

# SEQUENCIAMENTO DE DNA: MÉTODOS E APLICAÇÕES

Welika Faria Santos<sup>1</sup>, Marcia Silva de Oliveira<sup>2</sup>, Lélia Cristina Tenório Leói Romeiro<sup>3</sup>, Marcus Alisson Araújo da Cunha<sup>4</sup>.

**Abstract** — *The DNA sequencing is a procedure which involves a series of complex biochemical methods which aims to determine the order in which the nitrogenous bases adenine (A), cytosine (C), thymine (T) and Guanine (G), are arranged in the genetic material of organisms. There are several methods available and one of the most used is the "dideoxy method" of "chain terminators" or "Sanger" whose inventor was Frederick Sanger in the 70s. From 2005, as pyrosequencing, developed by Mostafa Ronaghi and Pål Nyhren came the technology of next generation sequencing (NGS) that have evolved rapidly. The system 454 was the first NGS platform to be commercialized. The Solexa platform has as innovation in vitro cloning of fragments into a solid glass platform. In the SOLiD system, unlike all other cases, the reaction is catalyzed by the enzyme DNA ligase, and DNA polymerase not. Another method, published in 2012, uses sensors on microchips, created by Ion Torrent to detect this chemical signature. Oxford Nanopore Technologies also presented this year, in which a microchip incorporated a pore in a membrane protein synthetic polymer. In all the processes used, the ultimate goal of the DNA sequencing is the reading and identification of the exact order in which they are the nitrogenous bases, which determines each gene.*

**Index Terms** - DNA sequencing, NGS, pyrosequencing, platforms, genetic material.

## INTRODUÇÃO

Todos os processos de desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e controle das atividades metabólicas das células são controlados pelo DNA. A informação de “como fazer” um ser vivo está contida nele. [1]

O DNA pôde ser decifrado no final da década de 1970, quando dois grupos de pesquisadores, um liderado por Sanger e outro por Gilbert desenvolveram diferentes estratégias de sequenciamento. Nos dias atuais existem as técnicas de sequenciamento de nova geração, as NGS, e as técnicas de terceira geração, essas ainda em desenvolvimento. [2]

Em todos os processos utilizados, o objetivo final do sequenciamento de DNA é a leitura e identificação da ordem exata em que estão as bases nitrogenadas, o que determina cada gene. [3]

## O DNA

O DNA, ou ácido desoxirribonucleico, é um longo polímero que possui unidades simples (monômeros) de nucleotídeos os quais são compostos por moléculas de açúcar (desoxirribose) e fosfato, intercalados, unidos por ligações fosfodiéster a uma das quatro bases nitrogenadas, duas purinas, Adenina e Guanina, que se ligam seletivamente às duas pirimidinas, Timina e Citosina, respectivamente por complementariedade, formando duas cadeias antiparalelas com extremidades 5' e 3'. [4]

As instruções codificadas nas sequências de bases nitrogenadas do DNA constituem os genes, e são transcritas para moléculas de RNA, e estas, traduzidas nas sequências de aminoácidos das proteínas. A sequência específica dos aminoácidos na cadeia é o que diferencia uma proteína de outra.[5]

Outro detalhe é que cada ser vivo, e alguns vírus, possuem uma identidade genética única que é determinada pela sequência exata das bases nitrogenadas presentes em seu DNA, apesar de possuir a mesma composição química. Essa sequência é resultado da herança genética, onde as características são transmitidas dos progenitores aos seus descendentes. [6]

## SEQUENCIAMENTO

Desde 1869, com a descoberta do DNA por Friedrich Meischer, passando pela publicação de James Watson e Francis Crick de 1953 que descreve o modelo em dupla hélice, utilizado até os dias atuais em que já se alcançou o ápice da biotecnologia, sente-se a necessidade de conhecer essa molécula tão relevante.[7].

Essa necessidade levou à busca por técnicas que possibilitassem a leitura exata da sequência que determina as

<sup>1</sup> Welika Faria Santos, Student of Biomedicine of the Faculty Anhanguera Educacional. QS 01 Street 212 Lotes 11/13/15, 70310-500, Águas Claras. Brasília/DF, Brazil, welikaseq@gmail.com.

<sup>2</sup> Marcia Silva de Oliveira, Full Professor of the Faculty Anhanguera Educacional. QS 01 Street 212 Lotes 11/13/15, 70310-500, Águas Claras. Brasília/DF, Brazil. Full Researcher of the Center for Studies in Education and Health Promotion, University of Brasilia – NESPROM/UnB. Campus Universitário Darcy Ribeiro s/n, set 07, room 34, 70.910-900, Asa Norte. Brasília/DF, Brazil, professora\_df@hotmail.com.

<sup>3</sup> Lélia Cristina Tenório Leói Romero, Professor of the Faculty Anhanguera Educacional. QS 01 Street 212 Lotes 11/13/15, 70310-500, Águas Claras. Brasília/DF, Brazil, lelialeoi@gmail.com.

<sup>4</sup> Marcus Alisson Araújo da Cunha, Professor of the Faculty Anhanguera Educacional. QS 01 Street 212 Lotes 11/13/15, 70310-500, Águas Claras. Brasília/DF, Brazil. marcus.cunha@aedu.com.

características dos seres vivos. Então surgiu o sequenciamento de DNA, que é basicamente um conjunto de complexos processos químicos que tem por finalidade determinar a ordem em que as bases nitrogenadas, Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) e Guanina (G), se dispõem no material genético dos organismos. [8]

Antes do sequenciamento em si, as longas seqüências de DNA devem ser extraídas e isoladas, a partir daí as amostras são picotadas em pedaços menores para serem analisadas. Essa fragmentação é feita por enzimas especiais (enzimas de restrição) específicas para cada tipo de DNA. Alguns desses métodos permitem apenas que os cromossomos sejam cortados individualmente, outros conseguem cortar o genoma inteiro de uma vez. [9]

Então fragmentos de DNA podem ser colocados em uma solução com bactérias, que multiplicam o DNA para que os cientistas possam ter mais matéria prima para análise, ou podem ser amplificados utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que é basicamente o mesmo processo de replicação natural, mas realizado in vitro. [10, 11]

O DNA será fragmentado novamente, mas agora com comprimento que contenha um número de pares de bases (pb) específico, de acordo com a técnica escolhida para sequenciar, e em seguida purificado, para que esteja pronto para o processo de sequenciamento. [12]

## PLATAFORMAS E MÉTODOS

Um dos mais utilizados é o chamado “método dideoxy”, de “terminadores de cadeia” ou “Sanger”, cujo inventor foi Frederick Sanger. O processo é realizado a partir de uma cadeia simples (não dupla) do DNA a ser sequenciado, obtida por desnaturação da molécula nativa; esta servirá de molde para gerar a outra metade complementar da dupla hélice. [13]

Sua estratégia consiste em identificar, continuamente e sequencialmente durante o processo, o último nucleotídeo incorporado na extremidade de alongamento da cadeia que deverá também portar uma “marca” (fluorescência) que permita detectá-lo na etapa de análise[14]

A partir de 2005 as plataformas de sequenciamento foram criadas com o intuito de gerar dados em larga escala, usando métodos de alto desempenho com um valor econômico mais viável e sendo tecnicamente mais eficientes, utilizando uma estrutura centralizada que pudesse atender às necessidades de vários projetos ao mesmo tempo. [15]

O Pirosequenciamento é uma técnica que tem como princípio a detecção de um pirofosfato liberado durante a incorporação do desoxinucleotídeo à cadeia, ao invés da terminação da cadeia de DNA com ddNTPs (dideoxy). [16]

O sequenciamento na plataforma Solexa, assim como o de Sanger, é realizado por síntese, usando a enzima DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A inovação consiste na clonagem in vitro dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida. [17]

No sistema SOLiD, o procedimento é praticamente o mesmo da plataforma Solexa, difere no fato de que a reação de sequenciamento é catalisada pela enzima DNA ligase, e não DNA polimerase. [16]

A Ion Torrent desenvolveu outro método que utiliza uma abordagem indireta para sequenciamento de DNA com base em nucleotídeos fluorescente-etiquetados. Explorando o fato de que um íon de hidrogênio é liberado sempre que um nucleotídeo se atribui a uma fita de DNA, foram projetados sensores em microchip, para detectar esta assinatura química. [18]

A Oxford Nanopore Technologies apresentou o seu próprio método inteligente para o sequenciamento. Incorporaram um poro de proteína em uma membrana de polímero sintético dentro do microchip. A cadeia de DNA a ser sequenciado passa através do poro e, quando cada nucleotídeo atravessa, é registrado como um sinal elétrico diferente detectado pela máquina Oxford. [19]

## APLICAÇÕES

O sequenciamento de DNA permitir-nos-á determinar, de um modo mais preciso, riscos como os da exposição a vários tipos de radiações, reagentes mutagênicos e toxinas em geral. [20]

A nível forense há o favorecimento no processo de identificação, cada vez mais exata, dos “culpados” ou “inocentes”; a paternidade (ou, ainda, outras relações de parentesco) de um indivíduo; as vítimas de catástrofes, acidentes.[1]

A análise das sequencias revolucionou o estudo de várias áreas de pesquisa como, por exemplo, para o estabelecimento de paradigmas que impulsionaram o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, o chamado melhoramento molecular, que utiliza informações de mapas genéticos para identificar regiões do genoma que contém genes de interesse econômico. [3]

Prevê-se a criação de novas fontes de energia, novos monitores de poluição e, possivelmente, a limpeza de resíduos tóxicos de uma forma mais asséptica, que não cause outros danos ao meio ambiente, através da produção de bioagentes extraídos de microorganismos induzidos por mutações.[21]

Obter informações sobre a linha evolutiva dos organismos através das sequencias contidas nos genomas poderão resultar em novos métodos de diagnóstico, na

formulação de novos medicamentos, vacinas, na prevenção e tratamentos mais eficazes contra doenças ou pragas.[21]

## REFERÊNCIAS

- [1] Silva, L. A. F.; Passos, N. S. DNA Forense: coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo do DNA. *Edufal*, 2<sup>a</sup> edição. Maceió, 2006.
- [2] Ning-Wei, Z. Recent progress in the methods of genome sequencing. *Braz. arch. biol. technol.*, v. 53, n. 2, Curitiba, Abril, 2010.
- [3] Davies, K. Decifrando o genoma. A corrida para desvendar o DNA humana. *Schwarcs*, 1<sup>a</sup> edição, São Paulo, 2001.
- [4] Griffiths, A. J. F.; Wessler, S. R.; Lewontin, R. C.; Carroll, S. B. Introdução à genética. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- [5] Watson, J. D.; Witkowski, J. A.; Myers, R. M.; Caudy, A. A. DNA Recombinante, Genes e Genomas, *Artmed*, 3<sup>ed</sup>. 2009.
- [6] Snustad, D. P.; Simmons, M. J. Fundamentos de Genética. *Guanabara Koogan*, 2<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro 2001.
- [7] Scheid, N. M. J.; Ferrari, N.; Delizoicov, D. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA, *Ciência & Educação*, v. 11, n. 2, p. 223-233, 2005.
- [8] Watson, J. D., Crick, F. H .C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, v. 171, pg. 737-738, 1953.
- [9] Nascimento, A. A. C.; Espreafico, E. M.; Larson, M. L. P.; Monesi, N.; Rossi, N. M. M.; Rodrigues, V. Tecnologia do DNA Recombinante. USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 2003.
- [10] Roca, M. G.; Davide, L. C.; Wheals, A. E. Template preparation for rapid PCR in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Braz. J. Microbiol.* v. 34, n. 1, São Paulo, Apr. 2003 .
- [11] Pasternak, J. J. Genética Molecular Humana. *Manole*, 1<sup>a</sup> ed. Barueri, 2002.
- [12] Shenduri, J.; Hanlee, J. Next- Generation sequencing DNA. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 10, 2008.
- [13] Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 12, USA, December 1977.
- [14] Figueiredo, G. S.; Reis, A. C. M.; Castro, A. S.; Bisol, T. B.; Neto, C. R. B. Reação de Sequenciamento de DNA e Purificação – *Protocolos de Otimização. Circular Técnica n. 22, EMBRAPA*, 2010.
- [15] Ferreira, M. E., Neto, C. R. B. A Importância da Pesquisa Genômica e o Sequenciamento de DNA. Comunicado Técnico n.91, *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 2003.
- [16] Carvalho, M. C. C. G.; Silva, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Cienc. Rural, Santa Maria*, v. 40, n. 3, Mar. 2010.
- [17] Metzeker, M. L. Sequencing Technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, Janeiro 2010.
- [18] Hui, P. Next Generation Sequencing: Chemistry, Technology and Applications. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* 2012.
- [19] Shang, F.; Guihen, E.; Glennon, J. D. Recent advances in miniaturisation – The role of microchip electrophoresis in clinical analysis. *Electrophoresis*, v. 33, n. 1, pag. 105–116, Janeiro 2012.
- [20] Castellanos, M. R.; Sangro, B. Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve? *Anales Sis San Navarra, Pamplona*, v. 28, n. 1, abr. 2005.
- [21] Cordeiro, M. C. R., Engenharia genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações. *Embrapa Cerrados, Documentos*, 2003.