

**MANUAL DE PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO**

**IMUNOGERONTOLOGIA E BIOLOGIA
MOLECULAR APLICADA AO
EXERCÍCIO**

APRESENTAÇÃO

O laboratório de Imunogerontologia e Biologia Molecular Aplicada ao Exercício, está equipado para atender rotinas de projetos de pesquisa e aulas práticas. Este laboratório está vinculado aos cursos de graduação em Biomedicina, Ciências Biológicas, Educação física, Farmácia, Medicina, Mestrado em Gerontologia, Mestrado e Doutorado em Educação Física da Universidade Católica de Brasília (UCB) e Mestrado e Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia. O espaço e a infraestrutura também são disponibilizados aos alunos de Iniciação Científica e alunos de Mestrado e Doutorado em Ciências Médicas e Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), para realização de seus trabalhos de pesquisa.

Está localizado no Campus I da Universidade Católica de Brasília, no Bloco São Gaspar Bertoni, salas M-223/M-224. Conta com uma área total de 69,63 m² / 70,34m² respectivamente, sendo todo espaço de uso comum (com bancadas, pias, equipamentos, armários, reagentes de uso comum, sala de informática e mobiliário) e equipamentos especializados para projetos específicos, tais como freezer -80°C, PCR em tempo Real, estufas de esterilização e bacteriológico, termocicladores, banho-maria, dentre outros.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1 – OBJETIVO..... | 5 |
| 2 – RESPONSABILIDADE | 5 |
| ✓ 2.1 CURSOS QUE UTILIZAM O LABORATÓRIO..... | 5 |
| ✓ 2.2 PESSOAS ENVOLVIDAS DIRETAMENTE COM O LABORATÓRIO..... | 6 |
| 3 – NORMAS DO LABORATÓRIO..... | 6 |
| 4 – NORMAS DEVIDO A PANDEMIA COVID-19..... | 7 |
| 5 – PLANOS DE AÇÕES..... | 7 |
| ✓ 5.1 – PLANO DE AVALIAÇÃO PERIÓDICA DOS ESPAÇOS..... | 7 |
| ✓ 5.2 - PLANO DE MANUTENÇÃO E GUARDA PATRIMONIAL..... | 8 |
| ✓ 5.3 - PLANO DE LIMPEZA E ORGANIZAÇÃO..... | 8 |
| ✓ 5.4 - PLANO DE ATUALIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS..... | 8 |
| ✓ 5.5 – AGENDAMENTO PARA AULAS PRÁTICAS..... | 8 |
| 6 - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS..... | 9 |
| PROTOCOLO PARA DILUIÇÃO DE PRIMERS (DO ESTOQUE PARA CONCENTRAÇÃO DE USO)..... | 10 |
| PARA PREPARAR ALÍQUOTAS DE USO A PARTIR DO ESTOQUE..... | 11 |
| ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,6%)..... | 11 |
| APLICAR AS AMOSTRAS..... | 12 |
| ✓ PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA | 13 |
| ✓ PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO – SALTING OUT (MODIFICADO) | 14 |
| PROCEDIMENTO TÉCNICO PARA EXTRAÇÃO DNA DE AMOSTRA DE SANGUE, SORO OU PLASMA. 16 | |
| ✓ TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA..... | 23 |
| ✓ PROTOCOLO MINI-PREP..... | 25 |
| ✓ AMPLIFICAÇÃO DE ECA POR PCR..... | 28 |
| 7 – PROCEDIMENTOS..... | 29 |
| ✓ 7.1 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL – EPI..... | 29 |
| ✓ 7.2 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA – EPC..... | 30 |
| ✓ 7.3 HIGIENIZAÇÃO/DESINFECÇÃO..... | 30 |
| ✓ 7.4 OPERAÇÕES DOS EQUIPAMENTOS..... | 30 |
| <i>Termociclador Biocycler – Modelos MJ96+ e MJ96G</i> | 30 |
| <i>PCR em Tempo Real QuantStudio 3</i> | 33 |
| <i>Estufas de secagem e esterilização modelo TE 397/2: Voltagem 220 V.</i> | 35 |
| <i>Incubadora de Bancada modelo NT712 : Voltagem 220V.</i> | 35 |
| <i>Sistema de purificação de água human UP 900 scholar UV</i> | 36 |
| <i>Leitora de ELISA modelo EL x 800 BIO-TEK</i> | 38 |
| <i>Destilador de água: voltagem 220V.</i> | 39 |
| <i>Fluxo laminar: voltagem 220V.</i> | 40 |
| <i>Autoclave: voltagem 220v</i> | 40 |
| <i>Banho-maria modelo TE 054 TECNAL 220V</i> | 41 |
| <i>Centrífuga refrigerada</i> | 41 |
| <i>Máquina de gelo</i> | 42 |
| <i>Centrifuga para tubos de coleta</i> | 42 |
| ✓ 7.5 TÉCNICAS REALIZADAS NO LABORATÓRIO..... | 46 |
| <i>Técnica de Extração de DNA:</i> | 46 |
| <i>Técnica de Eletroforese:</i> | 46 |
| <i>Técnica de PCR</i> | 47 |
| <i>Técnica de PCR em tempo real</i> | 47 |
| <i>Elisa</i> | 47 |
| ✓ 7.6 MANUSEIO DE PRODUTOS QUÍMICOS..... | 47 |
| ✓ 7.7 COLETAS, ACONDICIONAMENTO E RECOLHIMENTO DOS RESÍDUOS..... | 48 |

| | |
|--|-----|
| 8 - CONDUTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES | 49 |
| ✓ 8.1 CONTATOS DE EMERGÊNCIA..... | 49 |
| 9 - PROJETOS | 50 |
| 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 512 |

| EMISSÃO | | Data: 16/12/2022 |
|--|------------------------------|-----------------------------------|
| Elaboração: Thalyta Railine Cesar Palmeira | Assinatura ou Rubrica | Data: 16/12/2022 |
| Revisão: Thalita Tormin A. Cavalcanti | Assinatura ou Rubrica | Data: |
| Aprovação: | Assinatura ou Rubrica | Data: |

1 – OBJETIVO

Descrever de forma simples e objetiva técnicas, biossegurança, atividades e operações realizadas no laboratório.

2 – RESPONSABILIDADE

2.1 Cursos que utilizam o laboratório:

Regular

- Biomedicina
- Farmácia
- Especialização em Treinamento Físico aplicado à saúde e ao alto rendimento
- Mestrado e Doutorado em Educação Física
- Mestrado e Doutorado em Gerontologia
- Educação Física
- Odontologia
- Projeto integrado UCB/UnB

Eventual

- Biologia
- Mestrado e Doutorado em Ciências Genômicas

- Parcerias com instituições de Ensino Superior

2.2 Pessoas envolvidas diretamente com o laboratório:

- Coordenadores do laboratório
 - Prof. Dr. Thiago dos Santos Rosa
- Técnico:
 - Thalyta Railine Cesar Palmeira

3 – NORMAS DO LABORATÓRIO

- Não é permitida a presença de pessoas não autorizadas no laboratório.
- A chave do laboratório está na responsabilidade do técnico do laboratório e somente será liberada aos alunos e pesquisadores que tiverem autorização.
- É obrigatório o uso de EPI – *Equipamento de Proteção Individual* (jaleco, sapato fechado, e luvas sempre durante a realização de qualquer procedimento além de gorro e máscara caso se faça necessário) dentro do laboratório (Portaria da reitoria nº 143 NR06).
- Todos os alunos que utilizarem o laboratório devem ser orientados pelo professor e técnico quanto ao seu funcionamento antes do início das atividades no laboratório.
- É proibida a entrada e o consumo de qualquer tipo de alimento ou bebida.
- Após os procedimentos realizados no laboratório o aluno deverá deixá-lo limpo e organizado, e verificar se desligou todos os equipamentos que utilizou.
- Para manipulação de Brometo de Etídio é necessário à utilização de luva nitrílica ao invés da luva de látex, fornecida pelo técnico apenas para pesquisadores e professores.
- A manipulação do Brometo de Etídio e a confecção do gel de agarose devem acontecer somente na capela de exaustão.
- Todos materiais utilizados nos procedimentos de eletroforese estão devidamente identificados e não devem ser utilizados em outros procedimentos do laboratório.
- Tampão TAE 1X utilizado nas eletroforeses não deve ser descartado na pia. Após o uso deve ser colocado em frasco específico e previamente identificado e disponibilizado pelo técnico. O descarte será realizado somente pelo técnico do laboratório.

- O descarte do gel de agarose é feito nos frascos identificados.
- Os descartes dos demais reagentes utilizados no laboratório deverão passar primeiramente pelo técnico, que auxiliará na destinação adequada.

4 – NORMAS DEVIDO A PANDEMIA COVID-19

- Sempre utilizar máscara de proteção, de preferência com face shield
- Mantenha as portas e janela sempre abertas
- Respeite as demarcações de pisos e/ou bancadas
- Mantenha o distanciamento social
- Higienize sua estação de trabalho e de aula prática antes e depois do uso
- Não compartilhe materiais com os outros
- Higienize suas mãos sempre que possível, caso não tenha uma pia, utilize álcool em gel
- Ande com seu álcool em gel

5 – PLANOS DE AÇÕES

5.1 – Plano de avaliação periódica dos espaços

As verificações dos laboratórios são feitas diariamente ou semanalmente (dependendo das demandas de aulas e/ou aulas práticas) pelos técnicos responsáveis dos espaços. Qualquer problema de infraestrutura é aberto um chamado via sistema SISPREM, na qual a equipe de manutenção providencie os reparos necessários, dando maior importância para casos de emergência.

5.2 - Plano De Manutenção E Guarda Patrimonial

Os técnicos de cada espaço fazem as verificações dos equipamentos e material patrimonial. Se necessário, é feita uma calibração e limpeza externa preventiva dos equipamentos específicos, sempre no início e fim dos semestres, afim de preparar os equipamentos para os inícios das aulas práticas.

Equipamentos defeituosos são abertos requisições de manutenção enviados para a equipe do almoxarifado. Se for aprovado, o equipamento será levado por uma empresa externa e especialista no equipamento defeituoso.

Observação: Alguns equipamentos só podem ser limpos internamente e calibrados por uma empresa especializada, pois caso seja feita por qualquer outra pessoa, pode danificar, descalibrar e/ou estragar.

5.3 - Plano de limpeza e organização

Em cada andar dos blocos da Universidade, há uma equipe de higienização que ajuda nas lavagens e limpeza dos laboratórios. Esta equipe vai ao laboratório de acordo com as demandas dos espaços, com aulas práticas e monitorias. Montagem e desmontagem de aulas práticas e as limpezas de bancadas são feitas pelos técnicos responsáveis, visando melhor qualidade no conteúdo que será ministrado dentro do espaço.

5.4 - Plano de atualização dos equipamentos

Os equipamentos são catalogados em planilhas como o POP (Procedimento Operacional Padrão). Ao final de cada semestre os técnicos responsáveis anexam em planilhas a Previsão orçamentária de equipamentos que precisam ser comprados para aulas práticas.

5.5 – Agendamento para aulas práticas

Os agendamentos de aulas práticas é feito com antecedência, sendo ideal ser agendando no início do semestre para que não haja choque nos horários. A reserva é feita exclusivamente por e-mail: reservasala@ucb.br com cópia para o técnico responsável por aquele espaço. É IMPRESCINDÍVEL QUE ENVIE A RESERVA TAMBÉM

PARA O TÉCNICO DO LOCAL, POIS ELE QUE IRÁ ARRUMAR E ORGANIZAR O LABORATÓRIO.

No e-mail precisa constar algumas informações, como: Nome do professor; nome da disciplina; código da disciplina; data; horário; número do laboratório ou nome do laboratório; quantidade de alunos; e em anexo o roteiro de aula prática contendo materiais de interesse. Sem estas informações não será possível a realização da reserva.

6 - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O laboratório realizar análises em biologia molecular básica, como, PCR, Eletroforese, Digestão por enzimas de restrição para detecção de polimorfismos genéticos humanos, além de biologia molecular complexa, como extração de RNA e quantificação em tempo real (qPCR), dosagem de metilação de DNA, e ainda, realizar dosagens de mediadores inflamatórios por ELISA. Nesse sentido o laboratório fornece toda a estrutura para realização dos procedimentos (técnicas) de biologia molecular, genética e imunologia, buscando oferecer suporte para as atividades de pesquisa, extensão e ensino. Seguem o protocolo das aulas práticas:

Protocolo para preparação de dNTPs

Marcas Utilizadas: Amersham Biosciences.

- 1) O fornecedor geralmente fornece cada nucleotídeo separadamente (dATP, dCTP, dGTP, dTT) a uma concentração estoque de 100mM.
- 2) Deseja-se preparar um mix de dNTPs em que cada nucleotídeo fique na concentração final de 2,5mM.
- 3) Para preparar 500ul:

- 12,5uL de dATP
- 12,5uL de dCTP
- 12,5uL de dGTP
- 12,5uL de dTTP
- 450,0uL de H₂O ultrapura

⇒ misture invertendo os tubos várias vezes.

- 4) Rotule o tubo com a concentração de cada nucleotídeo: dNTPs 2,5mM
- 5) Dê um spin na centrífuga.
- 6) Guarde congelada na caixa apropriada Reagentes.

Protocolo para diluição de primers (do estoque para concentração de uso)

Ao receber e reconstituir o primer para formar a solução estoque

- 1) O fornecedor WMed fornece oligonucleotídeos (primers) já indicando o volume final (em uL) em que o reagente deve ser reconstituído para se obter solução 100uM.
- 2) Antes sequer de abrir o frasco pela primeira vez, centrifuge os tubos à velocidade de 12.000rpm.
- 3) Então, adicione o valor de água ultrapura (H₂O UP) indicado pelo fornecedor do primer.
- 4) Rotule o tubo com a concentração do estoque: 100uM
- 5) Dê um spin na centrífuga, e deixe ressuspendendo por 5-10 minutos em banho-maria à 65°C.

6) Guarde congelada na caixa apropriada: Primers - Estoques

OBS: Caso o fornecedor não dê o valor de Água Ultra Pura, faça o seguinte:

- Multiplique o valor da concentração do primer por 10.

Ex: [] 41,00nMoles X 10 = 410uL

Esse resultado de 410uL, é a quantidade de água que deve ser adicionado no eppendorf do primer.

PARA PREPARAR ALÍQUOTAS DE USO A PARTIR DO ESTOQUE

1) Recomenda-se que não sejam preparadas Alíquotas de Uso em volume superior a 400uL.

2) Tendo em vista que todo Estoque possui concentração de 100uM:

100uL do Estoque

+ 300uL de água ultrapura

400uL \Rightarrow concentração de uso de **25uM**.

3) Dê um spin na centrífuga

4) Mantenha no gelo enquanto estiver manipulando

5) Guardar no freezer.

Eletroforese em gel de agarose (1,6%)

1,6% -- 1,6g – 100mL

Preparo das soluções:

Agarose 1,6% (40 ml)

0,64 g de Agarose

4 ml de TAE + 36 ml de Água Destilada

1,5 ul de Brometo de Etidio

Agarose 1,6% (120 ml)

1,92 g de Agarose

12 ml de TAE + 108 ml de Água Destilada

4,5 ul de Brometo de Etidio

Obs - Composição do TAE: Tris-base, Acido Acético-Glacial, EDTA e H₂O.

Preparo da Cuba

Deixá-la montada antes de começar o preparo do gel. Com exceção dos pentes, que deverão ser colocados somente que o gel já estiver na cuba.

Procedimentos

⇒ Pesar 0,64 g (ou 1,92 g) de agarose

⇒ Medir 4 ml TAE + 36 ml H₂O destilada

⇒ Misturar a solução 40 ml ao 0,64 g agarose

⇒ Esquentar no microondas até que os cristais de agarose sejam dissolvidos (1'30'')

⇒ Adicionar 1,5 ul de brometo de etidio (**Fazer esse procedimento na CAPELA**)

Obs: Deixar esfriar um pouco o gel de agarose para não danificar a forma. Mas fique atento para o gel não solidificar no erlenmeyer.

⇒ Colocar na cuba montada e deixe solidificar.

APLICAR AS AMOSTRAS

⇒ Aplicar a totalidade das amostras: Para cada 08ul de amostra, misturar 2 ul de tampão de amostra (*para géis de agarose!*)

- ⇒ aplicar no gel, calmamente, utilizando pipeta
- ⇒ aplicar voltagem por no mínimo 30 minutos . Depois observar ao transluminador e fotografar gel.

Protocolo para Extração de DNA

Extração de DNA de Sangue Total – Método “Salting Out” (*modificado*)

Modificado de Miller et al, 1988 – NAR 16:1215

- 1- Volume Inicial de sangue 750 ul em 750 ul de Buffer A
- 2- Misturar e manter em gelo por 2 minutos
- 3- Centrifugar a 5000 RPM, durante 15 minutos
- 4- Descartar o sobrenadante **com CUIDADO para NÃO perder o pellet**
- 5- Ressuspender o pellet em 700 ul de Buffer A
- 6- Centrifugar a 5000 RPM, durante 15 minutos
- 7- Descartar o sobrenadante **com CUIDADO para NÃO perder o pellet**
- 8- Ressuspender o pellet em 350 ul de Buffer B
- 9- Adicionar 35 ul de SDS 10% e 5,5 ul de Proteinase K (10mg/ml estoque)
- 10- Incubar a 37 °C over night (ou 55 °C durante 60 minutos)
- 11- Adicionar 100 ul de NaCl Saturado (Aproximadamente 6M). Agite por 15 segundos
- 12- Centrifugar a 2500 RPM por 15 minutos
- 13- Transferir o sobrenadante para outro tubo de 1,5ml
- 14- Adicionar 2x o volume de etanol - 970 ul (gelado – 95%)
- 15- Inverter o tubo até precipitar o DNA
- 16- Centrifugar a 2500 RPM durante 2 minutos
- 17- Repetir os procedimentos 14, 15 e 16 com etanol a 70%
- 18- Descartar o etanol e deixar o restante evaporar
- 19- Adicionar 100 ul do Tampão TE
- 20- Incubar durante 1 hora em banho-maria à 37 °C
- 21- Centrifugar (spin) durante 30seg
- 22- Aplicar no Gel de Agarose à 0,6%, previamente preparado

- 23- Usar 8 ul da amostra de DNA para 2 ul do Tampão Corante
- 24- Deixar correr durante 20 à 25 minutos
- 25- Verificar a formação de bandas de DNA no transluminador (luz - UV) e quantificar as amostras.

Reagentes:

Buffer A (pH=7,6)

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 0,32 M Sacarose | 109.5 g de Sacarose |
| 10 mM ou 0,01M de Tris HCl pH 7.6 | 10 ml de Tris-HCL 1 M pH 7,6 |
| 5 mM ou 0,005M MgCl ₂ | 5 ml de MgCl ₂ 1 M |
| 1% de Triton X 100 | |

Buffer B (pH=8,0)

| | |
|--------------------------------|-------------------|
| 25 mM ou 0,025 M EDTA pH 8,0 | 50 ml EDTA pH 8,0 |
| 75 mM ou 0,075M NaCl | 40 ml NaCl 5 M |
| Complete volume para 1 litro | |
| Autoclave a solução | |
| Adicione 10 ml de Triton X 100 | |

Solução saturada de NaCl

Dissolver 35 gramas de NaCl em 100 ml (6M) de água deionizada. Se a solução não saturar, adicione 2 gramas de NaCl e misture. Repita procedimento até saturar solução.

SDS 10% (dodecilsulfato de sódio)

10 gramas de SDS
água deionizada qsp 100 ml

Proteinase K

Estoque de 10 mg/ml

Protocolo para Extração de DNA Bacteriano – Salting out (modificado)

Referências:

Casañas, et al. (2011) Specificity of a Polymerase Chain Reaction Assay of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA Used to Diagnose Human Brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20 :127–131.

Miller et al. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16:1215.

Soluções:

Solução de lise: NH₄Cl 375 mM e EDTA 120 mM

SDS 10%

Proteinase K (10 mg/mL)

Acetato de amônio 7,5M

Etanol gelado

Etanol 70% gelado

Opcionais:

Lisozima (20mg/mL)

RNase A (1 mg/mL)

Material:

Tubos eppendorf de 1,5 ml

Micropipetas e ponteiras

Banho a 55°C

Centrífuga

Procedimento:

1. Centrifugar a cultura bacteriana (2 a 10 mL) por 5 min a 10.000 rpm (centrífuga MiniSpin).
2. Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 80 µL de tampão de lise e 225 µL de água.
3. Adicionar 40 µL de SDS 10%,
* para Gram positivas adicionar 100 µL de lisozima e incubar por pelo menos 1 h.
4. Adicionar 40 µL de sol. Proteinase K, agitar com cuidado e incubar de 30 min a 1 h a 55 °C.
5. Adicionar 100 µL de sol. Acetato de amônio (temperatura ambiente), homogeneizar por inversão e centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo (aproximadamente 400 uL)
7. Adicionar 2x Vol. de etanol gelado (aprox.. 800 uL), homogeneizar por inversão.
8. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.

9. Descartar o sobrenadante e adicionar 200 μ L de etanol 70%, repetir a etapa 8.
10. Retirar todo o etanol 70% com pipeta.
11. Deixar secar na bancada, invertendo o tubo.
12. Ressuspender o DNA em 50 μ L de TE. (caso queira retirar o RNA, acrescentar RNase)

Soluções:

Todas as soluções usadas em Biologia Molecular devem ser preparadas em água ultrapura (Milli-Q) e autoclavadas, a não ser quando indicado. Qualquer dúvida, procurar o Livro:

Sambrook, J & Russel, DW (2000) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

A. Tampão TE (Tris-EDTA, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0)

Fazer uma diluição das soluções estoques de Tris-HCl 1M e EDTA 0,5 M, em H₂O.

Ex: Para 50 mL: 0,5 mL de Tris-HCl 1M + 0,1 mL de EDTA 0,5M + H₂O q.s.p. 50 mL

B. Solução SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)

Dissolver 10g de SDS em 100 mL de H₂O. A solução obtida deve ser armazenada à temperatura ambiente, não há necessidade de autoclavar.

C. Solução de NH₄Ac 7,5M (PM do NH₄Ac = 77,8)

Calcular a quantidade necessária para 7,5M ($77,8\text{g/L} = 1\text{M} \rightarrow \times 7,5 = 583,5\text{ g por L}$) no volume desejado. Esterilizar por filtração! Não autoclavar!

Ex. para 100 mL: dissolver 58,35g de NH₄Ac em H₂O.

D. Solução de Proteinase K (10 mg/mL)

Para cada mL, dissolver 10 mg. Não autoclavar!

E. Solução de Lisozima (20 mg/mL)

Para cada mL dissolver 20 mg em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Não autoclavar!

Procedimento técnico para extração dna de amostra de sangue, soro ou plasma.

(KIT QIAGEN)

Notas:

- Descongelar as amostras até a temperatura ambiente;
- Aquecer o banho-maria até 56°C, para o passo 04;
- Manter todo o procedimento a temperatura ambiente;
- Realizar a preparação dos tampões aw1 e aw2, conforme a indicação de seus respectivos rótulos (seguir a instruções do manual);
- Fazer a diluição da proteína-k (seguir a instruções do manual).

Procedimento técnico:

1. Pipetar **20µL da Protease** em um tubo de 1,5mL;
2. Adicionar **200µL da amostra** (Sangue, Plasma ou Soro);
3. Adicionar **200µL de buffer AL**, e misturar por **15 segundos (opcional** – dar um spin para baixar as gotas da tampa);
4. Incubar em banho-maria a 56°C durante **10 minutos**;
5. Dar spin apenas para baixar gotas da tampa;
6. Adicionar **200µL de etanol PA (96-100%)**, misturar por **15 segundos**, dar um spin para baixar as gotas da tampa;
7. Cuidadosamente, aplique todo o volume sobre uma coluna posicionada em um tubo coletor de 2mL. Centrifugar a **8000rpm por 1 minuto**. Descartar do tubo o filtrado (*o que passou*) e posicionar a coluna sobre outro tubo coletor novo;
8. Cuidadosamente abra a coluna e adiciona **500µL de Tampão AW1**. Centrifugue a **8000rpm por 1 minuto**. Troque o tubo coletor;
9. Cuidadosamente abra a coluna e adiciona **500µL de AW2**. Centrifugue a **14000rpm por 3 minutos**. Remova todo o líquido centrifugando uma 2ª vez. Não precisa trocar o tubo coletor;
10. Coloque a coluna em um tubo de **1,5mL novo**. Cuidadosamente, adicione **200µL de Tampão AE** ou **Água Ultra Pura**. Deixar a temperatura ambiente por **5 minutos** e centrifugar a **8000rpm por 1 minuto**;
11. Guardar o DNA.

Extração de RNA total pelo mirVANA PARIS (Life Technologies)

- Deixar preparado:**
- 2 sets de tubos cônicos 15 ml (para etapa denaturação e 1ª etapa phenol)
 - 2 sets de tubos 1,5 ml (para etapa etanol)
 - 1 set de colunas sobre tubos coletores (ou tampas adaptadas)
 - 2 set final de tubos coletores

(Incubar Denaturing Solution 2X a 37°C antes do uso e homogeneizar bem)

1. Descongele o sangue ou soro em banho-de-gelo.
 2. Distribuir 700 ul de cada amostra a 700 uL de Denaturing Solution 2X (com 2-mercaptoethanol), RT, (usar 1º set de tubos falcons).
 3. Add 5 uL de cada spike in.
 4. Vortezar bem. RT
 5. Adicionar 1400 ul de ácido fenol:clorofórmio a cada tubo.
 6. Vortezar por 30 a 60 seg, RT.
 7. Distribuir a mistura em 2 tubos de eppendorf 1,5 mL.
 8. Centrifugar por 5 min à velocidade máxima ($\geq 10.000g$), RT.
 9. Transfira a fase aquosa unindo as duplicatas em um novo tubo falcon, e anote o volume.
⇒ Cuidado para não transferir a fase orgânica junto. Despreze a interface, se necessário.
 10. Adicione álcool 100% (RT) ao filtrado (2/3 do volume anotado; ver tabela no verso).
 11. Vortezar brevemente (ou agitar com a pipeta), RT.
 12. Adicionar mistura em coluna (até 700 ul) (usar 1º set de colunas posicionadas sobre tubos coletores).
 13. Centrifugar por 30 seg., RT, à velocidade máxima.
 14. Descarte o filtrado.
⇒ RNAs totais ficarão presos à membrana.
⇒ Como o volume será >700 ul, repita o procedimento até toda a mistura passar pela coluna. Use o mesmo tubo coletor para as centrifugações.
 15. Guarde a coluna posicionando-a sobre o mesmo tubo coletor, para as lavagens subsequentes.
⇒ A partir deste ponto, procederá com as lavagens do RNA total.
- Nota:** Antes de iniciar o procedimento, pré-aquecer solução de eluição (ou H₂O RNase free) a 95°C.
16. Adicionar 700 ul de wash solution 1 (com etanol) a cada coluna

17. Centrifugar por 15 seg., RT, à velocidade máxima.
18. Descarte o filtrado.
19. Adicionar 500 ul de wash solution 2/3 (com etanol) a cada coluna
20. Centrifugar por 15 seg., RT, à velocidade máxima.
21. Descarte o filtrado.
22. Repetir a lavagem com wash solution 2/3
23. Após repetir lavagem, centrifugar por 1 minuto, RT, velocidade máxima para eliminar resíduos.
24. Transferir cada coluna para novo tubo coletor (usar set final de tubos coletores).
25. Aplicar 100 ul de solução de eluição ou H₂O RNase-free (aquecida 95°C) sobre o filtro da coluna.
26. Centrifugar por 30 seg., RT, à velocidade máxima.
27. Quantificar e estocar congelado.

| VOLUMES DE ETANOL 100% PARA EXTRAÇÕES | |
|--|----------------|
| DA AMOSTRA | DE ETANOL 100% |
| Total anotado (ul) | 2/3 |
| 100 | 67 |
| 150 | 100 |
| 200 | 133 |
| 250 | 167 |
| 300 | 200 |
| 350 | 233 |
| 400 | 267 |
| 450 | 300 |
| 500 | 333 |
| 550 | 367 |
| 600 | 400 |
| 650 | 433 |
| 700 | 467 |
| 750 | 500 |

| | |
|------|------|
| 800 | 533 |
| 850 | 567 |
| 900 | 600 |
| 950 | 633 |
| 1000 | 667 |
| 1050 | 700 |
| 1100 | 733 |
| 1150 | 767 |
| 1200 | 800 |
| 1250 | 833 |
| 1300 | 867 |
| 1350 | 900 |
| 1400 | 933 |
| 1450 | 967 |
| 1500 | 1000 |

Protocolo de preparação de cDNA de microRNAs usando TaqMan microRNA Reverse Transcription (RT) kit (códigos 4366596 ou 4324018 da Life Technologies)

Nota: descongelar amostras e reagentes em banho de gelo.

Deixar preparado:

- 1 set de tubos 0,2 ml para diluição de cada amostra de microRNAs
- n tubos 0,2 ml para RT, onde $n = (\text{n}^\circ \text{microRNAs}) * \text{n}^\circ \text{amostras}$
- 1 set de tubos 0,2 ml ou 1,5 ml (a depender do volume que precisar) para preparação dos mixes de cada primer.

1. Preparar diluições de cada amostra de microRNA para [] final = 3,3 ng/ul.

Dica: Para produzir 100 ul de uma solução 3,3 ng/ul de qualquer microRNA (*usar set de tubos 0,2 ml*):

- a. Dividir 330 pela [] do estoque de microRNA (em ng/ul)
- b. O produto da razão acima será o volume (em ul) a se pegar do estoque
- c. Acrescentar H₂O nuclease-free (cat AM9932) para completar 100 ul.

2. Para cada primer RT a ser usado (incluindo o endógeno), preparar o seguinte mix de reagentes (*usar set de tubos 0,2 ml ou 1,5 ml, a depender do volume que precisar*):

| REAGENTE | NA REAÇÃO | |
|---|----------------|--|
| | UNITÁRIA | MIX |
| Água Nuclease-free | 4,27 ul | Multiplicar pelo nº de amostras + 1 |
| 10X Reverse Transcription Buffer | 1,00 ul | |
| RNase Inhibitor, 20 U/μL | 0,13 ul | |
| 100mM dNTPs (with dTTP) | 0,10 ul | |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL | 0,50 ul | |
| Primer TaqMan 5X (RT) | 1,00 ul | |
| Total | 7,00 ul | |

3. Distribuir 7,0 ul do mix em cada tubo rotulado com o respectivo primer.
4. Distribuir 3,0 ul de amostra diluída ($\approx 10\text{ng}$) em cada tubo rotulado com o respectivo microRNA.
5. Levar reações para temociclagem, em programa:
 - 16°C, 30 minutos
 - 42°C, 30 minutos
 - 85°C, 5 minutos
 - 4°C, indefinidamente
6. Terminada a ciclagem, congelar para uso posterior em qPCR.

Protocolo de amplificação de cDNA por PCR em tempo real (q PCR) usando TaqMan Universal PCR Master Mix (código 4304437) da Life Technologies

Nota: descongelar amostras em banho de gelo. O TaqMan Universal PCR Master Mix é estocado a 4°C.

Deixar preparado: - n tubos de 0,2 ml ou 1,5 ml para preparação do mix, onde n = nº de primers

1. Para cada primer TM (incluindo o primer do controle endógeno), preparar o seguinte mix de reagentes (*usar tubo de 0,2 ml ou 1,5 ml*):

| REAGENTE | NA REAÇÃO | |
|---------------------------------|---------------|---|
| | UNITÁRIA | MIX |
| Água Nuclease-free | 0,5 ul | Multiplicar pelo nº de amostras (considerar duplicada) + 1 |
| TaqMan Universal PCR Master Mix | 5,0 ul | |
| TM Primer 20X | 0,5 ul | |
| Total | 6,0 ul | |

2. Distribuir 6,0 ul de mix no fundo dos poços a amplificar o respectivo microRNA.
3. Distribuir 4,0 ul do cDNA na parede dos poços (duplicata) a amplificar a respectiva amostra.
4. Selar a placa com o respectivo filme plástica (usar pinça ou outro instrumento para forçar adesão).
5. Centrifugar placa para baixar volumes.

Protocolo de Genotipagem de SNPs por PCR em tempo real (q PCR) usando TaqMan Genotyping Master Mix (código 4371355) da Life Technologies

Nota: descongelar amostras de DNA em banho de gelo. O TaqMan Genotyping Master Mix é estocado a 4°C.

Deixar preparado: - n tubos de 0,2 ml ou 1,5 ml para preparação do mix, onde n = n° de primers

1. Para cada primer, preparar o seguinte mix de reagentes (*usar o tubo de 0,2 ml ou 1,5 ml acima*):

| REAGENTE | NA REAÇÃO | |
|------------------------------|---------------|---|
| | UNITÁRIA | MIX |
| Água ultrapura | 2,75 ul | Multiplicar pelo n° de amostras (incluindo o branco) + 1 |
| TaqMan Genotyping Master Mix | 5,00 ul | |
| RS Primer 40X | 0,25 ul | |
| Total | 8,0 ul | |

2. Distribuir 2,0 ul do DNA no fundo do poço.
3. Escorrer 8,0 ul de mix na parede do poço.
4. Selar a placa com filme plástica (usar pinça ou outro instrumento para forçar adesão).
5. Centrifugar placa para baixar volumes.

Programa: 50 °C, 2 min ⇒ 95 °C, 10 min ⇒ 95 °C, 15 seg
(x1) (x1) 60 °C, 1 min (x45)

Transformação Bacteriana

Objetivos:

1. Introduzir DNA plasmidial em células de *E. coli* via choque térmico (transformação);
2. Análise de colônias bacterianas transformadas e não transformadas.

Material:

Meio de cultura LB líquido e sólido; Ampicilina 50 mg/ml (esterilizada por ultrafiltração)

X-gal 20mg/ml; IPTG 200mg/ml; Frasco Erlenmeyer esterilizado (250 ml); Pipetas, placas de Petri e ponteiros esterilizados; Bico de Bunsen

Alça de Drigalski, copo de Becker com álcool; Gelo

Esquema de transformação

A maioria dos protocolos de transformação pode ser resumida em quatro passos principais:

- 1 – Pré-incubação: as células são ressuspensas em uma solução de cátions e incubadas a 0 °C. Os cátions complexam com os fosfatos expostos dos lipídeos da membrana de *E.coli*. A baixa temperatura congela a membrana celular estabilizando a distribuição dos fosfatos carregados.
- 2 – Incubação: o DNA é adicionado e a suspensão celular é incubada novamente a 0 °C. Os cátions neutralizam os fosfatos negativamente carregados no DNA e na membrana celular. Com as cargas neutralizadas, a molécula de DNA estará livre para passar pela membrana celular.
- 3 – Choque Térmico: a suspensão célula/DNA é incubada rapidamente a 42 °C e então novamente incubada a 0 °C. A mudança rápida de temperatura produz um desbalanço térmico nos dois lados da membrana da *E.coli*, criando um fluxo que leva o plasmídeos para o interior das células.
- 4 – Recuperação: o meio LB é adicionado à suspensão células/DNA e incubado a 37 °C (preferencialmente com agitação), antes de serem semeados em meio seletivo. As células transformadas se recuperam, amplificam o plasmídeo transformado e iniciam a expressão da proteína que confere resistência ao antibiótico.

Procedimento experimental

1 - Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, misturar 100 µl de células de *E. coli* competentes com 5 ul da mistura de ligação (mistura de DNA plasmidial parental e recombinante). Incubar no gelo por 30 min (preparar as placas de Petri com meio LB sólido durante este período).

***Atenção:** Durante este intervalo, preparar uma placa de Petri contendo ampicilina.

2. Transferir o tubo de microcentrífuga para um banho d'água a 42°C por 2 minutos. Imediatamente recolocar o tubo no gelo por mais 2 minutos.

3. Adicionar 1,0 ml de meio de cultura LB líquido e incubar a 37 °C por 1 hora, sob agitação.

***Atenção:** Durante este intervalo, preparar as placas de Petri com Xgal e IPTG, e deixar secar.

5. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto

6. Descartar 800 uL de cultura (com cuidado para não ressuspender o pellet)

7. Ressuspender o volume restante

8. Espalhar, com alça de Drigalski, a suspensão de bactérias sobre a placa de Petri contendo meio LB sólido e ampicilina.

9. Incubar as placas a 37 °C, invertidas, durante 16-18 horas.

10. Contar o número de colônias transformantes. Contar o número de recombinantes. Analisar a eficiência de transformação

Preparação de placas de Petri: 20 ml de meio de cultura LB sólido liquefeito em microondas; 40 µl de ampicilina (50 mg/ml); 40 ul de X-gal e IPTG

Protocolo Mini-Prep

1. **Riscar uma placa** (LB + ampicilina) com células transformadas e incubar a 37°C overnight .
2. **Fazer o inóculo** com 5mL de LB com ampicilina e deixar crescer overnight a 37°C sob agitação.
3. **Centrifugar** a cultura na centrífuga Eppendorf de bancada a 13.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. *Centrifugar três vezes em tubos Eppendorf de 1,5mL.*
4. **Ressuspender** a cultura com **500µL de solução STE gelada** para retirar qualquer resíduo do meio LB, com auxílio de uma pipeta.
5. **Centrifugar** a 13.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente (descartar os sobrenadantes).

6. **Adicionar 250µL** por tubo de **solução I gelada** (com RNase, 100 ug/ml-concentração final) e ressuspender o pellet completamente utilizando uma pipeta.
7. Adicionar **250µL** por tubo de **solução II gelada** - NaOH + SDS – pH~12 - Solução de Lise - (preparada no mesmo dia!). Misturar por inversão (**NÃO** utilizar o vórtex!) e incubar em bancada por 5 minutos.
8. Adicionar **350µL** por tubo de **solução III gelada** - Acetato de potássio – pH~5 – Solução Neutralizante - e misturar bem por inversão (**NÃO** utilizar o vórtex!). Incubar por 10 minutos na geladeira.
9. **Centrifugar** a 13.000 rpm por 6 minutos em temperatura ambiente.
10. **Transferir os sobrenadantes para novos tubos** com cuidado (usar pipeta). *Se ainda ficarem restos de lise celular, repetir a última centrifugação.*
11. **Adicionar** aos sobrenadantes **400uL de isopropanol** e incubar em bancada por 10 minutos.
12. **Centrifugar** a 13.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente.
13. **Descartar os sobrenadantes.**
14. Lavar os pellets e as paredes dos tubos com **300µL etanol 70% gelado**.
15. **Centrifugar** a 13.000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente.
16. **Secar os pellets** por 10 minutos a temperatura ambiente (secar as paredes dos tubos com papel toalha).
17. **Ressuspender os pellets** com 30µL de água Milli-Q com auxílio da pipeta.
18. **Correr gel de agarose 0,8%** para verificar se todo RNA foi removido (bandas limpas, sem rastro).

Soluções:

1. Solução I

Para esta aula, misturar 500 ul de solução I gelada e 5 ul de RNase a 10 mg/ml.

| Reagente | Quantidade | Conc. Final |
|---------------------------------|--------------|-------------|
| Glicose | 0,9g | 50mM |
| Tris-HCl 1M pH 8,0 ¹ | 2,5mL | 25mM |
| EDTA 0,5M pH 8,0 ² | 2mL | 10mM |

¹ Dissolver 121g de Tris em 800mL de água. Ajustar o pH para 8,0 (na temperatura de uso) com HCl concentrado (~ 42mL). Completar o volume para 1L. Autoclavar.

H₂O **q.s.p. 100mL**

A solução deve ser autoclavada. Armazenar a 4°C.

2. Solução II

Misturar NESTA ORDEM: 20 ul de NaOH 10 N, 930 ml de H₂O, 50 ul de SDS 20%

| Reagente | Quantidade | Conc. Final |
|------------------|---------------------|-------------|
| NaOH 10M | 6mL | 0,2M |
| SDS 20% | 15mL | 1% |
| H ₂ O | q.s.p. 300mL | |

A solução deve ser preparada na hora do uso.

3. Solução III

| Reagente | Quantidade | Conc. Final |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| Acetato de Potássio 5M ³ | 60mL | 3M |
| Ácido acético glacial | 11,5mL | |
| H ₂ O | q.s.p. 100mL | |

A solução deve ser autoclavada. Armazenar a 4°C.

4. Solução STE

| Reagente | Quantidade | Conc. Final |
|--------------------|---------------------|-------------|
| NaCl 5M | 2mL | 0,1M |
| Tris-HCl 1M pH 8,0 | 1mL | 10mM |
| EDTA 0,5M pH 8,0 | 200µL | 1mM |
| H ₂ O | q.s.p. 100mL | |

A solução deve ser autoclavada. Armazenar a 4°C.

² Dissolver 186,1g de Na₂EDTA.2H₂O em 800mL de água. Ajustar o pH com NaOH (~ 20g de NaOH). Completar o volume com água para 1L. Autoclavar.

³ Pesar 29,44g do sal para 60mL de água.

5. Meio LB (1L):

| Reagente | Quantidade | Conc. Final |
|---------------------|------------|-------------|
| Extrato de levedura | 5g | |
| Peptona | 10g | |
| NaCl | 10g | |
| H ₂ O | q.s.p. 1L | |

Preparar dois tubos falcon com 5mL do meio (inóculo e controle).

Reagentes:

- Isopropanol gelado.
- RNase (concentração final de 2µg/mL)
- Etanol 70% gelado.

Amplificação de ECA por PCR

Método de Amplificação de DNA por PCR para gene ECA:

- Montando a reação

| SUBSTÂNCIAS | VOLUME UNITÁRIO | CONCENTRAÇÃO FINAL |
|-------------------------|-----------------|--------------------|
| Tampão 04 – [10X] | 2,5 µL | 1x |
| Ovalbumina 1mg/mL | 0,25 µL | 1,5mM |
| dNTPs (2,0mM) | 2,0 µL | 0,2mM |
| ECA-F1 (5,0 µM) | 1,0 µL | 2µM |
| ECA-R1 (5,0 µM) | 1,0 µL | 2 µM |
| Taq pd 5U/µL | 0,1 µL | 2,5 U |
| Dna da amostra | 1,0 µL | ≈ 100 – 300 ng |
| H ₂ O qsp VF | 17,15 µL | |

Produto da PCR = I-490pb e D-190pb

Aconselha-se o preparo de um mix de reagentes

1) calcule o volume de cada reagente que será necessário (tampão, Ovalbumina, dNTPs, primers, Taq e água).

Imagine que se queira amplificar 13 amostras e incluir 1 controle vazio

⇒ multiplique o volume unitário de cada reagente por 14,5

2) adicione os volume de reagente a um tubo comum, na seguinte ordem

água → tampão → Ovalbumina → dNTPs → 1º primer → 2º primer → Taq

3) agite bem o tubo e dê um spin na centrífuga

4) distribua 24,0 µL em tubos de 0,2 µL (tubos de PCR)

6) adicione 1 µL do DNA

7) dê um spin na centrífuga e leve ao termociclador

Amplificando no Termociclador:

HOT-START

1. Temperatura: 80°C por 1 minuto;

1º FASE

2. Temperatura de desnaturação: 95°C por 5 minutos;

2º FASE

3. Temperatura de desnaturação: 95°C por 45 segundo;

4. Temperatura de anelamento: 60°C por 45 segundos;

5. Temperatura de extensão: 72°C por 45 segundos;

Repetição por 35 ciclos, a partir do passo 2

3ª FASE

6. Temperatura de extensão: 72°C por 5 minutos

7. Resfriamento até 12°C para retirada dos tubos

Análise dos produtos de PCR em gel de agarose 1,6 %

7 – PROCEDIMENTOS

7.1 Equipamentos de Proteção Individual - EPI

- Para manipulação de reagentes: Jaleco, óculos, luvas e máscara.
- Para manipulação de corantes: jaleco e luvas.

7.2 Equipamentos de Proteção Coletiva - EPC

- Capela de Exaustão: Ligar na chave geral a iluminação e exaustão. Utilizar sempre que manipular reagentes líquidos, como ácidos, bases, solventes, reagentes tóxicos.
- Chuveiro de emergência: Em caso de acidentes causados por derramamento de reagentes químicos no corpo, puxar a alavanca localizada ao lado do chuveiro na parte de cima.
- Lava-olhos: Em caso de acidentes causados por derramamento ou respingos de reagentes ou amostras biológicas, empurrar a alavanca do lava-olhos colocar o rosto com os olhos abertos na direção que a água estiver saindo, lavar com água em abundância.

7.3 Higienização/Desinfecção

- O piso é limpo uma vez ao dia pelos servidores do serviço de limpeza e conservação.
- As bancadas são limpas com sabão e álcool 70° ao término de todas as aulas, e experimentos de projetos de pesquisa.
- Equipamentos e materiais são lavados ao término de cada aula, e se estiverem contaminados por fungos e/ou bactérias, são autoclavados.

7.4 Operações dos equipamentos

Termociclador Biocycler – Modelos MJ96+ e MJ96G



Para criar um programa novo

- 1) No menu inicial, mova o cursor até a palavra ENTER e pressione [Enter];
- 2) Na próxima tela, digite o nome para o programa desejado (até 8 caracteres); ao final, mova o cursor até “#” e pressione a tecla [Enter], ou pressione a tecla [#] diretamente no teclado do instrumento;
- 3) *Modo de controle*: opções Bloco ou Sim-tube; mova o cursor até a opção desejada, e pressione [Enter];
- 4) *Segmento 1*: mova o cursor para CYCLE e pressione a tecla [Enter];
- 5) *Passos (steps) do segmento 1*: digite “1” e pressione a tecla [Enter];
- 6) *Temperatura*: digite “9 4 0” para definir a temperatura em 94°C, e pressione a tecla [Enter];
- 7) *Tempo*: digite “2” para definir o tempo do segmento em 2 minutos, e pressione a tecla [Enter] duas vezes;
- 8) *Opção para o passo 1?* NO (não é necessário mover o cursor) e pressione a tecla [Enter];
- 9) *N.º total de ciclos*: digite “1” e pressione a tecla [Enter];
- 10) *Segmento 2*: mova o cursor para CYCLE e pressione a tecla [Enter];
- 11) *Passos (steps) do segmento 2*: digite “3” e pressione a tecla [Enter];
 - a) *Temperatura do passo 1 (Step 1)*: digite “9 4 0” e pressione a tecla [Enter];
 - b) *Tempo*: digite “0”, pressione a tecla [Enter], digite “3 0” e pressione a tecla [Enter] novamente, para definir o tempo do passo 1 em 30 segundos;
 - c) *Opção para o passo 1?* “NO” (não é necessário mover o cursor) e pressione a tecla [Enter];
 - d) *Temperatura do passo 2 (step 2)*: digite “5 5 0” e pressione a tecla [Enter];

- e) *Tempo do passo 2*: digite “0”, pressione a tecla [Enter], digite “3 0” e pressione a tecla [Enter] novamente, para definir o tempo do passo 2 em 30 segundos;
 - f) *Opção para o passo 2?*: NO (não é necessário mover o cursor) e pressione a tecla [Enter];
 - g) *Temperatura do passo 3 (step 3)*: digite “7 2 0” e pressione a tecla [Enter];
 - h) *Tempo do passo 3*: digite “0”, pressione a tecla [Enter], digite “3 0” e pressione a tecla [Enter] novamente, para definir o tempo do passo 3 em 30 segundos;
 - i) *Opção para o passo 3*: “NO” (não é necessário mover o cursor) e pressione a tecla [Enter];
- 12) Total de ciclos para o segmento 2: digite “3 0” e pressione a tecla [Enter]; assim, a seqüência dos três passos do segmento 2 serão repetidos 30 vezes.
- 13) *Segmento 3*: mova o cursor para CYCLE e pressione a tecla [Enter];
- 14) *Passos (steps) do segmento 3*: digite “1” e pressione a tecla [Enter];
- 15) *Temperatura*: digite “7 2 0” e pressione a tecla [Enter];
- 16) *Tempo*: digite “2” e pressione a tecla [Enter];
- 17) *Opção para o passo 1?* NO (não é necessário mover o cursor) e pressione a tecla [Enter];
- 18) *N.º total de ciclos*: digite “1” e pressione a tecla [Enter];
- 19) *Segmento 4*: mova o cursor para CYCLE e pressione a tecla [Enter];
- 20) *Passos (steps) para o segmento 4*: digite “1” e pressione a tecla [Enter];
- 21) *Temperatura*: digite “0 4 0” e pressione a tecla [Enter];
- 22) *Tempo*: digite “99”, pressione a tecla [Enter], digite “59” e pressione a tecla [Enter] novamente, para definir o tempo em 99 minutos e 59 segundos;
- 23) *Opção para o passo 1?* NO (não é necessário mover o cursor) e pressione a tecla [Enter];
- 24) *N.º total de ciclos*: digite um valor que, multiplicado pelo tempo, resulte em um número de horas necessário para a função geladeira (cada ciclo durará 100 minutos) e pressione a tecla [Enter];

Ex: digitando 6 para o n.º total de ciclos, o termociclador permanecerá a 4°C por 100 minutos X 6, ou 10 horas;

25) Segmento 5: pressione a tecla [Enter] (com o cursor em END);

26) Pressione a tecla [Enter] (com o cursor em YES) para salvar o método;

27) Espere enquanto o método é salvo; em seguida, é exibida a tela do menu inicial.

Para executar um programa salvo

- 1) No menu inicial, mova o cursor para RUN e pressione a tecla [Enter];
- 2) Serão listados todos os métodos salvos;
- 3) Mova o cursor para o programa desejado, e pressione a tecla [Enter];
- 4) “Use heated lid” (usar tampa aquecida?): em YES, pressione a tecla [Enter];
- 5) Será exibida a temperatura da tampa (aumentando gradativamente).

Para listar os programas salvos

- 1) Mova o cursor até LIST e pressione a tecla [Enter];

Para apagar programas salvos

- 1) Mova o cursor até FILES e pressione a tecla [Enter];
- 2) Pressione a tecla [Enter] sobre DELETE;
- 3) Serão listados todos os programas salvos;
- 4) Escolha o nome do programa e pressione a tecla [Enter];
- 5) Mova o cursor para YES e pressione a tecla [Enter].

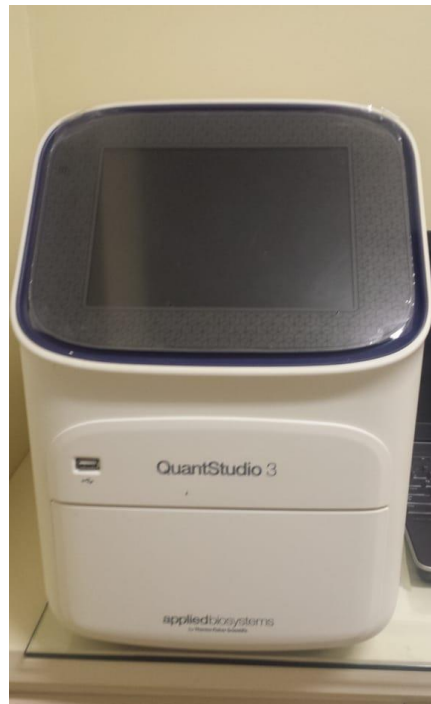
Para editar programas salvos (já existentes)

- 1) Mova o cursor até EDIT e pressione a tecla [Enter];
- 2) Siga os mesmos passos descritos para criar um programa novo.

Para configurar a temperatura da tampa

- 1) Mova o cursor até LID e pressione a tecla [Enter];
- 2) Configure para utilizar tampa aquecida.

PCR em Tempo Real QuantStudio 3



- Conecta a máquina em algum laptop ou computador;
- Ligue no botão situado na parte direta atrás do maquinário;
- Faça o teste para verificar se está funcionando de maneira adequada.
 1. Para verificação, utilize a placa TaqMan RNases P (deixe a placa em temperatura em torno de 5°C e ao utilizar deixe em temperatura ambiente durante 5 minutos
 2. Centrifugue a placa em 1500 rpm até eliminar todas as bolhas
 3. Na tela do QuantStudio 3 aperte o botão settings na parte inferior a direita
 4. Na tela seguinte aperte Maintenance and Service, após esta tela clique na opção RNase P verification
 5. Abre a bandeja do QuantoStudio clicando no botão de abertura no canto superior direito
 6. Retire a placa que vem dentro do instrumento e coloque a placa de verificação corretamente (seguir a numeração da placa e da bandeja, o código de barras estará voltada para você)
 7. Fecha a bandeja no mesmo botão de abrir e seleciona a opção Start
 8. A corrida dessa verificação deverá ocorrer entre 25 a 30 minutos

9. Ao término da corrida aperte a opção View Result e verá o resultado
 10. Na tela do resultado é possível ver os gráficos da corrida em Details
 11. Volte a tela e retire sua placa e coloque a que vem no aparelho
 12. Se ocorrer algum erro, ligue para o suporte técnico 08007725433 (escolha a opção 2 e depois opção 1)
- Para instalação de software, segue as instruções abaixo:
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010405_QuantStudioSys_SPG.pdf

Estufas de secagem e esterilização modelo TE 397/2: Voltagem 220 V



- Pressionar a chave liga /desliga (botão vermelho)
- Ajustar o controlador de temperatura: Gira-se o botão preto do controlador de temperatura acionando-se o led vermelho.

Incubadora de Bancada modelo NT712 : Voltagem 220V



- Ligar a chave geral
- Ligar os dois botões vermelhos (aquecimento/circulação), localizado na parte anterior do equipamento;
- Com o auxílio das teclas para cima e para baixo ajustar a temperatura (termostato);
- Utilizar um termômetro para verificar se o termostato está registrando a temperatura correta
- A cada bimestre a incubadora deve ser higienizada com álcool e formol.

Sistema de purificação de água human UP 900 scholar UV



- 1) Certifique-se de que a tensão elétrica da tomada do aparelho é compatível com a rede elétrica do laboratório.
- 2) Conecte o cabo de força na tomada.
- 3) Conecte a mangueira de entrada de água em um tanque (barrilete) contendo água destilada, deionizada ou osmose reversa.
- 4) Abra a torneira e verifique se não há vazamentos. Para melhor desempenho do aparelho, corte a mangueira para diminuir o curso de água. Se possível, suspenda o

barrilete para poupar o esforço da bomba interna e também para melhorar a vazão (saída de água).

OBS: Antes de operar o aparelho, mantenha a torneira sempre aberta para evitar a formação de bolhas no sistema e também o esvaziamento dos filtros e cartuchos.

5) Ligue o aparelho.

6) Pressione a tecla UP (Água Ultra Pura).

7) O aparelho inicia automaticamente o “SELF TEST”.

8) A opção RUNNING no display indica que o equipamento já está produzindo água.

9) Aguarde até que o display mostre o valor 18.3 MΩ-cm.

10) Pressione o gatilho para liberar a água.

11) Após retirar a água pressione a tecla UP novamente para deixar o aparelho em modo Stand By (repouso).

12) Caso necessite utilizar o aparelho novamente, pressione a tecla UP, aguarde até que o SELF TEST seja completado e repita os procedimentos 8, 9 e 10.

Importante!

Se os valores no display “running” forem inferiores a 18.3 mΩ-cm, pressione a tecla r/c para realizar a recirculação automática, para limpeza dos cartuchos e mangueiras ou sempre que desejar fazer a limpeza antes de coletar a água.

-Pressionando a tecla MODE após ligar o aparelho, obtém-se as mensagens para troca de cartuchos e filtros. O aparelho já vem programado de fábrica com os seguintes valores:

1ª mensagem: 13.0 MΩ-cm: O led indicador começa a piscar indicando a troca do cartucho.

2ª mensagem: 10.0 MΩ-cm: O led indicador fica aceso e a saída de água é bloqueada, sendo liberada somente após a troca do cartucho.

Caso queira alterar os valores de fábrica, utilize as teclas YES, NO, aumentando ou diminuindo os valores e ENTER para confirmar o ajuste.

Nota: Se o equipamento for ligado com a torneira fechada, os filtros e cartuchos irão esvaziar, possibilitando a entrada de ar no sistema. O led indicador para a troca do

cartucho irá acender e só irá apagar quando os filtros e cartuchos estiverem cheios novamente.

Leitora de ELISA modelo EL x 800 BIO-TEK




PARA

MT

RIA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R | E | A | | | | | | | | | P | M | | | 0 | 5 | / | 0 | 9 | / | 9 | 5 |
| R | E | A | D | | | D | E | F | I | N | E | R | E | P | O | R | T | | U | T | I | L |


Menu Principal

1. Pressione a tecla abaixo de **READ**;
2. Escolha o teste (assay) desejado (2 à 55) e pressione **ENTER**;
3. Digite o número de amostras que serão lidas e pressione **ENTER**;
4. Insira a identificação da placa com as teclas  e pressione **ENTER**;
5. Pressione a tecla **READ** ou **ENTER**.

PARA REALIZAR UMA LEITURA SIMPLES (RÁPIDA)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R | E | A | D | Y | | | | 9 | : | 4 | 5 | P | M | | | 0 | 5 | / | 0 | 9 | / | 9 | 5 |
| R | E | A | D | | | D | E | F | I | N | E | R | E | P | O | R | T | | U | T | I | L | |

Menu Principal

1. Pressione a tecla abaixo de **READ**;
2. Escolha o teste (assay) **01** e pressione **ENTER**;
3. Pressione a tecla abaixo de **SINGLE/DUAL** e pressione **ENTER**;
4. Insira o(s) comprimento(s) de onda(s) desejado(s) e pressione **ENTER**;
5. Digite o número de amostras que serão lidas e pressione **ENTER**;
6. Insira a identificação da placa com as teclas  e pressione **ENTER**;
7. Pressione a tecla **READ** ou **ENTER**.

PARA IMPRIMIR UM RESULTADO DA MEMÓRIA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R | E | A | D | Y | | | 9 | : | 4 | 5 | P | M | | | 0 | 5 | / | 0 | 9 | / | 9 | 5 | | | |
| R | E | A | D | | | | D | E | F | I | N | E | | | R | E | P | O | R | T | | U | T | I | L |

Menu Principal

1. Pressione a tecla abaixo de **REPORT**;
2. Pressione a tecla abaixo de **RESULT**;
3. Selecione a placa (resultado) com a tecla **OPTIONS** e pressione **ENTER**;
4. Pressione a tecla abaixo de **YES**.

PARA LISTAR OS PROGRAMAS DA MEMÓRIA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R | E | A | D | Y | | | 9 | : | 4 | 5 | P | M | | | 0 | 5 | / | 0 | 9 | / | 9 | 5 | | | |
| R | E | A | D | | | | D | E | F | I | N | E | | | R | E | P | O | R | T | | U | T | I | L |

Menu Principal

1. Pressione a tecla abaixo de **REPORT**;
2. Pressione a tecla abaixo de **LIST**.

PARA IMPRIMIR O SELF-TEST

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R | E | A | D | Y | | | 9 | : | 4 | 5 | P | M | | | 0 | 5 | / | 0 | 9 | / | 9 | 5 | | | |
| R | E | A | D | | | | D | E | F | I | N | E | | | R | E | P | O | R | T | | U | T | I | L |

Menu Principal

1. Pressione a tecla abaixo de **UTIL**;
2. Pressione a tecla abaixo de **TESTS**;
3. Pressione a tecla abaixo de **SYSTEM**.

Destilador de água: voltagem 220V

- Ligar a mangueira de água e deixar escorrer durante 5 minutos



- Selecionar a chave vermelha para cima
- Após destilar a quantidade desejada, selecionar a chave vermelha para baixo
- Deixar que a água escorra até que essa saia fria
- Fechar a mangueira de água

Fluxo laminar: voltagem 220V

- Limpar o interior do equipamento com bucha e sabão
- Higienizá-lo com álcool 70%
- Ligar o fluxo apertando o botão verde, localizado na parte anterior.
- Selecionar a chave metálica para cima (em direção à palavra “germicida”)
- Após 30 minutos, retornar a chave metálica para baixo (em direção à palavra “luz”)
- Desligue o aparelho apertando o botão vermelho e para desligar a luz branca deixe a chave metálica entre “germicida” e “luz”.



Autoclave: voltagem 220v

- Colocar água até a altura do descanso do cesto
- Colocar o material dentro da autoclave
- Fechar a tampa apertando os parafusos por igual e em forma de cruz
- Abrir a válvula de saída do vapor
- Ligar a chave comutadora no calor máximo.
- Esperar até a saída contínua de vapor no bico do registro e em seguida fechar a saída
- Esperar até que seja atingida a pressão de 121 kgf/cm²



- Mudar a chave comutadora para o calor médio
- Esperar de 15 a 20 minutos para esterilização de meios e vidrarias, respectivamente, e 30 minutos para descontaminação.
- Desligar a chave comutadora
- Esperar até a autoclave esfriar e o manômetro voltar a zero
- Depois de usar, limpar e secar a autoclave para prevenir corrosão
- Retirar da tomada

Banho-maria modelo TE 054 TECNAL 220V



- Adicionar água destilada no interior da cuba, o volume final fica a critério do usuário, entretanto, é aconselhável que o volume seja igual ao dos recipientes a serem incubados;
- Conectar o cabo elétrico a uma tomada compatível de voltagem 220 volts.
- Ligar a chave geral;
- Selecionar a temperatura desejada usando a chave do controlador de temperatura;
- Utilizar um termômetro para verificar se o banho está registrando a temperatura correta.

Centrífuga refrigerada



- Ligar a chave geral localizada atrás do painel;
- Pressionar o botão POWER;
- Para abrir a tampa ou parar a centrifugação antes do tempo selecionado, aperte STOP/DOOR;
- Colocar as amostras balanceadas e feche a tampa interna e externa;
- Selecionar a temperatura, a rotação e o tempo;
- Apertar START para iniciar;
- Remover todos os tubos da centrífuga;
- Para desligar – POWER e chave geral.

Máquina de gelo

- Ligar o registro que fornece água a máquina de gelo;
- Ligar a chave geral;
- Esperar o gelo ficar pronto;
- Retirar todo o gelo depositado no recipiente de armazenamento;
- Desligar a máquina.



Centrifuga para tubos de coleta



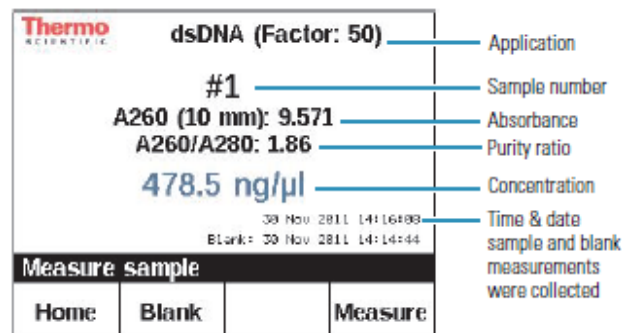
- Verificar a voltagem da centrífuga (110/220V);
- Ligar o equipamento no botão (liga);
- Abrir a tampa no botão (tampa);
- Colocar os tubos nas caçapas, conforme fique balanceado (isto é em sentido contrário);
- Fechar a tampa, configurar a rotação e o tempo necessário para o devido procedimento acionar o botão (parte);
- Ao término da centrifugação, ela acionara um sinal sonoro, onde um segundo sinal será acionado quando o rotor pare totalmente;
- Abre a tampa e retire os tubos (evite centrifugar tubos sem tampas).

Nanodrop



- 1) Selecione o aplicativo apropriado na tela inicial (DNA ou RNA) para medições de DNA, selecione o ensaio dsDNA ou ssDNA
- 2) ssDNA é fita simples de DNA, geralmente encontrada em vírus. dsDNA, DNA de fita dupla

- 3) Seguindo as instruções na tela, estabeleça um branco pipetando 1-2 uL do tampão de limpeza e injeta no pedestal inferior, fecha o braço do equipamento e pressione em branco
- 4) Quando a medição estiver concluída, levante o braço e limpe o tampão em ambos os pedestais superior e inferior usando um lenço para não arranhar
- 5) Confirme a pipetagem em branco de uma nova alíquota de tampão branco no pedestal inferior, abaixe o braço de pressão em branco
- 6) Medir a amostra pipetando 1-2 uL de amostra no pedestal inferior, medir o braço
- 7) Limpe o pedestal superior e inferior com um pano seco de laboratório e o instrumento está pronto para medir a próxima amostra.
- 8) Limpe como branco novamente o equipamento, seguindo toda a instrução
- 9) Resultado:



- 10) O grau de pureza de 260/280 é 1,8 a 2,2
- 11) Proporção 260/230 é uma proporção baixa. Pode ser o resultado de um contaminante absorvendo a 230 nm ou menos.
- 12) Comprimento de onda da depressão no espectro de amostra. este deve estar em torno de 230 nm

Sistema de fotodocumentação – Vilber Lourmat



- Pressione a chave (posição: atrás do aparelho) liga/desliga do monitor LCD
- Coloque o cartão de memória no aparelho (obs: verificar a posição correta)
- Monitor LCD consta esta opção:
 - ✓ Teclas (+e-) = Ajuste do tempo de integração (maior ou menor contraste)
 - ✓ Tecla FREEZER = Para congelar a imagem no monitor LCD ou salvar uma imagem no disco removível.
 - ✓ Tecla LIVE = Retornar a tela inicial
 - ✓ Local para o cartão de memória (onde irá salvar as imagens).

Transluminador:

- ✓ Botão preto dá opção da escolha da fonte luminosa (WL/UV)
- ✓ O botão verde liga/desliga

Aparelho de fotografar:

- ✓ Temos o primeiro anel, que ajusta a abertura do diafragma (luminosidade)
- ✓ No segundo anel, ajusta o zoom da imagem

Procedimento:

- ✓ Ligue o monitor LCD
- ✓ Colocar o objeto (gel) no transluminador (sempre com ele desligado)
- ✓ Acoplar a máquina de fotografar no transluminador
- ✓ Assim que o objeto (gel) estiver na posição desejada do aparelho:
 - Escolha a opção UV e ligue o transluminador
 - No monitor LCD, pressione a tecla +(0.200)

- Regula no 1º anel a intensidade da luz, a fim de obter uma imagem brilhante no visor
- Ajustar o foco (3º anel), a fim de obter uma imagem nítida
- Ajuste o zoom (2º anel)
- Pressione a tecla FREEZE para congelar a imagem e em seguida aperte novamente para salvar a imagem no cartão de memória
- Pressione a tecla LIVE para retornar a tela inicial, e retire o cartão de memória.

-Coloque o cartão de memória em um dispositivo removível para que possa armazenar a imagem salva no computador.

7.5 Técnicas realizadas no laboratório

Técnica de Extração de DNA:

Consiste em utilizar amostras de sangue, células ou tecidos, no caso deste laboratório utiliza-se com frequência amostras de sangue, para se obter o material genético (DNA), isso é possível por meio de kits comerciais ou métodos laboratoriais caseiros.

Técnica de Eletroforese:

Consiste na separação, identificação e purificação de moléculas. Essa técnica é executada utilizando-se gel de agarose, tampão TAE 1X, no qual o gel será submerso, dentro de uma cuba com eletrodos nas extremidades. As amostras serão aplicadas juntamente com um tampão de carregamento nos poços presentes no gel e submetidos a ação de um campo elétrico (de um lado positivo de do outro negativo) isso fará com que os ácidos nucleicos que possuem carga elétrica negativa migrem em direção ao polo positivo. A separação ocorre devido à carga e a massa das moléculas que são diferentes e migram em velocidades diferentes.

Técnica de PCR

A técnica consiste em multiplicar uma região específica do DNA, um gene ou parte dele, até o ponto que sua concentração seja tão alta que possa ser detectada em técnicas simples de separação e identificação de substâncias.

A multiplicação dos trechos se dá por meio da variação de temperatura de ensaio: Desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento dos primers (que delimita a sequência a qual será amplificada), continuação da sequência da fita por meio dos nucleotídeos adicionados a reação, temperatura ótima da enzima e reinício do ciclo, que ocorrerá cerca 35 vezes a depender do protocolo utilizado.

Técnica de PCR em tempo real

Consiste na amplificação de regiões específicas do molde de DNA por meio da ação catalisadora da enzima de DNA polimerase, primers, dNTPs, cátions divalentes e solução tampão. Nesta reação é possível visualizar e quantificar a amplificação de DNA em tempo real, ou seja, no momento que a reação está ocorrendo. Isso é possível, pois utiliza-se produtos químicos fluorescentes, que permitem capturar a fluorescência emitida em cada ciclo por meio de um sistema óptico e um software que quantifica a amplificação.

Elisa

Consiste em uma reação antígeno-anticorpo monitorada por meio da atividade enzimática. Detectando assim, quantidades extremamente pequenas de antígenos e anticorpos presentes em dada amostra.

Os protocolos das técnicas descritas variam do tipo de trabalho realizado. Os mesmos se encontram disponíveis no laboratório com o técnico responsável.

7.6 Manuseio de produtos químicos

O laboratório utiliza produtos químicos para realização de pesquisas, projetos e procedimentos para as práticas didáticas os quais são acondicionados em suas

embalagens originais devidamente identificados e segregados por compatibilidade química.

Os produtos químicos adquiridos por projetos são segregados e acondicionados separadamente dos produtos químicos adquiridos pela instituição. Este controle deverá ser realizado tanto fisicamente quanto na planilha eletrônica de controle do laboratório. As notas fiscais destes produtos químicos adquiridos por projetos são arquivadas em pastas separadas.

Coletas, Acondicionamento e Recolhimento dos Resíduos

Todos os resíduos gerados no laboratório são segregados e devidamente acondicionados, conforme legislação vigente e da seguinte maneira:

- Resíduos infectantes (Material contaminado com bactérias, sangue, soro ou demais resíduos biológicos) – Sacos Brancos Leitosos identificados;
- Resíduos perfurocortantes – Coletor de materiais perfurocortantes (DESCARPACK);
- Demais resíduos – Lixeira comum.
- Diariamente, um agente responsável recolhe os resíduos corretamente acondicionados e os transporta até o expurgo da Universidade. O recolhimento se dá em horário pré-estabelecido e, quando necessário, imediatamente após a sua geração.
- Lixo proveniente de Eletroforese contaminado com brometo de etídio, (papel toalha, parafilme, luvas) - Sacos Brancos Leitosos identificados.
- Gel de agarose – Descartado em tambor específico que fica devidamente fechado e posteriormente é levado para o abrigo de resíduos químicos da Universidade.
- Tampão TAE utilizado em eletroforese – Descontaminado com carvão ativo e posteriormente filtrado e descartado (líquido em água corrente e os filtros com o carvão são descartados no mesmo local que o gel de agarose).

8- CONDUTAS A SEREM ADOTADAS EM CASOS DE ACIDENTES

É fundamental informar a Brigada de Incêndio, ao Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT), a Coordenação do EAP's e aos Responsáveis pelo laboratório a ocorrência de qualquer acidente no laboratório.

Em caso de acidentes com ácido: lavar as partes afetadas com bastante água. Se os olhos forem atingidos, lavá-los com bastante água e pingar gotas de uma solução diluída de ácido bórico a 2%.

Em caso de acidentes com Brometo de Etídio: Lavar a parte afetada com água em abundância e comunicar ao técnico, ao serviço médico especializado e a brigada de incêndio imediatamente.

Choques elétricos: interromper a descarga, com desligamento da chave imediato.

8.1 Contatos de emergência

- Brigada de Incêndio – 3356-9439
- Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT) – 3356-9100 / 3356-9287
- Coordenação dos EAPs – 3356-9050 /
- Bombeiro/Defesa Civil - 193/199
- Laboratório de Imunogerontologia – 3356-9293

9 - PROJETOS

- Respostas Fisiológicas do Exercício Físico Sobre a Fístula Arteriovenosa em Pacientes com Doença Renal Crônica. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Brasília, CAAE: 47824521.7.0000.0029. 2022.
- Treinamento de força com oclusão vascular em Doentes Renais Crônicos - tfovdrc (EDITAL INTERNO 54/2018) E pró-cárdio-rim: mapeamento e prevenção de doenças cardiorenais em comunidades carentes no distrito federal - PCR em enquadramento no edital 02/2020 da FAPDF, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Brasília, sob o número: 23007319.0.0000.0029. 2021-2024

- Respostas fisiológicas do exercício físico sobre a fístula arteriovenosa em pacientes com doença renal crônica. Coordenador : Prf. Dr. Thiago dos Santos Rosa. Thaís Branquinho, Andrea Lucena, Hugo Correa, Lysleinde de Deus, Jéssica Mycaella. 2022
- Associação de polimorfismo genético, atividade total e níveis séricos da enzima dipeptidil peptidase IV – Coordador: Prf. Dr. Otávio Toledo Nóbrega/ Prf. Dr. Clayton Franco Moraes. Pesquisadores: Audrey Cecília Tonet Furioso, Elisa de Souza Alves e Gleiciane Gontijo de Avelar. 2019-2024
- Treinamento de força com oclusão vascular em doentes renais crônicos/ Heart rate variability in middle-aged sprinters and endurance runners – Coordenador : Prf. Dr. Thiago dos Santos Rosa. Alunos: Patrick Anderson Santos, Larissa Alves Maciel, Lysleine Alves de Deus, Rodrigo Vanerson Passos Neves e Hugo Luca Correa). 2022
- Resposta hormonais e metabólicas durante os testes de determinação do limiar anaeróbio individual (iat) e ponto de equilíbrio entre produção e remoção de lactato sanguíneo (Lacmin) – Coordenador: Dr. Hebert Gustavo Simões – Alunos: Patrick Anderson Santos, Larissa Alves Maciel, Lysleine Alves de Deus, Rodolfo Soares Mendes Nunes, Samuel da Silva Aguiar. 2022.
- Análises de Citocinas em Camundongos induzidos ao treino, treino HIT, destreino e retreino: Pró-inflamatórias, Interleucina-6 , TNF-alfa e Óxido Nítrico do Tecido Adiposo, obesidade. Alunos: Lana, Professor Dr.: Octávio Franco.2022

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOUVEIA, João José de Simoni; REGITANO, Luciana Correia de Almeida. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicadas à Produção Animal: Eletroforese de ácidos nucléicos.** Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48300/4/PROCILCAR2007.00420.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2015.

illumina. Eco™ Real-Time PCR System Guia do Usuário. Acesso em: 26/06/2015.

ROSELINO, Ana Maria. **Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais.** 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962008000300002>. Acesso em: 24 jun. 2015.

VIEIRA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações.** Disponível em: <https://afirmando.files.wordpress.com/2015/01/princc3adpios-da-pcr-copia.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2015.