

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELA DUARTE

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE DNASE E RNASE EM
EMBALAGENS PRIMÁRIAS DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.**

**CURITIBA
2017**

ISABELA DUARTE

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE DNASE E RNASE EM
EMBALAGENS PRIMÁRIAS DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dra. Juliana Ferreira de Moura
Co-orientador: Dra. Cristina Reinert

**CURITIBA
2017**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Adriana e Alexandre, por todo amor e carinho proporcionado nestes anos, à educação concedida a mim e toda sua dedicação. Obrigada por acreditarem no meu potencial, e estar sempre presentes em cada momento da minha vida.

Aos meus irmãos Gabriel e Pedro, pelo carinho, parceria, risadas e até as brigas. Vocês fizeram minha vida mais alegre.

Aos meus avós Suzana, Osvaldo, Ana e Wilard (*in memoriam*), obrigada por todo o carinho e amor. Parte de quem eu sou hoje é fruto de vocês. Obrigada por todo o apoio dado a mim durante toda a minha vida.

Ao Carlos, meu amor, obrigada por estar presente, sempre me ajudando a melhorar e buscar o melhor em mim. Obrigada pelo amor e carinho.

A minha orientadora Profa. Dra. Juliana de Moura, por aceitar me orientar e estar sempre disponível. Obrigada pela oportunidade e ensinamentos, mesmo antes da orientação.

A minha co-orientadora Dra. Cristina Reinert, obrigada pela maravilhosa oportunidade de fazer parte da equipe da Qualidade, por todos os conhecimentos passados a mim, e o apoio para desenvolver este projeto.

As minhas coordenadoras Lorena e Thaisa, obrigada pela ajuda, concelhos, conversas e orientação. Acima de tudo, obrigada pela amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP, Pedro, Tainara, Walleyd, Dásio e Fábio, obrigada pela ajuda, pelas risadas e brincadeiras. O trabalho fica mais leve com a presença de vocês.

As meninas da Garantia da Qualidade, Mariana, Ana, Dayane, Vanessa, Camila e Jocélia, obrigada pela paciência e orientações com as documentações. E o mais importante, obrigada pela amizade e o carinho proporcionado por vocês.

A todos os demais colaboradores do IBMP, obrigada pelo bom convívio.

Ao pessoal da Imunova Análises Biológicas, Max, Fernanda, Tobias, Breno e Celso. Com certeza vocês são responsáveis por boa parte da minha formação. Obrigada por, mesmo eu estando no primeiro período da faculdade, me conceder a oportunidade de estagiar com vocês e adquirir muito conhecimento. Fer, obrigada pelos concelhos e cafés da tarde, além de toda a ajuda no laboratório.

Aos meus amigos, Thalita, Caroline, Aline, Wagner, Ediney, Lucas, Jéssica, Carla, Wladimir, Ronaldo, Guilherme, Lilian, Carlos, Thais, dentre outros, pelos momentos de descontração e todo apoio que me deram nesses anos de faculdade.

Aos novos amigos que a Biologia me trouxe, Vinicius, Fabi, Bruno, Ariele, Franco, Matheus, Tacyany, e os demais colegas. Com vocês a Universidade foi maravilhosa.

Aos Professores Zanata, Lia e Adriana, pelas orientações, conhecimento e oportunidades.

Ao pessoal do Laboratório de Neurobiologia, pela amizade e parceria no período de estágio.

EPÍGRAFE

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças”.

Charles Darwin

RESUMO

A transfusão sanguínea é uma prática frequentemente utilizada na medicina, logo, há uma necessidade de assegurar que este procedimento seja seguro, impedindo que doenças infecciosas virais como HIV e HCV sejam transmitidas a vários indivíduos. Atualmente, o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) em parceria com Bio-Manguinhos produz insumos que compõem o KIT NAT Brasileiro, que detecta HIV, HCV e HBV, garantindo a qualidade do sangue disponibilizado para a hemorrede pública brasileira. A metodologia utilizada no NAT para a detecção destas doenças é uma reação de PCR em tempo real. Esta reação tem como base a detecção de material genético, portanto é indispensável que este material, assim como os insumos utilizados para o teste, encontrem-se livres de nucleases. Estas enzimas são conhecidas por clivar sequências de ácidos nucleicos e são classificadas em duas classes: as DNases, que possuem como atividade a clivagem de sequências com dupla ou simples fita de DNA, e RNases, que atuam na clivagem dos RNAs. Este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de uma metodologia que apresentasse alta sensibilidade para a detecção destas enzimas em materiais primários de embalagem. Foram utilizados para isto os Kits comerciais DNase Alert™ e RNase Alert® (*Thermo Fisher Scientific*), e testadas duas formas de análise. A primeira forma é composta por uma análise visual que, expondo as amostras previamente preparadas em luz UV, revela ou não fluorescência; a segunda é realizada em tempo real com o uso do equipamento *ABI 7500-Real Time System*, utilizado normalmente em reações de PCR em tempo real. Os resultados mostram que a utilização da análise em tempo real possibilitou maior sensibilidade e precisão no teste. Quando testadas em conjunto, as DNase e RNase foram identificadas com sucesso pela metodologia e, assim, resultando na otimização dos testes de detecção.

Palavras-chaves: Detecção, nucleases, DNase, RNase

ABSTRACT

The blood transfusion is a frequently practice used in the medicine, so, there is a necessity to ensure that this procedure be secure, preventing viral infectious diseases such as HIV and HCV being transmitted to several individuals. Currently, Molecular Biology Institute of Paraná (IBMP) in partnership with Bio-Manguinhos produces inputs that composes the Brazilian NAT KIT, which detects HIV, HCV and HBV, ensuring the blood quality provided for the Brazilian public blood donation network. The methodology used in NAT for the detection of these diseases is a reaction from real time PCR. This reaction is based in the detection of genetic material, therefore, is indispensable that this material, such as the used inputs for the test, find itself free from nucleases. These enzymes are known for cleaving sequences of nucleic acids and are classified in two classes: the DNases, which have as activity the sequences cleaving with double or simple band of DNA, and RNases, which acts on cleavage of the RNAs. This work had as objective to evaluate a methodology application that shows high sensibility for detecting these enzymes in primary materials of package. Were used for this the commercial kits DNase Alert™ and RNase Alert® (*Thermo Fisher Scientific*), and tested two forms of analysis. The first one is composed by an visual analysis that, showing the previously prepared UV light samples, reveals or not the fluorescence; the second one is realized in real time by using the equipment *ABI 7500-Real Time System*, normally used in real time PCR reactions. The results shows that the utilization of real time analysis made possible the attainment of higher sensitivity and accuracy in the test. When tested together, the DNase and RNase were successfully identified by the methodology and, thus, resulting in an optimization of the detection tests.

Keywords: Detection, nucleases, DNase, RNase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ilustração da amplificação exponencial de material genético.....	17
Figura 2: Ilustração do funcionamento de uma qPCR com a utilização de sondas...	18
Figura 3: Ilustração do mecanismo de detecção dos Kits DNase, e RNaseAlert.	21
Figura 4: Diluição seriada DNase	22
Figura 5: Diluição seriada RNase	23
Figura 6: Esquema de trabalho para avaliação de metodologia para detecção de DNase e RNase.....	24
Figura 7: Ciclos para detecção de fluorescência em equipamento 7500 Real-Time PCR,.....	25
Figura 8: Gráfico produzido pelo software 7500 DNase	27
Figura 9: : Gráfico produzido pelo software 7500 RNase.....	27
Figura 10: Controles negativos das enzimas DNase e RNase.....	28
Figura 11: Análise visual das diluições para DNase e RNase,.....	28
Figura 12: Análise de fluorescência dos tubos expostos à luz UV.	29
Figura 13: Gráfico da quantidade de fluorescência conforme a diluição Mix 1.	30
Figura 14: Gráfico da quantidade de fluorescência conforme a diluição, utilizando o Mix 2.....	30
Figura 15: Gráfico de Análise de metodologia para recuperação de DNase e RNase em tubos primários.....	31
Figura 16: Análise visual das metodologias utilizadas para recuperação das enzimas DNase e RNase..	32
Figura 17: Análise visual de fluorescência utilizando enzima RNase A proveniente do fabricante Thermo Fisher.	32
Figura 18: Análise visual de fluorescência utilizando enzima RNase A proveniente do fabricante Qiagen.	33
Figura 19: Gráfico da análise em Tempo Real da enzima RNase A do fabricante Thermo Fisher.	33
Figura 20: Gráfico da análise em Tempo Real da enzima RNase A do fabricante Qiagen.....	34
Figura 21: Análise visual de fluorescência utilizando enzima DNase I proveniente do fabricante Roche..	34

Figura 22: Gráfico da análise em Tempo Real da enzima DNase I do fabricante Roche.....	35
Figura 23: Gráfico da análise em tempo real da enzima DNase I em reação duplex..	36
.....	36
Figura 24: Gráfico da análise em tempo real da enzima RNase em reação duplex..	36

LISTA DE ABREVIATURAS

RFU – Unidade de Fluorescência Relativa

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HCV – Hepatite C

NAT - *Nucleic Acid Amplification Test* (Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DNase – Desoxirribonuclease

RNase – Ribonuclease

LCQ – Laboratório de Controle de Qualidade

IBMP- Instituto de Biologia Molecular do Paraná

qPCR- *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo)

FDA - *Food and Drugs Administration* (Amplificação de Ácidos nucleicos)

dNTP's - Desoxinucleotídeos

FREAT - *Fuorescence Resonance Energy Transfer* (Transferência de energia ressonância de fluorescência)

ROX – *Passive Reference Dye*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS	14
2.2 GERAL.....	14
2.3 ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 KIT NAT NACIONAL.....	15
3.2 PCR EM TEMPO REAL - qPCR.....	16
3.3 NUCLEASES	19
3.4.1 DNase	19
3.4.2 RNase	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 KIT DNase Alert™ e RNase Alert®	21
4.2 SENSIBILIDADE	22
4.3 RECUPERAÇÃO DE DNase E RNase	23
4.4 ANÁLISE VISUAL	24
4.5 ANÁLISE POR ABI 7500 Real-Time PCR	24
4.6 OTIMIZAÇÃO.....	25
4.7 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS COMERCIAIS	26
5 RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO.....	36
7.CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

A transfusão de sangue possui grande importância na temática de saúde pública, sendo imprescindível que o procedimento transfusional seja seguro e de qualidade, impedindo a transmissão de doenças. Nas últimas décadas, com o advento de novas tecnologias, houve diminuição no risco de infecções virais, como HIV e HCV, via transfusão sanguínea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; JACKSON *et al*, 2013). As técnicas utilizadas para triagem de bolsas de sangue estão cada vez mais sensíveis, sendo capazes de detectar baixos níveis de material genético viral do plasma do indivíduo infectado. A mais recente tecnologia empregada para realizar a triagem em doadores de sangue mundialmente, é denominada NAT, sigla oriunda do inglês *Nucleic Acid Amplification Test* (Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos). Emprega-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*), que amplifica e detecta RNA e DNA virais nas amostras, diminuindo o período denominado janela imunológica, na qual não é possível detectar a presença de antígenos e anticorpos (DODD, 2002; LIMA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O kit NAT Brasileiro é um produto nacional com custo reduzido em relação aos kits disponíveis no mercado de importação. A produção pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/Fiocruz em parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP, possibilitou a nacionalização deste Kit (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). O IBMP produz em sua planta fabril os Módulos de Amplificação para a composição do kit que contempla os reagentes necessários para a realização das reações de PCR. Em se tratando da detecção de material genético, é essencial que todos os materiais utilizados estejam livres de enzimas conhecidas como nucleases, capazes de degradar sequências nucleotídicas, rompendo suas ligações fosfodiéster (OLIVEIRA, 2008).

A atuação das nucleases é baseada na hidrólise de DNA de fita simples, dupla fita, fita RNA, assim como híbridos de DNA/RNA, podendo ou não depender de cofatores (SAENGER, 1991). Sua atividade é importante biologicamente para a manutenção da vida. No processo de replicação, as endonucleases e exonucleases têm papel fundamental na remoção de *primers*, e na conferência da sequência resultante. Eventos como reparo, recombinação do DNA e morte celular programada

também têm o envolvimento de nucleases. Essas atividades intracelulares são reguladas por substratos específicos e moléculas inibidoras, evitando assim a degradação indesejada de DNA e RNA (YANG, 2011; SATO&TAKENAKA, 2014; ERIKSSON&LANGEL, 2016). A biologia molecular utiliza nucleases em diversas técnicas, como na análise de restrição. Na medicina, a detecção destas enzimas é utilizada em diagnóstico de doenças como o *Lupus*, onde a uma redução funcional de DNase I (SATO&TAKENAKA, 2014; ERIKSSON&LANGEL, 2016, MECANOVIC&LACHMANN, 1997). Devido a sua capacidade de clivar ácidos nucleicos, é indispensável que produtos e equipamentos nos laboratórios de biologia molecular estejam livres de nucleases (MITSUHASHI&OGURA, 1996, MENDES, *et al*, 2011).

O Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) do IBMP realiza testes para garantir que os insumos produzidos e as matérias primas utilizadas estejam dentro dos padrões de qualidade e das normas vigentes. Atualmente, o LCQ realiza análise para detecção de DNases e RNases em insumos e diluentes que compõem o Módulo de Amplificação fabricado pelo IBMP. Um dos testes utilizados para a detecção de DNases e RNases é o kit DNaseAlert™ e RNaseAlert®, da Thermo Fisher Scientific, e a análise dos resultados é feita visualmente através do equipamento Fotodocumentador Doc-It2. Quando a amostra apresenta-se positiva para nuclease, há liberação de fluorescência visualizada através da excitação com luz ultravioleta nas mesmas. A contaminação por DNases e RNases é um problema quando se trata de produção de insumos para fins moleculares pois pode ocasionar a degradação do alvo, levando a um resultado falso negativo. Deste modo, é necessário garantir que materiais e produtos utilizados na produção de insumos estejam livres de DNases e RNases.

No presente estudo, foi avaliado se o método atualmente utilizado para investigar contaminações por DNases e RNases para diversas finalidades é efetivo na detecção de contaminações em materiais primários de embalagem. Além da análise visual, o método foi avaliado utilizando o Termociclador 7500 Real-Time PCR, com a finalidade de analisar quantitativamente a fluorescência e assim obter os resultados durante o período de incubação das amostras para cada enzima, separadamente, em tempo real. Posteriormente, as enzimas foram testadas em conjunto formando um duplex da reação como forma de otimização do protocolo.

2. OBJETIVOS

2.2 GERAL

- Avaliar e otimizar a aplicação da metodologia para detecção de contaminação em materiais primários de embalagens utilizadas na produção de insumos pelo IBMP, por DNase e RNase.

2.3 ESPECÍFICOS

- Testar protocolo de metodologia em tempo real para a detecção de nucleases utilizando o equipamento termociclador 7500 Real-Time PCR.
- Avaliação do uso de enzimas comerciais: RNase A Thermo Fisher Scientific, RNase A Qiagen e DNase I Roche.
- Otimização do protocolo utilizando as enzimas DNase e RNase simultaneamente em cada amostra.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 KIT NAT

NAT (*Nucleic Acid Amplification Test* – teste de amplificação de ácidos nucleicos), consiste de uma técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), para a detecção do material genético viral. Inicialmente, o Kit NAT foi utilizado para triagem de componentes plasmáticos com a finalidade de produção de hemoderivados, como imunoglobulina humana. Desta forma o Instituto alemão *Paul Erlich* foi o primeiro a estabelecer padrões no mercado do país (BARBARA, 1999). Este foi o primeiro Kit NAT aceito pelo FDA (*Food and Drugs Administration*), em 1995 (CARDOSO *et al*, 1998; BARBARA, 1999).

O *North Rhine-Westphalia* foi o primeiro local, na Alemanha em 1997, a implantar o teste NAT como método de diagnóstico nos serviços de hemoterapia. Posteriormente, outros países da Europa começaram a utilizá-lo para a verificação de bolsas de sangue destinadas à transfusão (CARDOSO *et al*, 1998). Em 1999, os Estados Unidos também implantaram o teste em sua rotina de triagem para transfusões sanguíneas (MACHUCA&HEWLETT, 2003). A análise inicial é realizada com *pools* de amostras, onde o plasma de vários pacientes são testados em conjunto no mesmo poço de amplificação. Logo após sua implantação, foi discutido o número de indivíduos utilizados nos *pools*, pois foi notado que quanto maior o número de pacientes contidos no *pool*, maior a chance de realização de retestes. Atualmente, o *pool* é preparado com amostras de 6 pacientes. Caso seja observada a amplificação para qualquer um dos alvos, o *pool* é aberto, ou seja, cada paciente é testado individualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; WILKOMENN *et al*, 1999).

A grande vantagem do teste NAT é a possibilidade de detecção da infecção logo após o contato com o agente etiológico, no qual a produção de anticorpos pelo sistema imune ainda é insuficiente para sua detecção por ensaios sorológicos convencionais, diminuindo a janela imunológica (BUSH *et al*, 2000; PETRY, 2013). O kit NAT é um complemento à sorologia e não a substitui. Em alguns momentos a carga viral não é detectável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012), como por exemplo quando o ciclo do agente etiológico está na fase de eclipse, que representa a fase inicial da infecção. Nesta fase a replicação do agente é lenta, dificultando a detecção de ácidos nucleicos (PETRY *et al*, 2013). Contudo, a utilização do Kit NAT vem se tornando

essencial para o aumento da segurança do processo de doação de sangue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

O Instituto de Biologia Molecular do Paraná, fundado em 2001 em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz e o Governo do Estado do Paraná, atua na produção de insumos para composição de kits de diagnósticos, assim como pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação utilizados no Sistema Único de Saúde (SUS). Um de seus produtos é o módulo de amplificação referente à detecção de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), HCV (Hepatite C) e HBV (Hepatite B) fornecido para Bio-Manguinhos para composição do Kit NAT.

A detecção destas doenças na hemorrede possui grande importância para garantir a qualidade das bolsas de sangue utilizadas para transfusões. A nacionalização do teste NAT possibilitou sua utilização, pois reduziu o custo por teste realizado, suprimindo a demanda brasileira e acrescentando desenvolvimento e capacitação tecnológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

3.2 PCR EM TEMPO REAL - qPCR

Também conhecida como PCR quantitativa, ou qPCR, a PCR em tempo real foi descrita inicialmente como uma técnica de amplificação de material genético. Esta técnica é a base da metodologia do teste NAT. Seus ciclos são acompanhados por um sistema fotodocumentador, constituído por uma câmera e um sistema de lentes capazes de identificar comprimentos de ondas provenientes da fluorescência emitida pelo agente intercalante, quando este se insere nas duplas fitas de DNA (HIGUCHI *et al.*, 1993).

Seu princípio é semelhante à PCR convencional, ou de tempo final, onde o material genético é amplificado de maneira exponencial, com o diferencial de quantificação simultânea desta amplificação. A técnica possui três fases, a de crescimento exponencial, crescimento linear e fase estacionária, porém é na fase de crescimento linear que os componentes são consumidos. A fluorescência obtida é diretamente proporcional à quantidade de produto formado (OLIVEIRA, 2010; HEID *et al.*, 1996).

Para a reação ocorrer é necessário, basicamente, a presença de oligonucleotídicos capazes de anelar a uma sequência de interesse a ser amplificada

a partir do DNA molde, dNTPs, enzima Taq polimerase, íons de magnésio e um tampão. Inicialmente, é aplicada uma alta temperatura para que as fitas de DNA possam desnaturar. Em seguida, a temperatura é reduzida com a intenção de anelar os iniciadores à sua sequência complementar da fita molde. Posteriormente, a temperatura é mantida a 72°C, condição ótima para que a DNA polimerase sintetize uma nova fita a partir dos iniciadores anelados. Ao final dos ciclos, é produzida uma quantidade de produtos de PCR 2^n , onde “n” representa a quantidade de ciclos (KUBISTA *et al*, 2006; BARTLETT & STIRLING, 2003) (FIGURA 1).

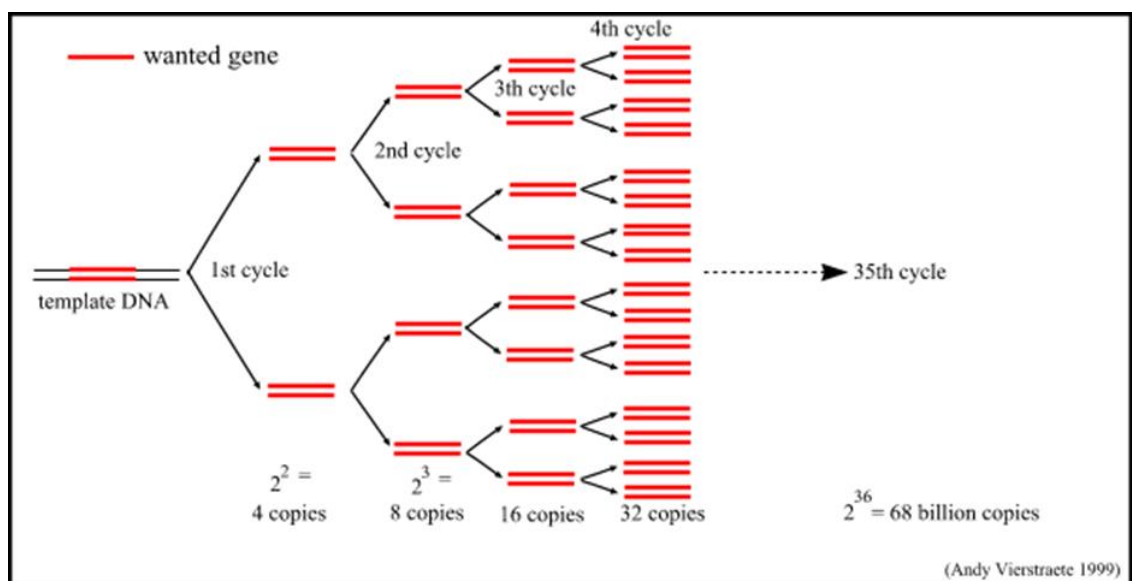


Figura 1: Ilustração da amplificação exponencial de material genético. Adaptado de Andy Vierstraete, 1999.

Para que a quantidade de produto possa ser identificada na técnica de PCR em tempo real, moléculas fluorescentes são inseridas na reação. Atualmente, encontram-se disponível dois grupos de agentes, classificados de acordo com seu composto fluorescente e sua atuação na reação (MACKAY *et al*, 2007). Do primeiro, fazem parte moléculas intercalantes, as quais não apresentam especificidade para sequências de DNA, ou seja, se intercalam em qualquer produto de PCR que apresente dupla fita. Como exemplo, podemos citar o SYBR® Green, que se baseia em um conjunto de moléculas que se ligam covalentemente à uma dupla fita de DNA, e ao serem excitadas, liberam uma fluorescência verde (MACKAY *et al*, 2007). O segundo é composto por sondas de hibridização que possuem duas moléculas fluorescentes, uma em cada extremidade. O método em que se utilizam sondas possui maior especificidade quando comparado com o método de moléculas intercalantes,

pois as moléculas são construídas a partir das sequências específicas do DNA de interesse (FIGURA 2). Quando a sonda está intacta, a fluorescência da molécula repórter é absorvida pela molécula *quencher*. Ao ocorrer a extensão da fita molde nos ciclos de PCR, a sonda de hibridização é clivada pela atividade 5' -3' da DNA polimerase, ocorrendo o afastamento das duas moléculas presentes na sonda. A molécula fluorescente começa a apresentar um aumento de fluorescência quando o *quencher* se encontra distante da sonda (HEID *et al* 1996; MACKAY *et al*, 2007).

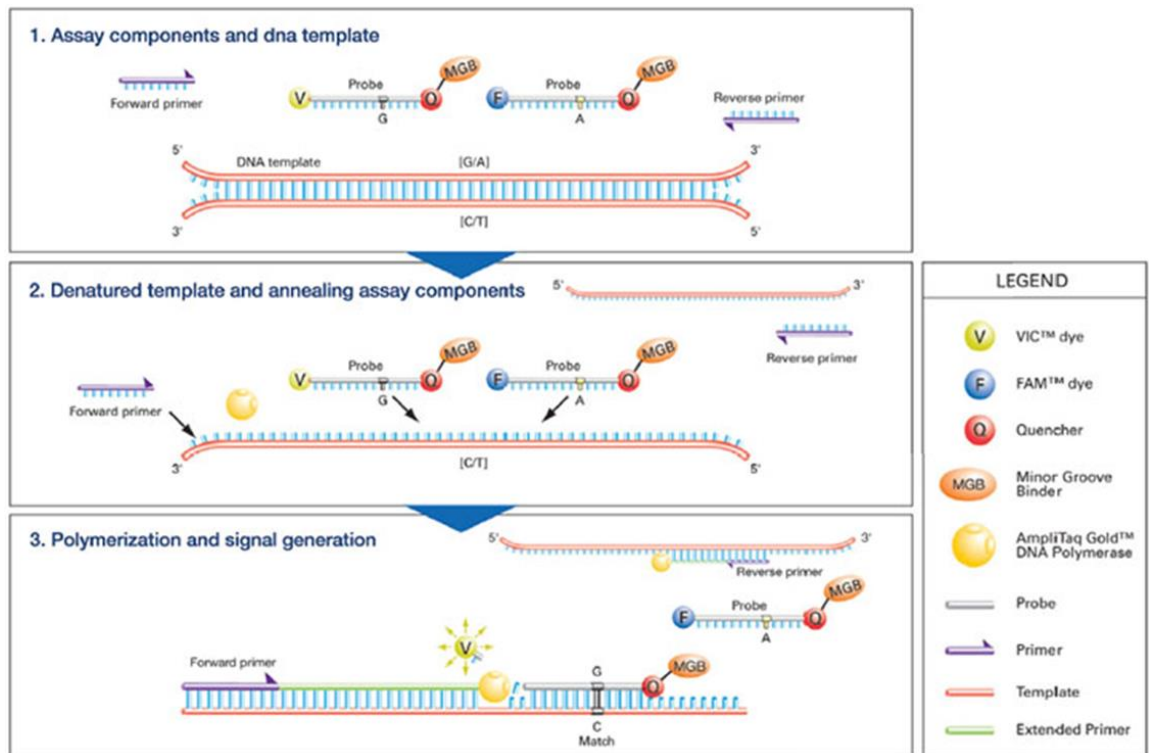


Figura 2: Ilustração do funcionamento de uma qPCR com a utilização de sondas. Adaptado de Thermo Fischer Scientific, 2017.

Para a análise dos dados, é preciso definir pontos como o *baseline*, *threshold* e o *Ct (cycle threshold)*. O *baseline* corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência, separando o ruído de fundo. O *threshold* é o limiar da fase exponencial, definida após determinação do *baseline*. *Ct* representa o número de ciclos necessário para que a fluorescência ultrapasse a linha do *threshold*. Quando uma grande quantidade de DNA template encontra-se presente na reação de PCR, o número de ciclos necessários para que a quantidade de fluorescência produzida ultrapasse o *threshold* é menor (OLIVEIRA, 2010).

3.3 NUCLEASES

Nucleases são enzimas onipresentes, capazes de catalisar e clivar sequências de DNA e RNA. As mesmas são necessárias para a manutenção da vida pois participam diretamente dos processos de replicação do material genético, como por exemplo as endo e exonucleases, importantes para a remoção dos iniciadores de RNA (KAO&BAMBARA, 2003; SCHEIN *et al* 2001; SAENGER, 1991; POMPA, *et al*, 2016). Recombinação, reparo e participação na morte celular programada também são funções destas enzimas. Em relação à defesa, são importantes para combate aos microrganismos (TOCK *et al*, 2005).

As nucleases têm sido importantes ferramentas nas técnicas de biologia molecular, como as endonucleases de restrição do tipo II, que permitem cortar sequências de interesse (COHEN *et al*, 1973), e também são utilizadas ao se extrair material genético. Na extração de DNA ocorre também extração indesejável de RNA. Para degradar o RNA presente, adiciona-se RNase e então, obtêm-se apenas sequências de DNA. O mesmo ocorre quando se tem interesse em amostras contendo apenas RNA, porém utiliza-se DNase com a finalidade de degradar resquícios de DNA da amostra (BASSO *et al*, 1985; COHEN *et al*, 1973). Possuem aplicação também para diagnósticos e terapias, como a DNase I, utilizada como terapia em pacientes com fibrose cística (SCHEIN *et al* 2001).

3.4.1 DNase

Como uma das endonucleases melhor caracterizadas, a DNase foi inicialmente descrita como uma enzima capaz de hidrolisar sequências de DNA na presença de cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} (LASKOWSKI, 1971). Presente em diversos tecidos animais, vegetais e em microrganismos, requer uma atenção dos pesquisadores com suas amostras, devido à sua atividade hidrolítica (CHOU&LIAO, 1990). Dentre as DNases, a DNase I e II são as mais estudadas. A DNase I catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster das fitas simples e duplas de DNA, na presença de Mg^{2+} (BARANOVSKII *et al*, 2004; WESTHEIRMER, 1987). Esta enzima

apresenta preferência por sequências de 5' -pirimidina-purina-pirimidina (BASSO, *et al* 1985).

Muito utilizada para diagnóstico de diversas doenças, como em pacientes com determinadas doenças autoimunes, nas quais a quantidade de DNase é inferior à concentração normal do organismo (MACANOVIC *et al*, 1997). Também é considerada um marcador de infarto agudo do miocárdio, situação em que ocorre o aumento de sua atividade (MORIKAWA *et al*, 2007). Em casos de infecções com *Staphylococcus aureus*, a detecção da DNase produzida pelo patógeno é considerado um marcador de diagnóstico. Neste caso, a bactéria é cultivada em meio seletivo contendo DNA, e quando existe a presença de *S. aureus* é observado padrões de coloração distintos de acordo com o meio utilizado, resultado da presença de DNase (SATO *et al*, 2014).

3.4.2 RNase

RNases são nucleases ubíquas que catalisam a degradação de RNA, presentes em eucariotos e procariotos. Algumas ribonucleases apresentam atividades angiogênicas, neurotóxicas, antitumorais e imunossupressoras (SCHEN, 2001). Em alguns casos, apresentam atividade citotóxica ao clivarem o RNA, pois levam à inibição da síntese proteica resultando em apoptose (CASTRO *et al*, 2011). Foi inicialmente descrita bioquimicamente por Gutte&Marrifield em 1971 que demonstraram sua síntese biológica. São consideradas termostáticas, por apresentarem capacidade de retornar a sua forma nativa após a exposição a temperaturas elevadas (MIYAMOTO *et al*, 2009)

A RNase A possui preferência por sequências de RNA com resíduos de citosina e uracila de cadeia simples, e, ao clivar estas sequências, resulta em terminações 3'-fosfato (RAINES, 1998). Todos os organismos produzem ribonucleases, sendo assim, são encontradas em quase todos os ambientes (WALTER *et al*, 2004).

À vista disso, existe a necessidade dos laboratórios que realizam testes utilizando biologia molecular, se encontrarem livres de nucleases, de forma a garantir a boa performance dos ensaios assim como resultados precisos, pois a presença destas enzimas acabam degradando o materiais genéticos utilizados. Desta forma, este trabalho tem em vista analisar e otimizar uma metodologia para a detecção destas enzimas em tubos utilizados na produção de insumos de testes de

diagnósticos. Garantindo assim, para os testes realizados em sequência, qualidade e eficiência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 KIT DNase Alert™ e RNase Alert®

A metodologia dos Kits DNase Alert e RNase Alert da Thermo Fisher Science baseia-se em ensaios fluorimétricos simples para detecção de DNases e RNases, respectivamente.

Os kits são compostos por um Tampão Nuclease Alert 10X, Controles Positivos (DNase I no DNaseAlert e RNase A no RNaseAlert) e sequências de oligonucleotídeos contendo uma molécula fluorescente em uma extremidade e, na outra, um *quencher* (substratos para cada reação). O substrato do RNaseAlert foi otimizado para a detecção de várias RNases, tais como: RNase A, RNase T1, RNase I, nuclease mitocondrial, nuclease S1, dentre outras.

A emissão de fluorescência somente se dá na presença de enzimas DNases e RNases. Enquanto a sequência utilizada como substrato encontra-se íntegra, a molécula fluorescente e o *quencher* ficam próximos fisicamente, desta forma, a energia emitida é absorvida pelo *quencher*, impedindo a visualização de fluorescência. Logo, quando a enzima é adicionada ao meio, esta sequência é clivada deixando as duas moléculas distantes, e assim, a fluorescência pode ser observada (FIGURA 3)

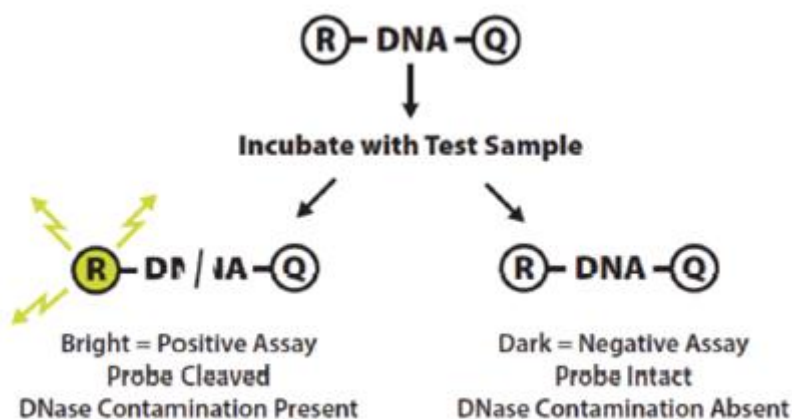


Figura 3: Ilustração do mecanismo de detecção dos Kits DNase, e RNaseAlert (Adaptado de User Manual IDT).

Ambos os kits foram avaliados por duas metodologias distintas:

- Incubação em estufa a 37 graus Celsius em microtubos contendo os insumos necessários para reação, conforme indicado pelo fabricante dos Kit, e em seguida de revelação em Fotodocumentador Doc-It2 da UVP.
- Empregando o termociclador 7500 Real-Time PCR: tanto para incubação como para revelação em leitura de placas de 96 poços.

4.2 SENSIBILIDADE

Para avaliar a sensibilidade dos métodos, foi realizada uma diluição seriada das enzimas. Para a DNase I, foi pipetado 1 μL da enzima à 2 U/ μL em 9 μL de 0,1X tampão RNase Free; desta solução foi utilizado 1 μL para um novo tubo contendo 9 μL , e assim sucessivamente até a diluição 1:10.000 (FIGURA 4)

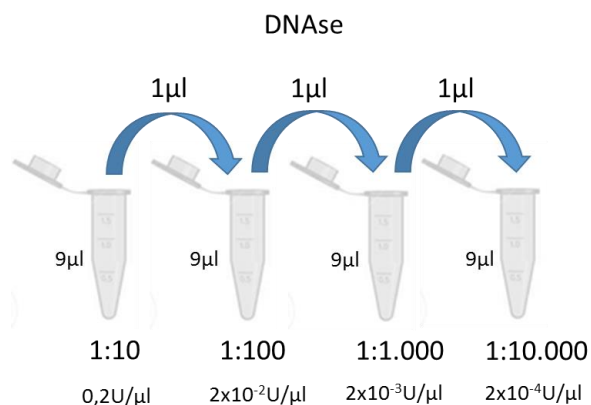


Figura 4: Diluição seriada DNase (Fonte: A Autora)

A diluição da RNase A seguirá o mesmo princípio, porém, o estoque da mesma encontra-se a uma concentração de 5U/ μL : sendo assim, a diluição foi preparada conforme a Figura 5.

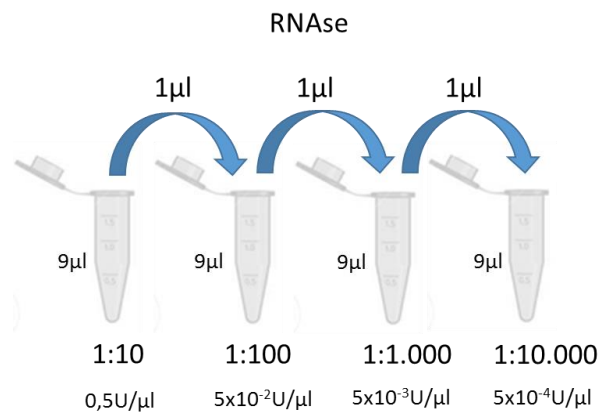


Figura 5: Diluição seriada RNase (Fonte: A autora)

Foram preparadas duas reações (Mix) contendo tampão e substrato, a primeira com volumes de 10 µL tampão 10x, 10 µL de substrato e 70 µL de água RNase free, conforme o teste utilizado pelo LCQ para detecção de DNase/RNase em água RNase Free. E uma segunda reação com valores de acordo com protocolo do fabricante: 1 µL de tampão 10x, 11 µL de substrato e 78 µL de água RNase Free. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de cada diluição em triplicata.

4.3 RECUPERAÇÃO DE DNase E RNase

Para avaliar o melhor método para a recuperação das enzimas dos tubos de embalagem primária, que consistem nos tubos utilizados armazenar os insumos produzidos, foram analisados 4 métodos distintos (FIGURA 6). Cada tubo foi contaminado com 1 µl das diluições contendo concentrações mais baixas de DNase e RNase, com $2 \times 10^{-3} \text{U}/\mu\text{l}$ e $2 \times 10^{-4} \text{U}/\mu\text{l}$ para DNase e $5 \times 10^{-3} \text{U}/\mu\text{l}$ e $5 \times 10^{-4} \text{U}/\mu\text{l}$ para RNase. Foram adicionados 180 µl de água ultrapura em cada tubo primário, dispostos em triplicata, e submetidos à 37°C por 30 minutos, temperatura ambiente por 30 minutos, vórtex por 10 segundos e realizando up/down, ou seja, puxar e dispensar o volume com uma micro pipeta várias vezes no tubo. Posteriormente, foram retirados 80 µl de cada um dos tubos e pipetado em uma placa contendo previamente o substrato e tampão 10x, e outros 80 µl para análise visual, em tubos contendo também os reagentes substrato e tampão 10x.

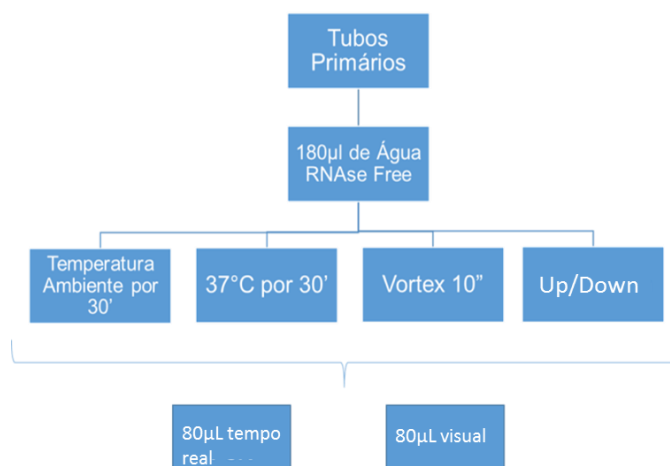


Figura 6: Esquema de trabalho para avaliação de metodologia para recuperação de DNase e RNase (fonte: A Autora).

4.4 ANÁLISES VISUAIS

Após a adição das amostras nos tubos contendo tampão e substrato, estes foram incubados à 37°C durante 1 hora. Foram utilizados controles negativos para ambas as enzimas em tubos de 600 µL contendo 10 µL de tampão, 10 µL de substrato, 80 µL de água RNaseFree, para estes controles não é adicionado enzimas.

Para análise dos resultados, foi utilizado o equipamento Fotodocumentador Doc-It2 310 com transiluminador da marca UVP, que ao emitir luz UV, excita a molécula fluorescente e assim é possível ver, através de uma barreira protetora, a fluorescência.

4.5 ANÁLISE POR ABI 7500 *Real-Time* PCR

O equipamento utilizado para este método foi o ABI 7500 Real-Time PCR System, da Thermo Fisher Scientific. Para avaliação de sensibilidade, foi preparado um mix inicial para ambos os testes, contendo 165 µL de substrato, 15 µL de tampão 10X, 1305 µL de água RNase Free. Os volumes citados para a produção do mix são referentes à 15 amostras. Após o preparo da reação, foram adicionados 90 µL da mistura em cada poço de uma placa óptica de 96 poços, normalmente utilizada para

PCR em tempo real. Logo após o mix, foram adicionados 10 µL das amostras, em triplicata.

Para avaliar os tubos amostrados, os insumos para as reações, tampão e substrato, foram pipetados em placas ópticas. Ao realizar o teste com os tubos, após a recuperação das enzimas, conforme item 4.3, foram pipetados 80 µL de amostra, também em triplicata, na placa contendo 10 µL de substrato e 10 µL de tampão 10x. Em todas as corridas foi adicionado controle negativo da reação. A leitura será realizada a cada 1 minuto, por 30 minutos, à 37°C (FIGURA 7).

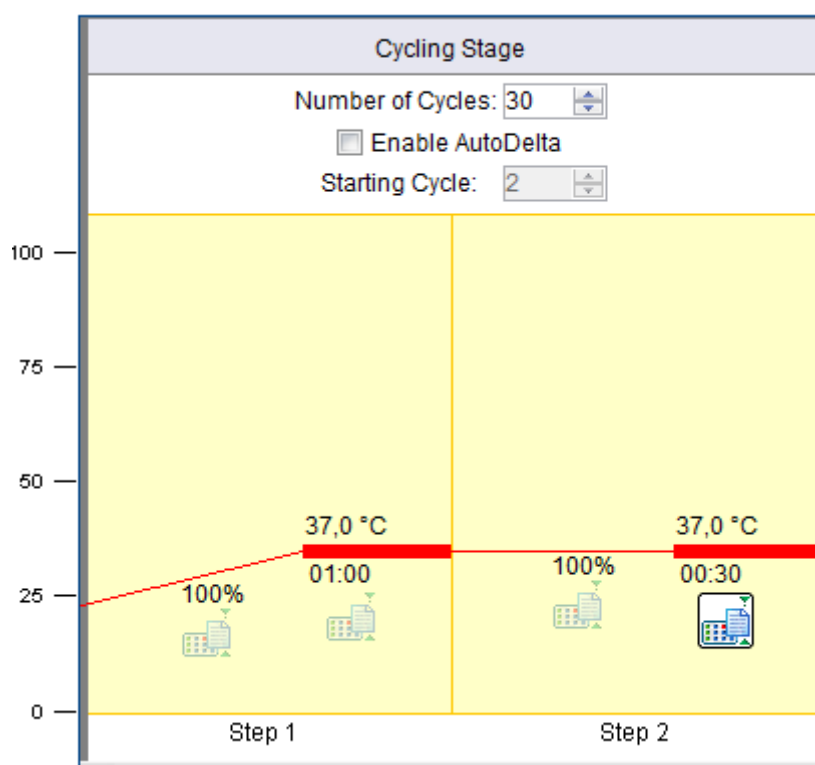


Figura 7: Ciclos para detecção de fluorescência em equipamento 7500 Real-Time PCR, a captação da fluorescência ocorre ao final de cada ciclo (Fonte: A Autora)

4.6 OTIMIZAÇÃO

Em um primeiro momento, cada enzima foi analisada separadamente em cada reação; após esta primeira análise foi realizado um teste com as enzimas em conjunto, formando um duplex da reação. Isso foi possível pois os fluoróforos utilizados para cada enzima são lidos pelo equipamento 7500 Real-Time PCR System em dois comprimentos de ondas distintos, DNase em 535/556 nm (filtro para detecção de

fluróforo VIC) e RNase 490/520 nm (filtro para detecção de FAM). A análise visual não é possível, pois não há como diferenciar as fluorescências juntas nesta metodologia. Para a reação, foram pipetados diretamente nos poços 10 µl de substrato de cada enzima, 20 µl de tampão *nuclease alert* 10X, e 70 µl de cada diluição das enzimas. Para o controle negativo foram pipetados (ao invés da amostra) 70µl de água RNase free. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os dados tratados estatisticamente com o Teste T de Student.

4.7 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS COMERCIAIS

Foi realizado um teste com enzimas comerciais RNase A Thermo Fisher Scientific, RNase A Qiagen e DNase I Roche, com finalidade de se avaliar a possibilidade de utilização do Kit com enzimas de outros fabricantes e, também, a capacidade do kit de detectar enzimas distintas. Foi realizada uma diluição seriada de acordo com o demonstrado pelas figuras 4 e 5.

5 RESULTADOS

Inicialmente, as enzimas foram analisadas separadamente para cada reação, descritas no item 4.2. Após a corrida em Tempo Real para verificar a sensibilidade no teste houve geração de um gráfico pelo equipamento com a quantidade de fluorescência e os ciclos da corrida, demonstrados nas figuras 8 e 9.

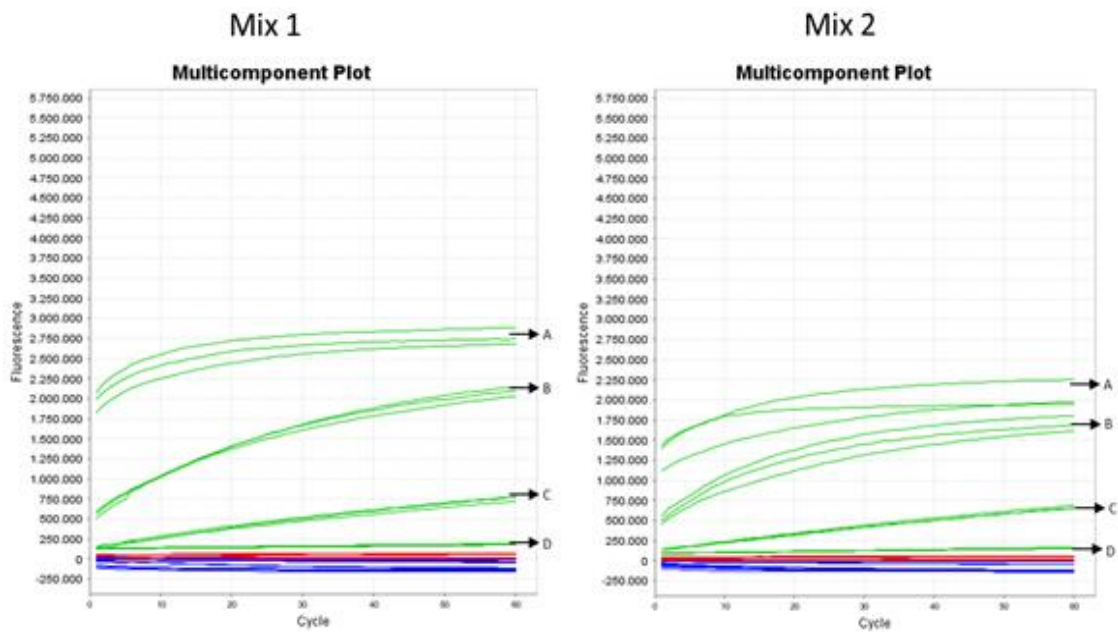


Figura 8: Gráfico produzido pelo software 7500. Mix 1 apresentou melhor homogeneidade entre as triplicatas de cada diluição assim como sua melhor separação. Gráfico referente à DNase. As letras A, B, C e D referem-se às concentrações testadas, 0,4 ng/ μ L, 40 pg/ μ L, 4 pg/ μ L, 0,4 pg/ μ L respectivamente.

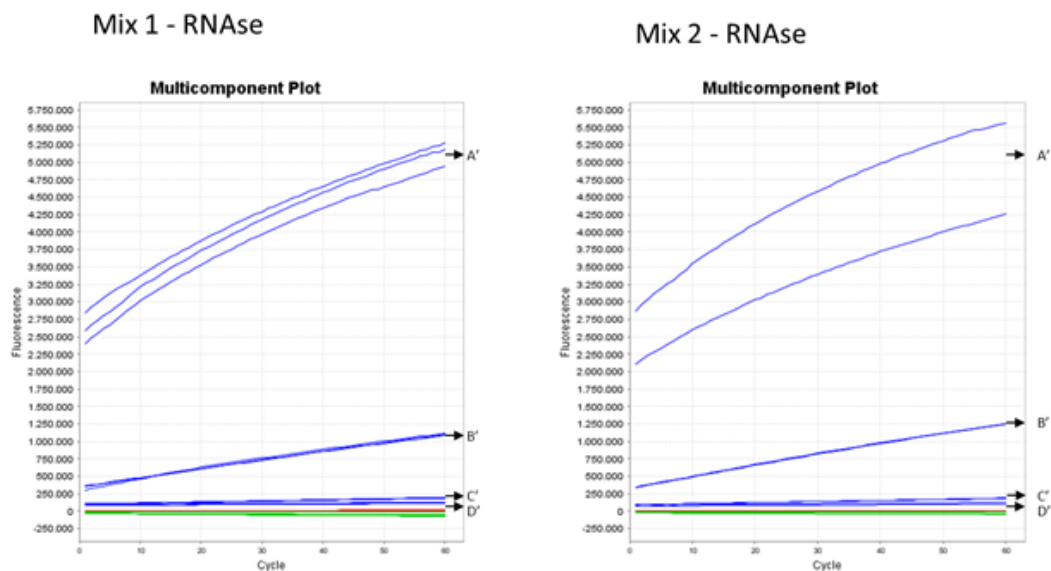


Figura 9: : Gráfico produzido pelo software 7500. Mix 1 apresentou melhor homogeneidade entre as triplicatas de cada diluição assim como sua melhor separação. Gráfico referente à RNase. As letras A', B', C' e D' referem-se às concentrações testadas, 5×10^5 pg/ μ L, 5×10^4 pg/ μ L, 5×10^3 pg/ μ L, 50 pg/ μ L respectivamente.

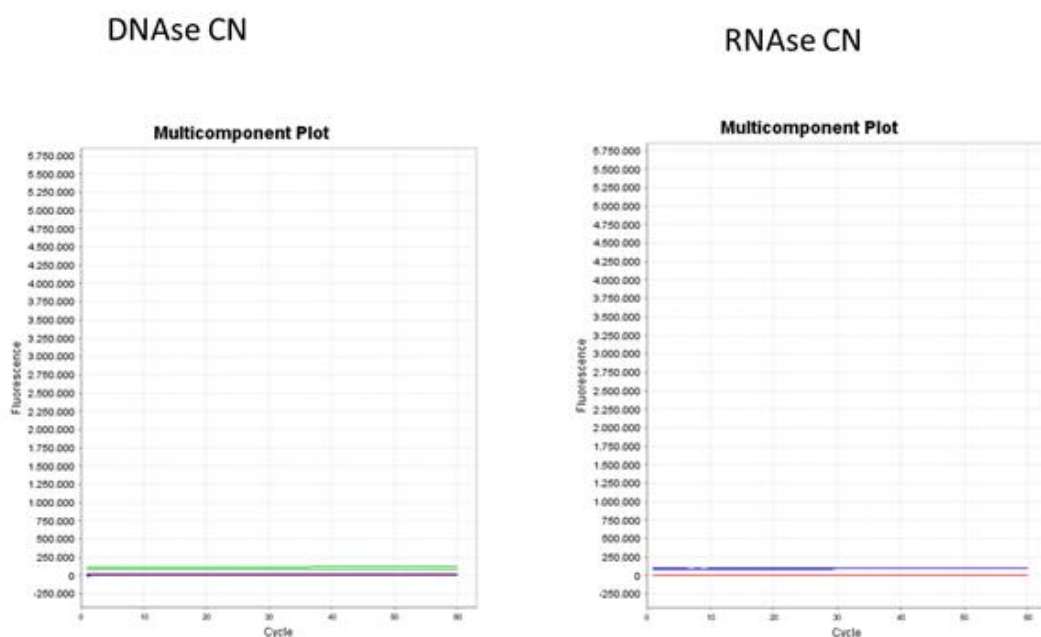


Figura 10: Controles negativos das enzimas DNase e RNase

Os controles negativos não apresentaram fluorescência significativa (FIGURA 10). Na análise visual não houve uma possível diferenciação entre as diluições (FIGURA 11). Os controles negativos apresentaram fluorescência igual às diluições.

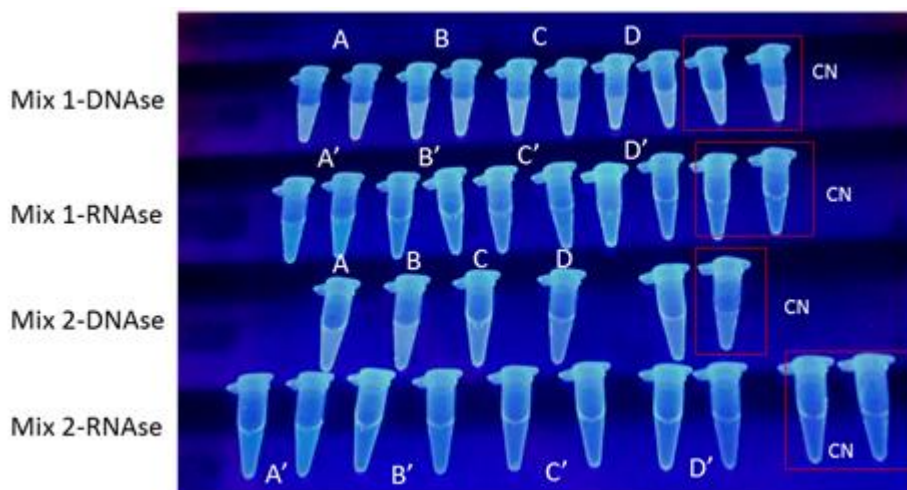


Figura 11: Análise visual das diluições para DNase e RNase, para cada Mix produzido. As letras A B, C e D referem-se às concentrações testadas, 0,4 ng/ μ L, 40 pg/ μ L, 4 pg/ μ L, 0,4 pg/ μ L respectivamente e as letras A', B', C' e D' referem-se às concentrações testadas, 5×10^5 pg/ μ L, 5×10^4 pg/ μ L, 5×10^3 pg/ μ L, 50 pg/ μ L. CN representa os controles negativos.

Foi realizado um teste nos tubos utilizados no experimento da figura 11, com a finalidade de descartar uma fluorescência própria do tubo e assim confirmar que o controle negativo apresentou contaminação. Observa-se que nos tubos vazios e

apenas com água, não houve fluorescência quando expostos à luz UV, em contrapartida o tubo contendo substrato, tampão e enzima apresentou fluorescência (FIGURA 12).

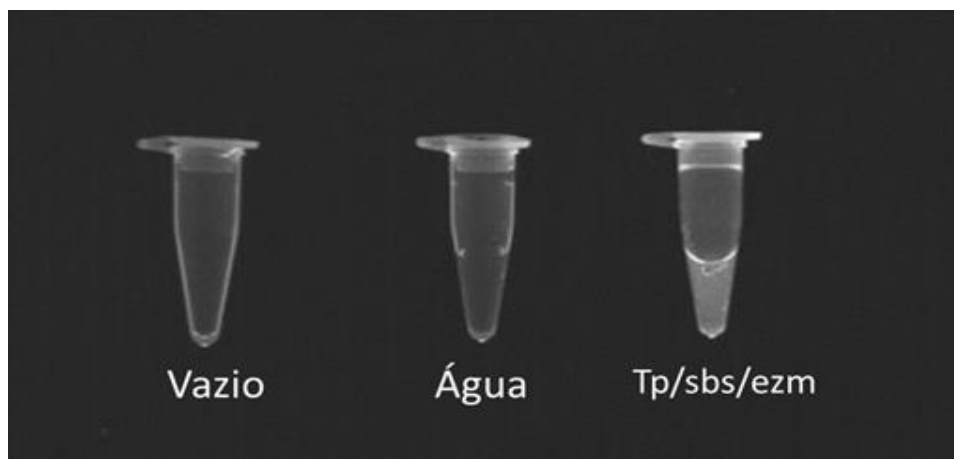


Figura 12: Análise de fluorescência dos tubos expostos à luz UV. Tb/ sbs/enzm refere se ao tubo contendo tampão, substrato e enzima

Para diferenciar a fluorescência basal dos controles negativos, no teste em tempo real, foram exportados os dados de valores de fluorescência e plotados em gráfico de barras para melhor visualização (FIGURA 13, FIGURA 14). Apenas os valores das 3 últimas diluições, de concentração igual a 40 pg/μL, 4 pg/μL, 0,4 pg/μL para DNase e 5x 10⁴ pg/μL, 5x 10³ pg/μL, 50 pg/μL para RNase, foram usados, pois a primeira diluição apresentou uma quantidade alta de fluorescência, interferindo na visualização gráfica das últimas diluições. Os valores foram tratados estatisticamente com Teste T de *Student*.

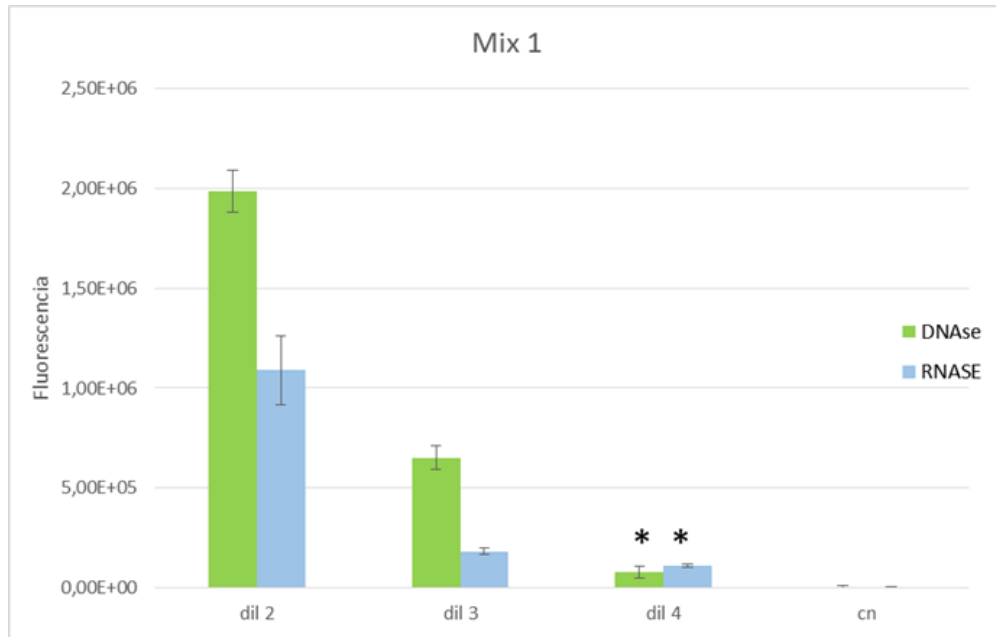


Figura 13: Gráfico da quantidade de fluorescência conforme a diluição, utilizando o Mix 1. A quantidade de fluorescência na última diluição em ambas as enzimas possui $P < 0,05$, sendo significativo em relação ao controle negativo (CN). A diluições referem-se à concentração de 40 pg/μL, 4 pg/μL, 0,4 pg/μL para DNase e 5×10^4 pg/μL, 5×10^3 pg/μL, 50 pg/μL para RNase, respectivamente.

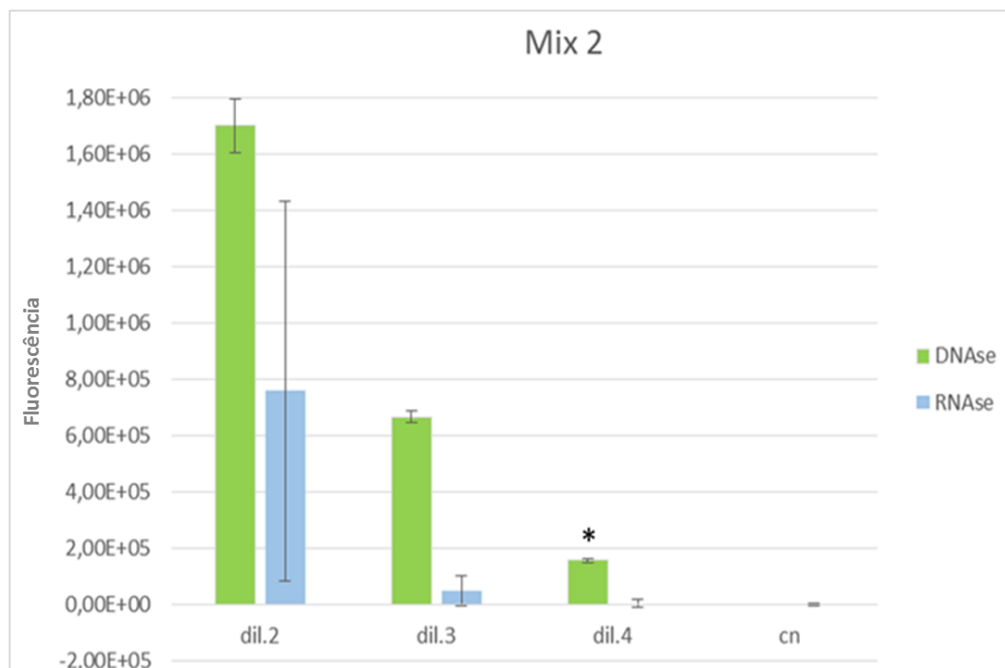


Figura 14: Gráfico da quantidade de fluorescência conforme a diluição, utilizando o Mix 2. A quantidade de fluorescência na última diluição para a DNase apresentou $P < 0,05$, sendo significativo em relação ao controle negativo. Porém, a última diluição de RNase apresentou $P > 0,05$, desta forma não significativo em relação ao controle negativo (CN). A diluição refere-se à concentração de 0,4 ng/μL, 40 pg/μL, 4 pg/μL, 0,4 pg/μL para DNase e 5×10^5 pg/μL, 5×10^4 pg/μL, 5×10^3 pg/μL, 50 pg/μL para RNase, respectivamente.

Para analisar a metodologia de recuperação das enzimas, foi utilizada inicialmente a enzima RNase, pois esta apresenta maior volume disponível no kit. Por

conta do baixo volume da DNase, foi proposto um teste com enzimas comerciais de outros fornecedores. Os métodos utilizados, conforme descritos no item 4.2, foram de incubação em estufa e análise visual e em PCR em Tempo Real. Porém, utilizou-se apenas a análise em tempo real para análise estatística mais precisa, seus resultados foram plotados no gráfico a seguir (FIGURA 15).

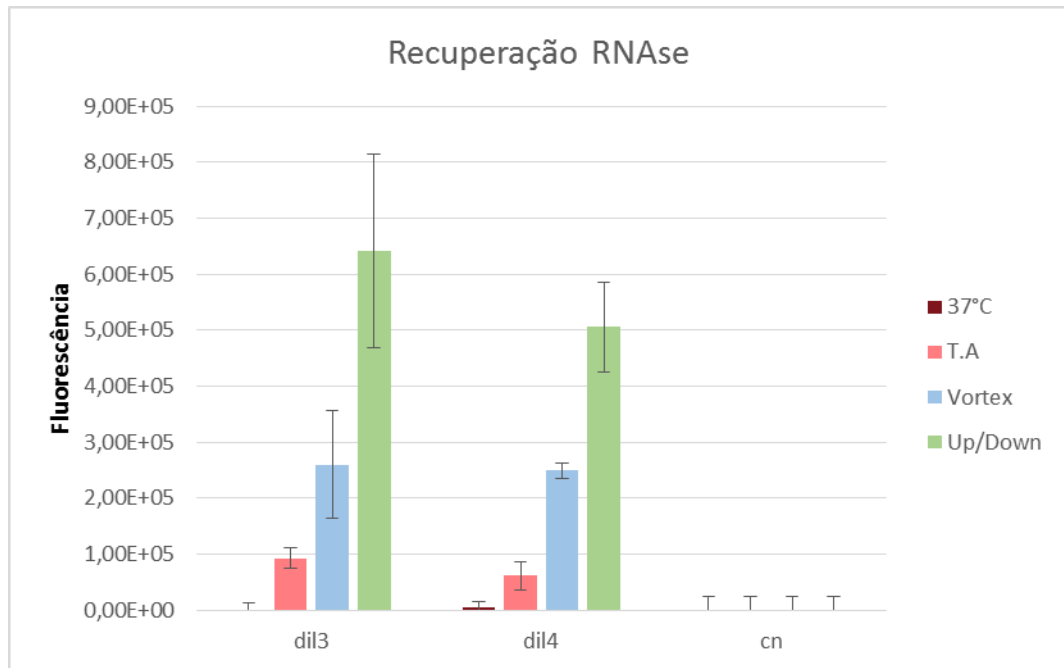


Figura 15: Gráfico de Análise de metodologia para recuperação de DNase e RNase em tubos de embalagem primária. Os testes à temperatura ambiente, vortex, e up/down apresentaram $P < 0,05$, assim sendo significativo em relação ao controle negativo (CN). A concentração da enzima utilizada foi de 5×10^{-3} U/ μ L e 5×10^{-4} U/ μ L respectivamente.

Na análise visual, não foi possível distinguir fluorescência entre as amostras, já que se apresentou próxima ao controle negativo (FIGURA 16), desta forma, a análise em tempo real apresentou maior eficácia em determinar fluorescências produzidas pela atividade das nucleases.

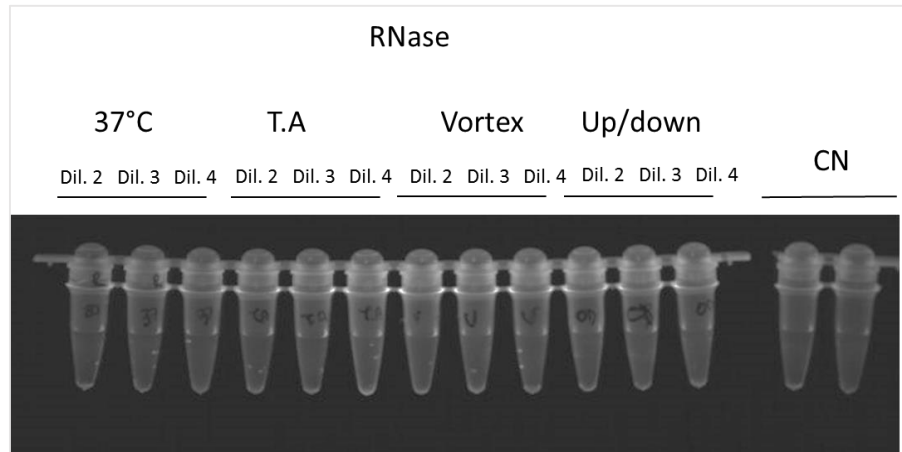


Figura 16: Análise visual das metodologias utilizadas para recuperação das enzimas DNase e RNase. Não foi possível observar diferença entre as fluorescências, assim como todas se apresentaram próximas ao controle negativo (CN). A concentração da enzima utilizada foi de 5×10^{-2} U/ μ L, 5×10^{-3} U/ μ L, 5×10^{-4} U/ μ L respectivamente..

As enzimas comerciais utilizadas foram DNase I da Roche, RNase A da Qiagen e RNase A da Thermo. As RNases A testadas apresentaram uma quantidade de fluorescência elevada, impossibilitando a diferença visual entre as diluições testadas (FIGURA 17 E 18).

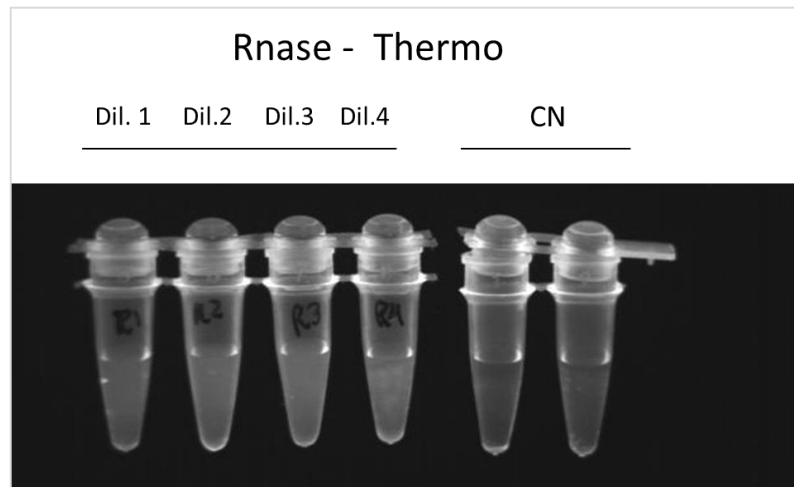


Figura 17: Análise visual de fluorescência utilizando enzima RNase A proveniente do fabricante Thermo Fisher. As concentrações referentes às diluições são 10 ng/ μ L (Dil. 1), 1 ng/ μ L (Dil. 2), 0,1 ng/ μ L (Dil. 3) e 0,01 ng/ μ L (Dil. 4). Controle negativo (CN).

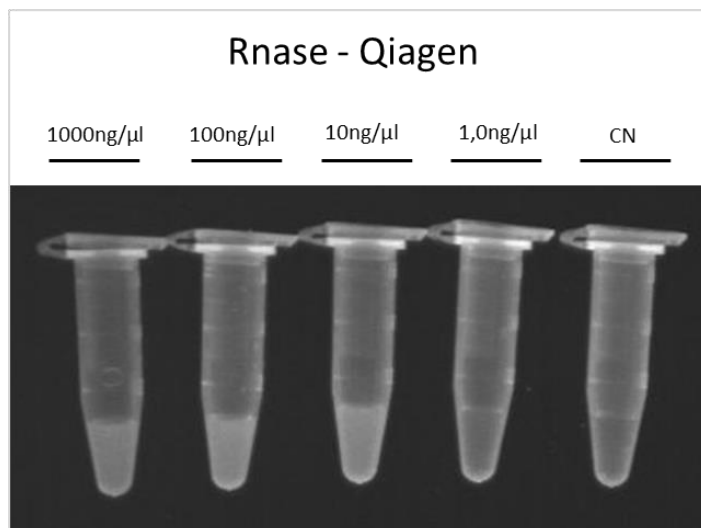


Figura 18: Análise visual de fluorescência utilizando enzima RNase A proveniente do fabricante Qiagen. As concentrações referentes às diluições são 10 ng/μL (Dil. 1), 1 ng/μL (Dil. 2), 0,1 ng/μL (Dil. 3) e 0,01 ng/μL (Dil. 4). Controle negativo (CN).

Este mesmo resultado é visto em análise de tempo real (FIGURA 19 e 20), onde a quantidade de RFU detectada para ambas RNase A é alta. Entretanto, a enzima RNase A da Thermo Fisher apresentou melhor distribuição entre as diluições.

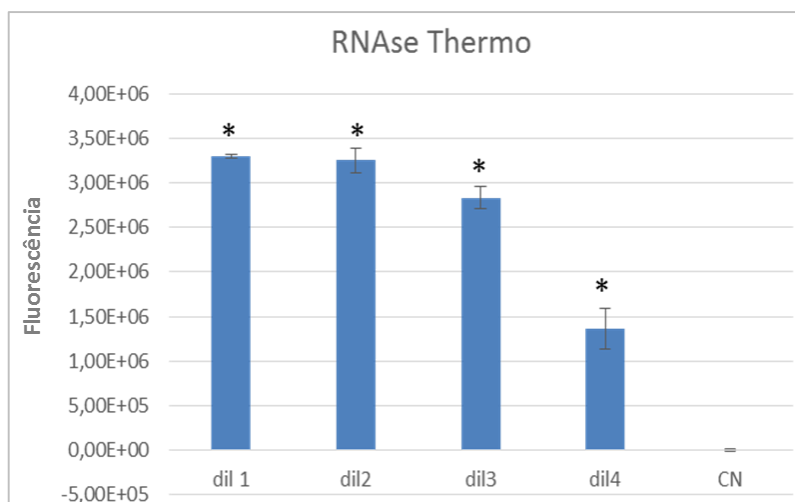


Figura 19: Gráfico da análise em Tempo Real da enzima RNase A do fabricante Thermo Fisher. Todas as diluições apresentaram $P < 0,05$, sendo então significativas em relação ao controle negativo (CN). As concentrações referentes às diluições são 10 ng/μL (Dil. 1), 1 ng/μL (Dil. 2), 0,1 ng/μL (Dil. 3) e 0,01 ng/μL (Dil. 4).

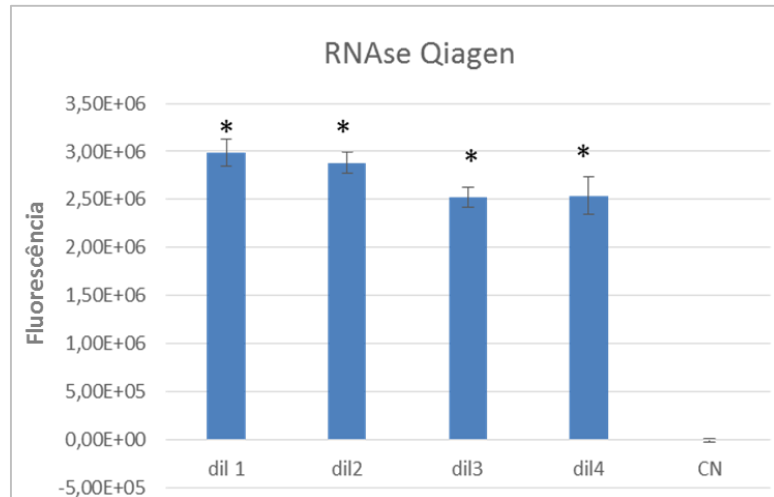


Figura 20: Gráfico da análise em Tempo Real da enzima RNase A do fabricante Qiagen. Todas as diluições apresentaram $P < 0,05$, desta forma significativa ao controle negativo (CN). As concentrações referentes às diluições são 10 ng/ μ L (Dil. 1), 1 ng/ μ L (Dil. 2), 0,1 ng/ μ L (Dil. 3) e 0,01 ng/ μ L (Dil. 4).

Apesar de visualmente não ser possível observar uma fluorescência alta (FIGURA 21), na análise em tempo real foram obtidos resultados significativos em relação ao controle negativo, com $P < 0,05$, mesmo com menor valor de RFU em comparação às RNases (FIGURA 22).

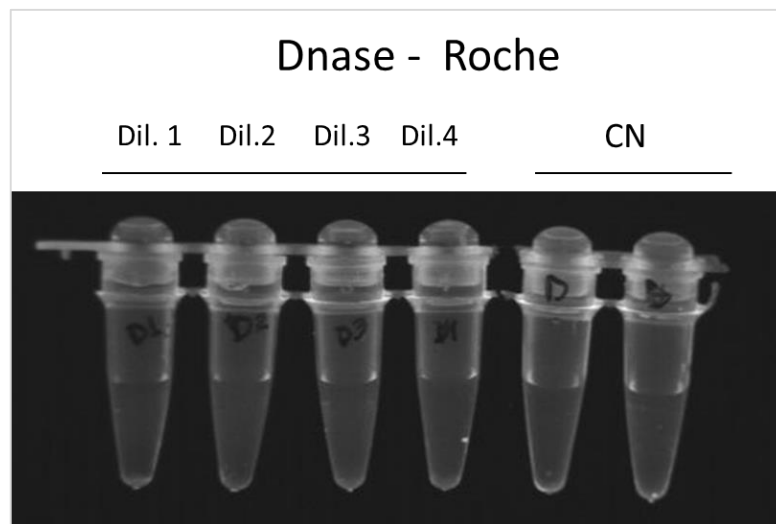


Figura 21: Análise visual de fluorescência utilizando enzima DNase I proveniente do fabricante Roche. As concentrações referentes às diluições são 5 ng/ μ L (Dil. 1), 0,5 ng/ μ L (Dil. 2), 0,05 ng/ μ L (Dil. 3) e 0,005 ng/ μ L (Dil. 4). Controle negativo (CN).

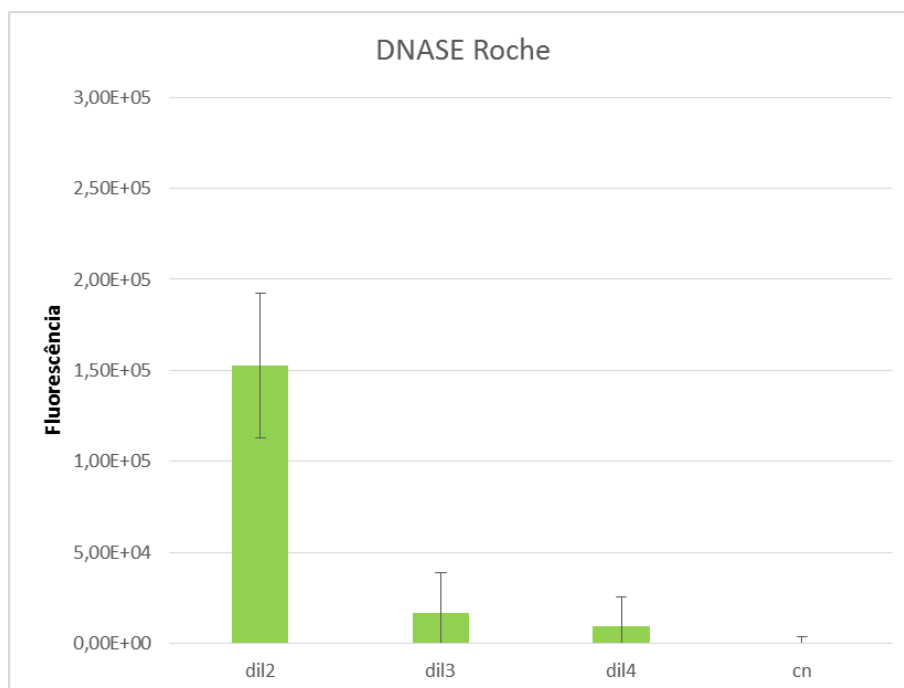


Figura 22: Gráfico da análise em Tempo Real da enzima DNase I do fabricante Roche. Todas as diluições apresentaram $P < 0,05$, desta forma significativa ao controle negativo (CN). As concentrações referentes às diluições são 0,5 ng/ μ L (Dil. 2), 0,05 ng/ μ L (Dil. 3) e 0,005 ng/ μ L (Dil. 4).

Para a realização do teste de DNase e RNase em conjunto, formando um duplex, o que otimiza o tempo do teste, foram utilizadas as enzimas DNase I proveniente do fabricante Roche, e RNase A da Thermo Fisher, pois o kit DNaseAlert™ vem com apenas 20 μ L da enzima DNase I para o controle positivo. Para não causar a falta deste insumo para o LCQ, optou-se por utilizar as enzimas comerciais testadas anteriormente.

Apesar de ser uma reação em conjunto, os dados foram analisados separadamente, pois a quantidade de RFU para DNase é menor que a obtida para RNase, causando uma divergência no gráfico. Ambas enzimas apresentaram fluorescência até a última diluição, com valor significativo ao controle negativo ($p < 0,05$) (FIGURA 23 E 24).

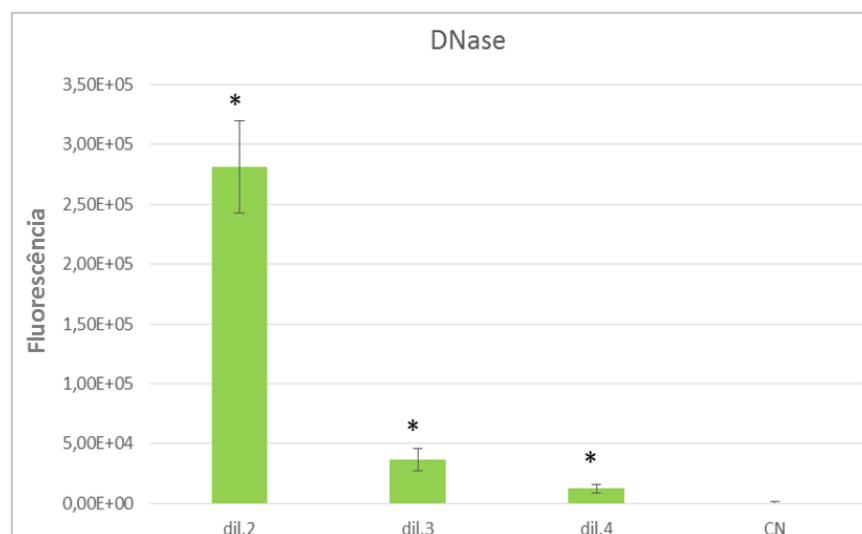


Figura 23: Gráfico da análise em tempo real da enzima DNase I em reação duplex. As concentrações referentes às diluições são 0,5 ng/μL (Dil. 2), 0,05 ng/μL (Dil. 3) e 0,005 ng/μL (Dil. 4). Todas as diluições apresentaram valores significativos em relação ao controle negativo (CN) ($P < 0,05$).

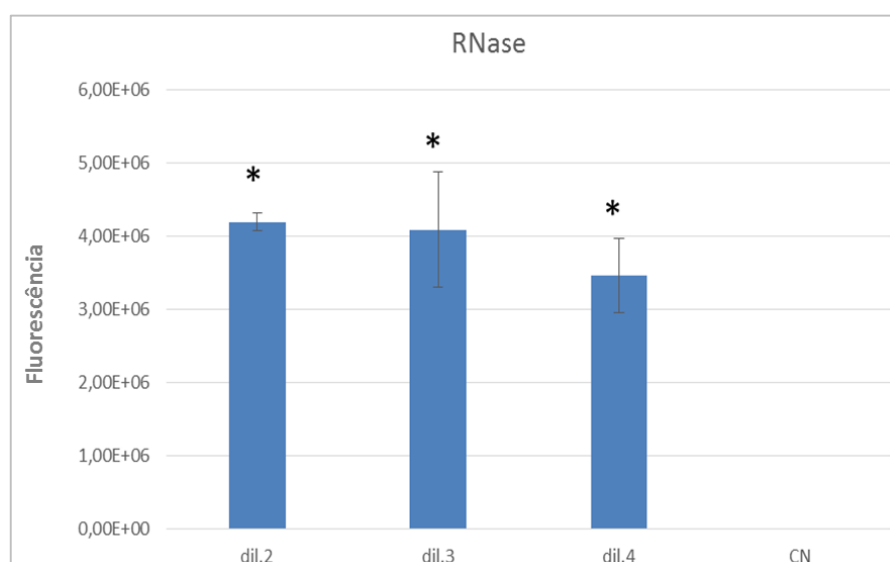


Figura 24: Gráfico da análise em tempo real da enzima RNase em reação duplex. As concentrações referentes às diluições são 1 ng/μL (Dil. 2), 0,1 ng/μL (Dil. 3) e 0,01 ng/μL (Dil. 4). Todas as diluições apresentaram valores significativos em relação ao controle negativo (CN) ($P < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Um dos principais problemas de contaminação nos laboratórios de biologia molecular é a presença de nucleases, pois devido sua atividade nucleolítica, levam a resultados insatisfatórios dos testes realizados. Industrialmente, o monitoramento da

qualidade dos materiais utilizados na produção de insumos, que são aplicados às técnicas moleculares, é um trabalho contínuo para o setor de controle de qualidade, pois apesar da aquisição de materiais com especificação nucleases *Free*, é necessário certificar que os lotes recebidos encontram-se dentro da qualidade esperada. No caso das rotinas de testes em biologia molecular, este tipo de contaminação pode ocasionar resultados falsos negativos. Ocorrendo uma contaminação, há um trabalho árduo para sua eliminação pois, principalmente RNases, são capazes de suportar tratamentos agressivos de limpeza (WALTER, 2004).

A utilização de sondas constituídas por oligonucleotídeos conjugadas com fluorescência (FRET) foi inicialmente para estudar propriedades catalíticas da RNase A (JAMES, 1998). Os kits *RNaseAlert® Lab Test Kit*, *DNaseAlert™ QC System*, utilizam esta metodologia para a detecção destas enzimas. Atualmente, estes kits são utilizados para realização de testes internos para a verificação de ausência destas enzimas em algumas soluções produzidas no IBMP, porém, ainda era necessário avaliar os materiais, como tubos de embalagem primária utilizados no processo de fabricação de insumos. Com este trabalho, adaptou-se uma metodologia com a finalidade de analisar e garantir que estes materiais estejam livres de nucleases.

Em um primeiro momento, foi avaliada a possibilidade de analisar visualmente este teste, e posteriormente com a utilização do equipamento *ABI 7500 Real Time PCR System*, que apresenta um bloco de aquecimento e um sistema de lentes para a detecção de fluorescência conforme seu comprimento de onda, sendo possível a sua adaptação para realização do teste. A sensibilidade obtida nos testes realizados foi de aproximadamente 50 pg/μL para RNase e de 0,4 pg/μL de DNase com a utilização da Reação 1 (ITEM 4.2). Os valores limites de detecção exposto pelo fabricante é de 1 pg/μL para DNase, e de 0,5 pg/μL para RNase, logo para detectar a DNase, conseguimos uma sensibilidade maior que o apresentado pelo fabricante, porém a RNase é necessário uma diluição maior para garantir que o teste esteja dentro da faixa limite de detecção do fabricante (*RNaseAlert® Lab Test Kit*, 2008; *DNaseAlert™ QC System*, 2009).

As curvas produzidas pela quantidade de fluorescência por ciclo, também correspondem com o esperado de acordo com o manual do fabricante, porém, a metodologia utilizada por eles foi uma leitura em um espectrômetro de fluorescência convencional. O fabricante não garante que a utilização de equipamentos como o ABI

7500 *Real-Time PCR System* apresente resultados satisfatórios ou um protocolo adequado, porém, neste trabalho conseguimos reproduzir este resultado com o equipamento utilizado normalmente para técnicas de qPCR.

Para conseguir adequar um protocolo, foi realizado duas reações, uma com os volumes propostos pelo fabricante e outro com os volumes utilizados no teste padrão interno (ITEM 4.2). A reação preparada com os volumes propostos pelo fabricante apresentou resultados insatisfatórios, quando analisados em tempo real, perdendo a uniformidade entre as triplicatas, assim como a sensibilidade para RNase, que apresentou resultado não significativo em relação ao controle negativo (FIGURA 14). Visualmente, a reação 1 apresentou maior quantidade de fluorescência e maior dificuldade de distinguir as diferentes concentrações das enzimas. Já a reação 2 apresentou uma melhor análise das diluições, apesar de um grau de fluorescência menor (FIGURA 11).

No volume sugerido pelo fabricante a quantidade é 10 vezes menor à quantidade utilizada pelo LCQ. É possível que a quantidade de tampão na reação influencie a atividade da enzima, uma vez que, estas são dependentes de cátions divalentes para que decorra sua atividade (LASKOWSKI, 1971; BARANOVSKII et al, 2004; WESTHEIRMER, 1987).

A última diluição, preparada com a reação 1 demonstrada no item 4.2, que contem 10 vezes mais quantidade de tampão em relação à reação 2, apresentou resultados significativos em relação ao controle negativo ($P < 0,05$), indicando que a quantidade de fluorescência obtida é superior à fluorescência basal (FIGURA 13). Entretanto, os controles negativos, ao ser analisados visualmente, apresentaram fluorescência ao ser exposto à luz UV. Na preparação das reações, ambas foram pipetadas para a análise visual e por tempo real em fluxo laminar, visando não contaminar dos controles negativos. As diluições contendo as enzimas, foram pipetadas fora do fluxo. Logo, as reações ao serem analisadas em equipamento de PCR não apresentaram fluorescência. Desta forma, é possível que os tubos utilizados possam estar contaminados, e assim há indícios que a análise visual para os métodos, tanto para DNase como para RNase, sejam capazes de detectar a contaminação nos materiais. Para excluir a possibilidade dos tubos utilizados apresentarem fluorescência do próprio material quando exposto a luz UV, foi realizado um teste com um tubo vazio, outro contendo apenas água e um terceiro com substrato, tampão e enzima, com isso foi possível observar que apenas o tubo contendo substrato, tampão

e enzima apresentaram (FIGURA 12), garantindo assim que o material que compõe os tubos não interfere nos resultados.

Um ponto negativo da análise visual é a sua subjetividade, pois a interpretação dos resultados depende diretamente do posicionamento do tubo no transluminador e o tipo de lâmpada UV utilizada, assim como a dificuldade de, quando a concentração da enzima é baixa, diferenciar a fluorescência dos controles negativos (POMPA, 2016).

Para realizar a recuperação da enzima RNase, o método onde o tubo com água foi submetido a incubação por 30 minutos a 37°C não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo ($P > 0,05$), indicando uma perda de sensibilidade. Isso pode ser explicado pelo fato de que as proteínas podem desnaturar conforme temperatura à qual elas são submetidas. No caso das enzimas, pode ocorrer perda de atividade. As RNases possuem resíduos de cisteína, formando ligações dissulfeto intramolecular, desta forma, quando ocorre a desnaturação estas enzimas possuem a capacidade de recuperar a sua forma nativa e sua atividade, quando expostas à temperatura ambiente (Thermo Fisher, 2015; WALTER, 2004; MIYAMOTO, et al, 2009). A exposição por 30 minutos em 37°C antes da reação, pode ter interferido na sua atividade, e necessitaria de um tempo em temperatura ambiente para uma possível recuperação da sua atividade (WALTER, 2004). Outra possibilidade é o tempo que a enzima ficou exposta a 37°C, pois a corrida em tempo real é dada por 1 hora à 37°C, resultando ao final em uma exposição total de 1 hora e 30 minutos. Já as análises em temperatura ambiente, vortex e agitação *Up/Down* apresentaram resultados significativos em comparação ao controle negativo (FIGURA 15). A metodologia utilizando agitação *Up/Down* apresentou resultado com maior eficiência em comparação aos outros.

As enzimas comerciais utilizadas, RNase Thermo Fisher Scientific, RNase Qiagen e DNase Roche, demonstraram que os Kits apresentam um espectro amplo de detecção de DNases e RNases, não se limitando aos presentes como controle positivo em cada Kit. Quando analisadas visualmente, as reações com enzimas comerciais não apresentaram uma boa fluorescência das amostras. Frente a isso, optou-se pela utilização do equipamento de qPCR para obtenção de resultados mais robustos, onde é possível visualizar melhor a diferença entre a menor concentração de enzimas e o controle negativo. O fabricante garante uma detecção para DNase de 1 pg (*DNaseAlert™ QC System*, 2009) e, utilizando enzimas comerciais de outros fabricantes, detectamos 5 pg da enzima com alto grau de fluorescência, não foi

realizado uma diluição abaixo disso, sendo então uma proposta futura para garantir que não houve perda de sensibilidade. Para a RNase, o valor referência de detecção é de 0,5 pg, segundo o fabricante (RNaseAlert® Lab Test Kit, 2008), já o teste com as enzimas comerciais detectou 10 pg . Diluições menores serão realizadas para poder se comprovar a sensibilidade. Mas é possível dizer que o uso das enzimas comerciais não interfere na atividade do teste, sendo possível sua utilização.

Ao realizar a reação em duplex, observou-se que a quantidade de RFU produzida pela RNase era superior ao observado para DNase, pois as diluições utilizadas foram diferentes, sendo a da DNase com valores de concentração menor em relação à RNase. Entretanto, mesmo com a maior fluorescência, a RNase não afetou a identificação da DNase. Para este teste foram utilizadas enzimas comerciais RNase Thermo Fischer e DNase Roche. Não é possível analisar visualmente ambas as enzimas ao mesmo tempo com esta metodologia visual, pois não é possível diferenciar as fluorescências nesse caso.

7.CONCLUSÃO

A necessidade de certificar embalagens primárias livres de RNase e DNase a fim de garantir a qualidade de insumos produzidos, levou o LCQ a buscar uma metodologia que garantisse a detecção destas enzimas nesses materiais. Portanto, com trabalho realizado, foi possível detectar com maior precisão, com a análise em tempo real, presença de fluorescência produzida pela hidrólise das sondas pelas nucleases. A otimização do teste utilizando uma reação em duplex, apresentou resultados satisfatórios, possibilitando uma melhor economia de insumos e tempo de preparo do teste, sem perder a sensibilidade para ambas enzimas. A validação para posterior implementação do método na rotina são as perspectivas futuras desse trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ARORA, Satyam; DODA, Veena; KIRTANIA, Tapanidhi. Sensitivity of individual donor nucleic acid testing (NAT) for the detection of hepatitis B infection by studying diluted NAT yield samples. **Blood transfusion**, v. 13, n. 2, p. 227, 2015.

BARANOVSKII, A. G.; BUNEVA, V. N.; NEVINSKY, G. A. Human deoxyribonucleases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 6, p. 587-601, 2004.

BARBARA, John AJ. NAT: perspectives for cellular components. **Biologicals**, v. 27, n. 4, p. 333-336, 1999.

BARTLETT, John MS; STIRLING, David. A short history of the polymerase chain reaction. **PCR protocols**, p. 3-6, 2003.

BASSO, D. et al. Serum deoxyribonuclease and ribonuclease in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. **Tumori**, v. 71, n. 6, p. 529-532, 1985.

BUSCH, M. P. et al. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. **Transfusion**, v. 40, n. 2, p. 143-159, 2000.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARDOSO, M. S.; KOERNER, K.; KUBANEK, B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. **Transfusion**, v. 38, n. 10, p. 905-907, 1998.

CASTRO GALLEGOS, Jessica et al. A human ribonuclease induces apoptosis associated with p21WAF1/CIP1 induction and JNK inactivation. **BMC Cancer**, 2011, vol. 11, núm. 9, 2011.

CHOI, Suk-Jung; SZOKA, Francis C. Fluorometric determination of deoxyribonuclease

I activity with PicoGreen. **Analytical biochemistry**, v. 281, n. 1, p. 95-97, 2000.

CHOU, Min-Yuan; LIAO, Ta-Hsiu. Shrimp hepatopancreatic deoxyribonuclease—purification and characterization as well as comparison with bovine pancreatic deoxyribonuclease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1036, n. 2, p. 95-100, 1990.

COHEN, Stanley N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973.

OLIVEIRA, Ana Elisabete Pereira Correia de. Controlo de Qualidade de PCR-Controlo interno e HACCP. 2009.

DODD, R. Y.; NOTARI, EP 4th; STRAMER, S. L. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. **Transfusion**, v. 42, n. 8, p. 975-979, 2002.

FANG, Evandro Fei; NG, TziBun. Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1815, n. 1, p. 65-74, 2011.

Fondazione Istituto Italiano Di Tecnologia. Pier Paolo Pompa et al. **Method for the colorimetric detection of contamination with nucleases**. WO. Pat. 2016097952 A1. 23 jun. 2016.

GUTTE, Bernd; MERRIFIELD, R. B. The synthesis of ribonuclease A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 6, p. 1922-1941, 1971.

HIGUCHI, Russell et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HUDLOW, William R. et al. A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the

presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing. **Forensic Science International: Genetics**, v. 2, n. 2, p. 108-125, 2008.

Integrated Dna Technologies, Inc. Joseph Alan Walder, et al. **Compositions and methods for visual ribonuclease detection assays**. U.S. Pat. 6,773,885. 10 ago. 2004.

JACKSON, Brian R. et al. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations. **Transfusion**, v. 43, n. 6, p. 721-729, 2003.

JAMES, D. Andrew; WOOLLEY, G. Andrew. A fluorescence-based assay for ribonuclease A activity. **Analytical biochemistry**, v. 264, n. 1, p. 26-33, 1998.

KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.

LIMA, D. S. Estudo Comparativo de Metodologias de Triagem para HIV e HCV em Doadores de Sangue. **Academia de Ciência e Tecnologia. Brasília**, 2011.

MACANOVIC, M.; LACHMANN, P. J. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 108, n. 2, p. 220-226, 1997.

MACANOVIC, M.; LACHMANN, P. J. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 108, n. 2, p. 220-226, 1997.

MACHUCA, Ana; HEWLETT, Indira. Riesgo residual de transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en bancos de sangre e impacto del cribado con pruebas de detección de ácidos nucleicos. **Medicina clínica**, v. 121, n. 11, p. 418-425, 2003.

MACKAY, Ian M. et al. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**, p. 1-39, 2007.

MANNHERZ, Hans Georg et al. Crystallization of cytoplasmic actin in complex with deoxyribonuclease I. **Biochemical Journal**, v. 225, n. 2, p. 517-522, 1985.

MENDES, Maria Elizabete et al. The importance of water quality in clinical laboratory reagent. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 3, p. 217-223, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Implantação e rotina dos testes de ácidos nucleicos (NAT) em serviços de hemoterapia – manual operacional / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. *Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. 1. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 80 p.*

MISHRA, Nawin C. **Nucleases: molecular biology and applications**. Wiley-Interscience, 2002.

MIYAMOTO, Toru; OKANO, Shinya; KASAI, Noriyuki. Irreversible thermoinactivation of ribonuclease-A by soft-hydrothermal processing. **Biotechnology progress**, v. 25, n. 6, p. 1678-1685, 2009.

MORIKAWA, Norihiro et al. Serum deoxyribonuclease I activity can be used as a novel marker of transient myocardial ischaemia: results in vasospastic angina pectoris induced by provocation test. **European heart journal**, v. 28, n. 24, p. 2992-2997, 2007.

OLIVEIRA, Tânia Maria dos Santos. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

PERSANO, Stefano; VECCHIO, Giuseppe; POMPA, Pier Paolo. A hybrid chimeric system for versatile and ultra-sensitive RNase detection. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

PETRY, Andrea et al. Implantação dos testes de amplificação de ácidos nucléicos

HIV/HCV Bio-Manguinhos na triagem de doadores de sangue: questões epidemiológicas e logísticas. 2013.

RABELO, Roberta Buarque et al. A comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS: um balanço dos primeiros anos de atuação. **Gestão e Saúde**, v. 6, n. 4, p. Pág. 3225-3240, 2015.

RAINES, Ronald T. Ribonuclease a. **Chemical reviews**, v. 98, n. 3, p. 1045-1066, 1998.

SAENGER, Wolfram. Structure and catalytic function of nucleases: Current opinion in structural biology 1991, 1: 130–138. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 1, n. 1, p. 130-138, 1991.

SATO, Shinobu; TAKENAKA, Shigeori. Highly Sensitive Nuclease Assays Based on Chemically Modified DNA or RNA. **Sensors**, v. 14, n. 7, p. 12437-12450, 2014.

SCHEIN, Catherine H. **Nuclease methods and protocols**. Springer Science & Business Media, 2001.

SHIOKAWA, Daisuke et al. Characterization of two DNase γ -specific monoclonal antibodies and the in situ detection of DNase γ in the nuclei of apoptotic rat thymocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 2, p. 343-349, 2000.

TOCK, Mark R.; DRYDEN, David TF. The biology of restriction and anti-restriction. **Currentopinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 466-472, 2005.

WESTHEIMER, Frank H. Why nature chose phosphates. **Science**, v. 235, n. 4793, p. 1173-1178, 1987.