

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS

JOÃO VICTOR MEIRELLES LEITE

**ANÁLISE DE SUPORTES DE AMOSTRAGEM POR *DRIED*
BLOOD SPOTS (DBS) APLICADA AO CONTROLE DE DOPAGEM
GENÉTICA NO ESPORTE**

Rio de Janeiro

2022

JOÃO VICTOR MEIRELLES LEITE

**ANÁLISE DE SUPORTES DE AMOSTRAGEM POR *DRIED*
BLOOD SPOTS (DBS) APLICADA AO CONTROLE DE DOPAGEM
GENÉTICA NO ESPORTE**

Projeto final de curso apresentado à banca examinadora e ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Químico (Curso: Química - Atribuições Tecnológicas).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Pizzatti.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sheila López

Rio De Janeiro

2022

JOÃO VICTOR MEIRELLES LEITE

**ANÁLISE DE SUPORTES DE AMOSTRAGEM POR *DRIED*
BLOOD SPOTS (DBS) APLICADA AO CONTROLE DE DOPAGEM
GENÉTICA NO ESPORTE**

Projeto final de curso apresentado à banca examinadora e ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Químico (Curso: Química - Atribuições Tecnológicas).

Aprovado por:

Prof^a. Dr^a. Luciana Pizzatti; DBQ – IQ – CCMN – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha; DQA – IQ – CCMN – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Fernanda Veronesi Marinho Pontes; DQA – IQ – CCMN – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Bianca Cruz Neves; DBQ – IQ – CCMN – UFRJ

Rio De Janeiro

2022

“Me dopar era parte do meu trabalho.”

- Lance Armstrong

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que participaram – direta ou indiretamente, de maneira positiva ou até mesmo negativa – na realização desse sonho que foi estudar na UFRJ e me dedicar à Ciência. Os últimos cinco anos e a construção desse trabalho representam um momento muito especial na minha vida e memórias que irei carregar para sempre.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Júnior e Zélia, por todo o apoio em todos esses anos e pelo incentivo na minha educação. Nada disso seria possível sem os “resgates” nas saídas do laboratório às 3:00 da manhã ou as inúmeras marmitas preparadas. Agradeço também à minha irmã Tatiane, à minha avó Zedith e à minha prima Raissa, obrigado por serem um refúgio quando eu mais preciso de leveza.

Agradeço às minhas orientadoras, Luciana e Sheila, por todos os ensinamentos, o apoio, a dedicação e, principalmente, pela confiança em mim como profissional. Sou extremamente grato por toda a liberdade e autonomia que me foi dada ao longo dos últimos 3 anos de orientação. Nenhuma outra experiência me moldou tanto quanto essa.

Agradeço a todos os Laboratórios que me acolheram nos últimos 5 anos e me permitiram viver meu sonho de infância de me dedicar à carreira científica. Não tenho como descrever o quanto aprendi com cada um de vocês, como profissional e como pessoa, e o quanto sou grato por isso.

Ao Professor Carlos Eduardo e à minha grande amiga Regina do LabITAn, por toda a paciência ao me introduzir na Química Analítica quando eu mal sabia o que era a Química Analítica em si. Não poderia desejar um início de trajetória melhor.

Aos meus colegas da COAMI/CETEM, em especial a minha co-orientadora Kátia, por todo carinho em um momento extremamente difícil da minha vida e por não desistir de mim quando eu mesmo já tinha desistido. Você provavelmente não sabe o quanto eu precisava disso.

Ao Professor Carlos Conte e à Dra. Rafaela Ferrari, por toda a confiança e compreensão no meu breve período no LAABBM/NAL. Além de todos os ensinamentos no curto tempo que trabalhamos juntos, obrigado por todo o respeito e a consideração como profissional, e não só como aluno. Espero que possamos nos encontrar novamente.

Aos meus colegas do LABMOPS e às minhas grandes amigas do DRAMAMOPS, obrigado por todo o companheirismo e por todos os ensinamentos, por todas as risadas e por

todos os momentos de desabafo, por todos os almoços de aniversário no Nova América e por todas as lágrimas enxugadas. Obrigado por tudo!

Aos Renegados do IPqM-15, pela experiência mais surpreendente que eu tive ao longo de toda a minha graduação. Vocês são a última coisa que eu esperava encontrar ao ingressar em um Grupo de Tecnologia de Materiais de uma instituição militar. Obrigado por todas as sabotagens, por todas as *flechitas* e por todo o acolhimento. Vocês faziam a viagem diária valer a pena.

À toda a Triagem IV/LAPAA por terem me recebido tão bem e por todo o apoio nessa fase final da minha graduação. O percurso foi difícil, mas vocês tornaram tudo suportável. Obrigado por me ensinarem tanto, obrigado por todo o apoio, obrigado por todo o companheirismo. Vocês são os Pipocas que pegaram Camarote no meu coração.

Agradeço à toda equipe do LBCD/LADETEC pela contribuição à minha formação. Desde a calibração das pipetas e os reagentes emprestados, até os pequenos *ziplocks* doados, as fofocas nos corredores e as risadas no Salão de Equipamentos. Participar disso tudo é grande demais.

Agradeço aos amigos que o Instituto de Química me deu: Andressa, Juliana e Raphael; Regina, Marra, Marianna, Luan e Ana Luiza; Felipe e Raquel; Paula, Flávia e Luciene; Anna e Roberta; Valter, Marcos, Eva e Anavitoria; Ju e Isa; Marcele, Beatrice, Carol e Letícia; Cinthia e Carol Reis; Gabi, Vt, Drika e Rickson; Julia e Ana Clara; e muitos outros que provavelmente estou esquecendo porque meu coração é grande demais e meu cérebro muito pequeno. Obrigado por estarem ao meu lado e por fazerem os meus dias mais felizes.

A todos os meus amigos de fora da faculdade, por sempre acreditarem em mim. Obrigado Nathan, Natália, Diego, Dani, Wallace, Mariana e Sthefani por me acompanharem desde o fundamental. Obrigado Ana, Aninha, Clara, Giovana, Julinha, Juliane e Bia por todos os momentos de alegria e inclusive as brigas. Principalmente as brigas. Obrigado Aline e Vovó Judite por todo o apoio, carinho e cuidado com a minha saúde. Obrigado Duda e Gabriel, por serem meu maior lugar de conforto. Obrigado Camila e Julio, por terem chegado tão de repente e tomado meu coração por inteiro. Obrigado Allan, Matheus, Thainá e Hanna, por serem a família que eu escolhi amar e por terem escolhido me amar de volta. Espero ter deixado vocês orgulhos

RESUMO

O rápido desenvolvimento das técnicas de terapia gênica é uma perspectiva promissora para a área da saúde, entretanto, igualmente implica em um risco potencial ao possibilitar novas abordagens não-terapêuticas, como, por exemplo, o melhoramento do desempenho atlético no esporte. Sabe-se que os avanços recentes comprovados em relação a biossegurança e aos benefícios da transferência gênica em humanos, aumentaram a probabilidade de busca do *doping* genético por atletas e que, além disso, um dos genes exógenos mais prováveis a serem utilizados como alvo é a eritropoietina (EPO). Tendo em vista a inclusão do *doping* genético no Código Mundial Antidopagem, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos com especificidade e sensibilidade adequadas para sua detecção. Abordagens baseadas no uso de técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são uma alternativa em amostras de sangue, principalmente quando aliados à amostragens não-convencionais, como, por exemplo, a coleta por *Dried Blood Spots* (DBS). Este é um sistema menos invasivo e de maior robustez, possibilitando um armazenamento e transporte mais estável. Neste trabalho foram analisados 3 diferentes suportes para DBS, visando acoplar os mesmos em um método e detecção para o cenário de controle de dopagem. Duas condições diferentes de temperatura de armazenamento (temperatura ambiente e -30 °C) e dois períodos de estocagem (1 e 21 dias) foram testados com o objetivo de averiguar o comportamento dos suportes. Amostras de sangue foram coletadas de 6 voluntários saudáveis, fortificadas com material de referência de EPO e tiveram seu DNA extraído. O rendimento foi avaliado por fluorimetria e a pureza dos produtos obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta. Dois ensaios para PCR tendo como alvo diferentes junções éxon/éxon de EPO transgênica foram usados para amplificação, assim como um ensaio para um gene constitutivo. Todas as amostras extraídas apresentaram rendimento, pureza e integridade adequados para um cenário de controle de dopagem. Os melhores rendimentos a -30 °C foram obtidos com o papel NUCLEIC-CARD™, enquanto à temperatura ambiente com o suporte Whatman. Para o tempo de 1 dia, não há correlação entre o uso de refrigeração e incrementos positivos nos resultados de extração e/ou detecção. Para o tempo de 21 dias, o mesmo é observado para o Whatman, enquanto os outros dois suportes expressam melhorias no montante de DNA extraído. Estudos futuros para avaliar a implementação de novas abordagens de aplicações não-volumétricas sob os suportes e de novos métodos de confirmação mais sensíveis são necessários. Novas perspectivas de abordagens por PCR multiplex são encorajadas e podem ser aplicadas para detecção de múltiplos alvos em amostras de DBS.

Palavras-chave: Dried Blood Spots, dopagem genética, PCR quantitativa, eritropoietina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Controle de dopagem no esporte.....	1
1.2. Dopagem genética.....	4
1.3. Dopagem por Eritropoetina (EPO)	7
1.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	9
1.5. Dried Blood Spots (DBS)	13
1.5.1. DBS no controle de dopagem	15
2. OBJETIVO	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. Preparo do tampão de extração Tris-EDTA 0,1 (TE _{0,1}).....	17
3.2. Coleta de sangue total de voluntários	17
3.3. Fortificação das amostras.....	17
3.4. Aplicação em suportes de <i>Dried Blood Spots</i>	18
3.5. Extração e armazenamento do material genético.....	20
3.6. Quantificação do material genético extraído	22
3.6.1. Quantificação por fluorimetria – Qubit.....	22
3.6.2. Quantificação por espectrofotometria – NanoDrop.....	23
3.7. Preparo dos controles de qualidade para reação de PCR em tempo real	24

3.8.	Método de amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR)	25
3.8.1.	Método de amplificação com ensaio Sigma 2	26
3.8.1.1.	Preparo do mix primer-sonda 20x do ensaio Sigma 2	27
3.8.1.2.	Construção de curva padrão para ensaio Sigma 2.....	27
3.8.1.3.	Amplificação de amostras com ensaio Sigma 2.....	28
3.8.2.	Método de amplificação com ensaio Sigma 4	31
3.8.2.1.	Preparo do mix primer-sonda 20x do ensaio Sigma 4	31
3.8.2.2.	Construção de curva padrão para ensaio Sigma 4.....	32
3.8.2.3.	Amplificação de amostras com ensaio Sigma 4.....	33
3.8.3.	Método de amplificação com ensaio para GAPDH	35
3.9.	Método de confirmação por corrida de eletroforese em gel de agarose	38
3.9.1.	Corrida dos produtos de amplificação do ensaio Sigma 2 em gel de agarose 4%	39
3.9.2.	Corrida dos produtos de amplificação do ensaio Sigma 4 em gel de agarose 4%	40
3.9.3.	Corrida dos produtos de amplificação do ensaio GAPDH em gel de agarose 4%	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1.	Avaliação da extração de DNA em diferentes suportes.....	41
4.2.	Estudo dos parâmetros de mérito dos ensaios de PCR	51
4.3.	Amplificação por PCR com ensaio Sigma 2.....	54
4.4.	Amplificação por PCR com ensaio Sigma 4.....	61
4.5.	Avaliação da integridade do DNA extraído em diferentes suportes	64
5.	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE	i
	Resultados individuais de rendimento de extração de DNA	i
	Resultados individuais de pureza de extração de DNA	ii
	Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 2 - NUCLEIC-CARD™,.....	iii

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 2 - Whatman...	iv
Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 2 – Blood Swab Organicoat.....	v
Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 4 - NUCLEIC-CARD™,.....	vi
Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 4 - Whatman..	vii
Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 4 – Blood Swab Organicoat.....	viii
Perfil de fluorescência – Curva padrão ensaio Sigma 2.....	ix
Perfil de fluorescência – Curva padrão ensaio Sigma 4.....	x
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 2 – NUCLEIC-CARD™.....	xi
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 2 – Whatman.....	xii
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 2 – Blood Swab Organicoat	xiii
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 4 – NUCLEIC-CARD™.....	xiv
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 4 – Whatman.....	xv
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 4 – Blood Swab Organicoat	xvi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Princípios de funcionamento da PCR.....	11
Figura 2. Funcionamento da qPCR.....	13
Figura 3. Descrição estrutural do RM-EPO utilizado neste trabalho.	17
Figura 4. Exemplo de armazenamento das manchas de sangue seco no suporte NUCLEIC-CARD™.	19
Figura 5. Monitoramento da temperatura ambiente.....	20
Figura 6. Fluorímetro utilizado neste trabalho.	23
Figura 7. Espectrofotômetro utilizado neste trabalho.....	24
Figura 8. Instrumentação de PCR utilizada neste trabalho.....	26
Figura 9. Assinalamento de poços para construção da curva padrão do ensaio Sigma 2.	28
Figura 10. Assinalamento de poços para análise de amostras com ensaio Sigma 2.....	30
Figura 11. Condições de ciclagem de temperatura para ensaio Sigma 2.....	31
Figura 12. Assinalamento de poços para construção da curva padrão do ensaio Sigma 4.	33
Figura 13. Assinalamento de poços para análise de amostras com ensaio Sigma 4.....	34
Figura 14. Condições de ciclagem de temperatura para ensaio Sigma 4.....	35
Figura 15. Assinalamento de poços para análise de amostras com ensaio para GAPDH.	37
Figura 16. Programa de temperatura para ensaio para GAPDH.....	38
Figura 17. Cuba de eletroforese em gel de agarose utilizada neste trabalho.	39
Figura 18. Exemplo de aplicação de um sangue fortificado da Coorte Amostral. Da esquerda para a direita: suporte NUCLEIC-CARD™, suporte Whatman, suporte Blood Swab Organicoat.	41
Figura 19. Comparação de extração de DNA entre os três suportes no tempo de 1 dia.	45
Figura 20. Comparação de extração de DNA entre os três suportes no tempo de 21 dias.	46
Figura 21. Comparação estatística entre os três suportes para cada condição de armazenamento.	47
Figura 22. Comparação de precisão de extração entre os grupos amostrais.....	48

Figura 23. Comparação estatística entre os tempos de armazenamento.....	49
Figura 24. Curva padrão (Cq x cp/ μ L) do ensaio Sigma 2 e seus parâmetros de mérito.	53
Figura 25. Curva padrão (Cq x cp/ μ L) do ensaio Sigma 4 e seus parâmetros de mérito.	54
Figura 26. Comparação de precisão entre os grupos amostrais com ensaio Sigma 2...56	
Figura 27. Corrida de eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos decorrentes da amplificação das amostras fortificadas em PCR com ensaio Sigma 2.....	57
Figura 28. Reteste de corrida de eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos decorrentes da amplificação das amostras fortificadas em PCR com ensaio Sigma 2.....	59
Figura 29. Corrida de eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos de amplificação do grupo controle com ensaio Sigma 2.	61
Figura 30. Comparação de precisão entre grupos amostrais em ensaio Sigma 4.	63
Figura 31. Eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos amplificados por PCR com ensaio Sigma 4.....	64
Figura 32. Eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos amplificados por PCR com ensaio GAPDH.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento de experiências para cada exemplar de suporte.	19
Tabela 2. Dimensionamento do <i>mix</i> de reação de PCR para ensaio Sigma 2.	26
Tabela 3. Dimensionamento do <i>mix</i> para uma placa inteira com o ensaio Sigma 2.....	29
Tabela 4. Dimensionamento <i>mix</i> de reação de PCR para ensaio GAPDH.	36
Tabela 5. Dimensionamento de PCR para uma placa com ensaio para GAPDH.....	36
Tabela 6. Resultados da quantificação do DNA extraído por Qubit (n = 7).	42
Tabela 7. Resultados da quantificação do DNA extraído por Nanodrop (n = 7).....	49
Tabela 8. Resultados da amplificação por PCR pelo ensaio Sigma 2 (n= 18).	55
Tabela 9. Amplificação dos controles por PCR pelo ensaio Sigma 2. (n=3).	59
Tabela 10. Resultados da amplificação por PCR pelo ensaio Sigma 4.	61
Tabela 11. Amplificação por PCR com ensaio GAPDH.	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- IAAF** *International Association of Athletics Federations*
- COI** Comitê Olímpico Internacional
- ABCD** Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem
- AMA** Agência Mundial Antidopagem
- WADA** *World Anti-Doping Agency*
- GC-MS** Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
- LADETEC** Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
- LBCD** Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
- CRISPR** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- EPO** Eritropoetina
- VEGF** Fator de Crescimento do Endotélio
- IGF-1** Fator de Crescimento tipo Insulina I
- GH** Hormônio do Crescimento
- PPAR δ** Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma- δ
- rEPO** Eritropoetina recombinante
- PCR** Reação em cadeia da Polimerase
- qPCR** Reação em cadeia da Polimerase quantitativa
- dPCR** Reação em cadeia da Polimerase digital
- DBS** *Dried Blood Spots*
- CEP** Comitê de Ética em Pesquisa
- RM-EPO** Material de referência da Eritropoetina
- NTC** *Negative Template Control*
- PTC** *Positive Template Control*
- ANOVA** Análise de Variância
- MIQE** *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*
- GAPDH** Glicerol 3- fosfato desidrogenase
- A260** Absorvância em 260 nm
- A280** Absorvância em 260 nm
- LOQ** Limite de Quantificação
- C_q** Ciclo de amplificação

1. INTRODUÇÃO

1.1. Controle de dopagem no esporte

A dopagem no esporte é uma prática histórica que acompanha a realização do exercício físico e a própria humanidade como um todo ao longo dos séculos. O termo “*doping*” foi mencionado pela primeira vez apenas em 1889, em um dicionário inglês, o qual descreveu o mesmo como “a administração ilícita de *doop* – um sumo viscoso de caráter estimulante preparado com ópio e resíduos de uva – em animais de corrida no turfe a fim de assegurar sua vitória”. Entretanto, diversos registros ancestrais já relatavam este ato muito antes em diversas civilizações ao redor do globo (Müller, 2010).

Como exemplo, têm-se Filostrátos de Lemnos e Galeno de Pérgamos, ambos filósofos gregos vivos no século III a.C, que já relatavam o uso de medicamentos para melhora na *performance* esportiva. Enquanto isso, médicos orientais já recomendavam o uso de extratos vegetais e o consumo de testículos de boi para melhoria na circulação e aumento da virilidade. Este último também era extensamente consumido antes de batalhas pelos Hunos, uma antiga confederação euroasiática de nômades equestres. Nos jogos Olímpicos clássicos, ocorridos entre 776 a.C. e 393 d.C., cogumelos alucinógenos e outras substâncias eram tão extensamente utilizados pelos atletas que levaram à abolição da competição pelo Imperador Teodósio I, em 395 d.C. (Müller, 2010).

Assim como atualmente, o uso dessas substâncias de forma a atentar contra a dignidade e o espírito esportivo era proibido pelo regulamento vigente. Entretanto, o uso de substâncias “comuns” que poderiam ser categorizadas como suplementação nutricional e as limitações técnicas do período impossibilitavam métodos efetivos de detecção da prática de *doping* (Müller, 2010).

Com o avanço tecnológico ao longo dos anos, o uso de estimulantes mais refinados como, por exemplo, a estriçnina, a cafeína, o álcool e a cocaína foi fortemente difundido no meio esportivo, assim como o uso abusivo de derivados de arsênio e de drogas de origem vegetal de forma “paramedicinal”. Proporcional à melhoria na capacidade estimulante dessas substâncias, a mortalidade associada a prática de dopagem moderna também evoluiu drasticamente. Assim, quando o combate a prática do *doping* se torna um compromisso não só com o espírito esportivo, mas também com a vida, urge a necessidade da implementação de triagens a fim de se combater efetivamente a mesma (Müller, 2010).

A história moderna do combate ao *doping* tem-se início de forma efetiva com o farmacêutico polonês Alfons Bukowski em 1910. Este foi responsável pelo desenvolvimento do primeiro método de detecção de alcalóides em salivas equinas, sendo o marco histórico da primeira aplicação de uma análise química neste cenário (Müller, 2010).

Em 1928, têm-se a Associação Internacional de Federações de Atletismo (IAAF – do inglês, International Association of Athletics Federations) como a primeira instituição formal a banir o uso de substâncias estimulantes no esporte e expor a necessidade de testagens humanas obrigatórias no meio esportivo para este fim (Müller, 2010). Em um efeito dominó, nos anos 70, as federações internacionais de ciclismo e de futebol iniciaram testes de dopagem em seus participantes. Além da própria Comissão Olímpica Internacional (COI) que instituiu uma Comissão Médica especializada para implementação de testes de triagem nos Jogos Olímpicos e sua primeira lista de substâncias proibidas (Müller, 2010).

A triagem em humanos exclusivamente durante as competições se mostrou uma abordagem ineficaz de, tendo em vista a possibilidade da interrupção do uso dos mesmos antes do momento de teste. Assim, a excreção das substâncias se encontraria encerrada ou mínima para além da sensibilidade analítica dos métodos em uso, enquanto os efeitos das melhorias na *performance* continuariam expressivos. Logo, a implementação de um monitoramento em tempo integral dos atletas, com testes fora do período de competições e em matrizes que possam ser acompanhadas por longos períodos de tempo foi fundamental para a consolidação de um sistema efetivo de controle de dopagem (MÜLLER, 2010).

O monitoramento longitudinal de marcadores em atletas pelo uso de matrizes biológicas, como sangue e urina, se tornou o alicerce do combate ao *doping* e, em paralelo a estes incrementos nos métodos de análise, maiores avanços na parte legislativa puderam ser observados. Em 1965, um relatório completo incluindo relatos, implementações e gargalos técnicos quanto ao *doping* nas Olimpíadas de Tóquio de 1964 foi redigido pela COI e sua Comissão Médica. A partir disto, diversas regulamentações anti-dopagem mais apuradas começaram a ser compostas ao redor do globo, assim como a implementação efetiva de testes em humanos de forma não-pontual e não-dependente do período de competições (Müller, 2010).

Em 1967, tem-se a morte do ciclista Tommy Simpson pelo uso abusivo de anfetaminas e, em 1968, os Jogos Olímpicos de Verão ocorridos na Cidade do México se tornaram o palco da primeira desclassificação oficial de um atleta – o sueco Hans-Gunnar Liljenvall – flagrado na primeira triagem oficial *antidoping* por níveis elevados de álcool no sangue. A perspectiva

sobre o combate a dopagem foi, assim, alterada mundialmente, elevando o nível do debate e trazendo o mesmo para uma ótica mais fina e apurada, com o COI aprovando, assim, a normativa nº 12/67, a primeira resolução oficial antidopagem (MÜLLER, 2010; PEREIRA DOS SANTOS et al., 2014).

Em 1984, nas Olimpíadas de Los Angeles, a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) foi implementada pela primeira vez como um método efetivo de detecção para testagem de esteroides anabolizantes. Em 1987, novas substâncias como betabloqueadores e diuréticos foram adicionadas a lista de substâncias proibidas pela Comissão Médica (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2014).

No final do século XX, uma reunião internacional foi realizada na Suíça, resultando na Declaração de Lausanne sobre o controle de dopagem no esporte. Este documento deu origem a Agência Mundial Antidopagem (AMA), uma organização internacional independente com objetivo central de combater a dopagem no esporte, além de regulamentar e realizar a curadoria da lista de substâncias e práticas proibidas, dentro e fora de competições esportivas. Por meio desta, políticas antidopagem foram estabelecidas com a intenção de proteger a saúde dos atletas, manter a integridade no esporte e estipular as sanções apropriadas aos devidos infratores (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2014).

Segundo a definição da AMA, o ato de dopagem é dado como “o uso qualquer de substâncias proibidas ou métodos proibidos por parte dos praticantes de esportes com objetivo de aumentar a sua eficiência desportiva ou apenas por objetivo estético”. A lista de substâncias proibidas estabelecidas pela AMA – integrada ao Código Mundial Antidopagem criado em 2003 – é atualizada conforme novos desdobramentos tecnológicos e científicos são alcançados, tendo-se assim o objetivo de manter o “espírito esportivo” e a dignidade no esporte de forma a priorizar a ética, a honestidade e a saúde (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2014).

No Brasil, o controle de *doping* foi iniciado em 1974 pela Federação de Futebol do Estado de São Paulo com testagens sendo realizadas em conjunto com laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Em 2011, a Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD) foi criada, preenchendo-se assim um dos pré-requisitos internacionais para o acolhimento dos Jogos Olímpicos e Paralímpicos pelo país, mais especificamente pela Cidade do Rio de Janeiro, em 2016.

A ABCD tem como função garantir a implementação da Política Nacional de Combate ao *Doping* – instituída em 2005, após o assino pelo Brasil da Convenção Internacional Contra

o *Doping* no Esporte, celebrada em Paris – para, assim, garantir igualdade, justiça e saúde para os atletas (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2014; SANTOS; BAHRKE, 2014).

Atualmente, o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD, antigo LAB-DOP), situado no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Analítico (LADETEC) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, é responsável pela realização da maioria dos testes de controle de dopagem no esporte nacional e na América Latina. Este é um laboratório acreditado pela AMA, atendendo as diretrizes técnicas e instrumentais de análise de substâncias controladas pela mesma com maestria. O LBCD foi o carro-chefe no combate a dopagem durante os Jogos Olímpicos de 2016, realizando mais de 6000 análises de sangue e urina de atletas nacionais e internacionais e funcionando 24 horas por dia (PEREIRA DOS SANTOS et al., 2014; SANTOS; BAHRKE, 2014).

1.2. Dopagem genética

A prática de dopagem genética pode ser encontrada desde 2004 dentre as substâncias presentes no Código Mundial Antidopagem que contém as substâncias e práticas proibidas pela Agência Mundial Antidopagem no esporte mundial. Esta prática é definida formalmente como: (i) o uso de células normais ou geneticamente modificadas a fim de aumentar o desempenho esportivo; (ii) o uso de ácidos nucleicos ou seus de análogos, que possam alterar a sequência genômica e/ou alterar a expressão genética por qualquer mecanismo e, isto inclui, mas não se limita a edição de genes, silenciamento de genes ou tecnologias de transferência genética com potencial para melhoria do desempenho esportivo (ARTIOLI; HIRATA; LANCHI, 2007; LÓPEZ et al., 2020).

Assim, entende-se que o *doping* genético difere nos meios e nos vetores utilizados, mas têm os mesmos objetivos que o *doping* convencional. Um breve histórico da recente evolução da dopagem genética pode ser traçado a partir do desenvolvimento da chamada terapia gênica. Esta pode ser definida como uma modalidade terapêutica atual da medicina, onde materiais genéticos de interesse são transferidos por meio de diferentes tipos de vetores, como, por exemplo, adenoassociados, retrovirais, lentivirais e derivados de CRISPR/Cas9, para determinadas células-alvo, com o objetivo de suprir os produtos de um gene estruturalmente anormal no genoma de um paciente (Artioli et al., 2007; López et al., 2020; Prado, 2013).

A descoberta da transferência de material genético por meio de bacteriófagos por Zinder e Lederberg em 1952 e a consequente pesquisa de Waclaw Szybalski em 1962 sobre as vias nos

quais os genes eram transferidos, modificados e regulados, podem ser considerados os primeiros passos na história para o desenvolvimento da terapia gênica. O primeiro ensaio clínico em seres humanos, por sua vez, foi realizado por Rogers e Pfuderer, em 1968, onde duas mulheres adultas portadoras de hiperargininemia, uma doença metabólica hereditária no ciclo da ureia, foram tratadas por meio do uso do vírus do papiloma Shope. Por meio deste ensaio, a estratégia de transferência de genes exógenos foi alcançada de forma bem-sucedida, porém os resultados terapêuticos obtidos não foram promissores.

Posteriormente, em 1989, a primeira transferência aprovada de genes exógenos no ser humano por meio do uso de retrovírus modificado confirmou a viabilidade e a segurança da terapia gênica em humanos, em um estudo contendo um espaço amostral significativo e respostas terapêuticas concretas (BISCAIA; NOBREGA, 2020).

Dados os resultados positivos obtidos, pela primeira vez, em 1990, um ensaio clínico de terapia gênica foi aprovado para pacientes com deficiência de enzima adenosina deaminase. A China, em 2003, foi o primeiro país a aprovar uma terapêutica oficial com base na terapia gênica. A Gendicine®, consiste num vetor adenoviral indicado para o tratamento do carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço. Em 19 de Julho de 2012, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) concedeu a primeira autorização de introdução no mercado ocidental para um produto com base na terapia gênica, Glybera®, um medicamento composto por um vetor adenoassociado que expressa a lipase proteica, para o tratamento da deficiência de lipase proteica. (BISCAIA; NOBREGA, 2020)

O número de ensaios clínicos aprovados deste então aumentou exponencialmente, principalmente relacionados à condições como cancro, doenças genéticas e doenças cardiovasculares. Em 1999, cerca de 117 ensaios clínicos foram aprovados, entretanto, devido a ocorrência de efeitos indesejáveis atrelados, este número sofreu uma significativa queda posteriormente. No início dos anos 2000, este número rondava por volta de 85 ensaios. Desde o início da década de 2010 e o seu relativo avanço tecnológico, o número de ensaios clínicos em terapia gênica novamente sofreu uma aumento expressivo, com cerca de 132 e 232 ensaios clínicos aprovados com resultados promissores, respectivamente, em 2017 e 2018. Geopoliticamente, a maioria desses ensaios têm sido desenvolvidos majoritariamente nos Estados Unidos da América e na Europa (Sapientia: Terapia Génica: Sistemas de Entrega, Mecanismos Moleculares e Abordagens Terapêuticas Aprovadas, n.d.).

Conforme a terapia gênica avança e se torna uma realidade cada vez mais concreta, seu mal uso em abordagens paramedicinais também devem ser avaliados. Em Junho de 2001, a Comissão Médica do Comitê Olímpico Internacional (COI), discutiu em âmbito internacional o tema da terapia gênica e seus impactos futuros nos esportes, dando início a discussão quanto ao que seria o *doping* genético em si no cenário esportivo. Tal reunião culminou no endossamento da aplicação da terapia gênica na prevenção e no tratamento de doenças humanas. Entretanto, apontando que esta modalidade pode ser utilizada de forma abusiva e antiética por parte de atletas para a melhoria da *performance* esportiva (Prado, 2013).

Em 2004, a editora chefe da revista *Molecular Therapy* publicou em editorial afirmando que, se nas Olimpíadas de Atenas, as histórias de *doping* genético possam ter sido consideradas apenas ficção científica e uma preocupação antecipada, a partir das Olimpíadas de Pequim em 2008, estas possivelmente não mais serão. Até o presente momento, não há registro de casos confirmados de atletas que tenham feito uso de manipulação genética para melhora do desempenho esportiva. Entretanto, considerando que ainda não existem meios de triagem e detecção do *doping* genético, e que já se é possível empregar essa terapêutica em seres humanos de forma confiável, concreta e segura, não se pode descartar categoricamente o uso desta prática ergogênica e que nenhum atleta já não o tenha experimentado (Artioli et al., 2007; López et al., 2020).

Entre os possíveis genes candidatos a serem manipulados para a melhoria indevida de *performance* no meio esportivo podem ser destacados: (i) eritropoetina (EPO); (ii) bloqueadores da miostatina; (iii) fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); (iv) fator de crescimento tipo insulina I (IGF-1); (v) hormônio do crescimento (GH); (vi) receptor ativado por proliferador de peroxissoma- δ (PPAR δ). Todos estes genes citados estão envolvidos com a *performance* humana, apresentando relação direta com o sistema hematopoiético, a musculatura esquelética, o endotélio vascular e o sistema endócrino (Artioli et al., 2007; López et al., 2020).

O amplo desenvolvimento de terapêuticas envolvendo o tratamento de anemias, de distrofia muscular e de doenças arteriais periféricas por meio da terapia gênica relacionadas à EPO, IGF-1 e VEGF-1, tornam estes os principais alvos para possíveis manipulação devido a fácil acessibilidade de produtos para tal. Além disso, o conhecimento da função destes genes na *performance* humana os torna elementos de interesse para possíveis melhorias de certas características importantes em um contexto competitivo, como a capacidade de transporte de

oxigênio, a tolerância de dor e o sistema de crescimento/reparo muscular (ARTIOLI; HIRATA; LANCHA, 2007; LÓPEZ et al., 2020).

Logo, um atleta poderia buscar a manipulação do gene da eritropoetina, por exemplo, pelo uso indevido de Repoxygen® – uma droga medicinal contendo o gene humano da EPO para o tratamento de anemia, câncer, neuropatia diabética e Doença de Parkinson. Esta favorece a regulação da capacidade de armazenamento e transporte de oxigênio, resultando em uma nítida vantagem em esportes dependentes de atividades aeróbicas. Assim como, por exemplo, maiores expressões de IGF-1 também poderiam ser alcançadas pelo uso de Increlex®, favorecendo a hipertrofia muscular e a melhora da recuperação das fibras (ARTIOLI; HIRATA; LANCHA, 2007; LÓPEZ et al., 2020).

1.3. Dopagem por Eritropoetina (EPO)

A eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína ácida de massa molecular de 30,4 kDa produzida nos rins cuja principal função é o estímulo e regulação da eritropoiese. É uma molécula de sinalização para eritrócitos precursores da medula óssea, atuando como fator hormonal de estimulação mitótica e diferenciação para formação de eritrócitos maduros a partir das células progenitoras eritróides. A eritropoetina é produzida por fibroblastos intersticiais renais em estreita associação com o peritubular capilar e túbulo contorcido proximal, sendo também gerada em células perisinusoidais hepáticas durante o período fetal e perinatal. O gene EPO humano está localizado no braço longo do cromossomo 7, contendo cinco éxons, que codificam um pró-hormônio de 193 aminoácidos, e quatro íntrons (ARTIOLI; HIRATA; LANCHA, 2007; BARROSO; TRISTÃO, 2019; BISCAIA; NOBREGA, 2020).

A produção de eritropoetina endógena é autorregulada estritamente pela demanda e oferta de oxigênio pelos tecidos. Um circuito de triângulo de estímulos é estabelecido no sistema biológico, onde a hipóxia age como um sensor ao oxigênio, presente em sítios celulares renais, estimulando a síntese e secreção da EPO. Ao contrário da hiperóxia, que de forma análoga, inibe esses processos. Associados a estes, têm-se o corpúsculo carotídeo, que responde à alterações do volume de oxigênio no sangue, emitindo influências ao hipotálamo posterior, via nervo de Hering-Castro, iniciando a cascata de modulações para formação ou inibição da EPO (ARTIOLI; HIRATA; LANCHA, 2007; BISCAIA; NOBREGA, 2020).

Em 1977, a EPO foi isolada e purificada a partir de urinas de pacientes com anemia aplásica por Eugene Goldwasser e colaboradores em um esforço extenso. Posteriormente, a

codificação do gene da EPO no DNA humano foi possível de ser alcançada assim como o sequenciamento de aminoácidos da mesma. Com a inserção do gene codificador em células ovarianas de hamsters chineses, a produção da eritropoetina recombinante por meio da indústria de biotecnologia foi possível, disponibilizando assim novas opções terapêuticas importantes para uma variedade de doenças e de deficiências sob diferentes nomes comerciais como, por exemplo, EPOgen®, Procrit®, Eprex®, Erypo® e Espo® (BARROSO; TRISTÃO, 2019; HENRIQUE SANTANA, 2017).

A terapia com EPO recombinante (rEPO) pode ser altamente eficaz em diversos casos de anemias, especialmente aquelas associadas a respostas eritropoiéticas deficientes. Também se recomenda EPO a pacientes que utilizam Zidovudina, para o tratamento da AIDS, assim, regulando o nível de hematócritos e de hemoglobinas. No cérebro, a EPO está relacionada a um sistema de proteção do desenvolvimento do cérebro desde o estado embrionário até o pós-natal, protegendo os neurônios de degeneração, além de ser um fator anti-apoptótico, antioxidante, antiinflamatório, inibidor do glutamato, neurotrófico e angiogênico. O tratamento com eritropoietina também melhora a função renal por reduzir a necrose tubular e a apoptose de podócitos e células endoteliais (HENRIQUE SANTANA, 2017).

Tendo em vista que o desempenho esportivo e o esforço físico estão diretamente ligados a capacidade de transporte de oxigênio e outros nutrientes aos músculos exigidos durante o esforço, entende-se que, ao aumentar a massa endógena de eritrócitos, a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue também é aumentada, retardando assim o decaimento do desempenho físico. Logo, a estratégia de dopagem da eritropoetina visando aumentar artificialmente a massa de células vermelhas e, assim, proporcionar maior disposição no transporte de oxigênio se torna um alvo de interesse para esportes onde se prevalece o exercício muscular aeróbico (HENRIQUE SANTANA, 2017).

As estratégias de dopagem sanguínea tanto pela administração da EPO recombinante quanto pelo uso de transfusões de sangue já são detectáveis por métodos de triagem e de monitoramento da AMA. Em contrapartida, uma vez que cópias adicionais do gene sejam inseridas no genoma do atleta, a expressão do mesmo levaria a um produto endógeno capaz de melhorar o desempenho atlético, sem diferenciação do componente biológico natural e, assim, imperceptível para detecção por técnicas analíticas convencionais. Além disso, pesquisas atuais com modelos animais como, por exemplo, ratos e macacos, e terapêuticas disponíveis atreladas

ao uso de terapia gênica para EPO sugerem que esse tipo de *doping* já seja factível (ARTIOLI; HIRATA; LANCHI, 2007; HENRIQUE SANTANA, 2017).

1.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Como dito por López et al (2020), a analogia da briga entre “o gato e o rato” é frequentemente utilizada para descrever o cenário de controle de dopagem, sendo uma comparação precisamente adequada para o caso específico da dopagem genética. Considerando os potenciais avanços na medicina e na biotecnologia, a necessidade de se estabelecer novos procedimentos e métodos de testagem, a fim de identificar atletas que possam fazer mau uso das estratégias de modulação genética se torna evidente a cada dia mais evidente (López et al., 2020).

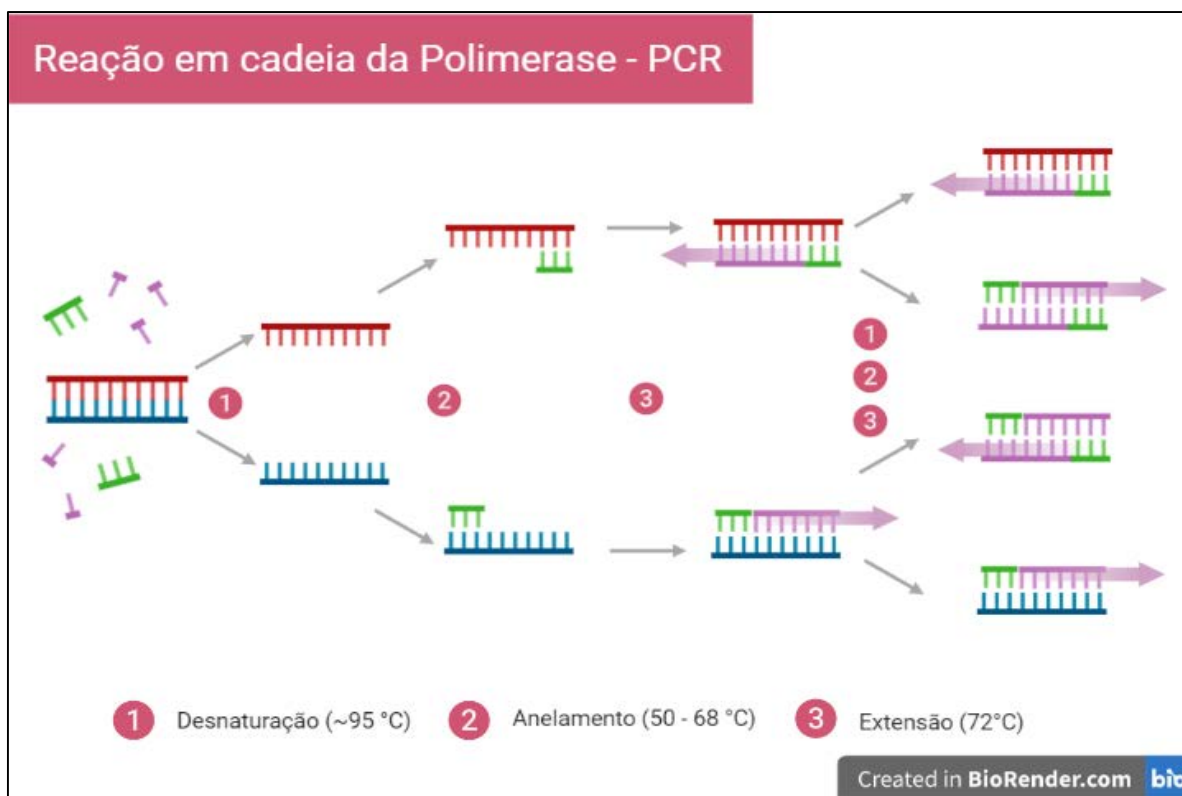
Os recentes avanços quanto as ciências ômicas e as modernas técnicas de biologia molecular representam uma interessante alternativa quanto a detecção de possíveis ocorrências de dopagem genética em atletas. A rápida evolução das tecnologias dessa área temática representa um extenso leque de possibilidades de técnicas a serem utilizadas, entretanto, dentre o estado-da-arte e a literatura vigente, pode-se destacar a técnica de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) como o carro-chefe no combate a dopagem genética no cenário esportivo (López et al., 2020).

A técnica de PCR – uma reação em cadeia *in vitro* capaz de multiplicar uma sequência genética em larga escala – atualmente é considerada uma das técnicas mais importante no ramo das biociências, com ampla utilização tanto na aplicação diagnóstica quanto no cenário forense. Utilizando a Taq Polimerase da *Thermophilus aquaticus*, um bloco termociclador e um Southern blot anexado, Kary Banks Mullis inventou o primeiro protótipo do que viria a ser a técnica de PCR em 1983. Fato que o concedeu, posteriormente, o prêmio Nobel em 1993. Existem dois aspectos que tornam a aplicação da PCR tão revolucionária: Primeiro, têm-se a sua elevada automatização instrumental, descartando a necessidade de certas operações manuais atreladas a erros analíticos sistemáticos, aumentando a frequência analítica e reduzindo a ocorrência de contaminações. Além disso, o jogo de reagentes feito sob medida para os determinados ensaios garante uma especificidade e robustez da reação, possibilitando a realização de experimentos de elevada complexidade com um grande volume de respostas informativas e representativas de problemas analíticos (JAGTAR SINGH et al., 2014; ZHU et al., 2020).

Uma reação de PCR é constituída essencialmente dos seguintes componentes: (i) *primers*; (ii) dNTPs; (iii) MgCl₂; (iv) Taq polimerase. Os *primers* consistem em uma pequena sequência iniciadora desenhada de forma complementar à sequência-alvo desejado, assim, sendo especificamente desenvolvida para a função de anelar com a região de interesse do material genético analisado, dando início no processo de amplificação desejado e sendo o fator limitante na seletividade da reação. Os dNTPs são os quatro desoxinucleotídeos trifosfatados diferenciados pelas bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina, timina). Estes são utilizados como substrato na reação de PCR, sendo incorporado à estrutura das novas moléculas construídas. O cloreto de magnésio (MgCl₂) age como uma fonte de íons Mg⁺², um importante cofator de ativação enzimática no meio reacional, além deste apresentar um efeito quelante para as cargas negativas das dNTPs presentes, favorecendo o ataque nucleofílico e a formação de ligações das mesmas nas estruturas necessárias. Por fim, tem-se a Taq polimerase, uma enzima DNA polimerase termoestável que age ativamente na amplificação dos fragmentos, incorporando determinados nucleotídeos e fabricando novas moléculas de DNA (JAGTAR SINGH et al., 2014)

O funcionamento de uma reação de PCR consiste em múltiplos ciclos de temperatura constituídos de três etapas fundamentais como ilustrado na Figura 1 abaixo: (i) inicialmente a mistura reacional é aquecida à aproximadamente 95 °C resultando assim na desnaturação da estrutura de dupla-fita do DNA ao romper as ligações de hidrogênio dos pares de bases nitrogenadas A-T e C-G; (ii) em seguida, temperaturas de anelação são alcançadas entre 50 e 65 °C, assim, permitindo a incorporação dos *primers* às suas regiões complementares das fitas simples do molde de DNA a ser amplificado; (iii) por fim, com o molde da sequência-alvo identificado e anelado às sequências iniciadoras, a Taq polimerase – à temperatura aproximada de extensão de 72 °C – adiciona os nucleotídeos complementares, gerando assim novas fitas e produzindo a nova molécula amplificada à temperatura de 72 °C. Ao fim de cada ciclo, ao se assumir idealmente 100% de eficiência reacional, espera-se que a quantidade de amplicons no meio reacional dobre, assim, resultando em uma amplificação exponencial. Após a realização de 20 a 40 desses ciclos, os produtos de amplificação podem ser identificados pelo seu tamanho molecular em técnicas acopladas de eletroforese ou quantificando os mesmos por detecções de fluorescência (JAGTAR SINGH et al., 2014; RAHMAN et al., 2013).

Figura 1. Princípios de funcionamento da PCR.



Originalmente, a técnica de PCR foi desenvolvida para detecção de mutações no gene HBB responsável por causar anemia falciforme. De forma a acompanhar as evoluções instrumentais e conceituais na academia, novas tecnologias derivadas surgiram no mercado como, por exemplo, a implementação do monitoramento de fluorescência em tempo real da PCR quantitativa (qPCR) e incorporação da transcriptase reversa na RT-PCR. Consequentemente, as mais diversas aplicações das mesmas em múltiplos campos das biociências foram concretizadas (JAGTAR SINGH et al., 2014; RAHMAN et al., 2013; ZHU et al., 2020).

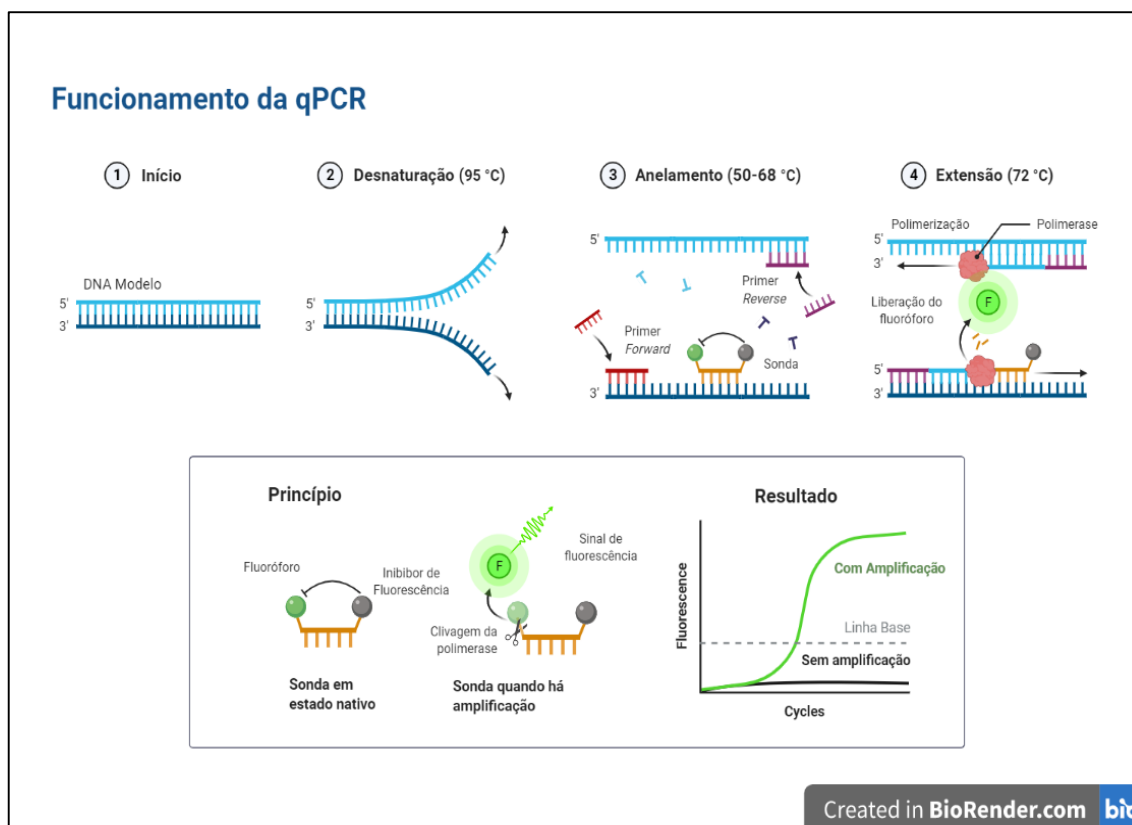
No caso específico do controle de dopagem genética no esporte, a técnica de PCR – em especial a PCR quantitativa – é encontrada amplamente na literatura como método de detecção do uso indevido de manipulações genéticas. Segundo López et al (2020), a situação hipotética de uma triagem de dopagem genética envolve baixíssimos níveis de concentração do transgene dopante devido a degradação endógena do DNA. Assim, o uso da técnica de PCR representa uma excelente alternativa de método de detecção sendo suficientemente sensível, específica, precisa e versátil para o problema analítico em questão (JAGTAR SINGH et al., 2014; LÓPEZ et al., 2020).

Como já demonstrado por diversos autores na literatura (BAOUTINA et al., 2016; LÓPEZ et al., 2020; MARCHAND et al., 2021), a PCR quantitativa pode ser utilizada de forma bem-sucedida para a detecção de transgenes decorrentes de dopagem genética ao alvejar as junções éxon-éxon da sequência desses genes. Essas regiões são características de produtos exógenos decorrentes de manipulação genética e de vias biotecnológicas, assim, não estando presente de forma endógena no genoma humano e sendo um excelente marcador de rastreabilidade do uso de terapias gênicas e de dopagem genética. Conseqüentemente, a detecção de presença de uma cópia sequer desta sequência em uma amostra real, já configura como um resultado analítico adverso para um cenário de controle de dopagem genética no esporte.

Esta técnica de PCR quantitativa – também denominada de PCR em tempo real – é uma variação da PCR que se baseia no monitoramento da luz emitida em determinados comprimentos de onda por sondas de hidrólise contendo corantes fluorescentes. Estas se encontram associadas aos *primers* da reação e hibridizam com alvo desejado, expondo o fluoróforo de tal forma a emitir energia, na forma luz e calor, detectável pelo sistema óptico da instrumentação. O momento no qual o nível de fluorescência medido ultrapassa inequivocadamente o sinal de fundo presente é o denominado ciclo de amplificação (C_q) e, a partir deste, inferências analíticas podem ser realizadas. Um esquema lúdico deste funcionamento se encontra na Figura 2 abaixo.

Além da elevada especificidade, esta estratégia baseada na utilização de qPCR também apresenta como vantagem o fato de ser facilmente acoplável a outras técnicas de biologia molecular para confirmação, como, por exemplo, a eletroforese em gel de agarose para identificação por tamanho molecular de amplicons, e a PCR digital (dPCR) como uma reação secundária mais sensível e seletiva para confirmação de um ensaio inicial de triagem dado como positivo. Além disso, variações como a qPCR multiplex, onde se utiliza múltiplas sequências iniciadoras atreladas a diferentes fluoróforos e comprimentos de onda, e a *Nested* PCR, na qual se utilizam múltiplos jogos de *primers* em corridas sequenciais de PCR, também podem ser utilizadas para a detecção de múltiplos genes diferentes. Assim, sendo uma eficiente abordagem para utilização em rotinas de triagem para controle de dopagem (JAGTAR SINGH et al., 2014; LÓPEZ et al., 2020)

Figura 2. Funcionamento da qPCR.



1.5. Dried Blood Spots (DBS)

Ao se abordar o desenvolvimento de métodos de detecção, as condições pré-analíticas das amostras devem ser discutidas de forma crítica e minuciosa. Parâmetros como o método de amostragem, as condições de transporte e armazenamento e a estratégia de extração dos analitos são vitais para a concepção de métodos precisos e efetivos. Além disso, esta discussão se torna ainda mais crítica em um cenário de triagem de dopagem genética, visto que situações de baixa concentração dos analitos são esperadas. O mecanismo de degradação das sequências-alvo no sangue ainda não foi completamente elucidado, o que também garante uma certa imprevisibilidade aos níveis de interesse dos analitos em questão (LÓPEZ et al., 2020).

Ao se tratar de sangue como matriz analítica para técnicas de detecção, um número ainda maior de cuidados específicos deve ser tomado. O controle de fatores como o tipo de tubo de coleta utilizado, os parâmetros operacionais de centrifugação, as condições de transporte e armazenamento – tanto a curto quanto a longo prazo – e o método de aquisição da bioespécime são cruciais para a análise. Os mesmos influenciam diretamente a detecção dos analitos pela técnica de PCR, visto que esta é sensível a presença de inibidores reacionais, em especial, os

grupamentos heme decorrentes do fenômeno de hemólise e da degradação de ácidos nucleicos (LÓPEZ et al., 2020).

Os suportes de amostragem do tipo *Dried Blood Spots* (DBS; em tradução livre, manchas de sangue seco) são ferramentas clínicas utilizadas em métodos de coleta simples, no qual pequenas quantidades de sangue total venoso são adquiridas de forma minimamente invasiva e praticamente indolor a partir de perfurações capilares em diversas extremidades corporais como, por exemplo, dedos, calcanhares e antebraços. Após a aquisição, sem a necessidade de flebotomia ou outros processos incisivos, o material biológico é depositado em um papel de filtro especial devidamente preparado para a fixação do mesmo. O suporte então pode ser facilmente manipulado, transportado e armazenado até o oportuno momento de extração, onde a bioespécime conservada pode ser eluída de acordo com o interesse da análise.

Entre as principais vantagens deste método de micro-amostragem, deve-se destacar a notória estabilidade do mesmo sob diferentes tempos e diferentes temperaturas de armazenamento. Tendo em vista que a refrigeração é uma das operações unitárias mais caras do universo laboratorial e é indispensável para a conservação das amostras coletadas pelo método tradicional em tubos contendo anticoagulante jateado, a possibilidade de se manusear e armazenar amostras em DBS à temperatura ambiente – sem comprometer a integridade da mesma – representa uma grande economia de interesse para um cenário de controle de dopagem genética.

A matriz de DBS apresenta inúmeras aplicações no ramo das biociências, sendo facilmente encontrada na literatura nos mais diversos experimentos como, por exemplo, a busca por biomarcadores em ensaios clínicos, monitoramento toxicológico de drogas terapêuticas e acompanhamento de perfil de HIV em pacientes soropositivos. Entretanto, o desenvolvimento de estudos de estabilidade quanto às condições de armazenamento ainda se mostra necessário.

Atualmente, o uso mais consolidado dos papéis de *Dried Blood Spots* se dá na prática clínica, onde recém-nascidos são submetidos à uma triagem de identificação de múltiplos distúrbios metabólicos de alta gravidade como, por exemplo, o hipotireoidismo congênito e a fenilcetonúria. Este é o famoso “Teste do Pezinho”, uma triagem neonatal rotineira no meio pediátrico, além de extremamente indolor para o bebê e de fundamental importância para evitar danos irreversíveis à saúde do mesmo.

1.5.1. DBS no controle de dopagem

O uso do DBS tem ganhado espaço nas pesquisas quanto a controle de dopagem. No geral, ensaios utilizando DBS já foram desenvolvidos e validados para a detecção de pelo menos uma substância de todas as 10 classes proibidas e para 1 método de dopagem proibido pela Agência Mundial Antidopagem. O uso do DBS como método de coleta se destaca como alternativa às tradicionais matrizes de sangue venoso e urina principalmente devido ao seu fácil transporte e ao seu armazenamento robusto (LÓPEZ et al., 2020; SOLHEIM et al., 2021).

Além disso, a extrema versatilidade de tipos de coleta minimamente invasivas por meio do DBS permite a implementação de abordagens específicas e vantajosas para perspectivas específicas. Por exemplo, a coleta pelo dedo indicador pode ser utilizada para a grande maioria dos esportes atuais, enquanto a coleta pelo antebraço, pode ser utilizada como um método preferencial para atletas que utilizam os dedos para a sua prática (ex: categorias de levantamento de peso e arquearia). Atletas com deficiência que apresentem amputações e/ou má circulação local também são favorecidos pela coleta por DBS, sendo um método mais acessível e adaptável à diversidade de situações e perfis pessoais (Solheim et al., 2021).

A baixa percepção de dor, os mínimos efeitos adversos à coleta e os insignificantes prejuízos à *performance* tornam o sistema de amostragem por *Dried Blood Spots* preferível não só por parte dos analistas, devido à melhoria nos parâmetros pré-analíticos já discutidos, como também por parte dos atletas à serem testados. (Solheim et al., 2021).

O uso dos sistemas de DBS permite alcançar um dos maiores desafios no desenvolvimento de métodos de detecção de dopagem: a disponibilização dos analitos de forma íntegra após o armazenamento prolongado da amostra. O pequeno volume de amostra suportado pelo DBS e a elevada flutuabilidade nas taxas de rendimento do material à ser extraído são desvantagens deste método de coleta que criam a necessidade de instrumentações analíticas suficientemente sensíveis para viabilização de seu uso. Este aspecto é atendido de forma satisfatória pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. Logo, o acoplamento da detecção por PCR com a amostragem por DBS torna possível o desenvolvimento de um método combinado de controle de dopagem genética com característica de alto interesse para implementação em uma rotina de triagem (Freeman et al., 2017; López et al., 2020).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar 3 diferentes sistemas de amostragem por *Dried Blood Spots*, expondo os diferentes parâmetros de mérito intrínsecos a cada um, visando a aplicação no cenário do controle de dopagem genética no esporte.

2.2. Objetivos específicos

Além disso, como objetivos específicos o trabalho propõe:

- (i) Avaliar o rendimento, a pureza e a integridade da extração de DNA de cada uma das manchas de sangue nos suportes submetidos às diferentes condições de estocagem,
- (ii) Comparar a eficácia e viabilidade dos três suportes selecionados para aplicação em um método de detecção de dopagem genética;
- (iii) Comparar a estocagem dos três suportes analisados em duas temperaturas de estocagem (temperatura ambiente e -30°C) por tempos de armazenamento diferentes (1 do por diversos autores na literatura e 21 dias).

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo do tampão de extração Tris-EDTA 0,1 (TE_{0,1})

Em um frasco Schott de 1 litro, 10 mL de tris(hidroximetil)aminometano 1M (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e 0,2 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,5 M (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) foram adicionados à 800 mL de água *nuclease-free*. A solução foi homogeneizada com auxílio de um agitador magnético e o pH da mesma foi ajustado até 8,0 com auxílio de HCl concentrado grau analítico e fitas indicadoras de pH. A solução foi avolumada para 1 litro e filtrada em membrana de 0,45 µm. Aliquotas de 1,5 mL foram porcionadas e armazenadas à 4 °C para uso.

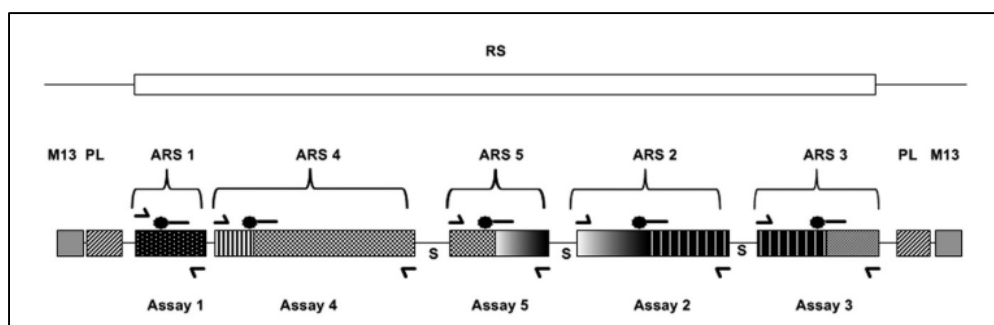
3.2. Coleta de sangue total de voluntários

Para a realização do trabalho, sete voluntários saudáveis, sendo quatro homens e três mulheres com idades variando entre 20 e 35 anos, doaram aproximadamente 4 mL de sangue conforme os protocolos de ética e consentimento adequados do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O procedimento de coleta foi realizado por um profissional devidamente instruído e qualificado da área da saúde e o material biológico foi coletado em um tubo EDTA preparado e lacrado para este fim.

3.3. Fortificação das amostras

Utilizando um plasmídeo linear contendo a sequência recombinante da Eritropoetina (RM-EPO), um total de 6 das amostras coletadas foram fortificadas ao nível de 1 cópia/µL. Este material de referência (vide Figura 3) utilizado para fortificação das amostras biológicas é propriedade do Governo Australiano, sendo devidamente preparado pelo *National Measurement Institute* de forma colaborativa.

Figura 3. Descrição estrutural do RM-EPO utilizado neste trabalho.



Partindo da solução estoque de RM-EPO com concentração de 4000 cópias/ μL , uma solução intermediária diluída 100 vezes em $\text{TE}_{0,1}$ – logo, na concentração de 40 cópias/ μL (cp/ μL) – foi preparada. Cada tubo de coleta contendo o sangue total adquirido dos voluntários foi vertido controlada e lenta 10 vezes. Além de centrifugado à $1300 \times g$ por 3 minutos à temperatura ambiente para homogeneização. Uma alíquota de 400 μL foi recolhida de cada tubo e transferida para microtubos estéreis de polipropileno de 1,0 mL previamente separado e identificado. Um volume de 10 μL da solução intermediária de RM-EPO à 40 cp/ μL foi adicionado à cada alíquota de sangue total e mistura foi homogeneizada 10 vezes com a própria pipeta utilizada para fortificação. As amostras biológicas foram armazenadas à 4°C.

O sétimo tubo de sangue doado não foi fortificado com o material de referência, sendo analisado paralelamente às amostras-problema deste trabalho como um grupo controle.

3.4. Aplicação em suportes de *Dried Blood Spots*

Os seguintes suportes para amostragem do tipo Dried Blood Spots (DBS) foram avaliados neste trabalho: Whatman Protein Saver (Merck), NUCLEIC-CARD™ (Thermo Fisher Scientific) e Blood Swab Organicoat (produção nacional, Organicoat).

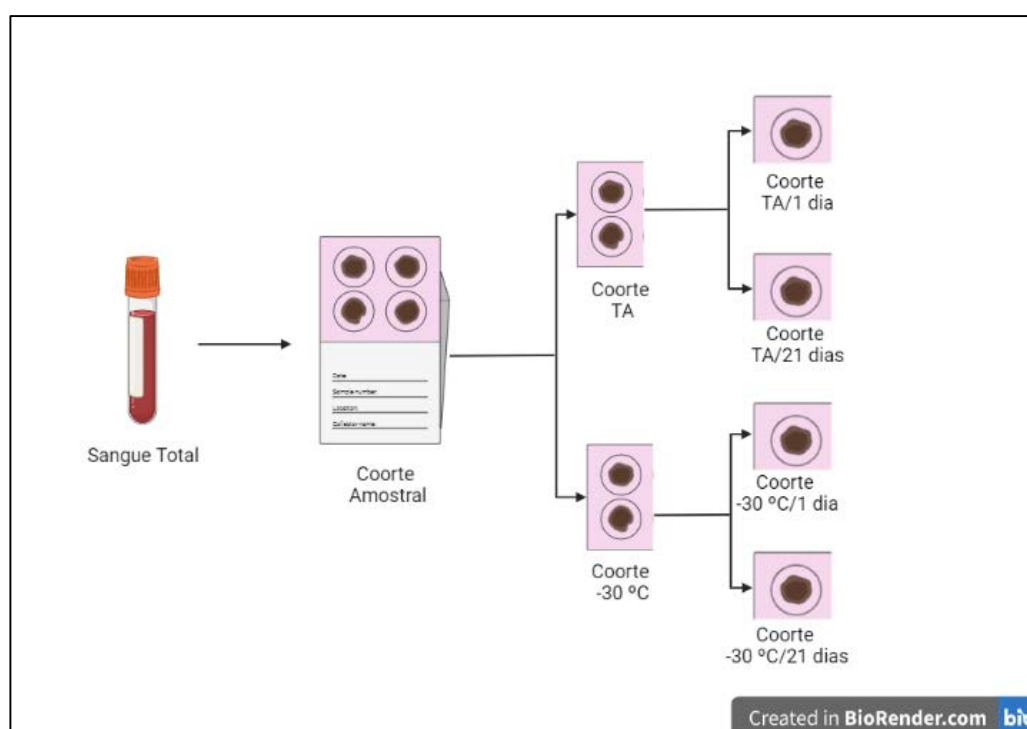
A partir de cada amostra fortificada, 4 alíquotas de 20 μL foram retiradas e aplicadas em cada suporte de amostragem (Coorte amostral). O mesmo procedimento foi realizado em paralelo para o sétimo tubo de sangue doado que, por sua vez, não foi fortificado com o material de referência. (Coorte controle). Após aplicação, um tempo de 40 minutos foi fixado para secagem e, por fim, todos os suportes foram armazenados em um saco plástico *ziplock* estéril contendo pequenas porções de sílica-gel.

Cada suporte contendo 4 manchas depositadas de material biológico foi submetido a um planejamento de experiências com 2 tempos de armazenamento diferentes e 2 temperaturas de armazenamento diferentes. Logo, para cada 4 dessas manchas de sangue, duas foram extraídas após 24 horas de aplicação, sendo uma delas armazenada à temperatura ambiente em bancada (Coorte T.A./1 dia) e outra armazenada à -30 °C em freezer (Coorte -30 °C/1 dia) durante este período. As outras duas aplicações nos suportes foram extraídas após 21 dias, sendo simetricamente armazenadas à temperatura ambiente (Coorte T.A./21 dias) e à -30 °C (Coorte -30 °C/21 dias). A matriz de planejamento e um exemplo de aplicação para o suporte NUCLEIC-CARD™ se encontram esquematizados, respectivamente, na Tabela 1 e na Figura 4 abaixo.

Tabela 1. Planejamento de experiências para cada exemplar de suporte.

Experimento	Tempo	Temperatura
1	1 dia	Temperatura ambiente
2	1 dia	-30 °C
3	21 dias	Temperatura ambiente
4	21 dias	-30 °C

Figura 4. Exemplo de armazenamento das manchas de sangue seco no suporte NUCLEIC-CARD™.

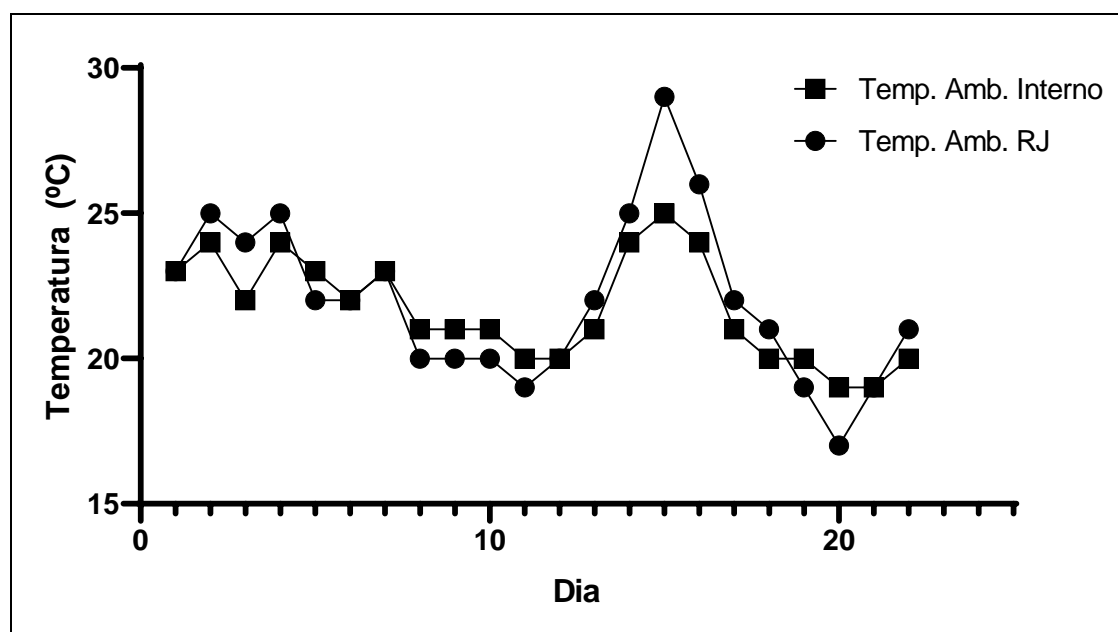


Logo, cada material biológico coletado – tanto os 6 fortificados quanto o grupo controle não fortificado – deu origem à 4 objetos de estudo. Assim, neste trabalho, têm-se um total de 28 amostras diferenciadas em 4 grupos amostrais distintos, contendo 7 replicatas cada.

Segundo dados coletados do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, a temperatura média na Cidade do Rio de Janeiro durante os 21 dias de armazenamento das amostras foi de 22 °C, sendo a maior e a menor temperatura registradas, respectivamente, de 29 °C e 17 °C. Estes dados foram recolhidos pela estação meteorológica do Aeroporto Galeão Antônio Carlos Jobim. Enquanto isso, segundo o monitoramento da temperatura interna do

laboratório, a temperatura ambiente média foi de 22 °C, com a temperatura máxima de 24 °C e a temperatura mínima de 19 °C sendo registradas. Os dados de monitoramento da temperatura ambiente durante o armazenamento dos suportes de amostragem se encontram compiladas na Figura 5 abaixo.

Figura 5. Monitoramento da temperatura ambiente.



3.5. Extração e armazenamento do material genético

As amostras foram submetidas a um protocolo de extração de DNA com o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) após os diferentes tempos e condições de armazenamento explicitados no item 3.4. O protocolo foi aplicado como orientado pelo fabricante. Assim, cada mancha de sangue seco foi partida em 6 partes menores e estas foram divididas em 2 tubos de centrifugação estéreis. Em cada tubo de centrifugação, 180 µL do Tampão de Digestão e 20 µL de Proteinase K foram adicionados. Ambos os reagentes foram fornecidos no kit de extração. A mistura foi brevemente agitada em vórtex por 10 segundos, incubada à 55 °C por 30 minutos com agitação constante à 1000 rpm e, em seguida, centrifugada à 10.000 x g em temperatura ambiente por 3 minutos.

Com a decantação das fibras de papel, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifugação e 20 µL de RNase (fornecido pelo kit) foram adicionados. Após homogeneização e incubação por 2 minutos, 200 µL de um Tampão de Lise/Ligação e 200 µL de etanol foram adicionados, seguidos de agitação em vórtex breve por 20 segundos.

O lisado gerado foi transferido para uma coluna de centrifugação também presente no kit de extração e centrifugado à $10.000 \times g$ por 1 minuto à temperatura ambiente. A solução inicial coletada foi descartada e 500 μL do Tampão de Lavagem 1 foram adicionados à membrana porosa da coluna de centrifugação. Uma nova centrifugação à $10.000 \times g$ por 1 minuto foi realizada e uma nova solução foi descartada. Um volume de 500 μL do Tampão de Lavagem 2 foi adicionado à coluna de centrifugação. Após uma centrifugação à $17.000 \times g$ por 3 minutos, um novo descarte de solução foi realizado. Ambos os tampões de lavagem utilizados foram fornecidos pelo fabricante no kit de extração.

Por fim, a coluna de centrifugação foi anexada à um microtubo estéril de polipropileno de 1,5 mL previamente identificado. Duas adições sequenciais de 50 μL de um Tampão de Eluição acompanhadas de incubação por 1 minuto e centrifugação à $17.000 \times g$ por 2 minutos foram realizadas. O material eluído nos dois tubos de centrifugação extraídos paralelamente devido a divisão inicial de cada amostra foram restituídos para um único microtubo estéril de polipropileno de 1,0 mL e levado à securo em um concentrador à vácuo aquecido SpeedVac Savant DNA 120 (Thermo Fisher Scientific).

Após uma etapa de ressuspensão deste material seco em 50 μL de etanol 70%, os mesmos foram mantidos sob refrigeração à $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas. Por fim, cada sistema foi centrifugado por 2 minutos à $17.000 \times g$ em condições refrigeradas (entre 10 e $12 \text{ }^\circ\text{C}$) e o etanol foi retirado vagarosamente com auxílio de uma pipeta automática e com extremo cuidado. O precipitado obtido foi seco em capela por aproximadamente 10 minutos e novamente ressuspensionado em 50 μL de água *nuclease-free*.

Os materiais genéticos obtidos foram mantidos armazenados sob refrigeração em Freezer à $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento de uso. Para os experimentos realizados neste trabalho, o material foi submetido à um protocolo prévio de homogeneização, onde foi descongelado inicialmente em geladeira à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para, em seguida, ser arrefecido à temperatura ambiente em bancada e submetido à homogeneização em um bloco de aquecimento Eppendorf ThermoMixer® C (Thermo Fisher Scientific) à temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação constante de 1000 rpm por 5 minutos.

3.6. Quantificação do material genético extraído

3.6.1. Quantificação por fluorimetria – Qubit

Para avaliação do rendimento da extração, o material genético obtido foi dosado por fluorimetria no fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) utilizando o dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. O mesmo se encontra apresentado na Figura 6.

Assim, uma solução de trabalho foi preparada diluindo 10 μ L do Reagente Qubit™ em 190 μ L do Tampão Qubit™ para cada amostra à ser quantificada. Ambos os reagentes foram fornecidos pelo kit. Para cada amostra a ser dosada, uma alíquota de 198 μ L desta solução de trabalho foi adicionada à 2 μ L do DNA em um tubo de PCR estéril de 0,5 mL. Após breve homogeneização em vórtex e incubação sob proteção de luz direta por 2 minutos, a solução foi submetida a leitura na instrumentação.

O mesmo protocolo foi realizado previamente para dois padrões fornecidos pelo kit de quantificação para calibração do equipamento pela construção de uma curva padrão. Com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.2, os resultados da quantificação de DNA foram analisados e comparados estatisticamente pelo teste t de Student e por Análise de Variância (ANOVA) de 1 fator. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste Grubbs para valores aberrantes também foram conduzidos com o mesmo software.

Figura 6. Fluorímetro utilizado neste trabalho.



3.6.2. Quantificação por espectrofotometria – NanoDrop

Para avaliação da pureza da extração, o material genético obtido foi dosado por espectrofotometria na região do ultravioleta em NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, vide Figura 7) conforme orientações fornecidas pelo fabricante. Assim, uma pequena alíquota de 2 μL do DNA a ser analisado foi inserida diretamente no canal de leitura do espectrofotômetro. Após breves segundos, tanto um espectro de absorvância por comprimento de onda, quanto razões de absorvância de 280 nm por 260 nm (A_{280}/A_{260}) e 280 nm por 230 nm (A_{280}/A_{230}) são retornados pelo instrumento.

Cada leitura foi realizada intercalada com limpezas do canal de leitura do equipamento com 4 μL de água *nuclease-free*. Uma calibração também foi realizada no início das leituras utilizando 2 μL de água *nuclease-free* como um branco de análise.

Figura 7. Espectrofotômetro utilizado neste trabalho.



3.7. Preparo dos controles de qualidade para reação de PCR em tempo real

Para cada corrida de PCR realizada neste trabalho, independente do ensaio utilizado, dois controles foram incluídos nas placas de reação, sendo assim amplificados paralelamente às amostras. Estes são o *negative template control* (NTC) e o *positive template control* (PTC).

O NTC consiste em água *nuclease-free* no lugar do material genético da amostra, logo, sendo um controle negativo da reação, ausente de qualquer material genético, atuando como um indicador de possíveis contaminações dos reagentes com amplicons provindo das amostras processadas. Assim, para cada placa de PCR, 3 poços reacionais são preenchidos com estes controles negativos, sendo cada um constituído por 10 μL do TaqMan Fast Advanced Mastex Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μL do ensaio de PCR à ser utilizado na amplificação em questão e 9 μL de água *nuclease-free*.

O PTC consiste em uma solução material de referência preparado em uma concentração conhecida a ser amplificada no lugar da amostra, sendo assim um controle positivo da sequência-alvo em questão com função de avaliar o bom funcionamento do ensaio e a possível presença de inibidores da reação. Assim, uma alíquota de 10 μL da solução estoque de RM-EPO à 4000 cp/ μL foi retirada e diluída em 190 μL de TE_{0,1}. Após breve agitação em vórtex por 10 segundos e centrifugação à 1000 x g por 10 segundos, uma solução intermediária de

concentração 200 cp/μL foi obtida. Um volume de 4 μL desta solução intermediária de concentração conhecida é adicionada à 10 μL do TaqMan Fast Advanced Mastex Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μL do ensaio de PCR à ser utilizado na amplificação em questão e 5 μL de água *nuclease-free* para cada um dos três poços reacionais à serem preenchidos em cada placa de placas de PCR.

3.8. Método de amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR)

Três ensaios para PCR quantitativa, tendo como alvo sequências diferentes e desenhados com sondas de hidrólise TaqManMGB foram utilizados para amplificar o material genético extraído dos suportes de amostragem.

Dois ensaios – denominados Sigma 2 e Sigma 4 – tiveram como alvo junções éxon-éxon distintas presentes na sequência de EPO transgênica, exclusivas de sequências gênicas modificadas para expressão recombinante. Além disso, um experimento utilizando ensaio para PCR tendo como alvo a sequência do gene constitutivo de glicerol 3- fosfato desidrogenase (GAPDH) também foi conduzido.

Todas as reações de PCR foram preparadas utilizando o TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Controles negativos e positivos previamente preparados segundo o tópico 3.7 foram corridos em paralelo às amostras. A instrumentação de PCR utilizada se encontra representada na Figura 8 abaixo.

Figura 8. Instrumentação de PCR utilizada neste trabalho.



3.8.1. Método de amplificação com ensaio Sigma 2

Para utilização do ensaio Sigma 2, um *mix* de reação de PCR foi preparado contendo 10 μL de TaqMan Fast Advanced Mastex Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μL do ensaio primer-sonda (preparado como descrito no item 3.1.2) e 5 μL de água *nuclease-free* para cada poço reacional a ser utilizado. O protocolo de preparo da solução de trabalho e do preenchimento das placas foi seguido conforme o fornecido pelo *National Measurement Institute* do Governo Australiano e seu dimensionamento se encontra compilado na Tabela a seguir.

Tabela 2. Dimensionamento do *mix* de reação de PCR para ensaio Sigma 2.

Número de poços reacionais	1
TaqMan Fast Advanced Mastex Mix	10 μL
Ensaio primer-sonda 20x	1 μL

(Continua)

(Conclusão)

Água <i>nuclease-free</i>	5 μL
Total	16 μL

A partir deste mix reacional preparado, dois experimentos foram realizados com este ensaio: (i) a construção de uma curva padrão; e (ii) a amplificação das amostras-problema.

3.8.1.1. Preparo do mix primer-sonda 20x do ensaio Sigma 2

Tubos âmbar contendo soluções-estoque do primer *Forward* 0,1 μM (TCCCAGACACCAAAGTTAATTTC), do primer *Reverse* 0,1 μM (CCTGCCAGACTTCTACGG) e da sonda TaqMan MGB 0,1 μM (CGACCTCCATCCTCTTC) foram armazenados à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso. Estes foram descongelados enquanto mantidos sob proteção de luz direta, vertidos gentilmente 10 vezes e centrifugados à 1000 $\times g$ por 10 segundos. Em um microtubo estéril de polipropileno de 1,0 mL previamente separado e identificado, 30 μL do primer *Forward*, 30 μL do primer *Reverse* e 20 μL de sonda foram adicionados à 420 μL de $\text{TE}_{0,1}$. O sistema foi homogeneizado 5 vezes com a própria pipeta utilizada para transferência da solução e centrifugado à 1000 $\times g$ por 10 segundos. Alíquotas de 50 μL foram preparadas e armazenadas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso. Este ensaio tem como alvo a região de junção dos éxons 3 e 4 da sequência codificante da Eritropoetina.

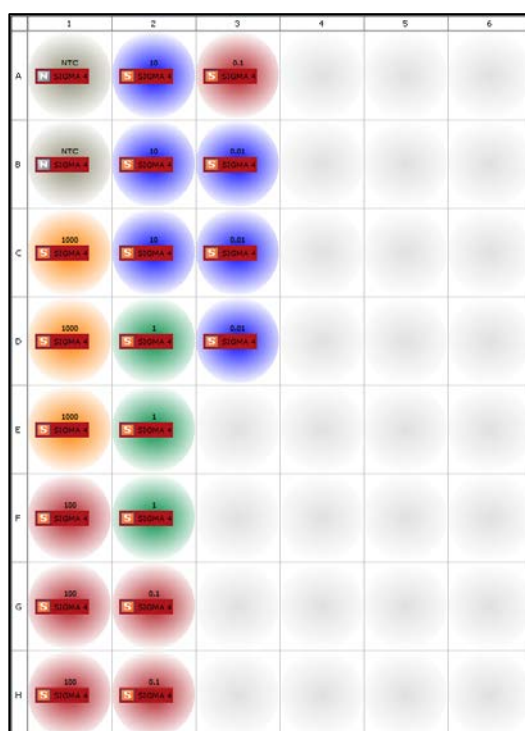
3.8.1.2. Construção de curva padrão para ensaio Sigma 2

De início, uma curva padrão foi construída pela amplificação do material de referência diluído à níveis de concentração conhecidos. Assim, para o ensaio Sigma 2, o RM-EPO previamente preparado foi diluído sequencialmente em razão 1:10 para os seguintes níveis de concentração: 1000, 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 cp/ μL .

Uma placa foi preparada de tal forma onde 21 poços foram preenchidos com 16 μL da solução de trabalho e 4 μL do RM-EPO diluído de acordo com o dimensionamento citado anteriormente. Cada nível de concentração foi amplificado em triplicata. Um controle negativo, em duplicata, foi construído em paralelo, onde 4 μL de água *nuclease-free* foram adicionados no lugar do material genético. Após preenchimento dos poços, a placa foi devidamente selada como orientado pelo fabricante, centrifugada à 1800 $\times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos e levada a

instrumentação de PCR para amplificação. O assinalamento de poços para este experimento se encontra esquematizado na Figura 9 abaixo.

Figura 9. Assinalamento de poços para construção da curva padrão do ensaio Sigma 2.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

Dados quanto ao coeficiente angular de reta, e um modelo de regressão linear representativo da amplificação deste ensaio foram obtidos. Além disso, os parâmetros de mérito de linearidade e de eficiência também foram avaliados.

3.8.1.3. Amplificação de amostras com ensaio Sigma 2

Quanto a análise das amostras-problema, três placas de PCR foram preparadas e preenchidas com os materiais genéticos das amostras-problema a serem amplificadas, sendo uma placa para cada tipo de suporte de amostragem testado. Um total de 28 amostras foram submetidas à amplificação em triplicata para cada um dos três tipos de suporte. Além disso, o NTC e o PTC também foram corridos paralelamente em triplicata, totalizando 90 poços a serem preenchidos por placa. O dimensionamento realizado para uma placa inteira de PCR se encontra compilado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Dimensionamento do *mix* para uma placa inteira com o ensaio Sigma 2

Número de poços reacionais	1	90
TaqMan Fast Advanced Mastex Mix	10 μ L	900 μ L
Ensaio primer-sonda 20x	1 μ L	90 μ L
Água <i>nuclease-free</i>	5 μ L	450 μ L
Total	16 μL	1440 μL

Desta forma, 90 poços reacionais à serem utilizados em cada placa de PCR foram preenchidos com 16 μ L do *mix* de reação preparado. Para os poços assinalados para amostras problemas, 4 μ L do referente material genético provenientes de cada uma delas foram adicionados. Para os poços de controle negativo e controle positivo, foram adicionados, respectivamente, 4 μ L de água *nuclease-free* e 4 μ L do RM-EPO diluído ao nível de 200 cp/ μ L como descrito no item 3.7.

O assinalamento dos poços preenchidos para cada placa se encontra apresentado na Figura 10 abaixo. Após total preenchimento dos poços, cada placa foi devidamente selada como orientado pelo fabricante, centrifugada à 1800 x g em 4 °C por 3 minutos e corrida na instrumentação de PCR para amplificação.

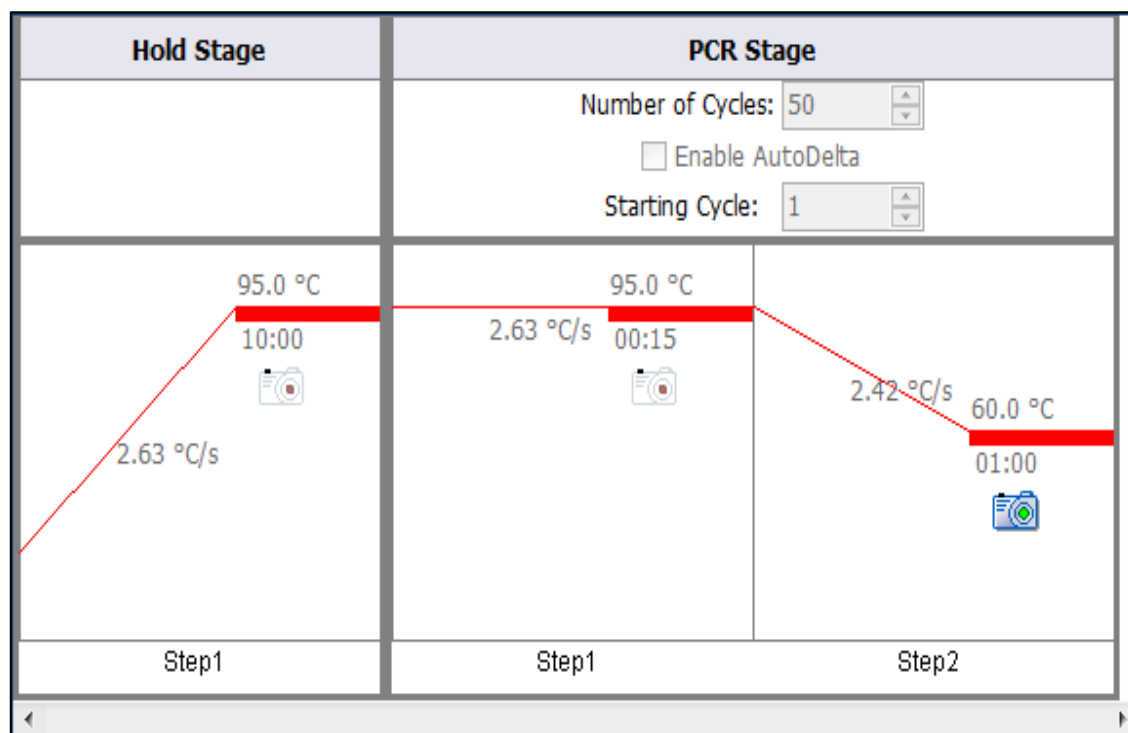
Figura 10. Assinalamento de poços para análise de amostras com ensaio Sigma 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC U SIGMA 2	H1 F-1 U SIGMA 2	H3 T-1 U SIGMA 2	M1 F-1 U SIGMA 2	M2 F-1 U SIGMA 2	C T-1 U SIGMA 2	H1 F-21 U SIGMA 2	H2 F-21 U SIGMA 2	M1 T-21 U SIGMA 2	M2 F-21 U SIGMA 2	M3 F-21 U SIGMA 2	PTC U SIGMA 2
B	NTC U SIGMA 2	H2 T-1 U SIGMA 2	H3 T-1 U SIGMA 2	M1 F-1 U SIGMA 2	M3 T-1 U SIGMA 2	C T-1 U SIGMA 2	H1 F-21 U SIGMA 2	H3 T-21 U SIGMA 2	M1 T-21 U SIGMA 2	M2 F-21 U SIGMA 2	C T-21 U SIGMA 2	PTC U SIGMA 2
C	NTC U SIGMA 2	H2 T-1 U SIGMA 2	H3 F-1 U SIGMA 2	M1 F-1 U SIGMA 2	M3 T-1 U SIGMA 2	C F-1 U SIGMA 2	H1 F-21 U SIGMA 2	H3 T-21 U SIGMA 2	M1 F-21 U SIGMA 2	M2 F-21 U SIGMA 2	C T-21 U SIGMA 2	
D	H1 T-1 U SIGMA 2	H2 T-1 U SIGMA 2	H3 F-1 U SIGMA 2	M2 T-1 U SIGMA 2	M3 T-1 U SIGMA 2	C F-1 U SIGMA 2	H2 T-21 U SIGMA 2	H3 T-21 U SIGMA 2	M1 F-21 U SIGMA 2	M3 T-21 U SIGMA 2	C T-21 U SIGMA 2	
E	H1 T-1 U SIGMA 2	H2 F-1 U SIGMA 2	H3 F-1 U SIGMA 2	M2 T-1 U SIGMA 2	M3 F-1 U SIGMA 2	C F-1 U SIGMA 2	H2 T-21 U SIGMA 2	H3 F-21 U SIGMA 2	M1 F-21 U SIGMA 2	M3 T-21 U SIGMA 2	C F-21 U SIGMA 2	
F	H1 T-1 U SIGMA 2	H2 F-1 U SIGMA 2	M1 T-1 U SIGMA 2	M2 T-1 U SIGMA 2	M3 F-1 U SIGMA 2	H1 T-21 U SIGMA 2	H2 T-21 U SIGMA 2	H3 F-21 U SIGMA 2	M2 T-21 U SIGMA 2	M3 T-21 U SIGMA 2	C F-21 U SIGMA 2	
G	H1 F-1 U SIGMA 2	H2 F-1 U SIGMA 2	M1 T-1 U SIGMA 2	M2 F-1 U SIGMA 2	M3 F-1 U SIGMA 2	H1 T-21 U SIGMA 2	H2 F-21 U SIGMA 2	H3 F-21 U SIGMA 2	M2 T-21 U SIGMA 2	M3 F-21 U SIGMA 2	C F-21 U SIGMA 2	
H	H1 F-1 U SIGMA 2	H3 T-1 U SIGMA 2	M1 T-1 U SIGMA 2	M2 F-1 U SIGMA 2	C T-1 U SIGMA 2	H1 T-21 U SIGMA 2	H2 F-21 U SIGMA 2	M1 T-21 U SIGMA 2	M2 T-21 U SIGMA 2	M3 F-21 U SIGMA 2	PTC U SIGMA 2	

FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

Tanto para a construção da curva padrão quanto para análise das amostras, a amplificação da sequência-alvo foi realizada em QuantStudio 12K Flex PCR System (Thermo Fisher Scientific) e a fluorescência da amplificação foi coletada pelo filtro FAM (canal de leitura x2-m2) deste equipamento. O seguinte programa de temperatura (Figura 11) foi construído e aplicado no método, onde inicialmente têm-se um platô de temperatura à 95 °C durante 10 minutos, seguindo de 50 ciclos de amplificação compostos de duas etapas: (i) uma etapa de 15 segundos à 95 °C; e (ii) uma etapa de 1 minuto à 60 °C.

Figura 11. Condições de ciclagem de temperatura para ensaio Sigma 2.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

Os resultados de todas as amplificações foram tratados com o software QuantStudio 12K Flex nativo do equipamento. Por meio do software GraphPad Prism 8.0.2, os resultados das amplificações foram analisados e comparados utilizando os testes estatísticos de t de Student e de Análise de Variância (ANOVA) de 1 fator. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste Grubbs para valores aberrantes também foram conduzidos com o mesmo software, além dos parâmetros de qualidade definidos pelas diretrizes MIQE que também foram verificados.

3.8.2. Método de amplificação com ensaio Sigma 4

De forma similar ao descrito no item 3.8.1, os mesmos experimentos, seguindo os mesmos dimensionamentos foram realizados com o ensaio Sigma 4.

3.8.2.1. Preparo do mix primer-sonda 20x do ensaio Sigma 4

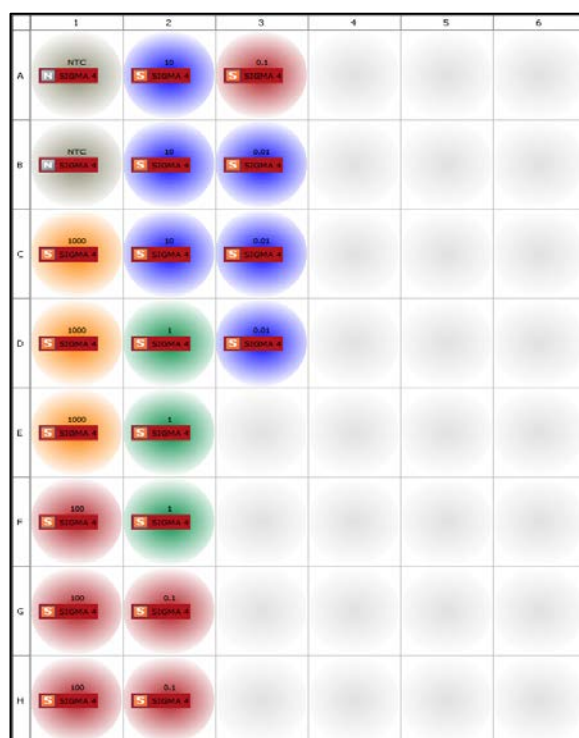
Tubos âmbar contendo soluções-estoque do primer Forward 0,1 μ M (GGGTGCACGAATGTCC), do primer Reverse 0,1 μ M (GACTCGGCTGTACAGATGAG) e da sonda TaqMan MGB 0,1 μ M (CTGGCTGTGGCTTCTCCTGTC) foram armazenados à -

20 °C até o momento de uso. Estes foram descongelados enquanto mantidos sob proteção de luz direta, vertidos gentilmente 10 vezes e centrifugados à 1000 x g por 10 segundos. Em um microtubo estéril de polipropileno de 1,0 mL previamente separado e identificado, 60 µL do primer Forward, 60 µL do primer Reverse e 20 µL de sonda foram adicionados à 360 µL de TE0,1. A mistura foi homogeneizada 5 vezes com a própria pipeta utilizada para transferência da solução e centrifugada à 1000 x g por 10 segundos. Alíquotas de 50 µL foram preparadas e armazenadas à -20 °C até o momento de uso. Este ensaio tem como alvo a região de junção dos éxons 4 e 5 da sequência codificante da Eritropoetina.

3.8.2.2. Construção de curva padrão para ensaio Sigma 4

De antemão, uma curva padrão foi construída para os níveis de concentração de 1000, 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 cp/ µL. Assim, uma placa foi preparada de tal forma onde 21 poços foram preenchidos com 16 µL do *mix* de reação de PCR e 4 µL do referente material de referência diluído. Cada nível de concentração foi amplificado em triplicata, assim como um controle negativo em duplicata, onde 4 µL de água *nuclease-free* foram adicionados. Após preenchimento dos poços, a placa foi selada, centrifugada à 1800 x g em 4 °C por 3 minutos e inserida na instrumentação de PCR para início da corrida. O assinalamento dos poços preenchidos se encontra apresentado na Figura 12 abaixo.

Figura 12. Assinalamento de poços para construção da curva padrão do ensaio Sigma 4.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

Como orientado pelas diretrizes MIQE, parâmetros analíticos de mérito de linearidade, limite de detecção e eficiência, assim como um modelo de regressão linear para este ensaio, foram mensurados

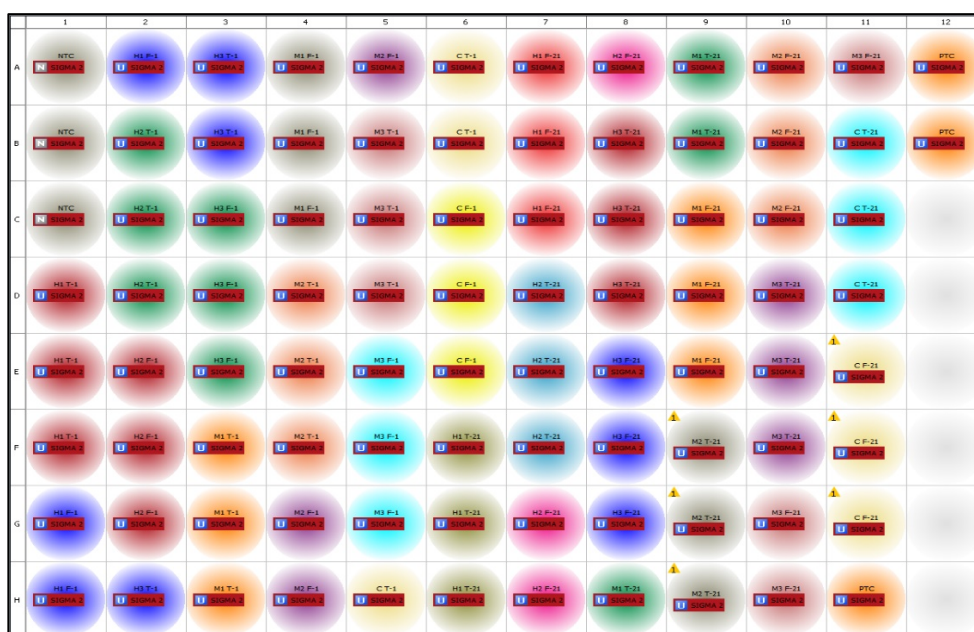
3.8.2.3. Amplificação de amostras com ensaio Sigma 4

Em seguida, três placas de PCR foram preparadas para análise das amostras-problema, sendo cada uma delas para um tipo de suporte de amostragem. Um *mix* de reação foi preparado contendo 10 μL de TaqMan Fast Advanced Mastex Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μL do ensaio Sigma 4 e 5 μL de água *nuclease-free* para cada poço a ser preenchido.

Em cada placa, um total de 90 poços reacionais à serem utilizados foram preenchido com 16 μL do *mix* reacional preparado. Para os poços designados às amostras, 4 μL do referente material genético foram adicionados. Para os poços de controle negativo e positivo de matriz, foram adicionados, respectivamente, 4 μL de água *nuclease-free* e 4 μL do RM-EPO diluído ao nível de 200 cp/ μL como descrito no item 3.7. Um exemplo de assinalamento dos poços preenchidos para cada placa se encontra apresentado na Figura 13 abaixo. Após total

preenchimento dos poços, cada placa foi devidamente selada como orientado pelo fabricante e centrifugada à 1800 x g em 4 °C por 3 minutos.

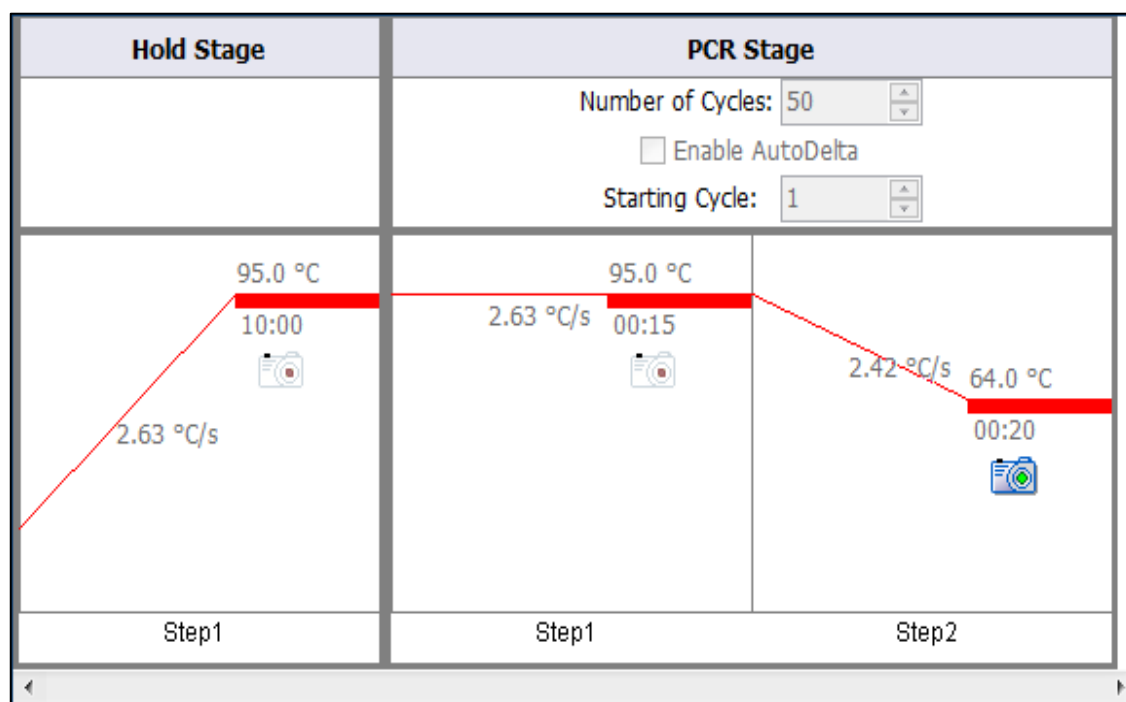
Figura 13. Assinalamento de poços para análise de amostras com ensaio Sigma 4.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

A amplificação da sequência-alvo foi realizada em QuantStudio 12K Flex PCR System (Thermo Fisher Scientific) e a fluorescência da amplificação foi coletada pelo filtro FAM (canal de leitura x2-m2) deste equipamento. O seguinte programa de temperatura foi construído e aplicado para todas as amplificações como apresentado na Figura 14 abaixo. De início, têm-se um platô de temperatura à 95 °C durante 10 minutos, seguindo de 50 ciclos de amplificação compostos de duas etapas: (i) uma etapa de 15 segundos à 95 °C; e (ii) uma etapa de 20 segundos à 64 °C.

Figura 14. Condições de ciclagem de temperatura para ensaio Sigma 4.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

Os resultados de todas as amplificações foram tratados com o software QuantStudio 12K Flex nativo do equipamento. Os resultados das amplificações foram estatisticamente tratados com o software GraphPad Prism 8.0.2, os testes estatísticos de t de Student, de Análise de Variância (ANOVA) de 1 fator, o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Grubbs foram utilizados para avaliação dos resultados.

3.8.3. Método de amplificação com ensaio para GAPDH

Buscando-se avaliar a integridade do DNA extraído dos suportes de amostragem, uma corrida de PCR tendo como sequência-alvo um gene humano constitutivo foi realizada. Uma solução de trabalho foi previamente preparada contendo 10 μL de TaqMan Fast Advanced Mastex Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,5 μL do ensaio primer-sonda desenhado para amplificação da sequência que codifica para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e 5,5 μL de água *nuclease-free* para cada poço a ser preenchido, vide Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Dimensionamento mix de reação de PCR para ensaio GAPDH.

Número de poços reacionais	1
TaqMan Fast Advanced Mastex Mix	10 μ L
Ensaio primer-sonda 20x	0,5 μ L
Água <i>nuclease-free</i>	5,5 μ L
Total	16 μL

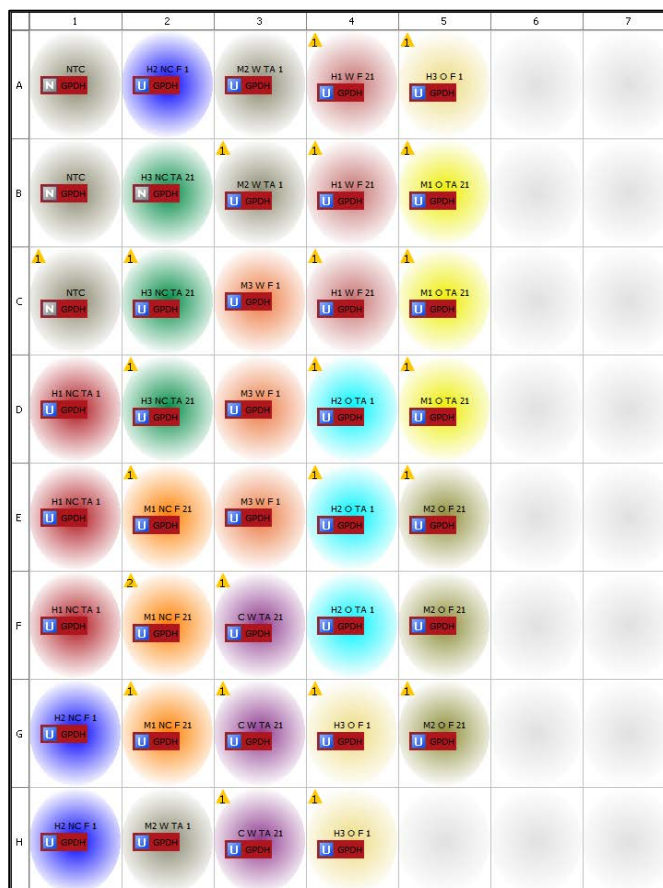
Um grupo de 12 amostras aleatórias representativas de todas as possíveis diferentes combinações das variáveis abordadas foi submetido à este experimento. Além disso, um NTC também foi corrido paralelamente em triplicata, assim como um material genético recém-extraído, de integridade garantida e quantificado atuando como controle positivo. O dimensionamento realizado para uma placa inteira, totalizando 42 poços a serem preenchidos, se encontra compilado na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Dimensionamento de PCR para uma placa com ensaio para GAPDH.

Número de poços reacionais	1	42
TaqMan Fast Advanced Mastex Mix	10 μ L	420 μ L
Ensaio primer-sonda 20x	0,5 μ L	21 μ L
Água <i>nuclease-free</i>	5,5 μ L	330 μ L

Cada um dos 42 poços reacionais utilizados foi preenchido com 16 μ L desta solução de trabalho reacional preparada. Como já descrito anteriormente, para os poços assinalados para as amostras problemas e do controle positivo, 4 μ L do referente material genético foram adicionados. Já para os poços de controle negativo foram adicionados 4 μ L de água *nuclease-free*. O assinalamento dos poços preenchidos para cada placa se encontra apresentado na Figura 15 abaixo. Após total preenchimento dos poços, cada placa foi devidamente selada como orientado pelo fabricante, centrifugada à 1800 x g em 4 °C por 3 minutos e submetida à corrida em instrumentação de PCR.

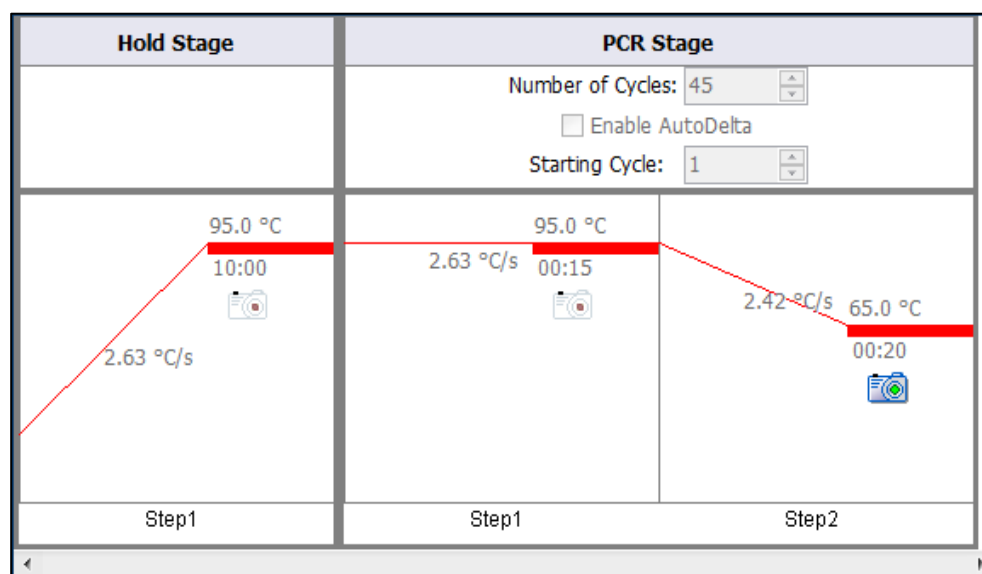
Figura 15. Assinalamento de poços para análise de amostras com ensaio para GAPDH.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

A amplificação da sequência-alvo foi realizada em QuantStudio 12K Flex PCR System (Thermo Fisher Scientific) e a fluorescência da amplificação foi coletada pelo filtro VIC (canal de leitura x3-m3) deste equipamento. O seguinte programa de temperatura foi construído e aplicado como apresentado na Figura 16 abaixo.

Figura 16. Programa de temperatura para ensaio para GAPDH.



FONTE: Captura de tela retirada da instrumentação QuantStudio 12K Flex PCR System.

Os resultados da amplificação foram tratados com o software QuantStudio 12K Flex nativo do equipamento. Os resultados da amplificação foram analisados e comparados utilizando os testes estatísticos de Shapiro-Wilk e de Grubbs, além dos parâmetros de qualidade definidos pelo MIQE.

3.9. Método de confirmação por corrida de eletroforese em gel de agarose

Como método de confirmação, a eletroforese em gel de agarose foi utilizada, buscando-se assim visualizar os produtos de amplificação da PCR com tamanhos específicos e previamente definidos na literatura para cada ensaio. A instrumentação utilizada se encontra na Figura 17 abaixo.

Figura 17. Cuba de eletroforese em gel de agarose utilizada neste trabalho.



3.9.1. Corrida dos produtos de amplificação do ensaio Sigma 2 em gel de agarose 4%

Dentre o universo de amostras amplificadas com o ensaio Sigma 2, elementos aleatórias representativas das possíveis combinações das diferentes condições de armazenamento foram selecionadas e resolvidas em cartuchos de agarose E-Gel™ EX 4% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) previamente corados com SYBR Gold DNA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) segundo informações do fabricante.

Assim, alíquotas de 20 µL dos produtos de amplificação foram alocadas nos poços dos cartuchos que por sua vez foram submetidos à uma cuba horizontal de eletroforese E-Gel™ Power Snap Electrophoresis System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Um padrão de fragmentos de DNA de 25 pares de base foi corrido paralelamente às amostras.

Sob uma voltagem constante de 90 V, a corrida eletroforética foi realizada durante 15 minutos. A visualização sob luz ultravioleta e a fotodocumentação da corrida foram realizadas pela própria instrumentação em módulo anexado.

As bandas obtidas foram comparadas visualmente com o padrão de massa de DNA corrido, assim, estipulando-se uma massa molecular aproximado para os fragmentos de

amplificação obtidos. Todas as amostras do grupo controle amplificadas pelo ensaio Sigma 2 também foram submetidos à este protocolo.

3.9.2. Corrida dos produtos de amplificação do ensaio Sigma 4 em gel de agarose 4%

De forma análoga ao item 3.9.1, as mesmas amostras aleatórias em diferentes condições foram resolvidas em cartuchos de agarose E-Gel™ EX 4% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e submetidas à corrida em cuba horizontal de eletroforese E-Gel™ Power Snap Electrophoresis System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Um padrão de de fragmentos de DNA de 50 pares de base foi corrido paralelamente às amostras.

Utilizando as mesmas condições instrumentais de corrida, por fim, a visualização foi igualmente realizada sob luz ultravioleta e fotodocumentada pela própria instrumentação no módulo anexado. As bandas obtidas foram comparadas visualmente com o padrão de DNA corrido, assim, estipulando-se uma massa molecular aproximado para amplicons obtidos.

3.9.3. Corrida dos produtos de amplificação do ensaio GAPDH em gel de agarose 4%

Para a confirmação da amplificação por ensaio para GAPDH, um novo grupo de amostras aleatórias representativas de todas as possíveis diferentes combinações de armazenamento foram resolvidas nos mesmos cartuchos de agarose E-Gel™ EX 4% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e submetidas à corrida em cuba horizontal de eletroforese E-Gel Power Snap Electrophoresis System, (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Um padrão de de fragmentos de DNA de 25 pares de base foi corrido paralelamente às amostras tal qual no item 3.9.1.

Partindo de 90 V de voltagem constante e do tempo de 20 minutos de corrida, as bandas obtidas foram comparadas visualmente com o padrão de DNA analisado, assim, estipulando-se uma massa molecular aproximado para os fragmentos de amplificação obtidos. A visualização do deslocamento das bandas foi obtida sob filtro de luz ultravioleta e a fotodocumentação obtida pela própria instrumentação em um módulo anexado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da extração de DNA em diferentes suportes

O presente trabalho foi conduzido inicialmente com o objetivo de avaliar o rendimento da extração de DNA do material genético obtido de diferentes suportes de amostragem por *Dried Blood Spots*. Busca-se entender a viabilidade e as limitações técnicas dos mesmos e, para isso, sete voluntários saudáveis de 20 a 35 anos, sendo 4 homens e 3 mulheres, doaram aproximadamente 4 mL cada. Seis dos sangues totais obtidos (3 mulheres e 3 homens) foram fortificados ao nível de 1 cópia/ μ L com um plasmídeo linear contendo a sequência recombinante da Eritropoetina, sendo assim aplicado como um material de referência. A partir de cada amostra fortificada, 4 alíquotas de 20 μ L foram aplicadas em um exemplar de cada tipo de suporte de amostragem (Grupo amostral). O mesmo procedimento foi realizado em paralelo para o sétimo tubo de sangue doado que por sua vez não foi fortificado com o material de referência. (Grupo controle). Mais detalhes se encontram descritos no item 3.3.

Figura 18. Exemplo de aplicação de um sangue fortificado da Coorte Amostral. Da esquerda para a direita: suporte NUCLEIC-CARD™, suporte Whatman, suporte Blood Swab Organicat.



A extração do material genético é o primeiro passo para a execução de diferentes procedimentos de Biologia Molecular realizados neste trabalho. Assim, as amostras em questão foram submetidas a um protocolo de extração de DNA com o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) após diferentes tempos e condições de armazenamento definidos seguindo o planejamento fatorial completo de dois fatores apresentado no item 3.4.

O protocolo de extração foi aplicado como orientado pelo fabricante (item 3.5), consistindo em: (i) uma etapa inicial de lise das células para expor o DNA; (ii) seguida de uma etapa de ligação para reter e concentrar o mesmo em uma membrana de sílica; (iii) em sequência, uma etapa de lavagem com uso de diferentes detergentes e centrifugações é realizada para quebrar e emulsionar gorduras, proteínas e outros rejeitos do meio; e (iv) por fim, uma etapa final de eluição para liberação do material genético e seu armazenamento.

Para avaliação do rendimento da extração, uma dosagem por fluorimetria (Qubit 3.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific) foi realizada utilizando o dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) conforme melhor descrito no item 3.6.1. Os resultados se encontram compilados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Resultados da quantificação do DNA extraído por Qubit (n = 7).

Matriz	Condição ^b	DNA extraído (ng/μL) ^a	Massa total de DNA extraído (ng) ^{a, b}
NUCLEIC CARD™	T.A./1 dia	1,29 ± 0,69	64,50 ± 34,60
	-30 °C/1 dia	1,58 ± 0,84	79,00 ± 41,98
	T.A./21 dias	0,229 ± 0,158	11,45 ± 7,91
	-30 °C/21 dias	1,33 ± 1,02	66,50 ± 51,00
Whatman	T.A./ 1 dia	1,55 ± 0,66	77,50 ± 33,13
	-30 °C/1 dia	1,45 ± 0,44	72,50 ± 21,97
	T.A./21 dias	0,234 ± 0,128	11,70 ± 6,40
	-30 °C/21 dias	0,945 ± 0,954	47,25 ± 47,70
Blood Swab Organicoat	T.A./ 1 dia	0,846 ± 0,345	42,30 ± 17,23
	-30 °C/1 dia	1,19 ± 0,43	59,50 ± 21,52
	T.A./21 dias	0,189 ± 0,122	9,45 ± 6,11
	-30 °C/21 dias	0,837 ± 0,415	41,85 ± 20,77

a. Média ± desvio padrão

b. Volume final de 50 μL

Legenda: **T.A./1 dia** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. **-30/1 dia** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 1 dia. **T.A./21 dias** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. **-30/21 dias** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias.

A determinação por fluorimetria se baseia na utilização de corantes fluorescentes intercalantes de alta precisão e sensibilidade. Estes interagem especificamente com as fitas duplas de DNA, emitindo uma fluorescência mensurável e proporcional a presença do ácido nucleico a ser dosado. Ao interpolar a fluorescência obtida na leitura da amostra analisada com uma curva analítica previamente construída a partir de padrões de calibração, obtém-se assim uma quantificação de DNA precisa, acurada e livre de interferência de contaminantes como, por exemplo, proteínas e moléculas de RNA (FISHER SCIENTIFIC, 2014; KHETAN et al., 2019).

Quanto as amostras quantificadas neste trabalho, nota-se, de forma geral, baixos rendimentos de material genético extraído. Este fato pode ser explicado pelo pequeno volume de sangue de partida aplicado ao suporte, o qual foi fixado como 20 µL por ser a exigência da WADA de capacidade mínima definida para suportes de amostragem no contexto de controle de dopagem (LUGINBÜHL; GAUGLER, 2021; WADA, 2021).

Kits comerciais de extração manual de DNA, como o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit utilizado neste trabalho, são métodos rápidos, versáteis e robustos de obtenção de material genético com elevada pureza e integridade. Satisfatórias concentrações do ácido nucleico podem ser obtidas de forma não-laboriosa, partindo de diversas matrizes biológicas diferentes e suportando uma ampla faixa de quantidade de amostra a ser processada. Além disso, diversas variáveis do procedimento são controláveis, permitindo distintas adaptações do protocolo conforme a necessidade. Entretanto, a falta de precisão na quantidade de produto final extraído é um fenômeno inerente ao uso desses tipos de kits de extração, assim, elevados desvios padrões entre replicatas são observados tanto nas amostras deste trabalho quanto na literatura. Por exemplo, Kovacs e colaboradores (2019) relatam a extração de 56 exemplares de seções de carcinoma colorretal utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit e obtenção de resultados com um coeficiente de variação de aproximadamente 40%. De forma análoga, Grassi et al (2022) discorre sobre seu trabalho com úlceras genitais masculinas colhidas em *swab*, onde 51 alíquotas tiveram seu DNA extraído e um desvio padrão relativo de aproximadamente 105% foi obtido.

Outro fator que torna a baixa precisão na extração do presente trabalho ainda mais expressiva é a própria natureza do método de coleta. Os fenômenos físicos de adsorção e de dessorção regem a fixação do material genético no suporte de DBS e, conseqüente, a

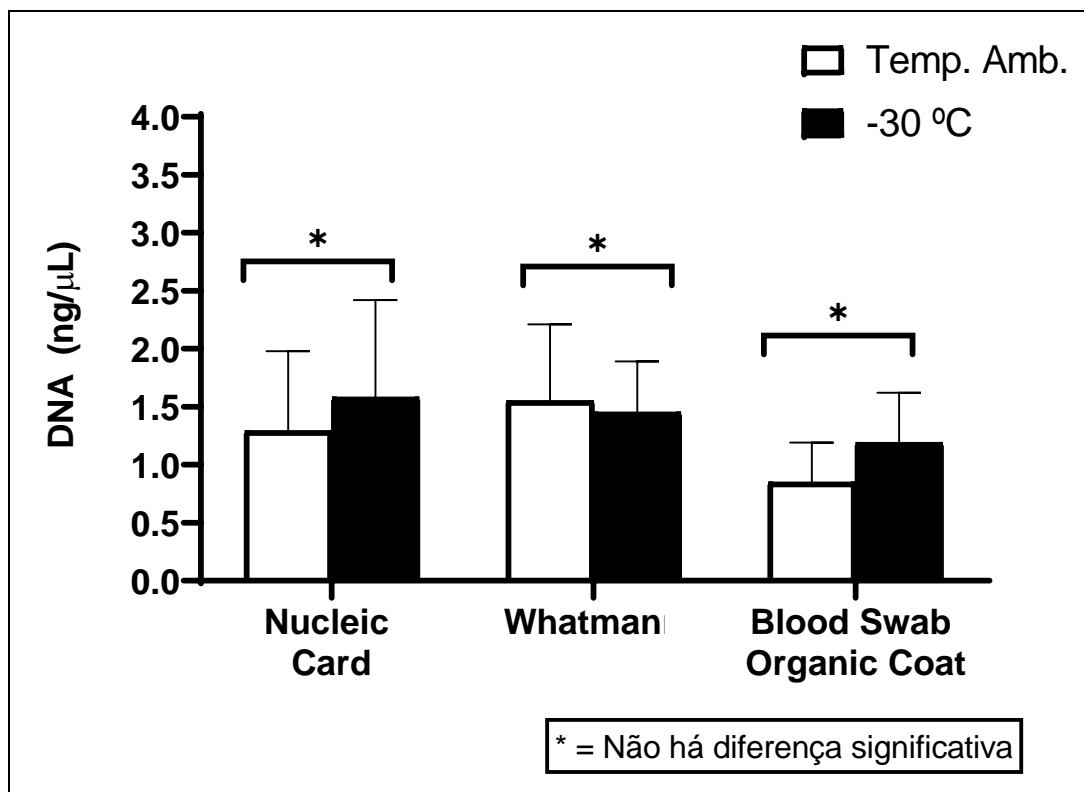
disponibilidade do mesmo à ser extraído pelos reagentes. Sabe-se que a viscosidade do sangue varia de forma inversamente proporcional com o número de hemácias presentes no mesmo que, por sua vez, é inversamente proporcional à área da mancha do sangue seco sobre o suporte. Assim, uma abordagem puramente volumétrica como a realizada neste trabalho e defendida pela Agência Mundial Antidopagem (AMA) possibilita a ocorrência de duas alíquotas com o mesmo volume de sangue apresentarem viscosidades distintas e, por consequência, áreas de manchas no suporte igualmente divergentes. Logo, partindo de manchas de sangue seco com diferentes áreas superficiais, quantidades distintas de material genético se encontram disponíveis espacialmente para a extração, acarretando em quantidades de produtos igualmente distintas à serem eluídas (LUGINBÜHL, GAUGLER, 2021).

Durante o armazenamento de sangue total, as hemácias passam por inúmeras mudanças físico-químicas de forma coletiva, tendo assim sua funcionalidade e estrutura celular afetadas e liberando componentes imunogênicos capazes de comprometer a disponibilidade do material genético para técnicas de Biologia Molecular. Esta resposta imunomodulatória é progressivamente acentuada com o aumento do tempo de armazenamento e pode ser parcialmente atenuada com o uso de baixíssimas temperaturas de refrigeração (KHETAN et al., 2019).

Tendo isso em vista e relacionando com os resultados obtidos por fluorimetria, observa-se que – de forma concordante com a literatura – dentro do período de tempo de 1 dia, a refrigeração à -30 °C promoveu um aumento médio do rendimento de extração de 22% para as amostras em papel NUCLEIC-CARD™ e de 40% para a matriz Blood Swab Organicoat, enquanto que, para o suporte Whatman, uma diminuição mínima do rendimento em 7% é observada.

Por meio do teste estatístico de Shapiro-Wilk, a normalidade destes resultados abordados foi assegurada, assim como a ausência de dados aberrantes por meio do teste de Grubbs. Utilizando o teste t de Student não-pareado com confiabilidade de 95% ($\alpha = 0,05$), nota-se que essas diferenças não são estatisticamente significantes. Assim, a refrigeração dos suportes de amostragem pode ser considerado um custo operacional descartável em um cenário de controle de dopagem genética considerando o tempo de armazenamento de amostra de apenas 1 dia, tendo em vista que sua aplicação encarece consideravelmente o processo analítico sem agregar melhorias relevantes no processamento do material biológico.

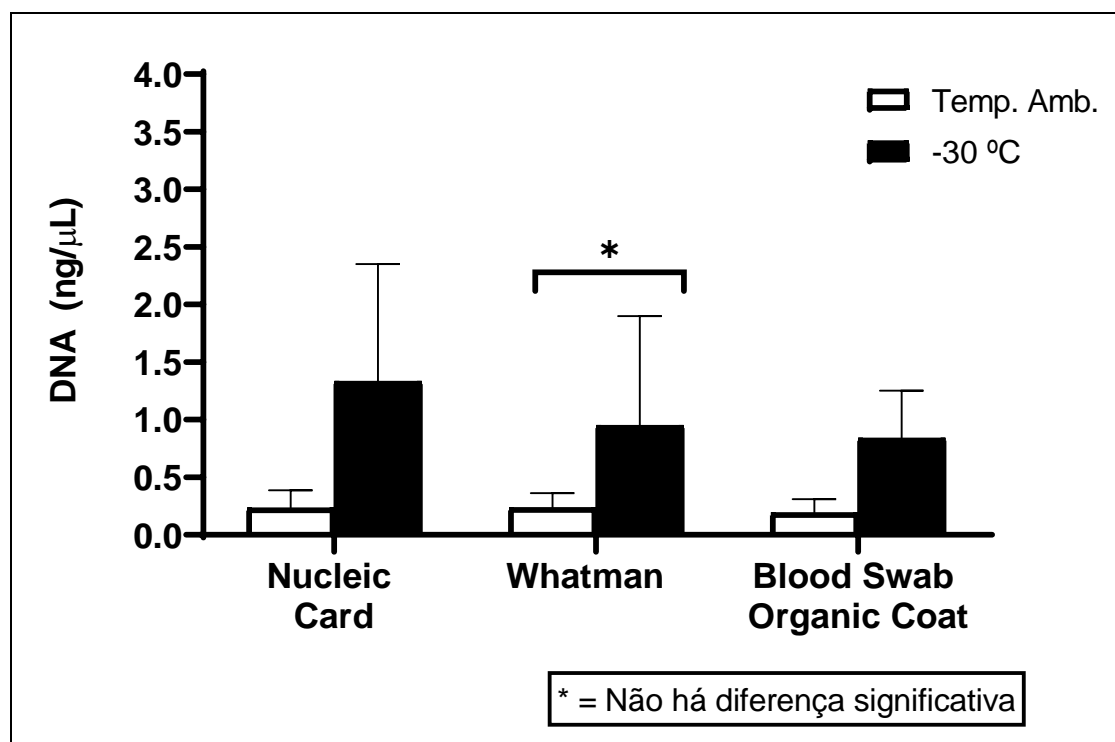
Figura 19. Comparação de extração de DNA entre os três suportes no tempo de 1 dia.



Enquanto isso, para o período de tempo de 21 dias, o armazenamento sob refrigeração promoveu elevados incrementos no rendimento médio de extração, onde obteve-se um material genético mais abundante em 480% para o papel NUCLEIC-CARD™, em 300% para Whatman e em 340% para Blood Swab Organiccoat, em comparação aos seus análogos armazenados à temperatura ambiente.

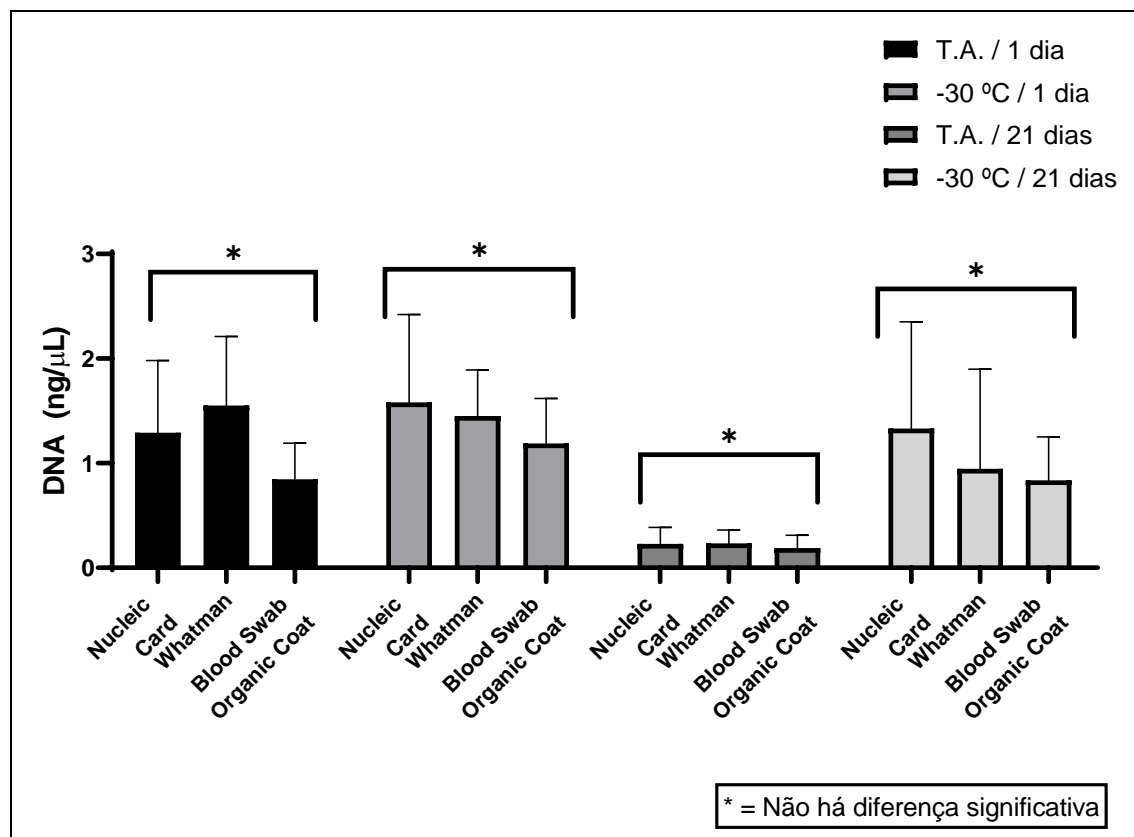
A normalidade destes resultados foi novamente confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk e a ausência de dados aberrantes por meio do teste de Grubbs. Utilizando o teste t de Student não-pareado com confiabilidade de 95% ($\alpha = 0,05$), nota-se que desta vez a diferença entre os rendimentos de extração se mostra significativa no cenário de 21 dias, com exceção para o suporte Whatman. Logo, entende-se que a refrigeração em uma situação de armazenamento prologando, é um parâmetro crucial no processamento amostral, sendo um fator limitante na disponibilização de material genético à ser extraído dos suportes. Esta inferência não se aplica ao suporte Whatman, visto que este apresenta um aumento significativo no rendimento de material genético extraído ao ser submetido a refrigeração, porém também é acompanhado de uma robustez suficiente para possibilitar o armazenamento de amostras sob temperatura ambiente sem perdas significativas na extração.

Figura 20. Comparação de extração de DNA entre os três suportes no tempo de 21 dias.



Em uma comparação intermatricial, o papel NUCLEIC-CARD™ se mostrou levemente superior nas condições refrigeradas tanto para 1 dia quanto para 21 dias, enquanto o suporte Whatman resultou em um melhor rendimento de extração para as amostras armazenadas à condições ambientes. Entretanto, estatisticamente, as médias obtidas para estes dois suportes nas mesmas condições de armazenamento não são significativamente distintas entre si ($\alpha = 0,05$), resultado concordante com o demonstrado por Marchand *et al* (2021).

Figura 21. Comparação estatística entre os três suportes para cada condição de armazenamento.



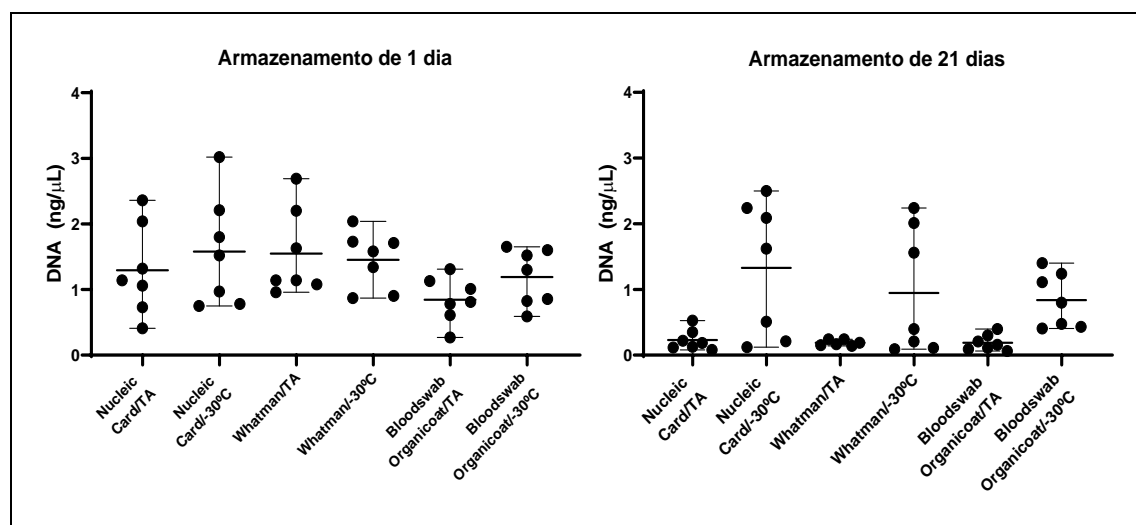
Os três suportes avaliados apresentaram diferenças estatísticas insignificantes ao se comparar os resultados sob a perspectiva de uma mesma condição de armazenamento utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) para 1 fator, indicando a viabilidade de qualquer uma dessas três opções como alternativas de suporte de amostragem. Entretanto, nota-se que o suporte nacional Blood Swab Organiccoat expressou a tendência a se alcançar os piores rendimentos em todos os cenários analisados.

A desvantagem do suporte Blood Swab Organiccoat vai além do rendimento de extração e este comportamento pode ser explicado pela própria natureza da estrutura do suporte. Este consiste em uma tira de base plástica feita de polipropileno, com um material de absorção aderido feito de poupa de celulose de algodão neutra com baixíssima reserva alcalina. Sua estrutura é de difícil manipulação, fato que dificulta o processamento das amostras. Assim, ao tornar o processo analítico mais laborioso para o operador, tende-se a criar mais possibilidades de contaminações e de erros aleatórios no procedimento analítico. Além disso, a faixa de absorção deste material, em água, é de aproximadamente 200g/m², segundo o fabricante, porém, nota-se que, na prática, o volume de 20 μL aplicado ao material não foi suportado pelo mesmo,

assim, comprometendo a etapa de extração pela não-fixação adequada do material biológico de partida e não atendendo um dos requisitos estipulados pela WADA.

A refrigeração diminui a precisão da extração em todas as matrizes quanto ao período de 1 dia, vide Figura 22 abaixo. Para 21 dias, este efeito é observado de forma ainda mais significativa. Este fato não pode ser explicado até o momento.

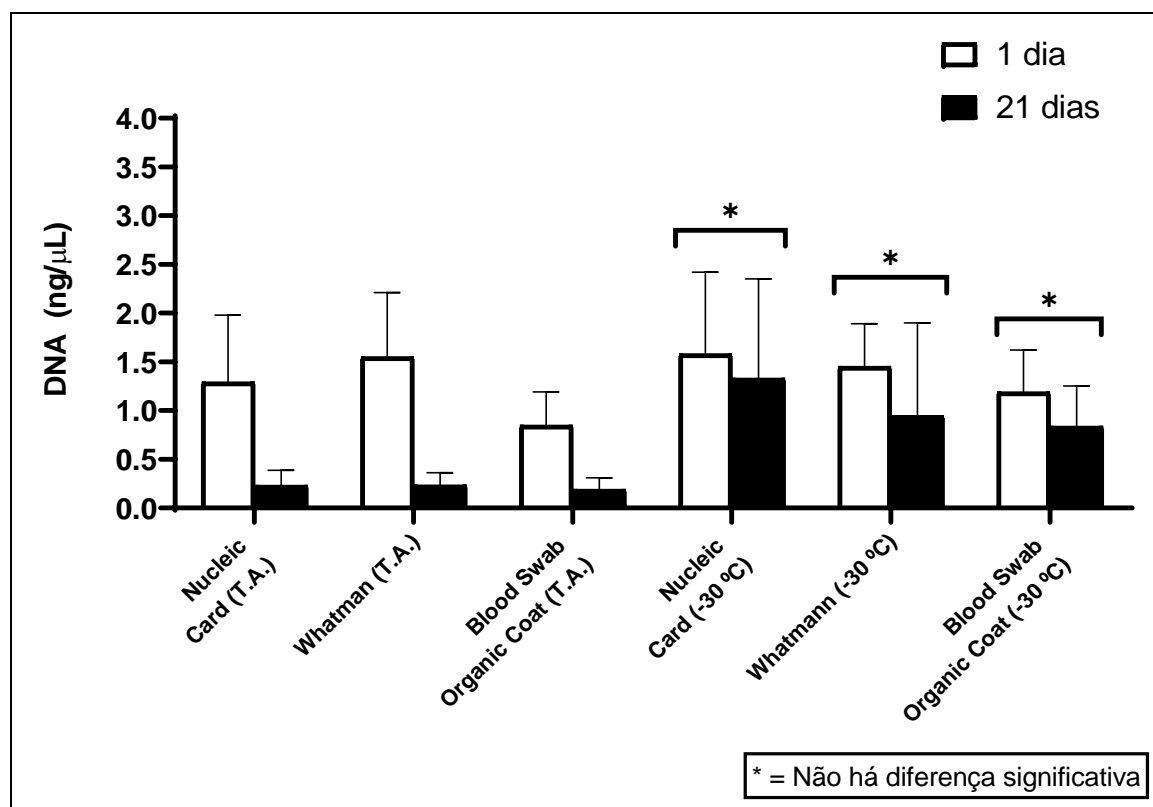
Figura 22. Comparação de precisão de extração entre os grupos amostrais.



Em uma mesma condição de temperatura, o aumento do tempo de estocagem promoveu a diminuição do rendimento da extração de DNA em todos os papéis, tal como esperado pela literatura. Nota-se uma menor sensibilidade à este parâmetro nos grupos amostrais mantidos armazenados sob refrigeração. Assim, à temperatura ambiente, ocorreu uma diminuição do rendimento de forma estatisticamente significativa em 83% para NUCLEIC-CARD™, de 85% para Whatman e de 78% para Blood Swab Organicoat ao comparar os tempos de 1 dia e de 21 dias. Enquanto isso, sob refrigeração, a diminuição do rendimento foi de apenas 16% para NUCLEIC-CARD™, 39% para Whatman e 30% para Blood Swab Organicoat., não sendo estatisticamente significativa, segundo o teste t de Student.

Logo, entende-se que para os suportes armazenados à temperatura ambiente, o aumento do tempo de estocagem acarreta em limitações do material genético disponível à ser extraído, podendo ser um fator limitante para as técnicas de detecção aplicadas em sequência, enquanto que sob condições refrigeradas de armazenamento, este gargalo não é considerável.

Figura 23. Comparação estatística entre os tempos de armazenamento.



Quanto a pureza do material genético extraído, as razões das absorvâncias à 260, 280 e 230 nm foram medidas por espectrofotometria na região do ultravioleta (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific). Os resultados se encontram compilados na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Resultados da quantificação do DNA extraído por Nanodrop (n = 7).

Matriz	Condição ^b	Razão	
		A260/A280 ^a	A260/A230 ^a
NUCLEIC CARD™	T.A./1 dia	1,65 ± 0,16	0,57 ± 0,14
	-30 °C/1 dia	1,77 ± 0,30	0,59 ± 0,09
	T.A./21 dias	1,72 ± 0,48	0,54 ± 0,04
	-30 °C/21 dias	1,80 ± 0,35	0,60 ± 0,15
Whatman	T.A./ 1 dia	2,00 ± 0,26	0,57 ± 0,09
	-30 °C/1 dia	1,94 ± 0,22	0,58 ± 0,13
	T.A./21 dias	1,94 ± 0,21	0,49 ± 0,09
	-30 °C/21 dias	1,67 ± 0,20	0,51 ± 0,05

(Continua)

(Conclusão)

	T.A./ 1 dia	2,13 ± 0,47	0,61 ± 0,18
Blood	-30 °C/1 dia	2,09 ± 0,56	0,76 ± 0,16
Swab Organicoat	T.A./21 dias	2,09 ± 0,15	0,42 ± 0,13
	-30 °C/21 dias	1,57 ± 0,30	0,63 ± 0,12

a. Média ± desvio padrão

Legenda: **T.A./1 dia** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. **-30/1 dia** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 1 dia. **T.A./21 dias** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. **-30/21 dias** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias.

A estimativa da pureza de um DNA extraído – ou seja, a condição do DNA como límpido e isolado, ausente de outros componentes como impurezas – pode ser averiguada via espectrofotometria na região do ultravioleta, como realizado neste trabalho. A medida de absorvância no comprimento de onda de 260 nm é indicativo da quantidade de ácidos nucleicos presentes, visto que é onde estes apresentam absorvância máxima. Outras espécies contaminantes como, por exemplo, polissacarídeos e proteínas apresentam absorvância máxima em 230 nm e 280 nm, respectivamente. Assim, as razões entre as absorvância em 260 nm por 280 nm e entre 260 nm por 230 nm são bons parâmetros da pureza do DNA obtido.

Para a razão A260/A280, valores próximos ou superiores a 1,8 são dados como ideais e indicativo de um bom material genético isolado. A contaminação por proteínas, fenóis ou outros compostos que absorvem próximo à 280 nm levam à subestimação dessa razão. Quanto a razão A260/A230, valores superiores à razão A260/A280 e entre 2,00 e 2,20 são esperados. Valores abaixo dessa faixa podem indicar a presença de agentes contaminantes como, por exemplo, EDTA, compostos orgânicos, fenóis, carboidratos, glicogênio, guanidina ou agentes caotrópicos (KHETAN, GUPTA, et al., 2019, VIANNA, ANDRESSA, et al., 2015).

Para este trabalho, a razão de A260/A230 não é levada em consideração, visto que segundo o próprio fabricante e a literatura, este parâmetro não é confiável para amostras de concentrações menores que 20 ng/μL, como no caso estudado. Além disto, a baixa concentração de ácidos nucleicos também afeta a razão A260/A280, deslocando a mesma para valores levemente inferiores mesmo em quadros de pureza. (FISHER SCIENTIFIC, 2010; KHETAN et al., 2019).

Tendo isto em vista, observa-se que todos os grupos amostrais apresentaram médias de razões A260/A280 satisfatórias, logo, o material genético extraído dos suportes nas condições

analisadas apresenta – com alta reprodutibilidade – pureza elevada e adequada para um cenário de controle de dopagem genética.

4.2. Estudo dos parâmetros de mérito dos ensaios de PCR

Dois ensaios para qPCR foram utilizados neste trabalho para amplificar sequências características de dopagem genética no material genético extraído das amostras-problema. Estes ensaios foram desenhados com sondas de hidrólise TaqManMGB e têm como alvo duas regiões de junções éxon-éxon diferentes da sequência de EPO transgênica, sendo estas inexistentes endogenamente e exclusivas de vetores biológicos exógenos. Além disso, um ensaio para qPCR tendo como alvo a sequência do gene constitutivo de glicerol 3- fosfato desidrogenase (GAPDH) também foi utilizado para amplificar às amostras extraídas e avaliar assim a integridade do DNA extraído, ou seja, estado de degradação do mesmo.

A detecção da amplificação das corridas de PCR foi realizada pelo monitoramento do sinal de fluorescência decorrente das reações. Este foi coletada em tempo real pelo filtro FAM (canal de leitura x2-m2) do equipamento QuantStudio 12K Flex PCR System (Thermo Fisher Scientific) para os ensaios desenhados para EPO transgênica e pelo filtro VIC (canal de leitura x3-m3) do mesmo equipamento para o ensaio que tem como alvo a sequência genômica da GAPDH.

Todas as reações de PCR foram preparadas utilizando o TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Um controle negativo ausente de fortificação com material de referência de EPO transgênica e um controle positivo com uma concentração de 200 cópias/ μ L do mesmo material de referência foram analisados em paralelo às amostras.

Uma curva padrão para cada ensaio foi construída a partir de 5 pontos de concentração conhecida de material de referência em diluições seriadas de razão 1:10 de acordo com o tópico 3.8.1 da metodologia. A análise da relação dos ciclos de amplificação (C_q) referentes a cada concentração dos pontos da curva e sua comparação com os valores de C_q obtidos em amostras-problema permite estimar o número de cópias do determinado gene alvo dopado em determinada amostra. Além disso, outra informação que pode ser obtida pela curva-padrão é o coeficiente angular da reta (*slope*) do modelo desta reação, valor que será utilizado no cálculo da eficiência da reação, segundo a Equação 1 abaixo:

$$E = 10^{[-1/Slope]} \quad (1)$$

Este coeficiente angular deve permanecer em torno de -3,3, sendo assim referente a uma eficiência aproximada entre 90% e 110% que, por sua vez, se refere a valor compatível com uma reação de PCR genérica em que o número de moléculas aproximadamente dobra a cada ciclo. (CRUZ, 2017; ISABEL WODEWOTZKY; PESSOA ARAÚJO JÚNIOR; CRUZ LANDIM E ALVARENGA, 2010).

Além disso, a curva construída é representada por um modelo de regressão linear de forma $y = ax + b$ atrelado a um fator de determinação R^2 indicativo da linearidade e reprodutibilidade do ajuste linear do método. Este deve ser idealmente o mais próximo possível de 1, têm-se o valor tal qual maior ou igual a 0,98 como aceitável. Por sua vez, o Limite de Detecção (LOD) da reação é dado como o limiar teórico máximo de identificação da mesma, ou seja, o menor número possível de cópias de molécula-alvo encontrada no C_q máximo aceitável dando origem a um sinal de amplificação estatisticamente significativa e com confiabilidade mínima de 95% de probabilidade.

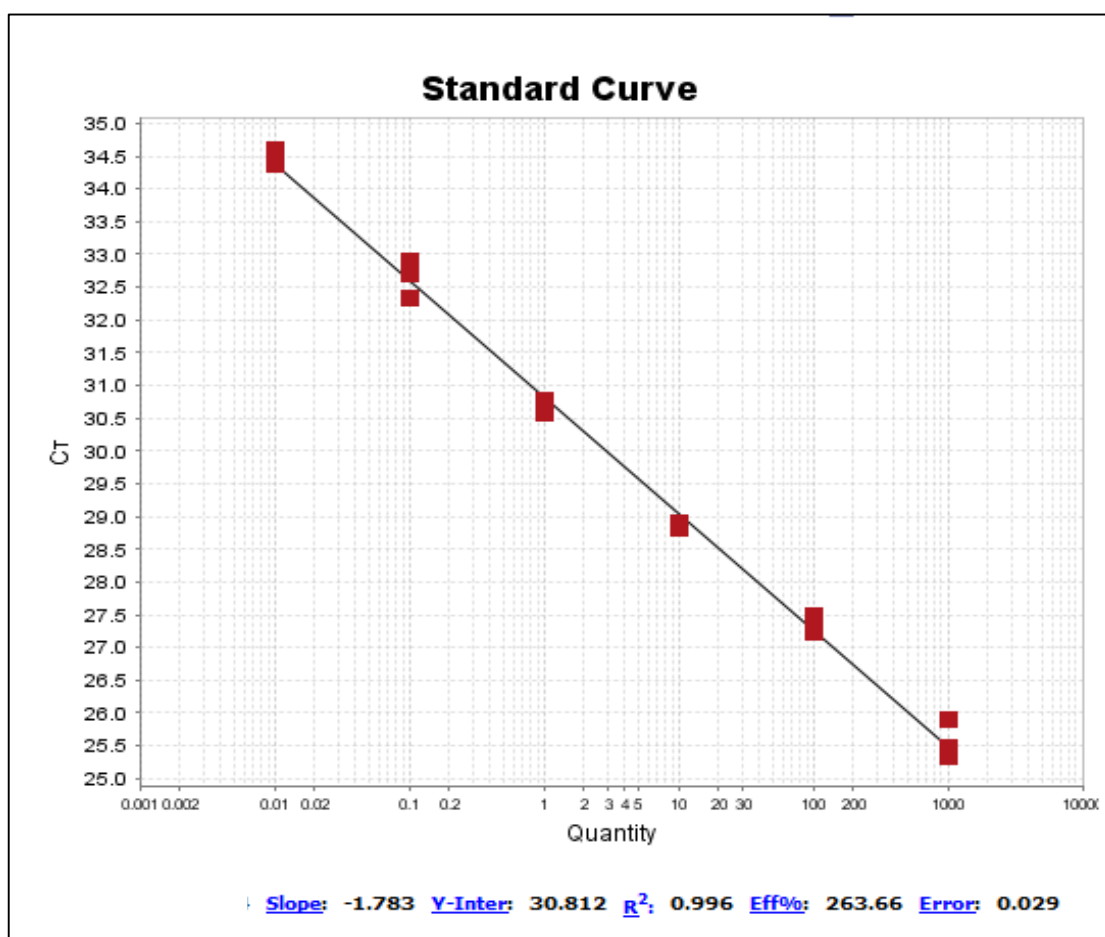
De acordo com a literatura e o conceito de distribuição de Poisson, o LOD de qualquer reação de qPCR não pode teoricamente ser menor que de 3 cópias em aproximadamente 36/37 ciclos de amplificação. Entretanto, otimizações do ensaio por meio de múltiplas diluições seriadas do material de referência em um alto número de replicatas podem ser realizadas para se obter e validar este parâmetro de forma mais representativa da metodologia em questão. Segundo as informações fornecidas pelo fabricante responsável pelo desenho destes ensaios estima-se o limiar de 39 ciclos como um valor máximo de C_q aceitável. (BUSTIN et al., 2009).

A curva padrão para o ensaio Sigma 2 se encontra representada na Figura 24 abaixo. A partir desta, é observado um coeficiente angular de reta de -1,738, logo, acarretando em um valor de eficiência de reação de aproximadamente 264%. Este valor é considerado insatisfatório e muitos fatores podem ser apontados como possíveis causadores de erros que afetam a curva padrão e deslocam os parâmetros de eficiência para além do teórico, como, por exemplo, a presença de inibidores, ocorrência de contaminação, erros de precisão da pipeta, e outros. Entretanto, valores de eficiência extremamente superestimados como neste caso são indicativos característicos de falta de especificidade do ensaio utilizado na reação, gerando assim produtos

inespecíficos e uma quantificação de baixa acurácia (BUSTIN et al., 2009; FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]).

Em contrapartida, um valor de R^2 altamente satisfatório é observado, indicando um bom ajuste linear do modelo utilizado, sendo este dado por $y = -1,738x + 30,812$. O Limite de Detecção desta reação encontrado no nível de 0,01 cópias/ μL é indicativo de um ensaio sensível e adequado para um cenário de detecção de dopagem genética de Eritropoetina visto que uma única cópia de sequência da junção exón-exón deste gene encontrado em um sangue humano já configura um resultado analítico adverso indicativo de dopagem genética.(MARCHAND, ROULLAND, et al., 2021).

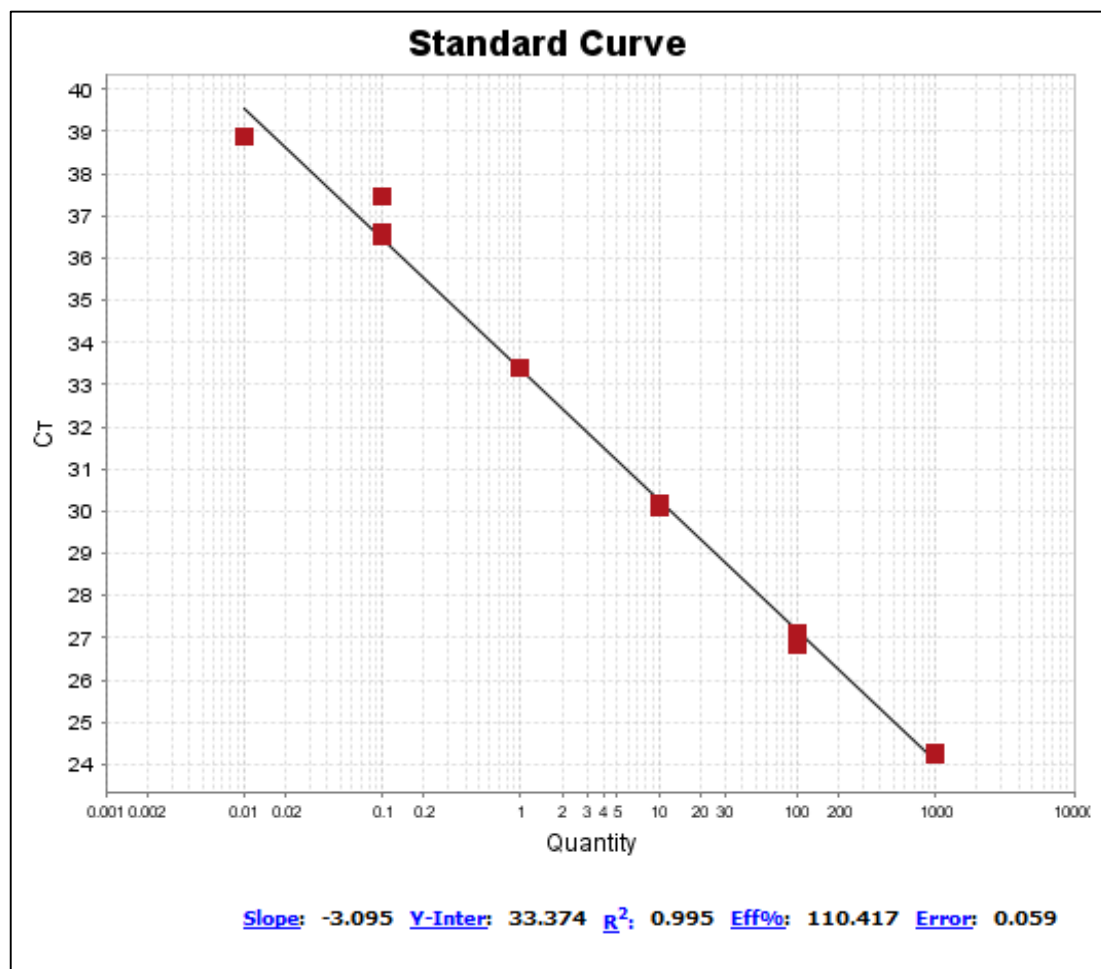
Figura 24. Curva padrão (Cq x cp/ μL) do ensaio Sigma 2 e seus parâmetros de mérito.



De forma análoga, a curva padrão para o ensaio Sigma 4 se encontra representada na Figura 25 abaixo e seus parâmetros de mérito podem ser igualmente verificados. Um coeficiente angular de reta de -3,095 é observado, logo, acarretando em um valor de eficiência de reação

extremamente satisfatório de 110%. Um valor de R^2 satisfatório também é observado, além de uma equação da reta igual a $y = -3,095x + 33,374$ e um Limite de Detecção no nível de 0,1 cópias/ μL .

Figura 25. Curva padrão (Cq x cp/ μL) do ensaio Sigma 4 e seus parâmetros de mérito.



4.3. Amplificação por PCR com ensaio Sigma 2

Quanto à amplificação das amostras-problema com o ensaio Sigma 2, os resultados da se encontram compilados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8. Resultados da amplificação por PCR pelo ensaio Sigma 2 (n= 18).

Condição	NUCLEIC CARD™, a	Whatman ^a	Blood Swab Organicoat ^a
T.A./ 1 dia	28,801 ± 0,594	28,572 ± 0,614	29,424 ± 0,595
-30 °C/ 1 dia	28,817 ± 0,710	28,778 ± 0,617	28,791 ± 0,705
T.A./ 21 dias	31,765 ± 1,924	30,985 ± 1,474	32,354 ± 2,735
-30 °C/ 21 dias	29,250 ± 1,016	28,233 ± 0,558	29,897 ± 1,160

a. Média (C_q) ± desvio padrão

Legenda: **T.A./1 dia** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. **-30/1 dia** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 1 dia. **T.A./21 dias** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. **-30/21 dias** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias.

A média e o desvio-padrão de cada grupo em estudo, assim como todo tratamento estatístico, foram construídos com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.2. Em relação as amostras armazenadas pelo tempo de 1 dia, nota-se, de forma qualitativa, que o uso do papel Whatman acarretou em amplificações em ciclos ligeiramente menores tanto para o armazenamento à temperatura ambiente quanto nas condições refrigeradas. Esta diferença é estatisticamente significativa na condição de temperatura ambiente, entretanto é insignificante sob refrigeração.

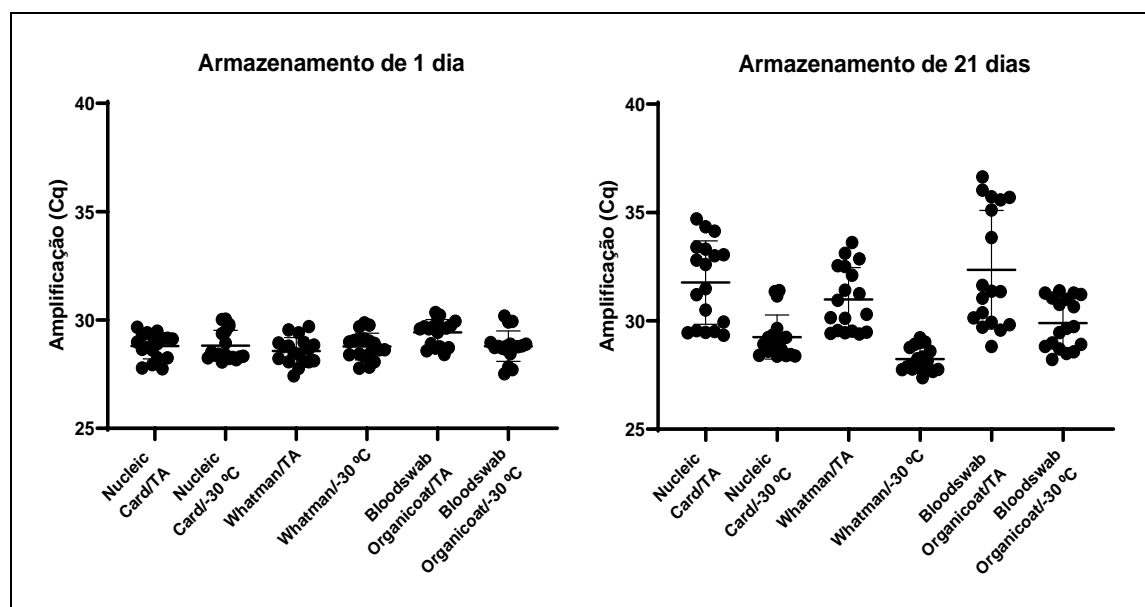
Para o tempo de armazenamento de 21 dias, todas as amostras apresentaram ciclos de amplificação superiores aos seus análogos de temperatura armazenados durante o período de 1 dia. Com excessão do papel Whatman, este apresentou ciclos menores no grupo -30/21 dias em relação ao grupo -30/1dia. Todas estas diferenças são estatisticamente insignificantes. Este fato pode ser explicado pelas condições de armazenamento deste grupo amostral de 21 dias as tornarem mais suscetíveis ao fenômeno de hemólise que, por sua vez, acarreta em grupos inibidores da reação de PCR e em ciclos de amplificação maiores. A robustez do sistema de amostragem por DBS garante um maior efeito protetor à influência do tempo de armazenamento (SIDSTEDT et al., 2018).

Em comparação, os grupos amostrais armazenado durante os períodos de 21 dias porém sob condições refrigeradas, apresentaram ampliações satisfatória em ciclos adequados e estatisticamente insignificantes em relação aos seus análogos armazenados à temperatura ambiente. O uso da matriz de DBS novamente se mostra, de forma geral, robusto o suficiente para tornar o uso da refrigeração dispensável nos contextos estudados, não trazendo melhoras estatisticamente significantes para os resultados e acarretando em um grande custo operacional para o processo analítico.

O uso do papel Whatman novamente se mostrou qualitativamente superior, com ampliações nos menores ciclos e com o menor desvio padrão entre as replicatas em todos os cenários testados. Por meio do teste de ANOVA para 1 fator, verifica-se que essa diferença entre as matrizes é estatisticamente significativa.

O armazenamento sob refrigeração aumentou a precisão em todas as matrizes quanto ao período de 21 dias, vide Figura 26 abaixo. Enquanto, para 1 dia, é observado o efeito contrário, onde o grupo amostral armazenado à temperatura ambiente apresentou menor desvio padrão e, logo, uma amplificação de maior precisão. Este fenômeno não pode ser explicado até o momento.

Figura 26. Comparação de precisão entre os grupos amostrais com ensaio Sigma 2.

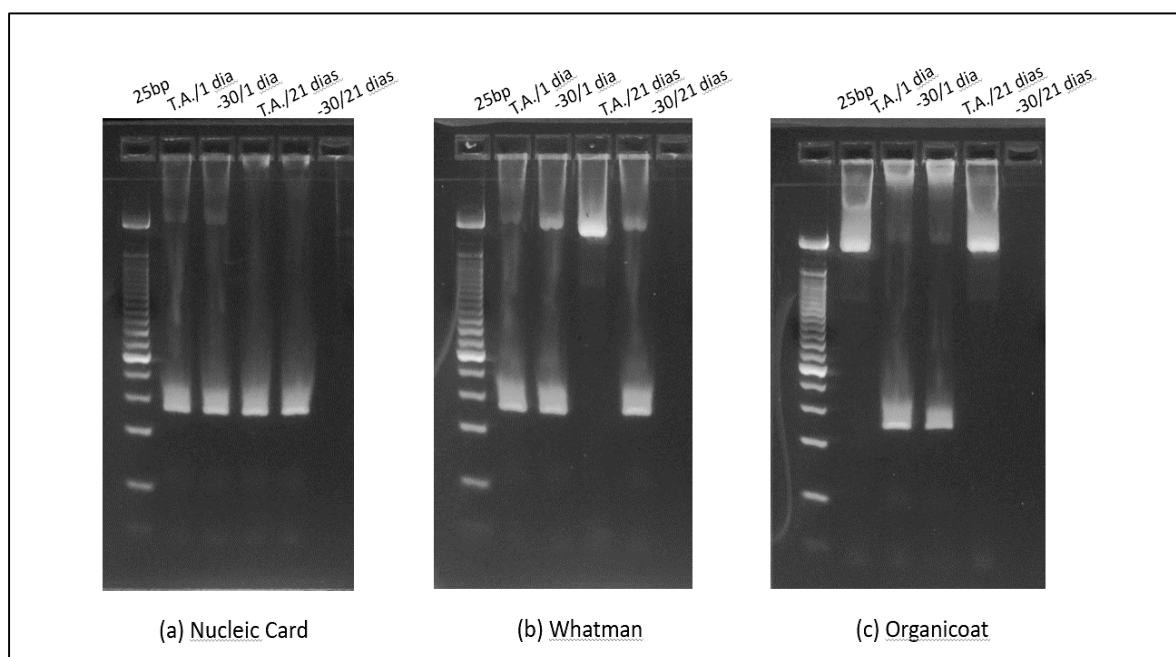


Quanto a exatidão, devido a alta taxa de eficiência deste ensaio e conseqüente baixa especificidade do mesmo, espera-se altas recuperações superestimadas do analito. Entretanto,

atenta-se que em um cenário de controle de dopagem genética, uma única cópia do transgene encontrada já é considerado um resultado analítico adverso, logo, todas as ampliações obtidas mesmo que superestimadas ainda seriam adequadas para um método de detecção de caráter puramente qualitativo de um gene dopante em uma hipotética triagem.

Os produtos de amplificação da PCR foram submetidos à uma etapa de confirmação em corrida de eletroforese em gel de agarose 4% como descrito anteriormente no item 3.9.1. Os resultados das corridas se encontram abaixo na Figura 27. Amplicons com tamanho aproximado de 64 bp são esperados e encontrados de forma satisfatória na maioria das amostras submetidas à técnica. Além disso, bandas de arraste são observadas no topo do gel de agarose, fenômeno indicativo de anelação do ensaio em regiões genômicas inespecíficas, em concordância com a baixa especificidade do mesmo já destacada anteriormente.

Figura 27. Corrida de eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos decorrentes da amplificação das amostras fortificadas em PCR com ensaio Sigma 2.



Legenda: 25bp = Padrão de fragmentos de DNA de 25 pares de bases. T.A./1 dia = amostra fortificada armazenada à temperatura ambiente por 1 dia. -30/1 dia = amostra fortificada armazenada à -30 °C por 1 dia. T.A./21 dias = amostra fortificada armazenada à temperatura ambiente por 21 dias. -30/21 dias = amostra fortificada armazenada à -30 °C por 21 dias.

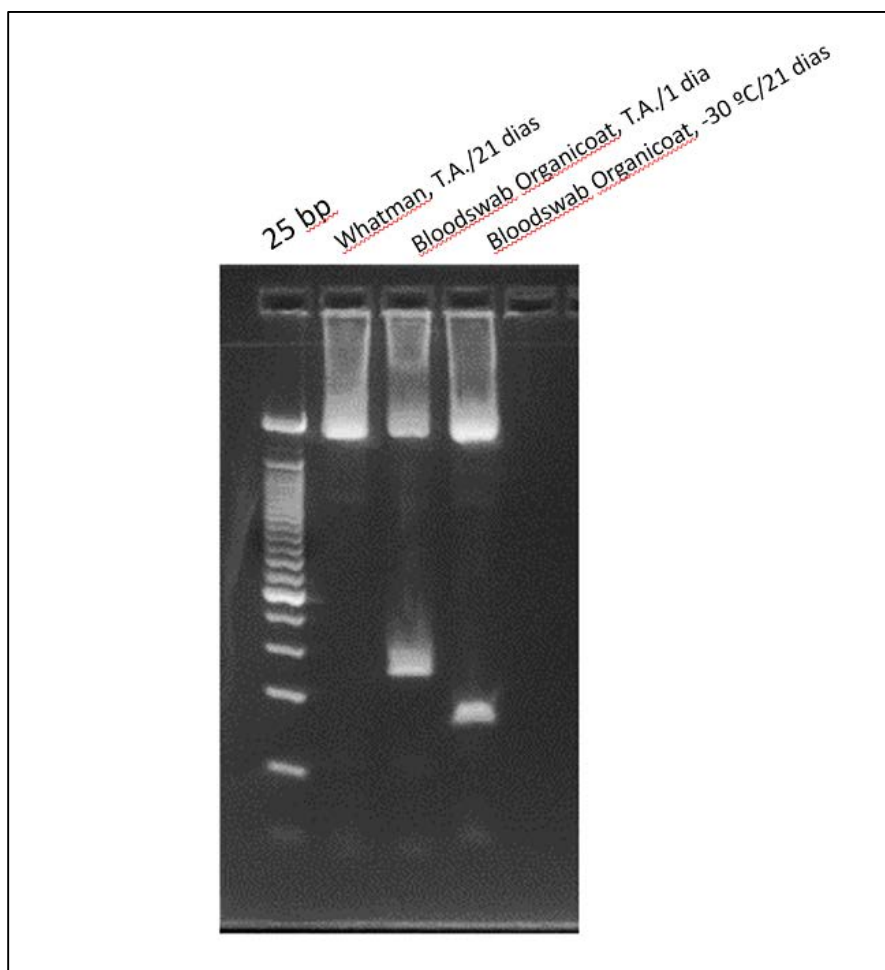
Amostras que apresentaram uma visualização adversa no gel foram submetidas a uma corrida de reteste e seu resultados se encontram representados na Figura 28. Nota-se que amostras amplificadas em valores elevados de ciclos próximos ao limite de detecção da reação – logo, de menores concentrações do gene-alvo – apresentaram produtos com visualizações

problemáticas no gel de agarose. As bandas obtidas são pobres e de difícil visualização e corridas minimamente satisfatórias ocorrem de forma estocástica., assim, esbarrando no gargalo visual da técnica de eletroforese em gel de agarose.

Um ensaio de confirmação mais sensível e preciso se mostra necessário para evitar a ocorrência de falsos negativos em um cenário de controle de dopagem genética. Entre as técnicas que poderiam substituir a eletroforese em gel de agarose como método de confirmação, a PCR digital se mostra a mais adequada visando os objetivos e desafios analíticos em questão. A PCR digital é uma técnica analítica simples, rápida, exata e precisão que permite uma quantificação absoluta de alta sensibilidade de ácidos nucleicos presente em uma amostra sem a necessidade de uma curva padrão.

Em um sistema de PCR digital, uma amostra é dividida em 20.000 gotas que se comportam como reações de PCR individuais e, após a amplificação, são detectadas por fluorescência e classificadas como positivas ou negativas. Em contraste com a PCR quantitativa utilizada neste trabalho, a PCR digital não depende do número de ciclos de amplificação para determinar a quantidade inicial de ácido nucleico em cada amostra, ao invés disso, baseando-se em um cálculo estatístico de Poisson – ao partir da proporção de positivos para negativos em cada amostra – para determinar a quantidade absoluta de DNA. A PCR digital se mostra aplicável satisfatoriamente para cenários que requerem alta resolução analítica, como, por exemplo, na detecção clínica de sequências raras em pacientes ou em uma triagem de controle de dopagem genética, sendo assim, uma possível alternativa de implementação tecnológica e alvo de futuros estudos (LÓPEZ et al., 2020).

Figura 28. Reteste de corrida de eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos decorrentes da amplificação das amostras fortificadas em PCR com ensaio Sigma 2.



Legenda: 25bp = Padrão de fragmentos de DNA de 25 pares de bases. T.A./1 dia = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. -30/1 dia = amostra fortificada armazenada a -30 °C por 1 dia. T.A./21 dias = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. -30/21 dias = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias.

Em divergência ao esperado, sinais de amplificação nas amostras do grupo controle, as quais não foram fortificadas com material de referência do gene da Eritropoetina foi encontrados nas corridas de PCR utilizando o ensaio Sigma 2. Os resultados da amplificação deste grupo se encontram compilados na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Amplificação dos controles por PCR pelo ensaio Sigma 2. (n=3).

Condição	NUCLEIC CARD™, a	Whatman ^a	Blood Swab Organicoat ^a
T.A./ 1 dia	28,797 ± 0,116	29,385 ± 0,114	32,136 ± 0,099

(Continua)

(Conclusão)

-30 °C/ 1 dia	28,057 ± 0,110	28,905 ± 0,075	29,934 ± 0,098
T.A./ 21 dias	34,265 ± 0,313	32,433 ± 0,239	31,389 ± 0,173
-30 °C/ 21 dias	29,802 ± 0,893	29,756 ± 0,185	30,438 ± 0,099

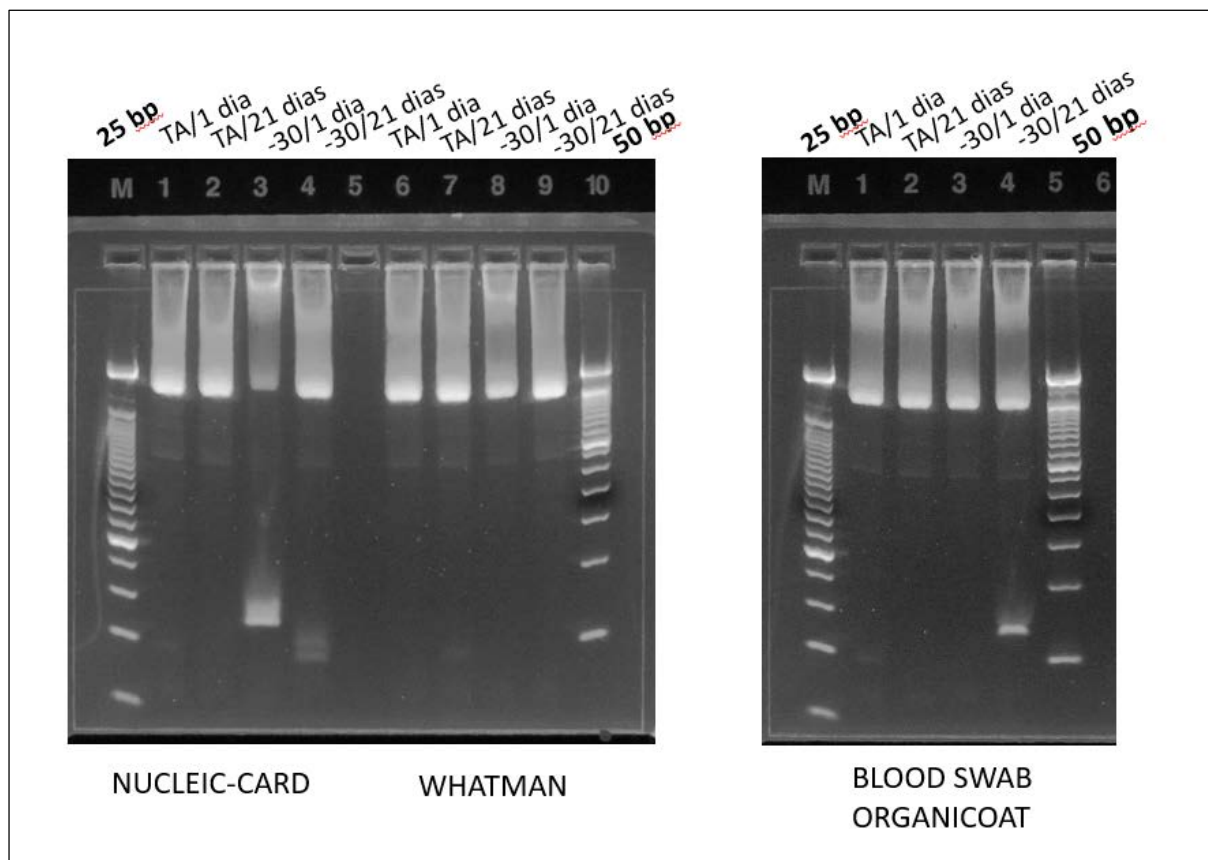
a. Média (C_q) ± desvio padrão

Legenda: **T.A./1 dia** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. **-30/1 dia** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 1 dia. **T.A./21 dias** = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. **-30/21 dias** = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias.

Os produtos de amplificação deste grupo controle foram submetidos à uma etapa de confirmação em corrida de eletroforese em gel de agarose 4% para verificar a identidade dos amplicons suspeitos obtidos. Os resultados das corridas se encontram na Figura 29 abaixo. Amplicons com tamanhos muito distintos do tamanho esperado de 64 bp foram encontrados, assim, a amplificação ocorrida não foi da sequência-alvo do gene da Eritropoetina.

Em concordância com elevada eficiência encontrada anteriormente para esta ensaio, este resultado corrobora a inferência discorrida sobre uma amplificação não-específica, que, por sua vez, gera produtos decorrentes da anelação com outras sequências constitutivas do material genético extraído. Assim, os produtos visualizados neste gel de agarose não são da amplificação de um gene dopante e, sim, decorrente de alguma sequência genômica amplificada erroneamente ou a formação de dímeros.

Figura 29. Corrida de eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos de amplificação do grupo controle com ensaio Sigma 2.



Legenda: 25 bp = Padrão de fragmentos de DNA de 25 pares de bases. T.A./1 dia = amostra fortificada armazenada em temperatura ambiente por 1 dia. -30/1 dia = amostra fortificada armazenada em -30 °C por 1 dia. T.A./21 dias = amostra fortificada armazenada em temperatura ambiente por 21 dias. -30/21 dias = amostra fortificada armazenada em -30 °C por 21 dias. 50 bp = Padrão de fragmentos de DNA de 25 pares de bases

4.4. Amplificação por PCR com ensaio Sigma 4

De forma simétrica ao tópico 4.3, os resultados da amplificação das amostras-problema pelo ensaio Sigma 4 se encontram compilados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Resultados da amplificação por PCR pelo ensaio Sigma 4.

Condição	NUCLEIC CARD™, a	Whatman ^a	Blood Swab Organicoat ^a
T.A./ 1 dia	30,919 ± 0,230	31,628 ± 0,814	32,646 ± 3,574
-30 °C/ 1 dia	30,727 ± 0,219	32,786 ± 2,076	32,045 ± 2,765

(Continua)

(Conclusão)

T.A./ 21 dias	31,720 ± 1,553	31,479 ± 0,985	31,351 ± 1,243
-30 °C/ 21 dias	31,038 ± 1,242	31,640 ± 0,775	32,036 ± 2,136

a. Média (C_q) ± desvio padrão

Legenda: **T.A./1 dia** = amostra fortificada armazenada à temperatura ambiente por 1 dia. **-30/1 dia** = amostra fortificada armazenada à -30 °C por 1 dia. **T.A./21 dias** = amostra fortificada armazenada à temperatura ambiente por 21 dias. **-30/21 dias** = amostra fortificada armazenada à -30 °C por 21 dias.

A média e o desvio-padrão de cada grupo em estudo, assim como todo tratamento estatístico, foram construídos com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.2. Para o tempo de 1 dia, as melhores amplificações – lê-se, qualitativamente em menores ciclos – foram obtidas com o papel NUCLEIC-CARD™ tanto para as temperaturas ambientes quanto refrigeradas. Enquanto isso, para os tempos de 21 dias, as melhores amplificações foram encontradas no papel Blood Swab Organicoat à temperatura ambiente e NUCLEIC-CARD™ à -30°C. Por meio do teste de ANOVA para 1 fator, verifica-se que todas essas diferenças são estatisticamente insignificantes.

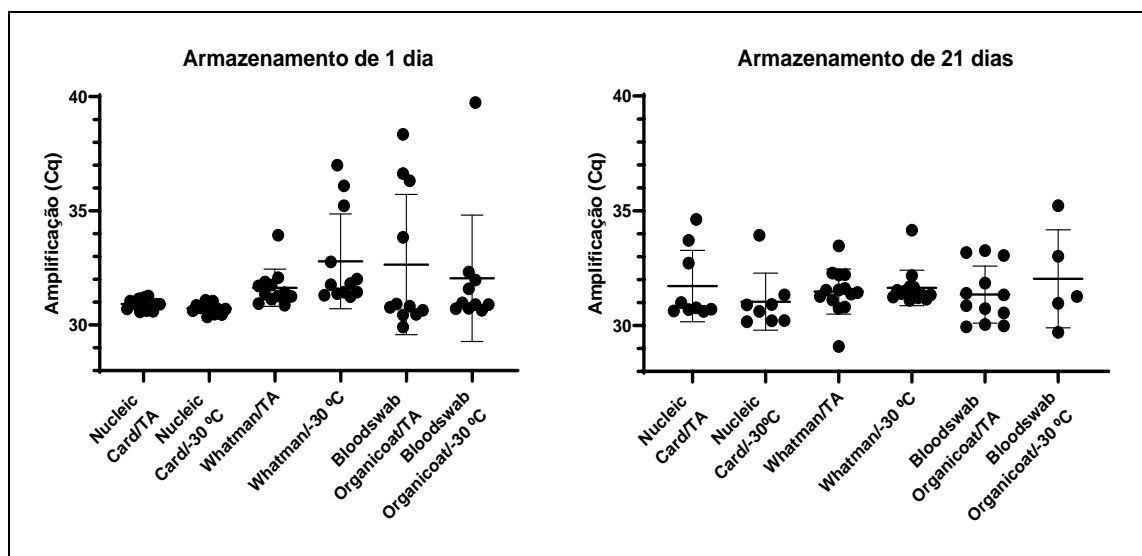
Em relação as amostras armazenadas pelo tempo de 1 dia, nota-se, diferenças estatisticamente insignificantes entre as amostras armazenadas à temperatura ambiente e sob a temperatura de -30 °C. O mesmo é observado para o armazenamento durante 21 dias. Reitera-se, assim, a não-correlação entre o uso da refrigeração e incrementos positivos sobre os ciclos de amplificação.

Entretanto, em contraste ao ensaio Sigma 2, nota-se amplificações de baixa qualidade em diversas replicatas de forma estocástica, principalmente nos grupos amostrais de 21 dias. Este fato pode ser explicado pelas condições de armazenamento que tornam as amostras mais suscetíveis ao fenômeno de hemólise que, por sua vez, acarreta em grupos inibidores da reação de PCR e desloca a amplificação para ciclos maiores. Este fenômeno atrelado a menor sensibilidade e capacidade de detecção do ensaio Sigma 4 resulta em um maior número de amplificações inconclusivas das amostras, de forma problemática a gerar resultados falso-negativos em um hipotético cenário de controle de dopagem (SIDSTEDT et al., 2018).

O efeito da refrigeração sob a precisão da amplificação ocorreu de forma variada para cada matriz, como explicitado na Figura 30 em questão. Enquanto para o suporte NUCLEIC-

CARD™ não se observou sensível à temperatura de armazenamento, para o Whatman, a precisão tende a se manter insensível no tempo de 1 dia e aumentar para 21 dias. Já para o suporte Blood Swab Organicoat é observado uma diminuição drástica do desvio padrão entre as replicatas das amostras sob refrigeração quando se comparado com as amostras armazenadas à temperatura ambiente no tempo de 1 dia e uma insensibilidade destes mesmos grupos à temperatura no tempo de 21 dias. Este fenômeno não pode ser explicado até o momento.

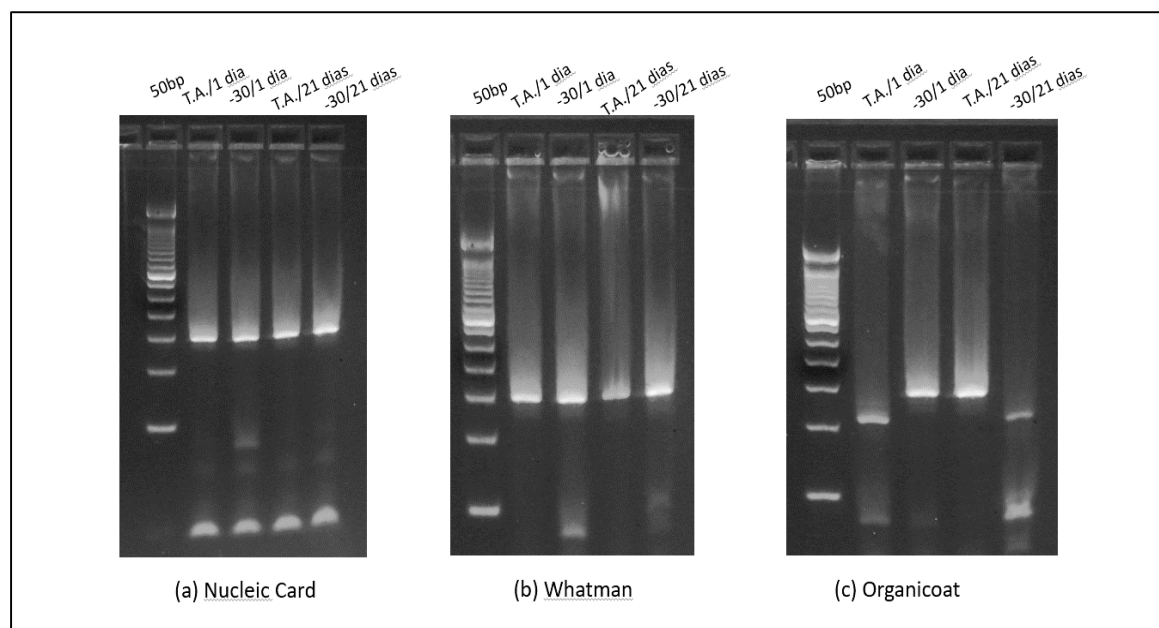
Figura 30. Comparação de precisão entre grupos amostrais em ensaio Sigma 4.



Os produtos de amplificação desta reação de PCR foram submetidos à uma etapa de confirmação em corrida de eletroforese em gel de agarose 4%. Os resultados das corridas se encontram na Figura 31 abaixo. Amplicons com tamanho aproximado de 146 bp são esperados segundo a literatura técnica deste ensaio e foram encontrados de forma satisfatória em todas as amostras submetidas à técnica.

O arraste de artefatos concatenados encontrados topo do gel de agarose são indicativos tanto de anelação deste ensaio em outras regiões genômicas quanto da saturação do poço de eletroforese com produtos de PCR. Este segundo fenômeno ocorre devido a não normalização dos poços de PCR à 20 ng de DNA que é tradicionalmente encontrado na literatura. Além disso, devido a taxa de eficiência satisfatória obtida para este ensaio, entende-se que a anelação que gera o produto inespecífico observado não é significativa nesta reação.

Figura 31. Eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos amplificados por PCR com ensaio Sigma 4.



Legenda: 50bp = Padrão de fragmentos de DNA de 25 pares de bases. T.A./1 dia = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. -30/1 dia = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 1 dia. T.A./21 dias = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. -30/21 dias = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias.

4.5. Avaliação da integridade do DNA extraído em diferentes suportes

Por fim, um estudo de avaliação da integridade do DNA extraído a partir de diferentes suportes de amostragem por *Dried Blood Spots* foi realizado. Para isso, uma amplificação de amostras por PCR com ensaio de um gene constitutivo, descrito no item 3.8.3, foi conduzida.

Um ensaio para qPCR tendo como alvo a sequência do gene constitutivo de gliceral 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado para amplificar às amostras extraídas. Em contraste ao esperado, resultados adversos e estocásticos foram obtidos. Sinais de amplificação confusos e não conclusivos com elevadas divergências entre replicatas foram observados e, assim, inferências não puderam ser feitas a partir a este conjunto de dados. Os resultados numéricos das amplificações se encontram compilados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Amplificação por PCR com ensaio GAPDH.

Matriz	Grupo	Amostra	GAPDH (C _q) ^a		
			Rep 1	Rep 2	Rep 3
NUCLEIC CARD™	TA/ 1 dia	H1	N.C.	4,388	N.C.
	-30/ 1 dia	H2	N.C.	N.C.	N.C.
	TA/ 21 dias	H3	N.C.	N.C.	N.C.
	-30/ 21 dias	M1	6,96	11,785	6,884
Whatman	TA/ 1 dia	M2	N.C.	N.C.	4,39
	-30/ 1 dia	M3	4,359	N.C.	N.C.
	TA/ 21 dias	C	5,434	11,741	7,987
	-30/ 21 dias	H1	6,288	4,253	4,794
Blood Swab Organicoat	TA/ 1 dia	H2	5,284	4,174	N.C.
	-30/ 1 dia	H3	N.C.	N.C.	N.C.
	TA/ 21 dias	M1	27,319	14,323	22,768
	-30/ 21 dias	M2	4,267	N.C.	33,734
	NTC		N.C.	N.C.	32,257

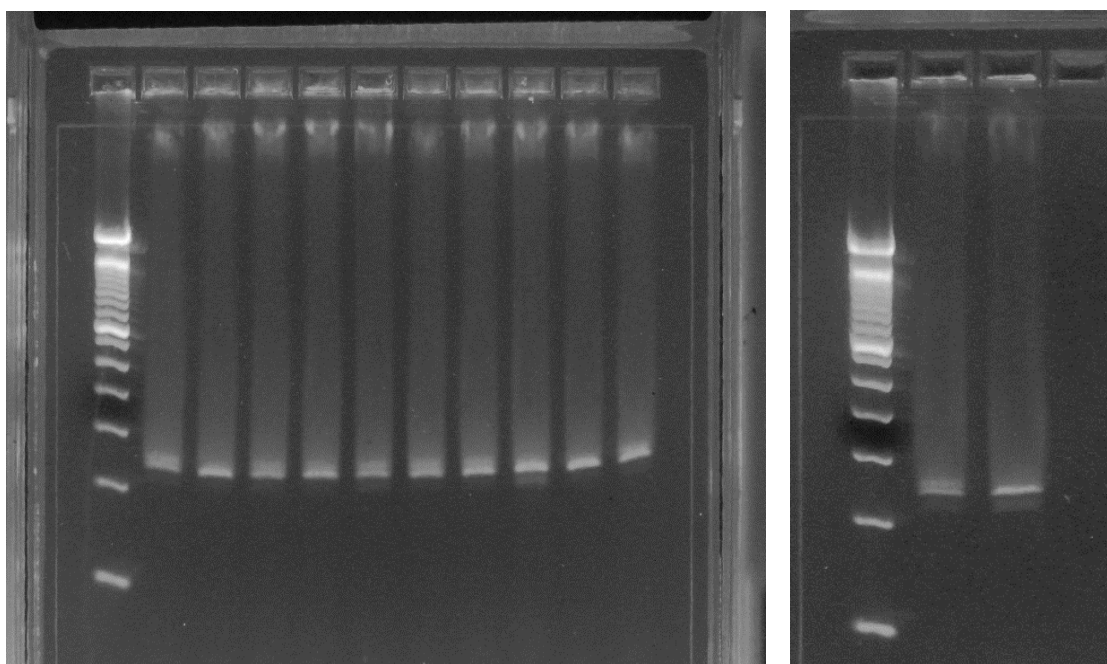
a. N.C. = Não conclusivo

Legenda: T.A./1 dia = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 1 dia. -30/1 dia = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 1 dia. T.A./21 dias = amostra fortificada armazenada á temperatura ambiente por 21 dias. -30/21 dias = amostra fortificada armazenada á -30 °C por 21 dias. NTC = controle negativo de *template* (Mix de reagentes de PCR + 4 µL de água *nuclease-free*).

Para confirmação e melhor entendimento do ocorrido, os produtos de amplificação da PCR foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose 4% como um ensaio de confirmação. Os resultados das corridas se encontram na Figura 32 abaixo, a ordem de carregamento dos poços seguiu a Tabela 11 anterior. Amplicons com tamanhos aproximados de 108 bp foram encontrados de forma satisfatória em concordância com a literatura. Assim, entende-se que a amplificação foi bem-sucedida e específica para sequências do gene constitutivo em estudo, evidenciando a integridade do material genético obtido pela extração dos suportes.

A divergência ocorrida nos dados de amplificação do ensaio pode ser explicada por: (i) problemas na captura da fluorescência pelo filtro VIC do equipamento utilizado, entretanto destaca-se que todas as calibrações necessárias e recomendadas pelo fabricante foram realizadas previamente ao início do ensaio; e (ii) pela falta de normalização de massa de DNA para cada reação, assim, a baixas concentrações de material genético em poços reacionais maximizaram dificuldades na emissão e leitura de fluorescência, podendo assim ter favorecido o erro instrumental ocorrido, assim como as altas concentração em alguns poços levaram a saturação e o devido arraste de artefatos concatenados nos géis.

Figura 32. Eletroforese em gel de agarose 4% dos produtos amplificados por PCR com ensaio GAPDH.



Ordem de carregamento idêntica à apresentada na Tabela 11.

A amplificação bem-sucedida com este ensaio ratifica a viabilidade do material genético extraído dos suportes de DBS a ser utilizado em diferentes técnicas de biologia molecular. Além disso, ao ser passível de amplificação do material genético com ensaios distintos para diferentes sequências-alvo, como realizado neste trabalho, se acende a perspectiva futura de se utilizar este mesmo sistema de amostragem no desenvolvimento de métodos de detecção de múltiplos genes dopantes como, por exemplo, IGF-1 e GH. A possibilidade de ensaios *multiplex* se torna cada vez mais plausível e concreta.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta um método de detecção de dopagem genética para Eritropoetina utilizando a técnica de PCR quantitativa acoplada a um sistema de amostragem por DBS. Todos os cenários estudados neste trabalho acarretaram em amostras extraídas com rendimento, pureza e integridade adequados para um ensaio de controle de dopagem genética no esporte.

Quanto ao rendimento do material genético extraído, destaca-se que os melhores resultados nas condições refrigeradas e em temperatura ambiente foram obtidos, respectivamente, com o uso dos papéis NUCLEIC-CARD™ e Whatman Protein Saver. De forma global, as amostras armazenadas em papel NUCLEIC-CARD™ à -30 °C durante 1 dia apresentaram os maiores rendimentos encontrados. Altos desvios padrões foram obtidos entre as replicatas dos grupos amostrais e estes podem ser explicados pelas diferentes áreas superficiais alcançadas nas manchas de sangue seco. Assim, se mostra recomendado ponderar sobre um controle espacial mais apurado na aplicação sob DBS em comparação a abordagem puramente volumétrica recomendada pela AMA/WADA e utilizada neste trabalho.

As diferentes condições de estocagem interagiram de forma não-trivial com os suportes utilizados e os materiais genéticos à serem eluidos. Nota-se que para o período de armazenamento de 1 dia, não há correlação do uso de condições refrigeradas e de incrementos positivos sobre os resultados, seja de rendimento de extração ou de ciclos de amplificação, em nenhum dos suportes avaliados. Assim, sendo um custo operacional descartável neste cenário. Quanto ao armazenamento de 21 dias, o mesmo comportamento é observado apenas para o papel Whatman Protein Saver. Para os outros suportes são observadas melhorias positivas significativas no montante de DNA extraído porém nenhum incremento no número de ciclos de amplificação. A influência das condições de estocagem sobre a precisão da extração não pode ser explicada até o momento.

O uso do suporte de amostragem nacional Blood Swab Organicoat é desaconselhado visto sua tendência qualitativa à menores rendimentos de extração de DNA e menor efeito protetor contra hemólise, resultando nos maiores ciclos de amplificação. Além disso, seu uso e manuseio é laborioso e não-gradável ao analista, tornando o processamento das amostras laborioso e mais suscetíveis a erros.

O uso do sistema de amostragem de DBS se mostra eficiente para um cenário de controle de dopagem, proporcionando uma extração satisfatória de DNA genômico e apresentando um

adequado efeito retardante do fenômeno indesejado de hemólise. O desenho dos *primers* utilizados na reação em questão se mostra o verdadeiro gargalo para um acoplamento eficiente deste sistema à técnica de qPCR. Os ensaios utilizados devem apresentar seletividade e sensibilidade suficientes para serem aplicados na detecção de sequências-alvo característica de genes dopantes. O ensaio Sigma 2 abordado neste trabalho falha no primeiro destes requisitos, assim, gerando anelamentos inespecíficos em regiões genômicas e, logo, resultados falso-positivos. Enquanto o Sigma 4 peca na falta de sensibilidade, assim, resultando em laudos falso-negativos ao não ser capaz de contornar a influência de inibidores de PCR decorrentes do fenômeno de hemólise. Torna-se necessário trabalhos futuros com melhores desenhos de sequências-iniciadoras, assim como estudos mais criteriosos quanto aos parâmetros de mérito de sensibilidade e seletividade das mesmas.

Amplificações bem-sucedidas foram obtidas para três diferentes sequências-alvo neste trabalho. Novas perspectivas quanto a aplicação de DBS em ensaios de PCR quantitativa *multiplex* para múltiplos elementos ergogênicos podem ser abordadas.

Por fim, o método de confirmação por eletroforese em gel de agarose, como recomendado pela AMA/WADA, se mostra problemático para cenários de baixo número de cópias do transgene, a situação esperada como normalidade dentro do controle de dopagem. Assim, torna-se imprescindível avaliar a possibilidade de substituição do mesmo por outras técnicas mais sensíveis, tal qual, por exemplo, a dPCR, em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

ARTIOLI, G. G.; HIRATA, R. D. C.; LANCHI, A. H. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, p. 349–354, set. 2007.

BAOUTINA, A. et al. Synthetic certified DNA reference material for analysis of human erythropoietin transgene and transcript in gene doping and gene therapy. **Gene Therapy**, v. 23, n. 10, p. 708–717, 1 out. 2016.

BARROSO, F. P. M.; TRISTÃO, T. C. **ERITROPOETINA: ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E O USO PARA FINS ESPORTIVOS**. [s.l: s.n.].

BISCAIA, C.; NOBREGA, C. **Terapia gênica: sistemas de entrega, mecanismos moleculares e abordagens terapêuticas aprovadas**. [s.l: s.n.].

BUSTIN, S. 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, 1 abr. 2009.

CRUZ, F. B. C. P. **Desenvolvimento de protocolo de PCR em Tempo Real para monitoramento da carga viral de CMV em pacientes pós-transplante renal**. [s.l: s.n.].

FISHER SCIENTIFIC, T. **Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers**. [s.l: s.n.].

FISHER SCIENTIFIC, T. **Qubit® 3.0 Fluorometer Catalog Number Q33216**. [s.l: s.n.].

FISHER SCIENTIFIC, T. **Real-time PCR handbook**. [s.l: s.n.].

FREEMAN, J. D. et al. State of the Science in Dried Blood Spots. 2017.

HENRIQUE SANTANA, B. **ERITROPOETINA: FERRAMENTA PARA O DOPING**. 2017.

ISABEL WODEWOTZKY, T.; PESSOA ARAÚJO JÚNIOR, J.; CRUZ LANDIM E ALVARENGA, F. **Padronização da Técnica de PCR em tempo-real na Avaliação da Pluripotência de Células-tronco Mesenquimais Caninas**. [s.l: s.n.].

JAGTAR SINGH et al. A critical review on PCR, its types and applications | Semantic Scholar. 2014.

KHETAN, D. et al. Comparison of UV spectrometry and fluorometry-based methods for quantification of cell-free DNA in red cell components. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 13, n. 2, p. 95–99, 1 jul. 2019.

LÓPEZ, S. et al. Gene doping and genomic science in sports: Where are we? **Bioanalysis**, v. 12, n. 11, p. 801–811, 1 jun. 2020.

LUGINBÜHL, M.; GAUGLER, S. Dried blood spots for anti-doping: Why just going volumetric may not be sufficient. **Drug Testing and Analysis**, v. 13, n. 1, p. 69–73, 1 jan. 2021.

MARCHAND, A. et al. EPO transgene detection in dried blood spots for antidoping application. **Drug Testing and Analysis**, v. 13, n. 11–12, p. 1888–1896, 1 nov. 2021.

MÜLLER, R. K. History of Doping and Doping Control. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 195, p. 1–23, 2010.

PEREIRA DOS SANTOS, M. A. et al. Antidoping Control in Brazil: History, Current Situation, and Prospects for the 2014 World Cup and the 2016 Olympic Games. <https://doi.org/10.3109/10826084.2014.914319>, v. 49, n. 9, p. 1152–1155, 2014.

PRADO, N. V. N. DO. **Doping genético no esporte: Uma revisão de literatura**. Disponível em: <<https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/53197>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

RAHMAN, M. T. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. **Anwer Khan Modern Medical College Journal**, v. 4, n. 1, p. 30–36, 6 fev. 2013.

SANTOS, A. M.; BAHRKE, M. S. Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD). <http://dx.doi.org/10.3109/10826084.2014.937622>, v. 49, n. 13, p. 1844–1847, 10 nov. 2014.

SIDSTEDT, M. et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 10, p. 2569–2583, 1 abr. 2018.

SOLHEIM, S. A. et al. No pain, just gain: Painless, easy, and fast dried blood spot collection from fingertip and upper arm in doping control. **Drug Testing and Analysis**, v. 13, n. 10, p. 1783–1790, 1 out. 2021.

VIANNA, C. et al. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Semiárido Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015.

WADA. **International Standard Laboratories**. [s.l: s.n.].

ZHU, H. et al. PCR past, present and future. **BioTechniques**, v. 69, n. 4, p. 317–325, 1 out. 2020.

APÊNDICE

Resultados individuais de rendimento de extração de DNA

Matriz	Amostra	Condição (ng/ μ L)			
		TA/1 DIA	-30/1 DIA	TA/21 DIAS	-30/21 DIAS
NUCLEIC-CARD™	Homem 1	1,06	1,80	0,127	2,09
	Homem 2	1,32	0,97	0,185	2,24
	Homem 3	0,73	0,78	0,218	0,51
	Mulher 1	0,41	2,21	0,351	0,12
	Mulher 2	2,04	0,75	0,525	2,50
	Mulher 3	1,14	1,52	0,115	0,21
	Controle	2,36	3,02	0,080	1,62
Whatman	Homem 1	1,14	0,903	0,188	1,560
	Homem 2	1,08	1,71	0,142	2,240
	Homem 3	2,69	1,34	0,510	2,010
	Mulher 1	2,20	1,73	0,167	0,110
	Mulher 2	0,96	2,04	0,151	0,090
	Mulher 3	1,63	0,87	0,240	0,207
	Controle	1,14	1,58	0,241	0,398
Organic Coat	Homem 1	0,61	0,855	0,062	0,406
	Homem 2	1,13	1,52	0,157	1,40
	Homem 3	1,31	1,60	0,301	0,476
	Mulher 1	0,78	1,65	0,110	1,24
	Mulher 2	1,01	0,59	0,090	1,11
	Mulher 3	0,81	1,30	0,207	0,432
	Controle	0,27	0,825	0,398	0,798

Resultados individuais de pureza de extração de DNA

Matriz	Amostra	Condição (A280/260)			
		TA/1 DIA	-30/1 DIA	TA/21 DIAS	-30/21 DIAS
NUCLEIC-CARD™	Homem 1	1,81	1,25	1,74	1,52
	Homem 2	1,88	2,23	2,75	2,03
	Homem 3	1,78	1,73	1,62	2,38
	Mulher 1	1,55	1,90	1,52	1,38
	Mulher 2	1,51	1,90	1,72	2,01
	Mulher 3	1,52	1,61	1,35	1,58
	Controle	1,52	1,77	1,34	1,70
Whatman	Homem 1	2,37	2,27	1,67	1,53
	Homem 2	2,02	2,03	2,00	1,95
	Homem 3	2,02	2,14	1,86	1,89
	Mulher 1	2,13	1,82	1,55	1,53
	Mulher 2	2,13	1,82	1,54	1,71
	Mulher 3	1,65	1,64	1,42	1,70
	Controle	1,66	1,85	1,87	1,38
Organic Coat	Homem 1	1,88	1,47	1,64	1,63
	Homem 2	2,23	3,02	1,67	1,67
	Homem 3	2,54	1,95	1,80	1,57
	Mulher 1	2,58	2,26	1,66	2,13
	Mulher 2	2,26	2,58	1,61	1,21
	Mulher 3	1,21	1,74	1,40	1,35
	Controle	2,18	1,62	1,41	1,42

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 2 - NUCLEIC-CARD™,

Condição	Amostra	Amplificação (Ct)			Condição	Amostra	Amplificação (Ct)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			Rep 1	Rep 2	Rep 3
TA/1 DIA	Homem 1	28,620	28,740	28,901	TA/21 DIAS	Homem 1	29,543	29,443	29,945
	Homem 2	28,250	28,643	28,266		Homem 2	33,312	33,407	32,598
	Homem 3	29,159	29,136	28,980		Homem 3	29,463	29,332	29,504
	Mulher 1	29,409	29,669	29,304		Mulher 1	32,805	33,053	33,000
	Mulher 2	27,786	27,936	27,746		Mulher 2	31,205	31,479	30,501
	Mulher 3	29,481	29,119	29,275		Mulher 3	34,337	34,141	34,704
	Controle	28,739	28,930	28,721		Controle	34,625	34,109	34,061
-30/1 DIA	Homem 1	28,389	28,292	28,274	-30/21 DIAS	Homem 1	28,440	28,381	28,717
	Homem 2	29,480	29,800	29,375		Homem 2	28,677	28,594	28,918
	Homem 3	30,041	30,024	29,710		Homem 3	31,350	31,146	31,395
	Mulher 1	28,063	28,331	28,429		Mulher 1	29,649	29,234	29,332
	Mulher 2	28,943	28,257	28,524		Mulher 2	28,410	28,401	28,372
	Mulher 3	28,165	28,387	28,221		Mulher 3	29,154	29,229	29,108
	Controle	28,150	28,084	27,936		Controle	29,380	30,827	29,198
NTC		NOAMP	NOAMP	NOAMP					
PTC		27,059	26,866	26,865					

Legenda: NO AMP = Sem sinal de amplificação; resultado em vermelho = abaixo do Limite de Detecção.

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 2 - Whatman

Condição	Amostra	Amplificação (Ct)			Condição	Amostra	Amplificação (Ct)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			Rep 1	Rep 2	Rep 3
TA/1 DIA	Homem 1	28,771	28,487	28,652	TA/21 DIAS	Homem 1	32,54	32,509	32,103
	Homem 2	29,697	29,406	29,539		Homem 2	29,448	29,421	29,477
	Homem 3	28,081	28,068	28,8		Homem 3	31,418	30,943	31,256
	Mulher 1	27,77	28,075	27,424		Mulher 1	29,52	29,556	29,389
	Mulher 2	28,124	28,426	28,221		Mulher 2	32,857	33,115	33,614
	Mulher 3	28,966	28,843	28,945		Mulher 3	30,114	30,301	30,145
	Controle	29,319	29,517	29,32		Controle	32,417	32,202	32,679
-30/1 DIA	Homem 1	28,628	28,436	28,629	-30/21 DIAS	Homem 1	29,22	29,017	29,003
	Homem 2	29,024	28,985	28,922		Homem 2	27,662	27,372	27,861
	Homem 3	29,074	29,06	29,121		Homem 3	27,988	27,76	27,865
	Mulher 1	28,067	28,425	28,399		Mulher 1	28,249	28,332	28,166
	Mulher 2	27,772	27,827	28,311		Mulher 2	28,923	28,77	28,6
	Mulher 3	29,864	29,69	29,764		Mulher 3	27,881	27,774	27,75
	Controle	28,992	28,868	28,856		Controle	29,901	29,819	29,548
NTC		NOAMP	NOAMP	NOAMP					
PTC		26,745	26,539	26,83					

Legenda: NO AMP = Sem sinal de amplificação; resultado em vermelho = abaixo do Limite de Detecção.

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 2 – Blood Swab Organicoat

Condição	Amostra	Amplificação (Ct)			Condição	Amostra	Amplificação (Ct)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			Rep 1	Rep 2	Rep 3
TA/1 DIA	Homem 1	30,35	30,053	30,217	TA/21 DIAS	Homem 1	29,576	29,822	29,71
	Homem 2	29,628	29,587	29,735		Homem 2	30,132	30,373	29,931
	Homem 3	28,407	28,724	28,906		Homem 3	31,635	31,039	31,346
	Mulher 1	29,948	29,69	29,691		Mulher 1	35,578	35,695	36,637
	Mulher 2	29,633	29,593	29,432		Mulher 2	35,726	36,033	35,109
	Mulher 3	28,574	28,758	28,699		Mulher 3	33,844	28,818	31,371
	Controle	32,172	32,213	32,024		Controle	31,293	31,589	31,285
-30/1 DIA	Homem 1	30,186	29,939	29,908	-30/21 DIAS	Homem 1	28,573	31,282	31,213
	Homem 2	28,782	28,888	28,786		Homem 2	28,819	28,706	28,982
	Homem 3	27,831	28,445	27,706		Homem 3	30,752	30,656	30,994
	Mulher 1	28,964	27,515	28,728		Mulher 1	28,492	28,913	28,215
	Mulher 2	28,888	28,695	28,772		Mulher 2	29,647	29,732	29,458
	Mulher 3	28,803	28,636	28,77		Mulher 3	31,39	31,281	31,049
	Controle	29,82	29,992	29,989		Controle	30,483	30,324	30,506
NTC		38,361	NOAMP	NOAMP					
PTC		27,052	26,075	26,835					

Legenda: NO AMP = Sem sinal de amplificação; resultado em vermelho = abaixo do Limite de Detecção.

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 4 - NUCLEIC-CARD™,

Condição	Amostra	Amplificação (Ct)			Condição	Amostra	Amplificação (Ct)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			Rep 1	Rep 2	Rep 3
TA/1 DIA	Homem 1	31,165	31,264	31,213	TA/21 DIAS	Homem 1	30,637	30,71	31,001
	Homem 2	30,91	30,704	31,037		Homem 2	NOAMP	NOAMP	NOAMP
	Homem 3	30,623	31,141	30,598		Homem 3	30,691	30,769	30,614
	Mulher 1	30,93	30,908	31,045		Mulher 1	NOAMP	45,178	NOAMP
	Mulher 2	30,724	30,946	30,572		Mulher 2	32,723	33,706	34,627
	Mulher 3	NOAMP	46,923	48,837		Mulher 3	NOAMP	NOAMP	NOAMP
	Controle	42,488	NOAMP	NOAMP		Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP
-30/1 DIA	Homem 1	30,671	30,452	30,854	-30/21 DIAS	Homem 1	49	45,458	NOAMP
	Homem 2	NOAMP	NOAMP	47,369		Homem 2	NOAMP	NOAMP	NOAMP
	Homem 3	41,494	30,691	NOAMP		Homem 3	30,614	NOAMP	NOAMP
	Mulher 1	30,745	30,786	30,757		Mulher 1	30,168	31,336	30,903
	Mulher 2	30,629	30,474	30,352		Mulher 2	44,742	NOAMP	33,934
	Mulher 3	31,047	31,075	30,919		Mulher 3	30,219	30,211	30,917
	Controle	NOAMP	39,045	43,212		Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP
NTC		NOAMP	NOAMP	NOAMP					
PTC		27,772	27,981	27,802					

Legenda: NO AMP = Sem sinal de amplificação; resultado em vermelho = abaixo do Limite de Detecção.

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 4 - Whatman

Condição	Amostra	Amplificação (Ct)			Condição	Amostra	Amplificação (Ct)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			Rep 1	Rep 2	Rep 3
TA/1 DIA	Homem 1	31,711	31,884	32,073	TA/21 DIAS	Homem 1	NOAMP	NOAMP	NOAMP
	Homem 2	NOAMP	NOAMP	NOAMP		Homem 2	31,434	31,618	31,552
	Homem 3	33,929	31,744	30,938		Homem 3	29,092	NOAMP	33,474
	Mulher 1	30,862	31,267	31,132		Mulher 1	31,265	31,116	30,808
	Mulher 2	31,248	31,342	31,41		Mulher 2	31,368	30,743	31,537
	Mulher 3	48,972	NOAMP	40,561		Mulher 3	32,213	32,207	32,283
	Controle	47,188	NOAMP	42,089		Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP
-30/1 DIA	Homem 1	31,369	31,244	31,435	-30/21 DIAS	Homem 1	NOAMP	34,158	32,169
	Homem 2	NOAMP	NOAMP	43,164		Homem 2	31,533	31,661	31,096
	Homem 3	36,995	35,222	36,093		Homem 3	31,336	31,33	31,395
	Mulher 1	32,009	32,758	31,81		Mulher 1	31,471	31,15	31,209
	Mulher 2	31,761	31,44	31,301		Mulher 2	NOAMP	42,669	NOAMP
	Mulher 3	NOAMP	NOAMP	NOAMP		Mulher 3	31,695	31,242	31,514
	Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP		Controle	NOAMP	43,815	NOAMP
NTC		NOAMP	NOAMP	NOAMP					
PTC		28,862	29,414	28,856					

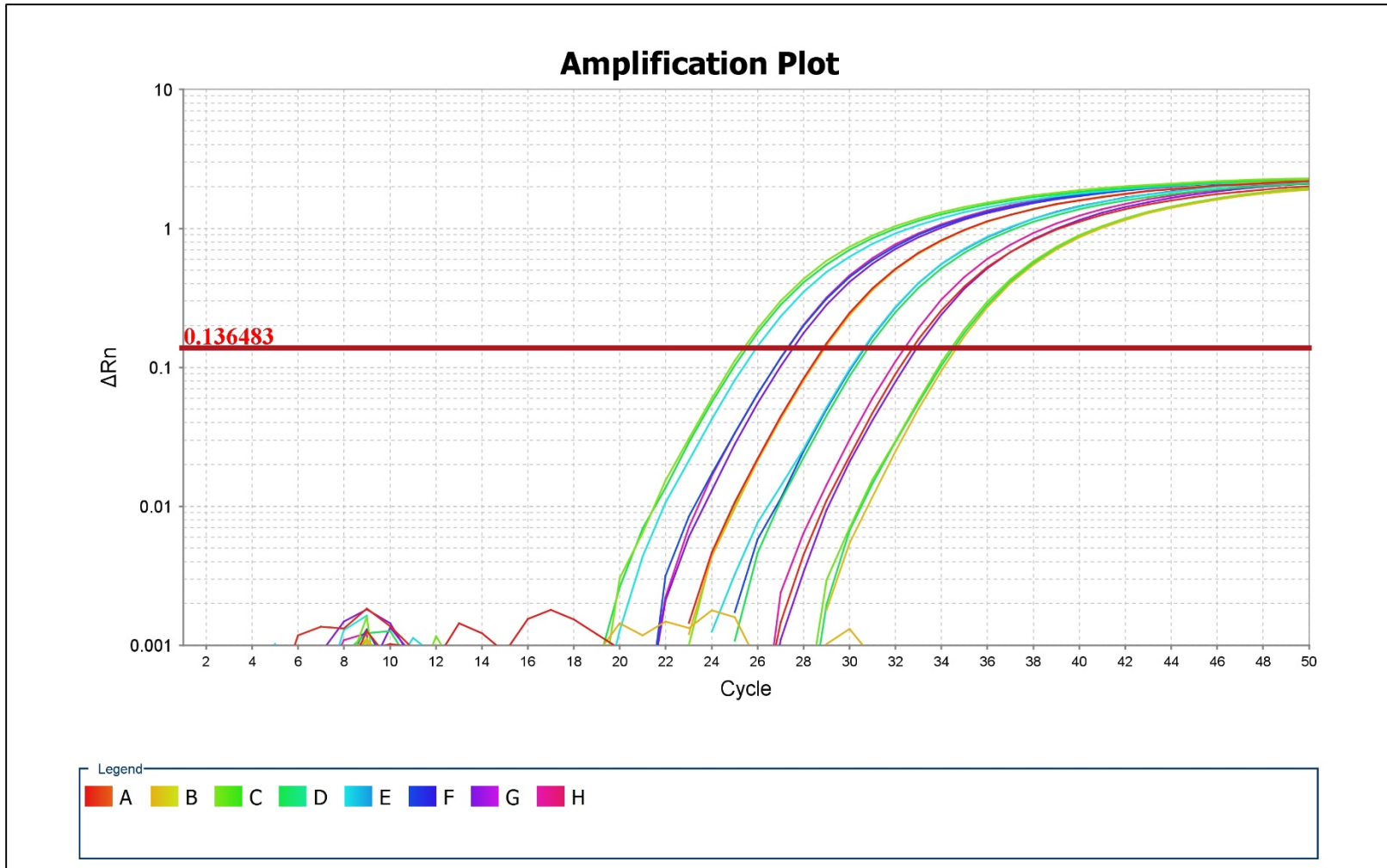
Legenda: NO AMP = Sem sinal de amplificação; resultado em negrito = abaixo do Limite de Quantificação; resultado em vermelho = abaixo do Limite de Identificação.

Resultados individuais de amplificação das amostras com ensaio Sigma 4 – Blood Swab Organicoat

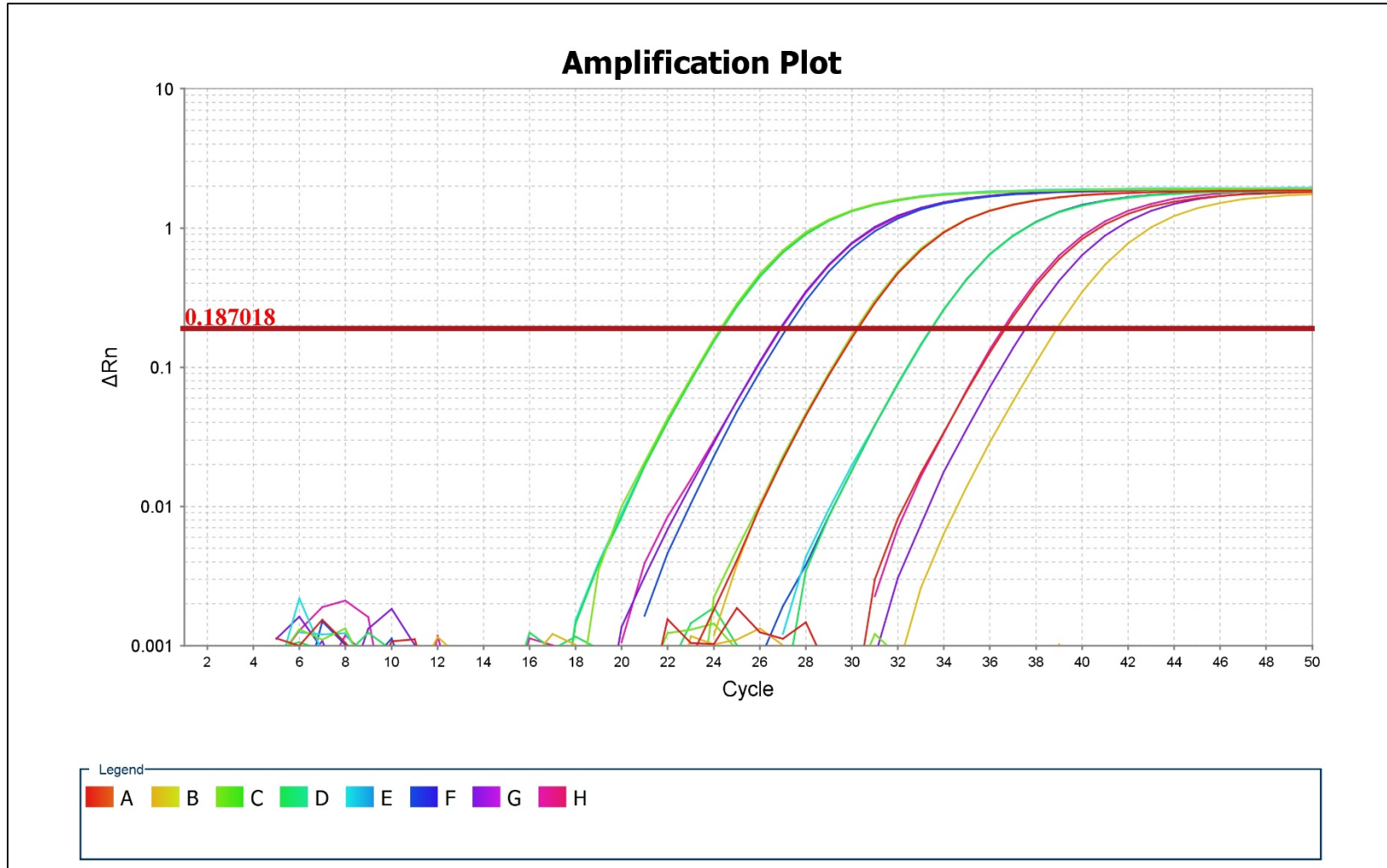
Condição	Amostra	Amplificação (Ct)			Condição	Amostra	Amplificação (Ct)		
		Rep 1	Rep 2	Rep 3			Rep 1	Rep 2	Rep 3
TA/1 DIA	Homem 1	30,436	36,314	33,839	TA/21 DIAS	Homem 1	30,734	30,862	30,553
	Homem 2	48,148	NOAMP	NOAMP		Homem 2	31,848	31,333	31,400
	Homem 3	29,911	30,468	30,823		Homem 3	33,053	33,269	33,183
	Mulher 1	38,349	40,561	36,632		Mulher 1	NOAMP	NOAMP	NOAMP
	Mulher 2	40,637	NOAMP	NOAMP		Mulher 2	NOAMP	NOAMP	NOAMP
	Mulher 3	30,920	30,643	30,773		Mulher 3	30,046	29,943	29,985
	Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP		Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP
-30/1 DIA	Homem 1	42,810	39,740	NOAMP	-30/21 DIAS	Homem 1	NOAMP	29,708	35,219
	Homem 2	NOAMP	48,285	NOAMP		Homem 2	43,283	NOAMP	43,512
	Homem 3	30,711	30,647	30,730		Homem 3	NOAMP	NOAMP	45,505
	Mulher 1	NOAMP	NOAMP	NOAMP		Mulher 1	30,971	31,264	33,017
	Mulher 2	30,888	30,970	30,890		Mulher 2	42,676	40,676	NOAMP
	Mulher 3	31,970	32,320	31,587		Mulher 3	NOAMP	42,458	NOAMP
	Controle	NOAMP	43,372	NOAMP		Controle	NOAMP	NOAMP	NOAMP
NTC		NOAMP	NOAMP	NOAMP					
PTC		28,528	27,972	27,862					

Legenda: NO AMP = Sem sinal de amplificação; resultado em negrito = abaixo do Limite de Quantificação; resultado em vermelho = abaixo do Limite de Identificação.

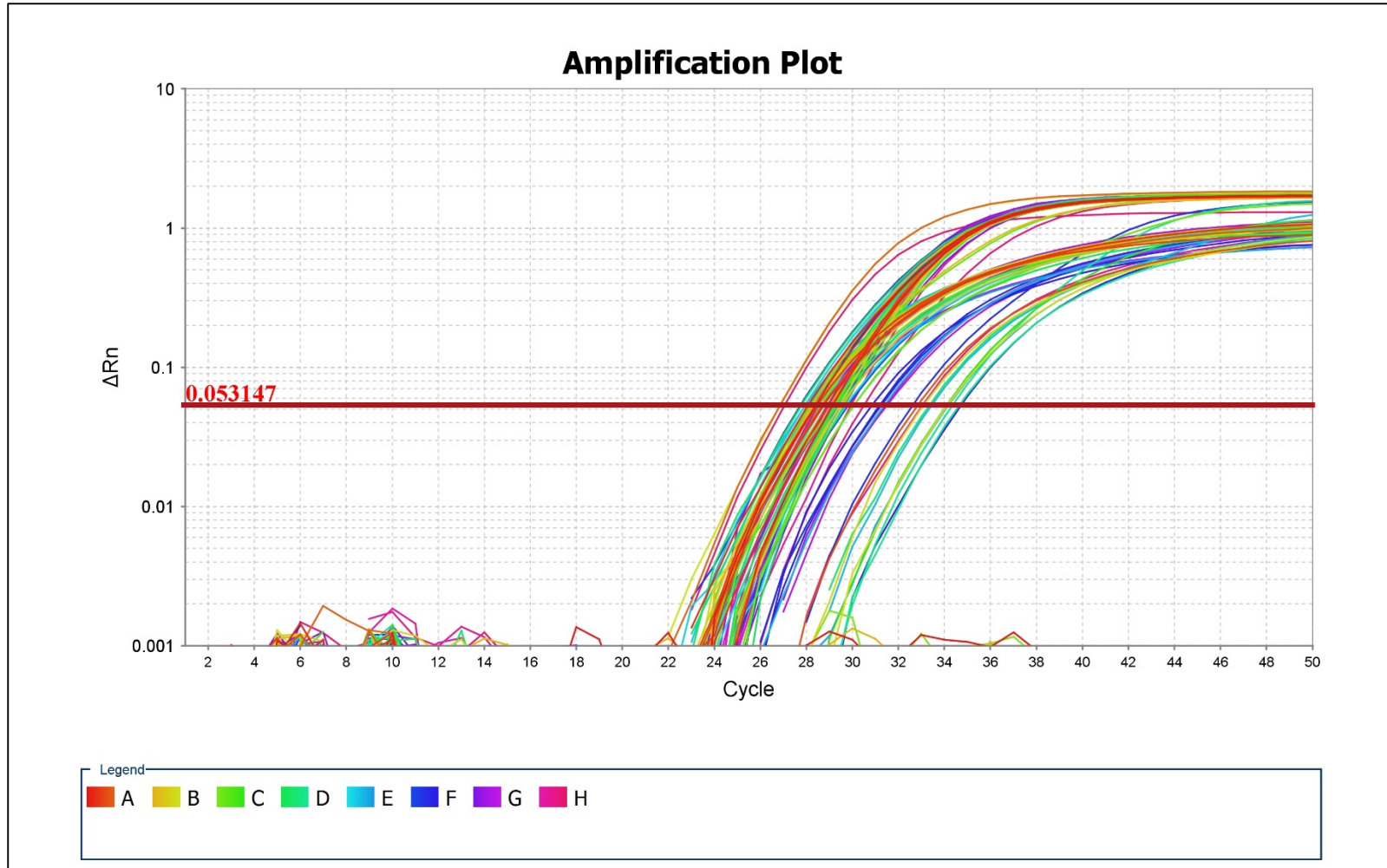
Perfil de fluorescência – Curva padrão ensaio Sigma 2



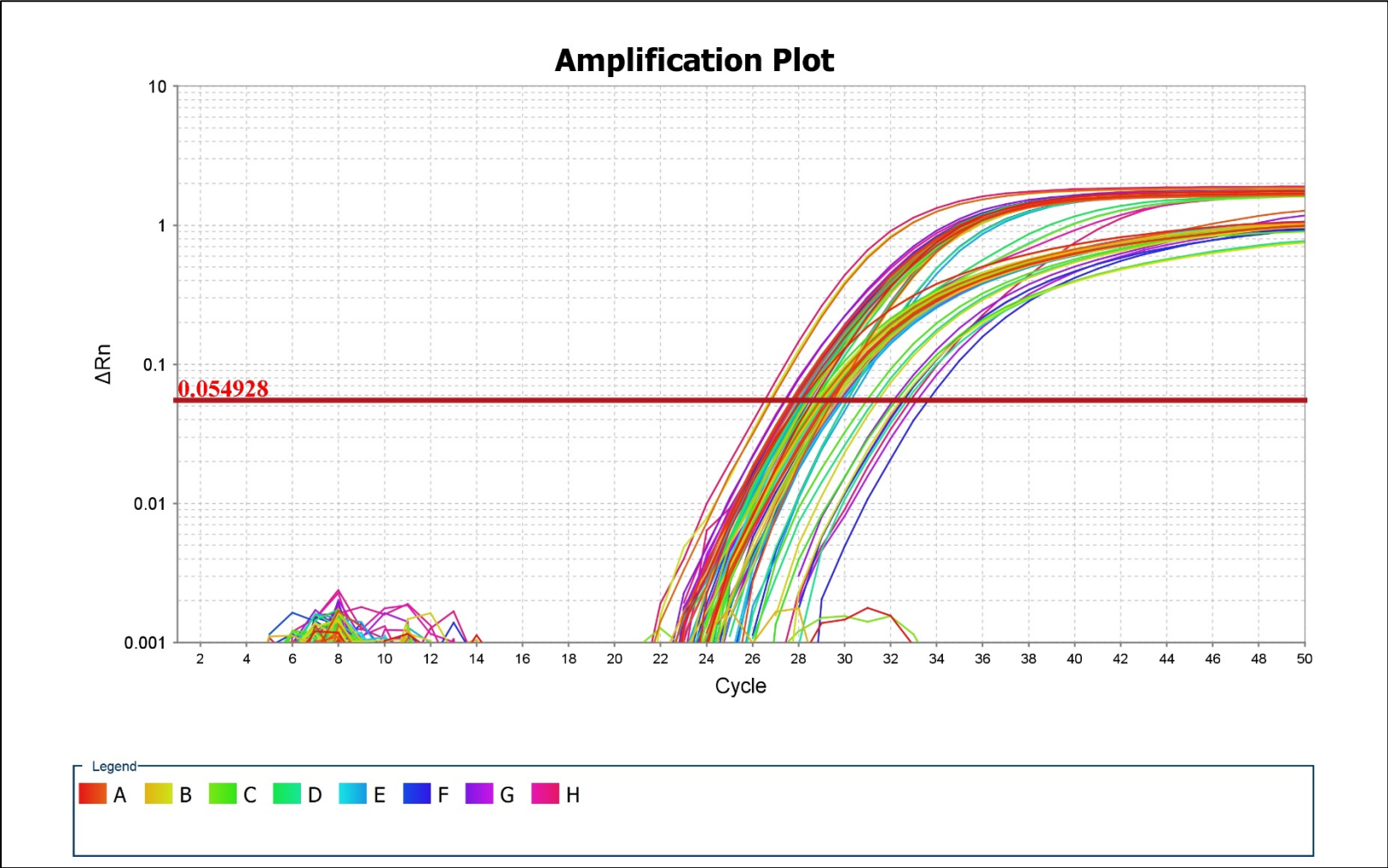
Perfil de fluorescência – Curva padrão ensaio Sigma 4



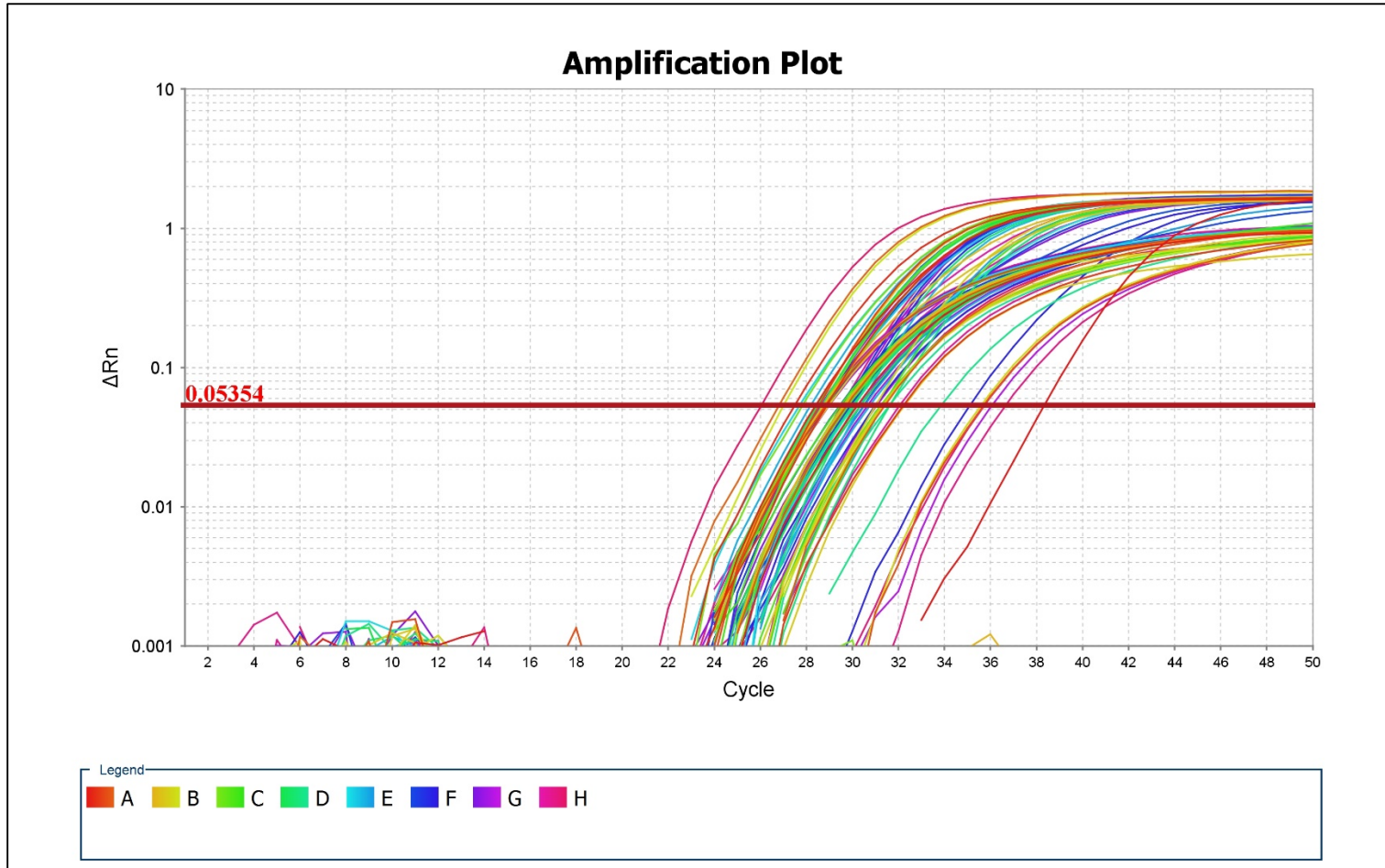
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 2 – NUCLEIC-CARD™



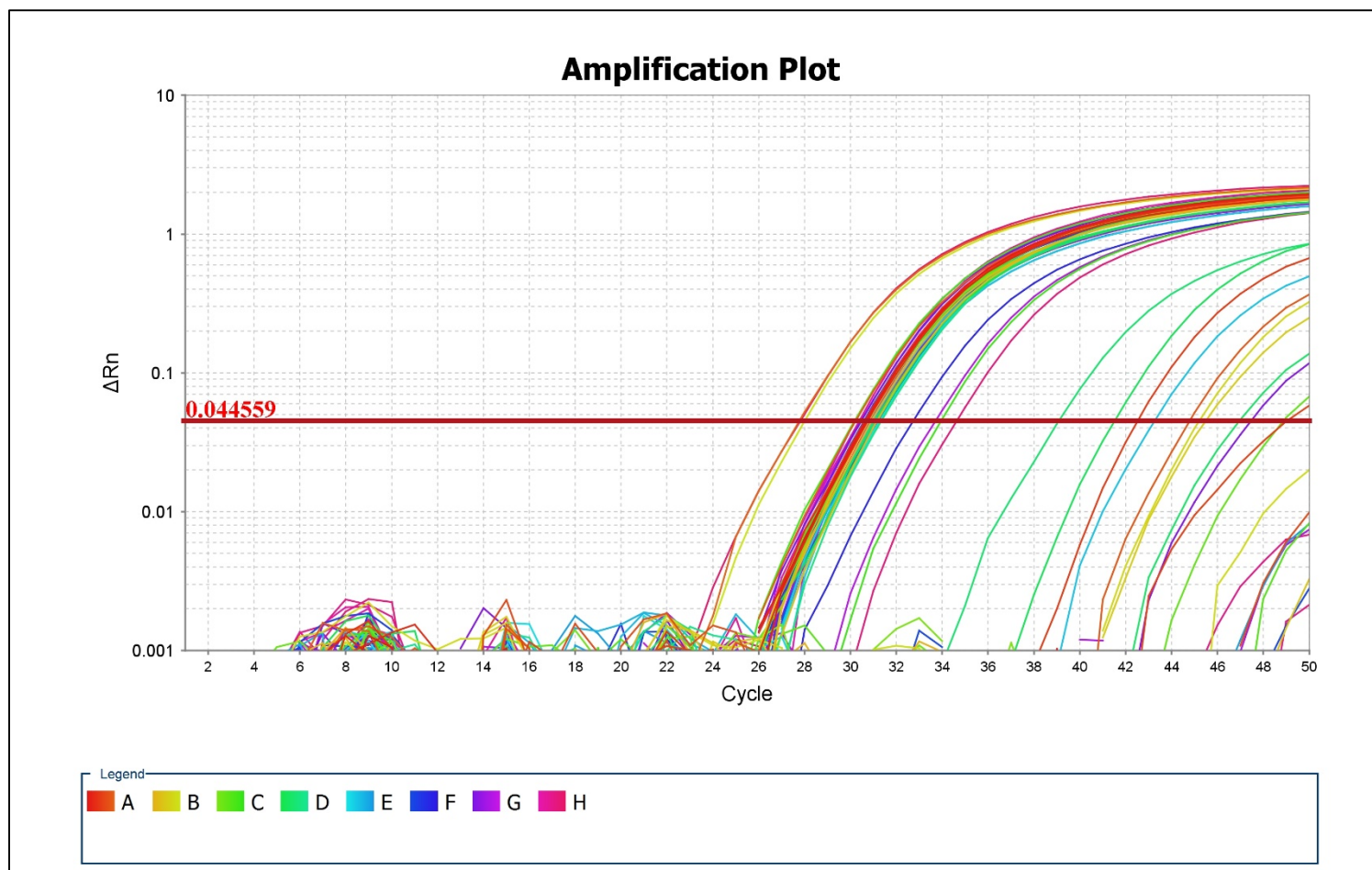
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 2 – Whatman



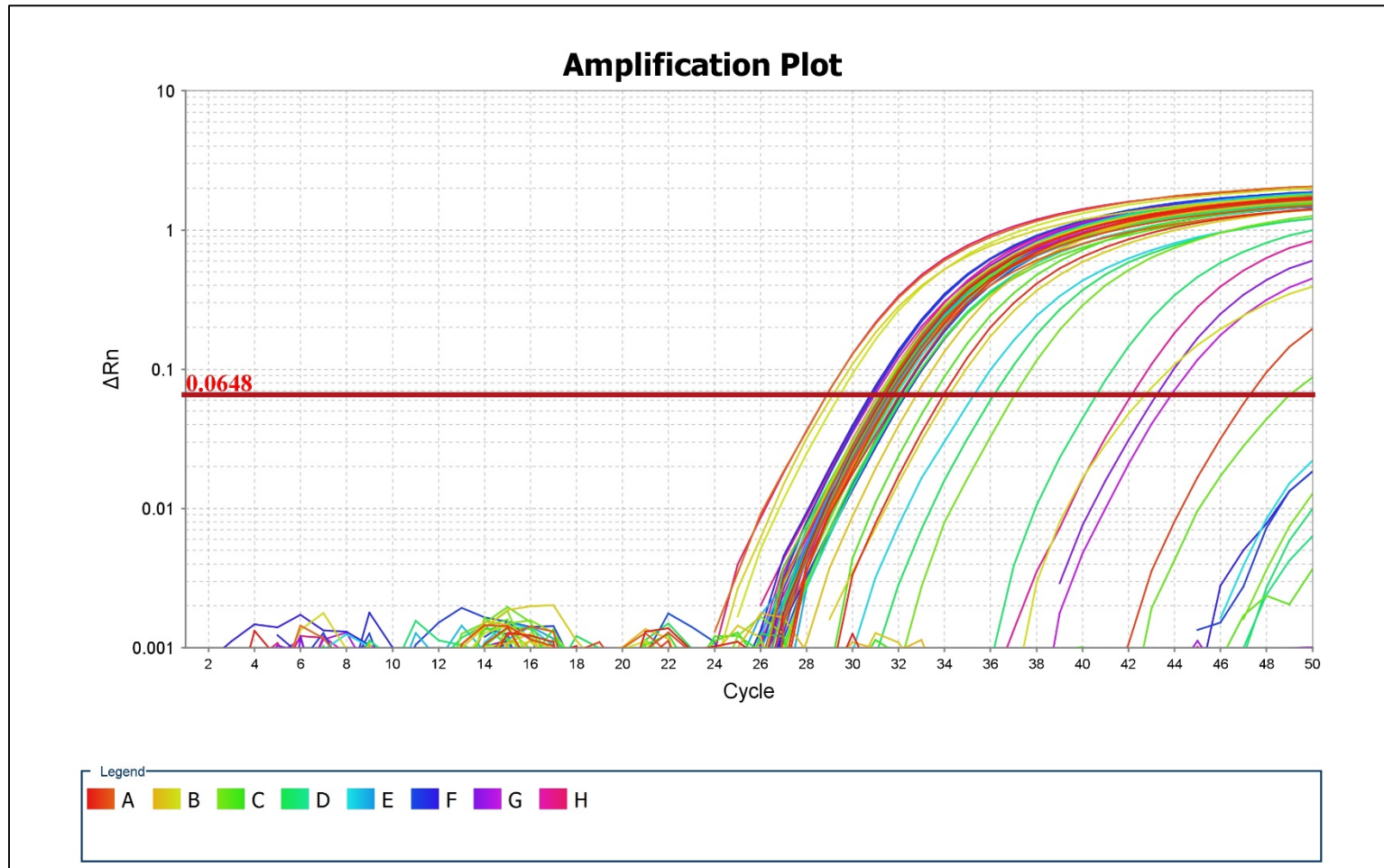
Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 2 – Blood Swab Organicoat



Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 4 – NUCLEIC-CARD™



Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 4 – Whatman



Perfil de fluorescência – Ensaio Sigma 4 – Blood Swab Organicoat

