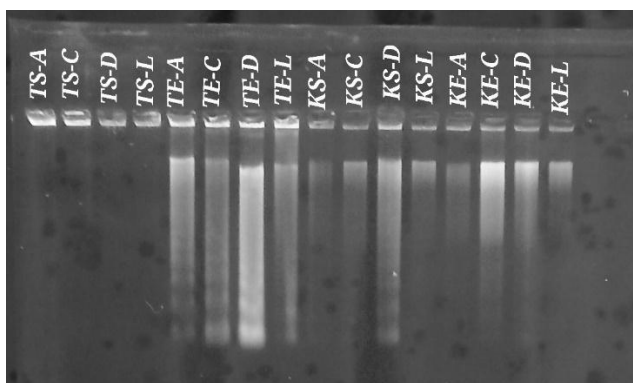
Para fins de obtenção de um DNA de boa qualidade para as análises das inserções Alu na população universitária, também foi realizada uma comparação com a utilização de um kit comercial e o protocolo de Abrão (2005).

Foi realizada uma comparação de duas metodologias de extração de DNA, buscando identificar nos resultados observados em eletroforese de gel de agarose, qual das metodologias obteve o melhor rendimento. Foram comparados os resultados da extração de DNA das amostras utilizando um kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (250) Qiagen e a metodologia padronizada por Abrão et al (2005).

Foram comparados dois métodos de coleta, sendo escova estéril e swab, para as duas metodologias de extração de DNA (figura 1). Foram coletadas 4 amostras de DNA de 4 pessoas (amostras A, C, D e L). Foram realizadas duas coletas, uma com escovas estéreis e outra com swab. Foram utilizadas de cada pessoa uma amostra coletada com a escova estéril e uma amostra coletada com o swab, realizando a extração de DNA com o kit comercial; uma amostra coletada com a escova estéril e uma amostra coletada com o swab, realizando a extração de DNA com a metodologia padronizada por Abrão et al (2005).

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose das amostras de DNA obtidas por dois métodos de extração de DNA.

TS: Metodologia padronizada por Abrão, swab utilizado como instrumento de coleta; TE: Metodologia padronizada por Abrão, escova estéril utilizada como instrumento de coleta; KS: Extração de DNA realizada por kit comercial, swab utilizado como instrumento de coleta; KE: Extração de DNA realizada por kit comercial, escova estéril utilizada como instrumento de coleta. As letras A, C, D e L representam as amostras das diferentes pessoas voluntárias



Fonte: Autoria própria

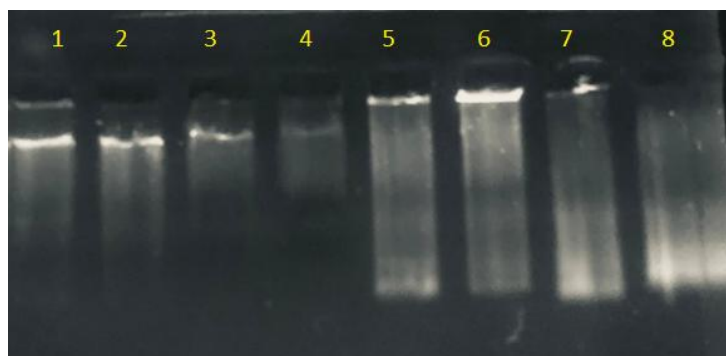
Através da análise eletroforética das amostras, observamos que os dois métodos de extração possibilitaram a obtenção de amostras de DNA. A variação nas concentrações obtidas estava mais relacionada com a eficiência do método de coleta. Observamos que as coletas realizadas com a escova estéril obtiveram melhor rendimento em comparação com o swab. A diferença observada entre a raspagem com o swab e com a escova estéril deve-se, provavelmente, à uma maior quantidade de material que pode ser coletada ao utilizar a escova. Isto resulta em um maior rendimento na extração de DNA.

No entanto, utilização da escova estéril para a coleta das amostras em aulas práticas de genética e biologia molecular acarreta um maior custo do que a utilização do swab. Assim, optou-se pela escolha do swab para a coleta das amostras, com recomendação explícita, no protocolo didático, de maior cuidado durante a coleta das amostras e indicando um número maior de raspagem na bochecha.

Para otimização do processo de extração foi realizada uma adaptação da metodologia padronizada por Abrão et al (2005): variação do tempo de incubação das amostras em banho-maria, que inicialmente era feita em 2h. Os resultados demonstram (figura 2) que não houve diferença significativa nos períodos de incubação de 40 minutos ou 1h em banho-maria. Também não foi observada diferença significativa entre os períodos de incubação de 1h30 e 2 horas.

Figura 2 – Análise de diferentes períodos de incubação das amostras em banho-maria.

1, 2, 3 e 4: Foi retirado o swab do microtubo antes de iniciar a extração de DNA (coletando o botão de células). **5, 6, 7 e 8:** O swab foi mantido durante o período de incubação da amostra em banho-maria. Em todas as amostras foi adicionado 2,5ul de enzima proteinase K (20mg/ml). Amostras 1 e 5 foram incubadas por 30 minutos a 42°C em banho-maria; as amostras 2 e 6 foram incubadas por 1 hora a 42°C; as amostras 3 e 7 foram incubadas por 1 hora e 30 minutos a 42°C; e as amostras 4 e 8 foram incubadas por 2 horas a 42°C.



Fonte: Autoria própria

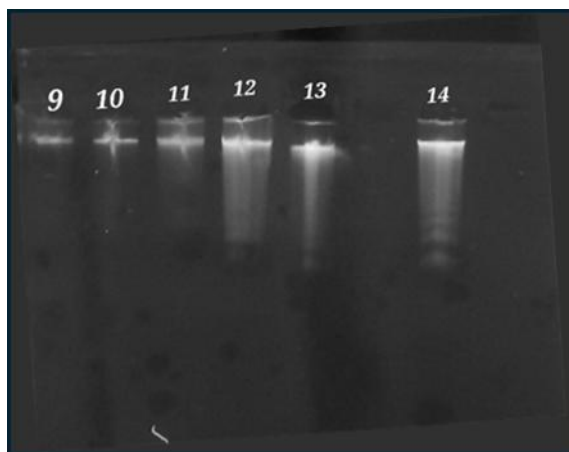
A partir dos resultados, foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos (40 minutos ou 1h de incubação em banho-maria e 1h30 ou 2 horas de incubação em banho-maria), o que se torna um empecilho para sua utilização como ferramenta didática, uma vez que o período limitado de uma aula deve ser levado em consideração, dificultando, assim, sua aplicação. Esperava-se que houvesse redução do tempo de incubação para 30 minutos, sem mudanças significativas.

Desta maneira, ao considerar limitações de tempo e a duração das aulas, foi observado que o tempo de incubação das amostras em banho-maria a 42°C presente na metodologia padronizada por Abrão et al (2005) pode ser reduzido para 40 minutos de incubação caso a

concentração da enzima proteinase K seja aumentada em duas vezes em comparação com a metodologia original (figura 3).

Figura 3 – Comparação de rendimento de extração de DNA com diferentes períodos de incubação em banho-maria a 42°C e com diferentes concentrações de proteinase K.

9 e 10: amostras incubadas por 2 horas a 42°C em banho-maria; adição de 2,5 µL de proteinase K (20 mg/ml). **11, 12, 13 e 14:** amostras incubadas por 40 minutos a 42°C em banho-maria; adição de 5 µL de proteinase K (20 mg/ml).



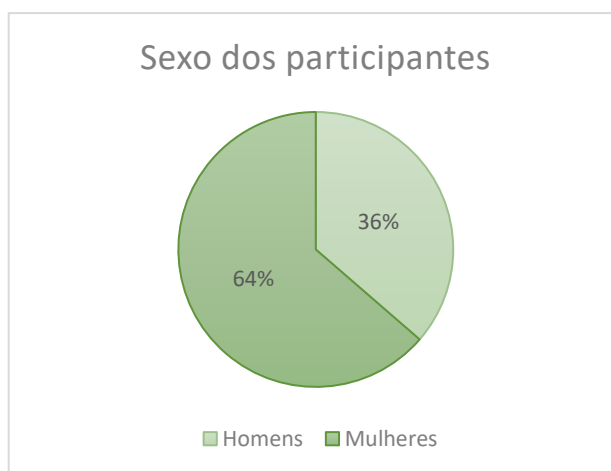
Fonte: Autoria própria

Análise das inserções Alu

Foi realizada a análise da inserção APOA1 do elemento Alu utilizando as condições de coleta e extração padronizadas para o protocolo didático. Para fins comparativos também foram analisadas amostras de DNA extraídas com o kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit.

Foram coletadas 99 amostras de uma população de indivíduos saudáveis da população presente na Universidade Presbiteriana Mackenzie e no seu entorno.

Gráfico 1: Caracterização da população analisada com relação sexo dos participantes.



Fonte: Autoria própria

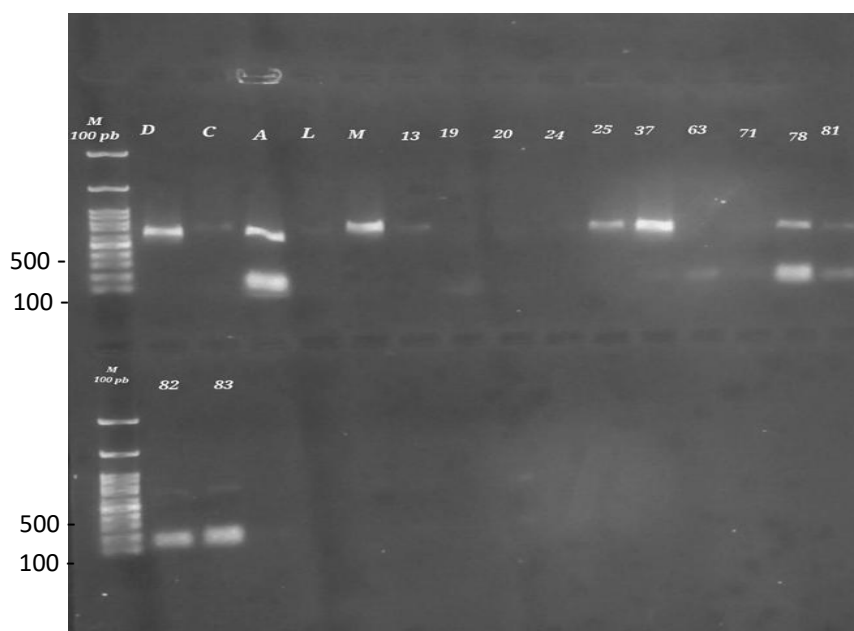
A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de Abrão et al (2005) com modificações. As coletas foram realizadas pela raspagem da face interna da bochecha do voluntário com a utilização de um swab estéril.

Posteriormente, todas as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro de micro volume NanoDrop, em que foram selecionadas 29 amostras para realização de PCR. Foram observadas também variações na concentração de DNA das amostras, o que se justifica, provavelmente, pelo método de coleta, que depende da intensidade e força que cada voluntário aplica no momento da coleta, influenciando, portanto, na quantidade de material coletado.

Na figura 4 é possível observar o resultado das amplificações das inserções Alu. Foi realizada a amplificação por PCR das amostras A, C, D e L, com diferentes métodos de coleta e extração de DNA; posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% para observação dos resultados. Nessas amostras foram utilizados 8 µL de DNA, totalizando 50 µL (reagentes e amostra) para a realização do PCR.

Uma inserção Alu resultará na presença de uma banda maior (400pb) em comparação com o alelo não inserido, que aparecerá como uma banda menor (100pb) ou ausente, permitindo a diferenciação entre os diferentes padrões de inserção. A presença de uma única banca indica que o indivíduo é homozigoto, tanto para a presença (+) quanto para a ausência (-) da inserção.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR realizada com primer APOA1. M: marcador; 13, 19, 20, 24, 25, 37, 63, 71, 78, 81, 82 e 83: indivíduos não aparentados. A: pai; L: mãe; D, C e M: filhos. Os fragmentos de DNA que apresentam a inserção Alu tem 400 pb e, os que não apresentam, 100 pb.



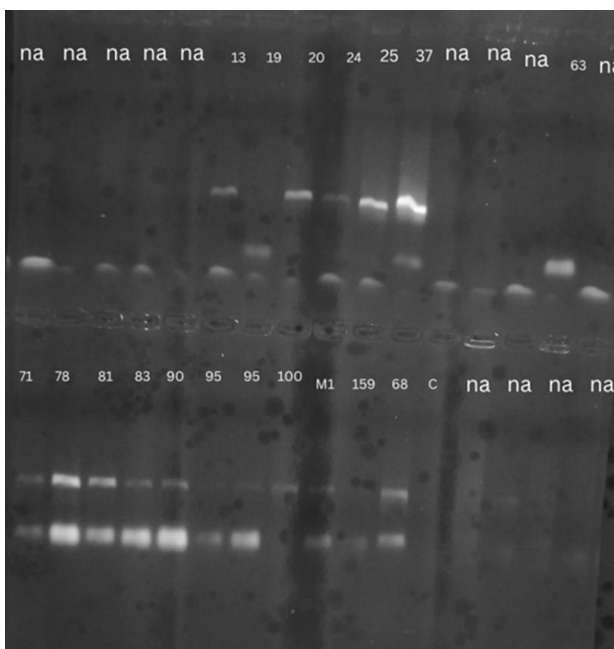
Fonte: Autoria Própria

Foi observado que os resultados em que houve maior amplificação foram nas amostras em que a extração foi realizada utilizando kit comercial, o que pode ser explicado pela maior precisão e exatidão na preparação dos reagentes presentes no kit, diminuindo, assim, erros por parte do pesquisador. Este método, portanto, não é acessível para ser utilizado para fins didáticos, sendo necessária maior atenção e cuidado ao realizar a extração de DNA ao utilizar métodos convencionais.

As amostras utilizadas nessa padronização são pertencentes a indivíduos aparentados, sendo pai, mãe e três filhos. A observação e exemplificação das inserções presentes ou ausentes nesses indivíduos se mostra uma importante ferramenta didática para a abordagem sobre hereditariedade, uma vez que essas sequências se comportam no padrão Mendeliano (Deininger e Batzer 1999). É possível observar que a amostra A (pai) é heterozigota (+/-), a amostra L (mãe) é homozigota (+/+), a amostra M (filho 1) é homozigota (+/+), assim como as amostras D (filho 2) e C (filho 3). Dessa maneira, se torna uma clara exemplificação da transmissão de cromossomos nas gerações.

Foram realizadas outras reações de amplificação de PCR para as outras 21 amostras selecionadas (figura 5), das quais 17 tiveram amplificação (figura 4). Na figura 4 também mostra o resultado da PCR usando o primer APOA1, com amostras de voluntários não aparentados.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Resultado da PCR realizada com primer APOA1. 13, 19, 20, 24, 25, 37, 63, 71, 78, 81, 82, 83, 90, 95, 100, M1, 159, 68: indivíduos não aparentados; na: não amplificado; c: controle negativo. Os fragmentos de DNA que apresentam a inserção Alu tem 400 pb e, os que não apresentam, 100 pb.



Autoria própria

Na tabela 1 mostra os resultados das reações de PCR realizadas neste projeto, em que mostra a totalidade indivíduos heterozigotos (+/-) ou homozigotos (+/+; -/-) para a inserção. Foi observado que a maioria da população é heterozigota para a inserção, sendo 11 indivíduos num total de 22 amostras analisadas. A partir da observação dos resultados, os indivíduos D, C, L, M, 13, 20, 24, 25 e 100 puderam ser identificados como homozigotos positivos para a inserção (+/+); os indivíduos A, 37, 71, 81, 83, 90, 95, M1, 159 e 68, como heterozigotos (+/-); e os indivíduos 19 e 63 puderam ser identificados como homozigotos negativos (-/-).

Tabela 1 – Polimorfismos APOA1 observados em todas as amostras amplificadas por PCR.

Polimorfismos APOA1	Nº de indivíduos	Porcentagem (%) em relação ao número total de indivíduos
+/+ (homozigoto)	9	40,90%
+/- (heterozigoto)	11	50,00%
-/- (homozigoto)	2	09,09%
Total	22	100,00%

Autoria própria

Protocolo didático para aulas práticas

Atividades práticas podem funcionar como ferramentas de ensino na biologia molecular e genética, uma vez que permitem uma melhor compreensão dos processos biológicos que ocorrem nos seres vivos. A prática de extração de DNA, por exemplo, permite a conexão entre conceitos teóricos abstratos e produtos visíveis. Assim foi desenvolvido um protocolo didático para aulas práticas levando em consideração os resultados obtidos nesse trabalho.

A versão estendida do protocolo, para utilização em aulas de genética e biologia molecular, disponível no link: https://docs.google.com/document/d/1snlV2jPoCdmhb5O1dNCF_VS99XjQtnSIZrkNBjDlwIU/edit?usp=sharing.

Apresentamos aqui uma versão reduzida com destaque para a padronização do método de extração do DNA.

Protocolo de aulas práticas - Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCL desenvolvida por Abrão et al (2005), modificada por Oliveira et al (2025)

1. Friccione o swab na face interna das bochechas. Repita o movimento aproximadamente 10 vezes em cada face da bochecha;
2. Após a coleta, coloque o swab ou a escova em um micro tubo de 1,5 a 2,0ml e corte a haste excedente, com uma tesoura limpa com álcool 70%;
3. Adicione, ao micro tubo, 1ml de água estéril com o auxílio de uma micropipeta. Incube as amostras em banho-maria a 37°C por 10 minutos;
4. Realize vórtex de 15 segundos várias vezes, em cada amostra, e um vórtex final de 1 minuto;
5. Com o auxílio de uma pinça limpa com álcool 70%, retire o swab;
6. A amostra deve ser centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante deve ser retirado com pipeta de 1000ul. No fundo do micro tubo deve restar o botão de células bucais;
7. Adicione, ao micro tubo, 200ul de TES (Tris HCL 10mM, pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%);

8. Após adicionado o TES à amostra, agite manualmente (ou com o auxílio do vórtex) o micro tubo, de forma a ressuspender as células presentes no botão de células. Após isso, adicione 5ul de proteinase K (20mg/ul) e incube-a em banho-maria por 40 minutos a 42°C;

9. Adicione 42ul de NaCl saturado (6M) e agite manualmente com vigor. Posteriormente, centrifugue a amostra por 1 minuto a 15000 x g;

10. Nomeie um novo micro tubo e transfira o sobrenadante para esse tubo. Adicione 2 vezes o volume de etanol absoluto. Agite o tubo manualmente com vigor e o centrifugue por 1 minuto a 13000 rpm;

11. Descarte o etanol absoluto e adicione 1ml de etanol 70%. Inverta o micro tubo várias vezes.

12. Centrifugue a amostra por 1 minuto a 13000 rpm e descarte o etanol 70% e adicione 1ml de etanol 70% novamente, repetindo o processo.

13. Após isso, descarte o sobrenadante e mantenha o micro tubo aberto por 30 minutos para evaporação do etanol residual.

14. Adicione 50ul de tampão TE no micro tubo para a ressuspensão do DNA.

15. Incube a amostra em banho-maria a 64°C por 10 minutos, agitando manualmente com vigor a cada 5 minutos.

5. CONCLUSÃO

O ensino de biologia molecular pode ser abstrato para alunos de graduação, uma vez que aborda tópicos pouco tangíveis. Atividades práticas podem funcionar como ferramentas de ensino na biologia molecular e genética, uma vez que permitem uma melhor compreensão dos processos biológicos que ocorrem nos seres vivos.

Uma vez que as sequências Alu são eficazes marcadores genéticos e tem ampla distribuição no genoma humano, elas podem servir como material didático em aulas práticas de biologia molecular e genética para elucidar processos biológicos e de ancestralidade. Além disso, por serem transmitidas pelos padrões mendelianos, facilitam a observação de diferentes polimorfismos presentes em uma sala de aula, exemplificando diferentes processos biológicos, como transmissão de caracteres hereditários e técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese.

6. REFERÊNCIAS

- ABEID, Said Nassor et al. Alu elements within the human major histocompatibility class I region in the Comoros Islands: genetic variation and population relationships. *Annals of Human Biology*, v. 46, n. 2, p. 169-174, 2019.
- ABRÃO, M. G. et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 49, n. 6, p. 978-982, 2005.
- BARTON, Michelle; LIEBERMAN, Michael A. An optional laboratory in molecular techniques as an aid in the teaching of medical biochemistry. *Biochemical Education*, v. 27, n. 3, p. 150-152, 1999.
- BATZER, Mark A. et al. Genetic variation of recent Alu insertions in human populations. *Journal of molecular evolution*, v. 42, n. 1, p. 22-29, 1996.
- BEAUMONT, Rebekah et al. Genomic diversity and differentiation of Alu insertion polymorphisms in a native British and four South Asian migrant populations. *Annals of Human Biology*, v. 50, n. 1, p. 117-122, 2023.
- CARARETO, Claudia Marcia Aparecida; MONTEIRO-VITORELLO, Claudia Barros; VAN SLUYS, Marie-Anne (Ed.). Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2015.
- CARDELLI, Maurizio et al. A polymorphism of the YTHDF2 gene (1p35) located in an Alu-rich genomic domain is associated with human longevity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 61, n. 6, p. 547-556, 2006.
- CASLA, A. V.; ZUBIAGA, I. S. Paternity testing in a PBL environment. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 38, n. 1, p. 37-42, 2010.
- CORDAUX, Richard; BATZER, Mark A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews genetics*, v. 10, n. 10, p. 691-703, 2009.
- COTRIM, Nelson Henderson et al. Polymorphic Alu insertions in six Brazilian African-derived populations. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, v. 16, n. 3, p. 264-277, 2004.
- DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. Alu repeats and human disease. *Molecular genetics and metabolism*, v. 67, n. 3, p. 183-193, 1999.
- ELBARBARY, Reyad A.; LUCAS, Bronwyn A.; MAQUAT, Lynne E. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science*, v. 351, n. 6274, p. aac7247, 2016.
- FEDOROFF, Nina V. Barbara McClintock (June 16, 1902-September 2, 1992). *Genetics*, v. 136, n. 1, p. 1, 1994.
- FESCHOTTE, Cédric; ZHANG, Xiaoyu; WESSLER, Susan R. Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons. *Mobile DNA II*, p. 1145-1158, 2007.
- FOSSEY, Annabel; HANCOCK, Carolyn. DNA replication and transcription: An innovative teaching strategy. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 33, n. 6, p. 411-415, 2005.
- Genetic Origins. Geneticorigins.org. Disponível em: <<http://www.geneticorigins.org/pv92/aluframeset.htm>>. Acesso em: 01/04/2024.
- HEARN, R. P.; ARBLASTER, K. E. DNA extraction techniques for use in education. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 38, n. 3, p. 161-166, 2010.
- Jesus, E; Quintanilha, D.M.; Costa, N.S.; VAnSlys, M.A. Genoma Movel Mecanismo de transposição e impacto evolutivo IN: MENCK, CARLOS FM; SLUYS, Marie-Anne Van. *Genética molecular básica: dos genes ao genoma. Grupo GEN*, 2017. p335-357.

- KLAUTAU, N. et al. Relação entre herança genética, reprodução e meiose: um estudo das concepções de estudantes universitários do Brasil e Portugal. *Enseñanza de las ciencias: revista de investigación y experiencias didácticas*, n. Extra, p. 2260-2263, 2009.
- KAZAZIAN, Haig H.; GOODIER, John L. LINE drive: retrotransposition and genome instability. *Cell*, v. 110, n. 3, p. 277-280, 2002.
- LANDER, ES. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 409, p. 860-921, 2001.
- MENDES-JUNIOR, C. T.; SIMÕES, A. L. Alu insertions and ethnic composition in a Brazilian population sample. *International Journal of Human Genetics*, v. 1, n. 4, p. 249-254, 2001.
- NOVICK, Gabriel E. et al. Polymorphic Alu insertions and the Asian origin of Native American populations. *Human Biology*, p. 23-39, 1998.
- OLIVEIRA, AEPC. Controlo e Garantia de Qualidade da Técnica de PCR. Universidade do Porto, 2008.
- OSTERTAG, Eric M. et al. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *The American Journal of Human Genetics*, v. 73, n. 6, p. 1444-1451, 2003.
- PAVAN, O. H. de O. DNA recombinante. *Genética na Escola*, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 54-62, 2006. DOI: 10.55838/1980-3540.ge.2006.19. Disponível em: <https://www.geneticaaescola.com/revista/article/view/19>. Acesso em: 27 abr. 2024.
- ROWOLD, Diane J.; HERRERA, Rene J., Alu elements and the human genome, *Genetica*, v. 108, n. 1, p. 57-72, 2000.
- SALZANO, Francisco Mauro; SANS, Mónica. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genetics and molecular biology*, v. 37, p. 151-170, 2014.
- SANTOS, Kaïsson E. et al. Insights on the HLA-G evolutionary history provided by a nearby Alu insertion. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 11, p. 2423-2434, 2013.
- SILVA, A. P. B. da; GARCIA, J. E. Simulação de perícia criminal na sala de aula para compreensão de temas básicos da genética mendeliana e molecular. *Genética na Escola*, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 51-67, 2024. DOI: 10.55838/1980-3540.ge.2024.515. Disponível em: <https://www.geneticaaescola.com/revista/article/view/515>. Acesso em: 27 abr. 2024.
- STENGER, Judith E. et al. Biased distribution of inverted and direct Alus in the human genome: implications for insertion, exclusion, and genome stability. *Genome research*, v. 11, n. 1, p. 12-27, 2001.
- STONEKING, Mark et al. Aluinsertion polymorphisms and human evolution: Evidence for a larger population size in Africa. *Genome research*, v. 7, n. 11, p. 1061-1071, 1997.
- TERREROS, Maria C. et al. Insights on human evolution: an analysis of Alu insertion polymorphisms. *Journal of human genetics*, v. 54, n. 10, p. 603-611, 2009.
- VEGA-REQUENA, Yasser V. et al. Genetic admixture analysis in the population of Tacuarembó-Uruguay using Alu insertions. *Human Biology*, v. 91, n. 4, p. 249-256, 2020.
- VENNER, Samuel; FESCHOTTE, Cédric; BIEMONT, Christian. Dynamics of transposable elements: towards a community ecology of the genome. *Trends in Genetics*, v. 25, n. 7, p. 317-323, 2009.
- VOYTAS, Daniel F.; BOEKE, Jef D. Yeast retrotransposon revealed. *Nature*, v. 358, n. 6389, p. 717-717, 1992.
- WELLS, Jonathan N.; FESCHOTTE, Cédric. A field guide to eukaryotic transposable elements. *Annual review of genetics*, v. 54, n. 1, p. 539-561, 2020.
- WICKER, Thomas et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature reviews genetics*, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

XAVIER, César Silva; CAVALCANTI, Danielle Pereira. Desenvolvimento de um kit didático de eletroforese para o ensino prático de Biologia Molecular na educação básica e superior. *Revista de Ensino de Bioquímica*, v. 15, p. 49-62, 2017.