

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) COMO FERRAMENTA PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E EPIDEMIOLÓGICO: COMO FUNCIONA A TÉCNICA?¹

Luisa Padaratz Mendes², Carla Ivane Ganz Vogel³, Ketriane Mota de Souza⁴

¹ Vinculado ao projeto “Caracterização funcional e expressão de genes envolvidos no sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em modelos de tripanossomatídeos submetidos a agentes genotóxicos”.

² Acadêmica do curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC/UDESC.

³ Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – carla.vogel@udesc.br.

⁴ Doutoranda em Bioquímica e Biologia Molecular – CAV.

Com o passar dos anos, o desenvolvimento científico possibilitou descobertas antes inimagináveis. Não só é possível explorar o que ficou no passado, como material genético de dinossauros, preguiças gigantes e mamutes, mas também o que está ocorrendo em tempo real e prever o que virá no futuro, como mapear genomas de vírus e outros agentes ainda pouco conhecidos. Hoje, com equipamentos portáteis, o sequenciamento de DNA em larga escala é perfeitamente executável, permitindo que os pesquisadores analisem, cataloguem e utilizem os dados obtidos para desenvolver medicamentos, vacinas, experimentos e muitos outros recursos que beneficiam as populações ao redor do mundo. Devido à pandemia do COVID-19, a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) tornou-se mais difundida com o objetivo de sequenciar o genoma do SARS-CoV-2 para detecção de variantes e produção de vacinas. No Laboratório ANBIOGEN do CAV/UDESC foi feito o sequenciamento de amostras humanas positivadas para COVID-19 a fim de detectar variantes do vírus SARS-CoV-2, que tem um genoma de RNA fita simples de 29.000 bases. Os resultados foram analisados, permitindo identificar a variante do vírus, as regiões genômicas das mutações, quais aminoácidos foram trocados, além de várias outras informações muito interessantes e de considerável utilidade.

O sequenciamento do genoma viral é um processo meticuloso e complexo, com inúmeras etapas, necessitando de ferramentas específicas. Como o material genético do vírus SARS-CoV-2 é RNA, antes do sequenciamento ser feito utiliza-se uma técnica para transformar esse RNA em cDNA (pela Transcriptase Reversa) e amplificá-lo, isto é, produzir várias cópias para facilitar a detecção do agente na amostra: a PCR Multiplex. Ao final desse processo, utiliza-se a eletroforese em gel de agarose para poder observar a presença do vírus. A amostra é previamente preparada seguindo o protocolo ARTIC, o qual está disponível, junto com inúmeros tutoriais e aulas, no site da Oxford Nanopore Technologies. No Laboratório ANBIOGEN, fez-se o uso do MinION, um aparelho da mesma empresa. Em seu interior, instala-se uma *flow cell* e, nela, há inúmeros (nano) poros, pelos quais fitas de (agora) DNA do SARS-CoV-2 são lidas. As trincas de bases nitrogenadas (A, C, T, G) codificam diferentes aminoácidos que formam proteínas, as quais correspondem a genes diversos. Esses genes representam características específicas do vírus, como proteínas de adesão e da cápsula viral, mecanismos de resistência ao sistema imune do hospedeiro, entre outras.

Ao final do processo de sequenciamento, os dados são reunidos em alguns arquivos, em uma pasta no computador conectado ao MinION. Esses arquivos podem ser anexados diretamente na plataforma EPI2ME – ela é baixada diretamente do site da Oxford Nanopore Technologies, em qualquer computador. No programa, seleciona-se “Iniciar nova análise” e anexa-se os arquivos que contêm o resultado da leitura do DNA. Depois, indica-se qual o protocolo se quer usar para a análise. Neste trabalho, para uma amostra de controle positivo, isto é, que sabidamente continha material genético do SARS-CoV-2, foi utilizado o protocolo Fastq QC + ARTIC + NextClade. Em seguida, em alguns minutos, o software realizou todo o reconhecimento dos dados, gerando um relatório completo sobre a amostra decodificada. Nesse relatório, está indicada qual a linhagem e variante virais, quantas leituras de DNA foram realizadas (cada leitura indica uma passagem de fita de DNA por um poro do equipamento), como ficou a cobertura dos pares de bases contidos na amostra, em que regiões desse DNA encontram-se mutações, quais são elas e em qual troca de aminoácidos elas resultam, entre vários outros dados. A Figura 1 representa o relatório fornecido pelo EPI2ME.

Na amostra analisada, obteve-se a variante Gama 20J (V3), da linhagem Pango P.1, com 32 mutações (trocas de nucleotídeos) e 22 trocas de aminoácidos. É graças a essas mutações e trocas que há diferentes cepas de vírus, bactérias, protozoários etc. – aminoácidos diferentes configuram, algumas vezes, proteínas diferentes, que modulam diferentes funções e capacidades do agente de perpetuar no organismo do hospedeiro. Outra análise muito interessante realizada no EPI2ME foi a Fastq WIMP, utilizada quando não se sabe o que há dentro da amostra coletada. O software rápida e corretamente reconheceu que se trata de um vírus, do gênero *Betacoronavirus*, táxon “Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2” – o SARS-CoV-2. Curiosamente, também foi detectado DNA humano (*Homo sapiens*), em pouquíssima quantidade, provavelmente por resquício da própria amostra nasofaríngea humana.

Graças ao sequenciamento de DNA, aliado à RT-qPCR, foi possível não só identificar uma amostra positiva para o vírus da COVID-19, mas também seu material genético, identificando várias mutações e mudanças ocorridas em comparação às outras cepas e ao genoma referencial, descoberto no final de 2019. A saúde pública como um todo é beneficiada com técnicas como a de sequenciamento. Com os sucessivos avanços, uma enorme quantidade de patologias e agentes etiológicos pode ser estudada, elucidada e combatida com competência, auxiliando na produção de vacinas, medicações e terapias eficazes.

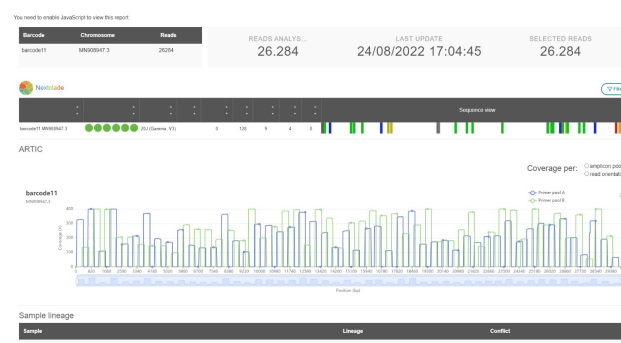


Figura 1. Relatório do Fastq QC + ARTIC + NextClade.

Palavras-chave: Sequenciamento de DNA. COVID-19. MinION.