

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
MEDICINA VETERINÁRIA

Eduarda Laís Munari

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NAS ÁREAS DE
IMUNOBIOLOGIA, MICROBIOLOGIA, BIOLOGIA CELULAR e BIOLOGIA
MOLECULAR**

Curitibanos

2021

Eduarda Laís Munari

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NAS ÁREAS DE
IMUNOBIOLOGIA, MICROBIOLOGIA, BIOLOGIA CELULAR e BIOLOGIA
MOLECULAR**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Médica Veterinária.
Orientador: Prof. DSc. Álvaro Menin

Curitibanos

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lais Munari, Eduarda
RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NAS ÁREAS DE
IMUNOBIOLOGIA, MICROBIOLOGIA, BIOLOGIA CELULAR e BIOLOGIA
MOLECULAR / Eduarda Lais Munari ; orientador, Álvaro
Menin, 2021.
40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. I. Menin, Álvaro . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

Eduarda Laís Munari

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NAS ÁREAS DE
IMUNOBIOLOGIA, MICROBIOLOGIA, BIOLOGIA CELULAR e BIOLOGIA
MOLECULAR**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Médica Veterinária

Curitiba, 18 de Maio de 2021.

Prof. Dr. Malcon Andrei Martinez Pereira
Coordenador do Curso
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Álvaro Menin, DSc.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Aline Félix Schneider Bedin
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a. Carolina Reck
Avaliadora
VERTÁ, Instituto de Pesquisa e Diagnóstico

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas de bom coração que contribuíram para a minha formação, em especial ao Cadu e Sodom que despertaram em mim a vontade de seguir nesta profissão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela vida maravilhosa, pelos familiares, pelos amigos e por todas as dificuldades que enfrentei até chegar aqui. Segundamente gostaria de agradecer a minha família por todas as oportunidades e incentivos, em especial a minha mãe e ao meu padrasto que não mediram esforços para me incentivarem a correr sempre atrás dos meus objetivos, obrigada por nunca duvidarem de mim e da minha capacidade. Vocês mais do que ninguém, acreditaram em mim e no meu potencial.

Ao meu companheiro de longa data, o Bruno, que esteve ao meu lado durante a graduação inteira. Mesmo com a distância desses últimos dois anos, você sempre esteve presente dando apoio e me fazendo rir. Obrigada por tudo! Principalmente por cuidar tão bem de mim e dos nossos cães (Cadu e Sodom), que agora devem estar morrendo de saudades de nós dois.

Aos professores da Universidade Federal de Santa Catarina por todo o conhecimento compartilhado e tempo de qualidade investidos em nós alunos de graduação, serei eternamente grata por tanto. Em especial a professora Evelyn Winter que me orientou por dois anos na iniciação científica e hoje é responsável pela minha tendência a pesquisar, fazer experimentos, estudar técnicas e a organização, obrigada de coração. Ao professor Álvaro Menin que topou me orientar nessa fase final e me mostrou o Laboratório de Imunobiologia (LIDI), do qual eu sou extremamente apaixonada. Obrigada professor! Por ter imaginado para mim o melhor futuro que eu poderia ter. Vou levar os seus ensinamentos e falas sempre no meu coração.

Ao pessoal do LIDI: Yonne, Aline, Fabi, Juliano, Sérgio, Natana, Nika, Bianca, Carol, Mendes, Greicy, Luci, Dina e o Filho. Aos professores André Báfica e Daniel Mansur. Não consigo descrever o quanto sou grata por tudo que me ensinaram, por todas as conversas e puxões de orelha. Vocês são incríveis, admiro todos! Nunca vi tanto sentido como agora na frase dita por Isaac Newton “Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Agradeço em especial a Ruth, minha musa inspiradora, rainha do Nilo, diva de todos os oceanos. Foi o ser humano mais incrível que conheci nesse tempo inteiro de estágio, sinto que a nossa ligação ultrapassa essa vida. Com toda a paciência do mundo, me ensinou tudo do zero e apostou em mim todas as fichas. Pode ter certeza que para sempre vou ser uma “Ruthiêti” que volta o volume das pipetas, que lava a louça que sujou, deixa tudo organizado e que expressa e purifica uma proteína como ninguém. Já sinto falta de você antes mesmo de partir.

As minhas melhores amigas, Gi e Fer, duas mulheres maravilhosas que completaram a minha vida. Vou guardar vocês para sempre dentro do meu coração. Eu poderia escrever aqui

um TCC inteiro falando só como não amar vocês. Obrigada por todo companheirismo e brigas! Sentirei falta dos nossos sofrimentos, desabafos, apuros e brincadeiras, sem vocês com toda certeza esse caminho não teria tanto sentido. Já imagino o futuro de vocês e sei que serão incríveis profissionais.

Ao eterno Clube do Pi, composto nada mais nada menos que Jean, Arthur, Alex e Vini (além de mim, da Fer e Gi). Vocês são chatos, teimosos, preguiçosos, mas eu sinto um amor imenso por vocês. Mesmo que agora vocês ignorem mais que antes, mas sou muito grata pela nossa amizade. Da faculdade para vida, independente do lugar que cada um esteja.

A minha *roommate* Maria Cláudia (Mah), que me fez rir todos os dias com suas histórias, dancinhas e comidas gostosas cheias de tempero (segundo ela é para dar um *tasty*). Obrigada por me fazer tão feliz!

A todas as outras pessoas que eu não mencionei, aos amigos que fiz a curto prazo e as amizades que acabei perdendo ao longo da graduação. Tenho certeza que levarei um pouco de vocês dentro do meu coração.

E por último e não menos importante Cadu e Sodom, dos quais são responsáveis pela minha mudança súbita de profissão, obrigada por despertarem em mim a vontade de ser uma futura Médica Veterinária.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha, não nos vemos se não saímos de nós”.

(SARAMAGO, 1998)

RESUMO

O presente relatório teve como objetivo descrever algumas das atividades mais importantes desenvolvidas durante o período de estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária, realizado durante o período de 25 de janeiro a 26 de abril de 2021, sob supervisão do Professor Doutor André Báfica e orientação do Professor Doutor Álvaro Menin. Como local de estágio optou-se pelo Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) na cidade de Florianópolis, Santa Catarina (SC), onde foi possível desenvolver experimentos nas áreas de expressão heteróloga em sistema bacteriano, quantificação de proteínas pelo método BCA, cultivo celular e preparação de meios de cultura.

Palavras-chave: DNA recombinante. Plasmídeo. Proteínas.

ABSTRACT

The purpose of this report was to describe some of the most important activities developed during the period of compulsory internship in Veterinary Medicine, carried out during the period from January 25 to April 26, 2021, under the supervision of Professor Doctor André Báfica and guidance from Professor Doctor Álvaro Menin. As an internship location, the Immunobiology Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (UFSC) was chosen in the city of Florianópolis, Santa Catarina (SC), where it was possible to develop experiments in the areas of heterologous expression in a bacterial system, quantification of proteins by the method BCA, cell culture and preparation of culture media.

Keywords: Recombinant DNA. Plasmid. Proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fachada do prédio Fritz Muller (Prédio do departamento MIP).....	17
Figura 2. Laboratório de Imunobiologia (LIDI).....	18
Figura 3. Google Calender do Laboratório de Imunobiologia	20
Figura 4. Representação esquemática da técnica do DNA recombinante	21
Figura 5. Fluxograma das práticas relacionadas a produção e expressão de proteínas	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 6. Mapa dos vetores de expressão pET21a (a) e pET28a (b).....	23
Figura 7. Representação esquemática da ação do Ca^{2+} na membrana celular de <i>E. coli</i>	25
Figura 8. Representação esquemática da técnica de transferência bacteriana.....	26
Figura 9. Representação esquemática PCR	29
Figura 10. Fotos representativas de um experimento com eletroforese SDS-PAGE 15%	30
Figura 11. Fotos representativas de um experimento de eletroforese em gel de agarose 0,8%	31
Figura 12. Representação esquemáticas das principais etapas da metodologia de <i>Western Blot</i>	32
Figura 13. Redução do Cu^{2+} e reação com BCA formando complexo roxo-azulado.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Iniciadores utilizados para amplificação do gene Rv1419	29
Quadro 2 – Composição dos meios de cultura utilizados nas práticas de expressão heteróloga em sistema bacteriano.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resistência aos antibióticos das células bacterianas de clonagem e expressão.....	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BCA – Ácido Bicinconínico
- BSA – Albumina do Soro Bovino
- Ca – Cálcio
- CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
- CCB – Centro de Ciências Biológicas
- Cu – Cobre
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNTPs – Deoxinucleotídeos
- DO – Densidade Ótica
- DTI – Desenvolvimento Tecnológico e Industrial
- FBS – Soro Fetal Bovino
- HRP - Enzima Peroxidase de Rábano Silvestre
- IC – Iniciação Científica
- IPTG – Isopropil β-d-1-Tiogalactopiranósido
- kDa – Quilodalton
- LB - Luria Bertani
- LIDI – Laboratório de Imunobiologia
- MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
- MIP – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
- Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*
- N-CoV – Proteína Nucleocapsídica do SARS-CoV-2
- nm – Nanómetro
- pb – Pares de Bases
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- pET – do inglês, *plasmid for expression by T7 RNA polimerase*
- POPs – Procedimentos Operacionais Padrões
- RPM – Rotações Por Minuto
- SARS-CoV-2 – Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
- SC – Santa Catarina
- SDS-PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio
- sMTL-13 – Lectina secretada de *Mycobacterium tuberculosis* de 13 kDa

TB – Terrific Broth

TBST - Solução Salina Tamponada com Tris e Tween 20 a 0,1%

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

WB – *Western Blot*

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO	17
3.1	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	17
3.2	FUNCIONAMENTO DO LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA (LIDI)	19
3.3	GRUPO DE PESQUISA	20
3.4	EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA BACTERIANO.....	20
3.4.1	Atividades Desenvolvidas.....	22
3.4.1.1	<i>Fluxograma de expressão heteróloga em sistema bacteriano</i>	<i>22</i>
3.4.1.2	<i>Vetores de expressão e células hospedeiras.....</i>	<i>23</i>
3.4.1.3	<i>Bactérias Competentes</i>	<i>24</i>
3.4.1.4	<i>Transformação de Bactérias</i>	<i>25</i>
3.4.1.5	<i>Expressão De Proteínas</i>	<i>26</i>
3.4.1.6	<i>MINIPREP.....</i>	<i>27</i>
3.4.1.7	<i>PCR Convencional.....</i>	<i>28</i>
3.4.1.8	<i>Eletroforese em gel.....</i>	<i>29</i>
3.4.1.9	<i>WESTERN BLOT.....</i>	<i>31</i>
3.5	OUTRAS ATIVIDADES	33
3.5.1	Quantificação de proteínas pelo método BCA	33
3.5.2	Cultura Celular.....	34
3.5.3	Preparação de Meio.....	34
4	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa feita durante o período da graduação permite que os alunos desenvolvam um conjunto de competências, principalmente relacionadas às técnicas de pesquisa e apresentação de seus resultados. Isto significa que a pesquisa permite capacitar o discente a coletar, interpretar e apresentar informações de modo coerente e convincente, habilidades hoje consideradas imprescindíveis nas áreas científicas e profissionais. Essas aptidões, mais tarde, permitem que o aluno esteja preparado para trabalhar com mais autonomia.

Pensando nesses aspectos, a inserção de alunos de graduação através de programas como iniciação científica e a oportunidade de estágios em laboratórios de pesquisa, podem contribuir para a formação de profissionais mais qualificados. Por isso, objetivou-se durante o período de estágio, vivenciar a rotina do Laboratório de Imunobiologia (LIDI) da Universidade Federal de Santa Catarina. Com a finalidade de adquirir conhecimentos necessários para despertar uma nova mentalidade em relação à pesquisa, construir um raciocínio crítico e preparar-se para a pós-graduação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas e acompanhadas pela discente durante o período de estágio supervisionado obrigatório nas áreas de imunobiologia, microbiologia, biologia celular e biologia molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o local de estágio quanto à sua estrutura física e pessoal;
- Citar as atividades acompanhadas e desempenhadas rotineiramente;
- Descrever o princípio das técnicas experimentais mais acompanhadas durante o período de estágio;

3 DESENVOLVIMENTO DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO

3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Laboratório de Imunobiologia (LIDI) é um dos laboratórios de pesquisa pertencentes ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), *Campus* Reitor João David Ferreira Lima, Bairro Trindade, Florianópolis, SC, Brasil (Figura 1).

Figura 1. Fachada do prédio Fritz Muller (Prédio do departamento MIP)



Fonte: arquivo pessoal (2021).

O laboratório está localizado no segundo andar do MIP e é dividido em sete salas: 1) Sala de Cultura; 2) Sala *Mtb*; 3) Sala de Equipamentos; 4) Estoque; 5) Sala Geral; 6) Fluxo da sala geral 7) e Sala dos Professores (Figura 2).

Figura 2. Laboratório de Imunobiologia (LIDI). A: Corredor de acesso as salas do LIDI; B: sala de cultura; C: sala *Mtb*; D: sala de equipamentos; E e F: sala geral.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Atualmente o laboratório é coordenado pelos professores André Báfica, Daniel Mansur, Fernando Spiller e José Henrique M. Oliveira. O grupo de pesquisa dentro do laboratório é constituído por cinco pós-doutorandos, nove doutorandos, dois mestrandos, cinco alunos de iniciação científica e uma bolsista DTI.

As principais linhas de pesquisa do LIDI são: investigação dos mecanismos de interação entre células imunes inatas e patógenos de importância médica como *M. tuberculosis*, estudos envolvendo a biologia de vetores com a finalidade de diminuir a disseminação de

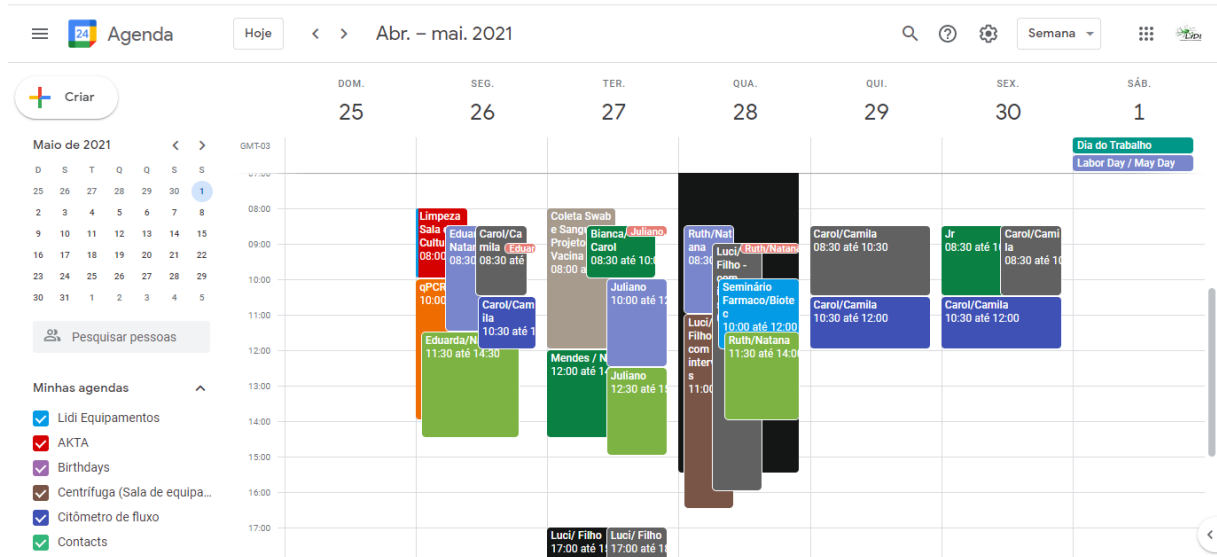
doenças como Dengue e Zika e, através dos conhecimentos da ciência básica, desenvolver vacinas, ferramentas e estratégias terapêuticas contra doenças humanas.

3.2 FUNCIONAMENTO DO LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA (LIDI)

O estágio ocorreu do período de 25 de janeiro a 26 de abril de 2021, durante esse período, foi possível acompanhar a rotina dos estudantes de pós-graduação do grupo de pesquisa do LIDI. Todas as atividades realizadas ocorreram de forma dinâmica e de acordo com a demanda de cada pesquisador, possibilitando ao estagiário a oportunidade de acompanhar práticas de pesquisa básica. As atividades desenvolvidas consistiam em acompanhar os alunos de pós-doutorado, doutorado, mestrado e em algumas ocasiões os alunos de IC, quando estes já apresentavam total domínio das técnicas e equipamentos. Toda e qualquer prática desenvolvida deveria ser previamente marcada no aplicativo Google Calender, do qual todos os integrantes do laboratório tinham acesso. Cada equipamento na agenda apresentava uma cor específica e os horários marcados deveriam ser cumpridos, para não comprometer a rotina dos demais alunos (Figura 3).

Além disso, para cada atividade ou equipamento a ser utilizado, existem Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) e manuais dos equipamentos compartilhados com todos os alunos, explicando como proceder na execução de atividades. Assim, todas as tarefas, como pesagem de produtos, preparação de meios de cultura e reagentes, eram anotadas em etiquetas com a data e nome do responsável pelo preparo, a fim de estabelecer padrões mínimos de gestão da qualidade e contribuir para a rastreabilidade dos dados. Uma vez que foi possível compreender a dinâmica e funcionamento do laboratório, foram definidos os grupos de pesquisa para o acompanhamento dos experimentos e discussão de resultados.

Figura 3. Google Calender do Laboratório de Imunobiologia. Google Calender representativo da semana do dia 25 de abril a 01 de maio de 2021. Na imagem é possível observar o nome de cada aluno, bem como o equipamento reservado com a sua respectiva cor.



Fonte: arquivo pessoal (2021).

3.3 LINHAS DE PESQUISA

Todas as práticas demonstradas neste relatório estão relacionadas a expressão de duas proteínas: a **sMTL-13** (lectina de 13 kDa secretada pelo *M. tuberculosis*) e a **N-CoV** (proteína do nucleocapsídeo do agente SARS-CoV-2). A proteína sMTL-13 é uma lectina codificado pelo gene Rv1914 de *M. tuberculosis* que demonstra potencial alvo terapêutico e de diagnóstico, devido as suas interações com o sistema imune do hospedeiro (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Em relação a proteína N-CoV, a mesma também desempenha um papel importante para a patogenicidade do vírus SARS-CoV-2 e tende a estimular a expressão de anticorpos específicos, o que também demonstra ser uma ferramenta de pesquisa para construção de testes diagnósticos (JORDÃO, 2020). Diante disso, foi possível acompanhar diversos experimentos, dos quais estão descritos mais detalhadamente na Seção 3.4.

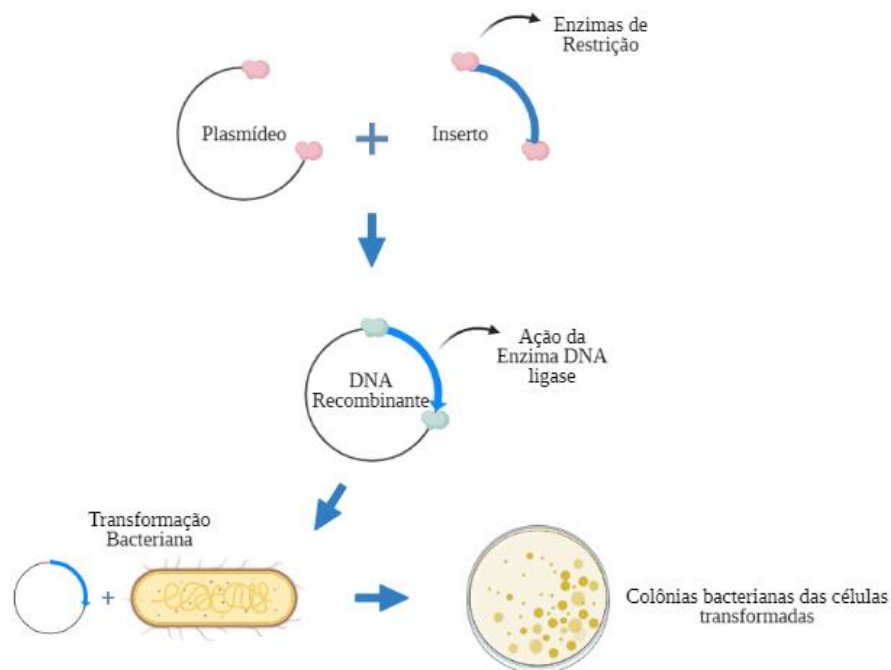
3.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA BACTERIANO

A produção de proteínas heterólogas através da tecnologia do DNA recombinante, proporcionou muitos avanços comerciais e tecnológicos. Os organismos mais utilizados para

tal prática são bactérias gram negativas, *E. coli*, devido as suas características genéticas, facilidade de cultivo e isolamento, baixo custo e produção em larga escala (SWARTZ, 2001).

Basicamente a produção de proteínas recombinantes consiste em isolar o gene de interesse, através de uma reação utilizando enzimas de restrição, da quais reconhecem sequências nucleotídicas específicas do DNA, produzindo extremidades coesivas. Essas extremidades ligam-se ao vetor bacteriano pela ação da enzima DNA-ligase. Posteriormente, essas moléculas de DNA plasmidial contendo o gene que codifica uma determinada proteína, são inseridos em uma célula bacteriana, da qual produz colônias com milhares de cópias do genoma modificado (Figura 4) (CORDEIRO, 2003; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Figura 4. Representação esquemática da técnica do DNA recombinante.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No caso da produção de proteínas heterólogas, são necessários vetores de expressão, como os pertencentes a família pET (*plasmid for expression by T7 RNA polimerase*). A expressão da proteína recombinante usando esses plasmídeos é fortemente regulada e, quando induzida, produz grandes níveis de transcritos e proteínas recombinantes (STUDIER *et al.*, 1990). Para comportar esse alto número de cópias, cepas bacterianas especializadas em expressão também são utilizadas com o intuito de acomodar as proteínas produzidas (TAYLOR-PARKER, 2015). Também podem ser empregadas nessa técnica, bactérias de

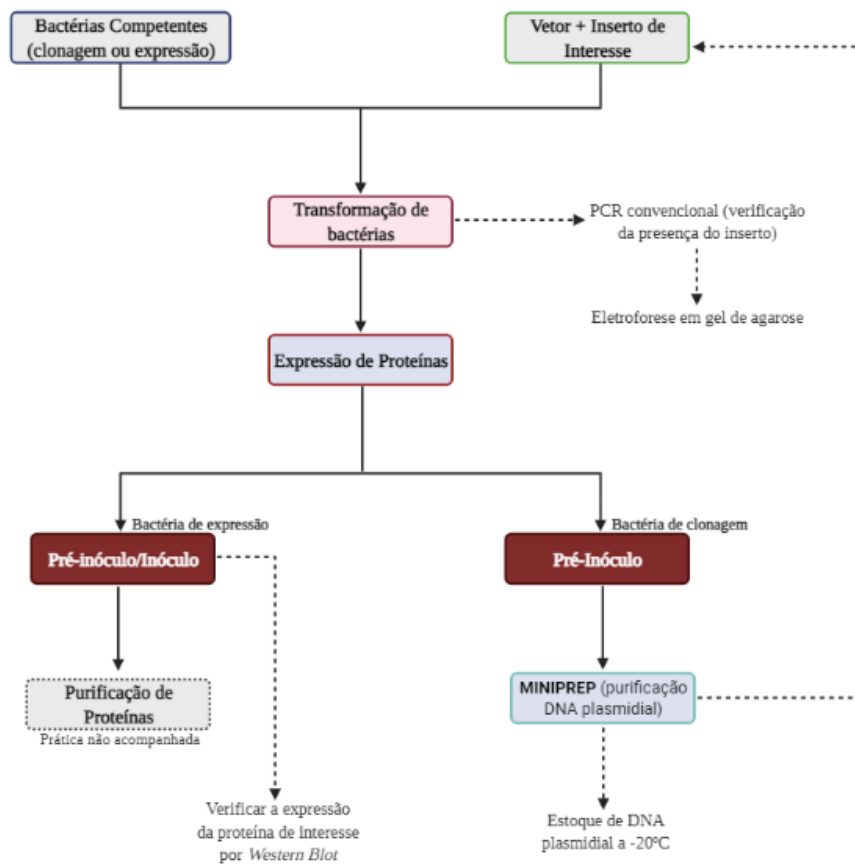
clonagem, para a propagação de plasmídeos contendo o inserto sem o estímulo para a expressão de proteínas (FERENC, 2014).

3.4.1 Atividades Desenvolvidas

3.4.1.1 Fluxograma de expressão heteróloga em sistema bacteriano

A figura 5 representa o fluxograma das atividades desenvolvidas durante o período de estágio final obrigatório, com a finalidade de expressar proteínas em um sistema bacteriano. Para isso foram acompanhadas e desenvolvidas as atividades de bactérias competentes, transformação de bactérias, expressão de proteínas (pré-inóculo e inóculo), *western blot*, MINIPREP, PCR convencional e gel de agarose. Todas essas etapas são fundamentais para que posteriormente ocorra a técnica de purificação de proteínas, da qual não foi acompanhada.

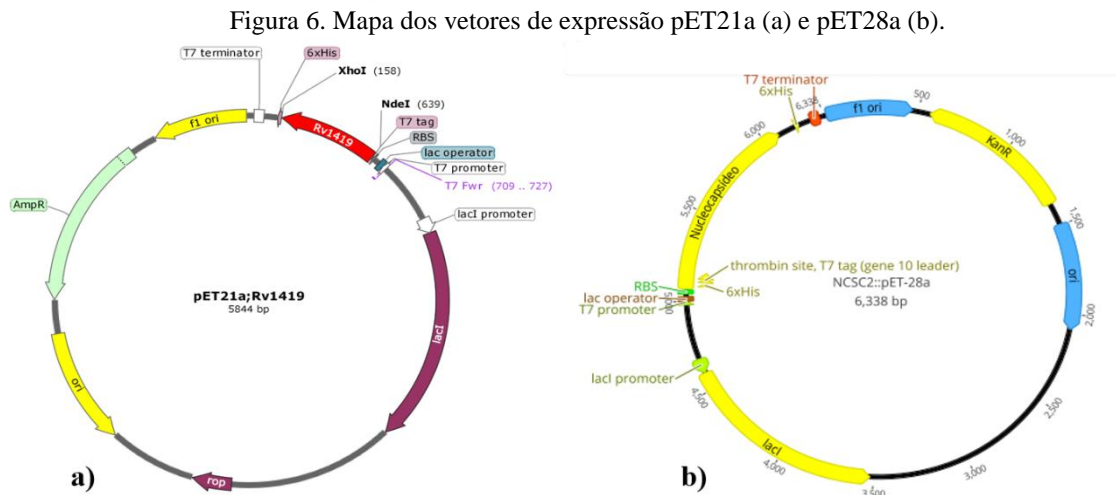
Figura 5. Fluxograma de atividades desenvolvidas durante o período de estágio final obrigatório.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

3.4.1.2 Vetores de expressão e células hospedeiras

Os plasmídeos pET-21a, o qual contém o gene Rv1419 responsável por codificar a proteína sMTL-13, foram cedidos pelo Professor Dr. André Báfica da Universidade Federal de Santa Catarina. Esse plasmídeo contém um gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Figura 6a). Enquanto que o plasmídeo pET-28a, contendo o gene NCSC-2 responsável por produzir a proteína N-CoV, foram cedidos pelo Professor Dr. Fabio Mambelli Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais. Esse plasmídeo contém um gene de resistência ao antibiótico a canamicina (Figura 6b). As células bacterianas de expressão e clonagem, bem como a resistência aos antibióticos das mesmas estão citadas na tabela 1.



Os vetores contêm um promotor para a T7 RNA polimerase, e genes que conferem resistências aos antibióticos ampicilina (a) e canamicina (b). Fontes: figura a) elaborado pela autora (2021); figura b) Fábio Mambelli (2021).

Tabela 1. Resistência aos antibióticos das células bacterianas de clonagem e expressão

CÉLULA BACTERIANA EXPRESSÃO	ANTIBIÓTICO
Condon Plus	Cloranfenicol
BL21	Sem Resistência
Rosetta	Cloranfenicol
CÉLULA BACTERIANA CLONAGEM	ANTIBIÓTICO
DH10B	Sem Resistência
XL10 GOLD	Tetraciclina
TOP10	Estreptomicina

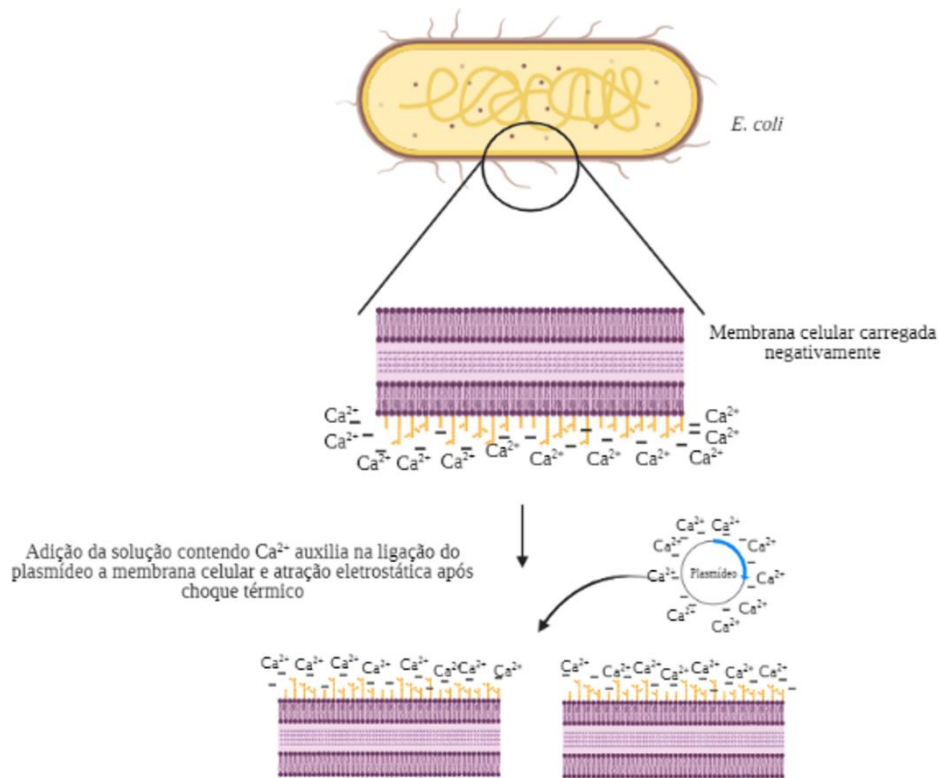
Fonte: elaborado pela autora (2021).

3.4.1.3 Bactérias Competentes

Bactérias competentes são aquelas bactérias aptas a receber plasmídeos, também denominado de vetores, através da utilização de diferentes técnicas (CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015). A preparação dessas bactérias consiste em isolar colônias bacterianas de uma cepa de *E. coli*, previamente semeadas em placas de Petri contendo LB-ágar (Luria-Bertani). Com uma ponteira P200 essa colônia foi adicionada em um tubo falcon contendo 10 mL de meio LB líquido para crescimento sob agitação em uma incubadora a 120 rpm e temperatura igual a 37°, por aproximadamente 16 horas. Posteriormente, transferiu-se 1 mL dessa solução para um tubo contendo 50 mL de meio LB líquido, o qual foi incubado sob agitação a 37 °C até que fosse atingida a Densidade Ótica de 600nm (DO_{600nm}) de 0,4. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuscitado com a adição de 50 mL de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$) 0.1M, do qual permaneceu por 1 hora sob o gelo e depois centrifuga novamente. O sedimento foi então homogeneizado com 5 mL de uma solução gelada de $CaCl_2$ 0,1 M, contendo 20 % de glicerol, a suspensão foi mantida por 30 minutos em gelo. Por fim, foram aliquotados 50 µl em microtubos e armazenados no freezer a -80°C.

Células bacterianas quando em contato com o composto $CaCl_2$, criam pontes entre as cargas negativas do lipídeo A das bactérias gram negativas e a estrutura de fosfato de DNA. Logo, A solução de $CaCl_2$ gelada facilita a ligação do DNA à superfície da célula facilitando a entrada do DNA plasmidial através de um estímulo térmico (Figura 7). Esta técnica é comumente usada para transformar células com plasmídeos para vários fins, como expressão de proteínas, clonagem e armazenamento a longo prazo de plasmídeos (CHANG *et al.*, 2017).

Figura 7. Representação esquemática da ação do Ca^{2+} na membrana celular de *E. coli*.

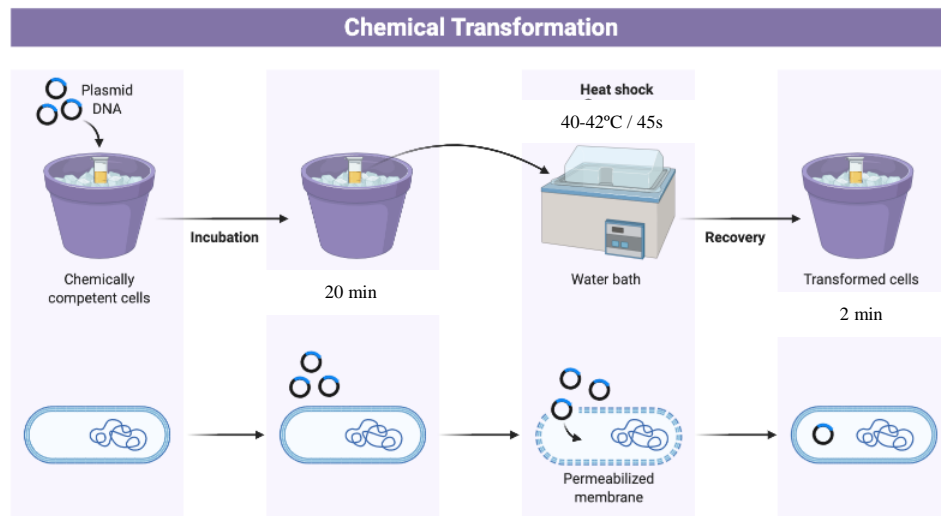


Fonte: elaborada pela autora (2021).

3.4.1.4 Transformação de Bactérias

Uma vez que bactérias se tornam competentes, estas podem ser submetidas ao processo de transformação bacteriana, do qual consiste na introdução do DNA plasmidial em células bacterianas de *E. coli*. Isso é possível após um tratamento térmico, do qual é responsável por abrir poros na membrana celular, permitindo que ocorra a entrada do DNA plasmidial para o interior da célula devido a uma atração eletrostática (Figura 8) (CHANG *et al.*, 2017; EMBRAPA, 2008).

Figura 8. Representação esquemática da técnica de transformação bacteriana.



Fonte: Adaptado de BioRender (2021).

De maneira geral, a técnica de transformação consiste em adicionar 1 µl do plasmídeo de interesse em microtubos contendo bactérias, seguido da incubação em gelo por 20 minutos. Após o período de incubação, as bactérias são submetidas a uma temperatura de 40-42°C por cerca de 45 segundos e colocadas sobre o gelo novamente. Em seguida, as células foram estabilizadas com a adição de 500 µl de meio LB líquido, sendo mantidas a 37 °C durante 45 a 60 minutos. Por último, 100 µl da solução foi transferida para uma placa de Petri contendo o antibiótico para o qual o plasmídeo e a bactéria conferem resistência. Antibióticos são considerados marcadores de seleção, permitindo diferenciar as células bacterianas não-transformadas das células transformadas (EMBRAPA, 2008; CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015).

3.4.1.5 Expressão De Proteínas

A técnica de expressão permite a produção de grandes quantidades de proteínas de interesse de forma rápida, através da utilização de células bacterianas. A expressão de proteínas em bactérias é bastante simples e consiste em inserir o gene responsável por codificar uma molécula de interesse em um vetor de expressão, que é então transformado em células bacterianas de expressão. As células transformadas se multiplicam e são induzidas a produzir a proteína, que posteriormente podem ser purificadas e caracterizadas (ROSANO; CECCARELLI, 2014; CECCHETELLI, 2018).

Para técnica de expressão de proteínas são necessárias duas etapas denominadas de: pré-inóculo e inóculo. A fase de pré-inóculo consiste em transferir uma colônia bacteriana transformada e selecionada pelo antibiótico, do qual o plasmídeo confere resistência, para um tubo falcon contendo 10 mL de meio LB líquido contendo 10 µl de antibiótico (proporção 1:1). Os tubos são incubados a 37°C em uma rotação de aproximadamente 120 rpm. Posterior a incubação, a fase de inóculo se inicia e consiste em transferir cerca de 5 mL do pré-inóculo para garrafas contendo 250 mL de meio LB ou TB líquido com 25 µl de antibiótico, onde as bactérias continuaram crescendo sob agitação (150 rpm) a 37 °C até alcançar a DO_{600nm} de 0,4. Uma vez que a DO atinge o limite desejado, inicia-se o processo de expressão adicionando IPTG (1 mM) para a expressão da proteína de interesse. O IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) é um reagente químico utilizado para remover um repressor da região do *Operon Lac*, com a finalidade de induzir a expressão gênica (KROEMER, 2021).

3.4.1.6 MINIPREP

A técnica de MINIPREP foi utilizada com intuito de purificar e obter concentrações altas de DNA plasmidial de uma cultura bacteriana. De maneira geral, esse ensaio ocorre em duas etapas: 1º crescimento bacteriano em meio de cultura líquido LB (pré-inóculo), seguido da 2º etapa que consiste em lisar a parede bacteriana para concentrar e purificar as moléculas de DNA extracromossomal (plasmídeo). Para isso, foi utilizado *kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kits* (invitrogen), inicialmente deve-se equilibrar a coluna com 2 mL de tampão de equilíbrio (EQ1), pois é nesse sistema que o DNA plasmidial ficará retido. Em paralelo, uma alíquota do meio de cultura LB contendo as bactérias de interesse são centrifugadas durante 20 minutos a 4000 x g, para a formação do *pellet* contendo as células bacterianas. Esse *pellet* em seguida é ressuscitado com 400 µl tampão R3 (*Ressuspension Buffer*) e recebem 400 µl de tampão L7 (*Lysis Buffer*), do qual atua nas células bacterianas, rompendo a membrana plasmática e liberando várias moléculas, entre elas o plasmídeo contendo o inserto. Após 5 minutos, 400 µl do tampão N3 (*Precipitation Buffer*) foi acrescentado na mistura anterior, seguido da centrifugação 4000 x g durante 20 minutos. A partir disso, a fração correspondente ao sobrenadante é coletado e transferido para a coluna recém atividade com a solução EQ1, pois é neste sistema em que o DNA plasmidial se ligará. Posteriormente, 900 µl do tampão E4 (*Elution Buffer*) é adicionado com o intuito de remover o material adsorvido na coluna. O produto da eluição é precipitado com 630 µl de isopropanol e centrifugado a 4000 x g durante

40 minutos a 4°C. Por último, o sobrenadante é descartado e o *pellet* novamente ressuspendido com 50 µl tampão TE.

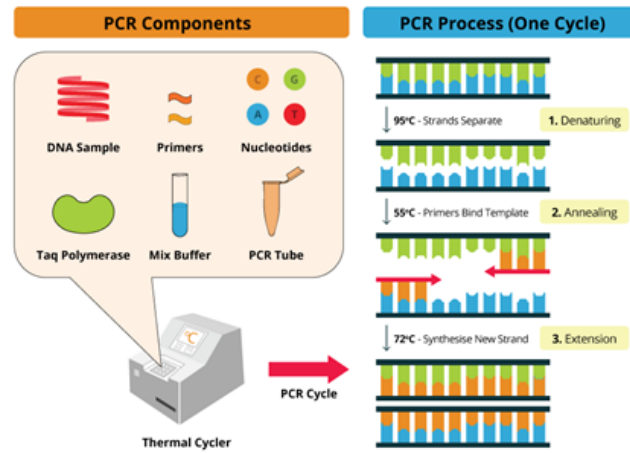
3.4.1.7 PCR Convencional

A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica *in vitro* que permite a geração de milhões de cópias de um fragmento específico de DNA na presença de enzimas (SINGH *et al.*, 2014). Mas para que essa reação ocorra alguns componentes são exigidos, entre eles: *Taq* DNA polimerases, DNA molde, *Primers*, dNTPs, Cloreto de Magnésio (MgCl₂) e um termociclador. Esses elementos quando unidos formam um *mix* que posteriormente passam pelos processos de desnaturação, anelamento e extensão, permitindo à amplificação e quantificação de uma sequência curta de DNA da bactéria alvo (RAJAPAKSHA *et al.*, 2019).

Cada componente desempenha um papel importante na técnica de PCR. A *Taq* DNA polimerase é uma enzima termoestável e tem como função básica a síntese da fita molde através da incorporação de nucleotídeos. Os *primers*, também chamados de iniciadores, normalmente apresentam entre 18 a 24 pares de bases (pb), delimitam a sequência alvo para amplificação. Os dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) são as bases nitrogenadas necessárias para a formação da fita molde e o MgCl₂ serve como tampão fornecendo as condições ideais para a atividade da polimerase (SINGH *et al.*, 2014; RAJAPAKSHA *et al.*, 2019).

Resumidamente, a reação em cadeia da polimerase inicia quando o *mix* é submetido a diferentes temperaturas. A primeira etapa ocorre a uma temperatura igual ou superior a 95°C, levando a desnaturação das duas fitas da molécula de DNA alvo, devido ao rompimento das ligações entre A-T e G-C. Em seguida, ocorre a etapa de anelamento a uma temperatura de 50-65°C, permitindo a ligação dos *primers forward* e *reverse* na extremidade 3' das regiões de interesse do DNA de fita simples. Por último, a *Taq* polimerase então estende a nova fita de DNA adicionando dNTPs e a molécula de fita dupla se reestrutura na temperatura de extensão de 72°C. Este processo é repetido por vários ciclos, gerando inúmeras cópias da molécula de interesse (Figura 9) (SINGH *et al.*, 2014; RAJAPAKSHA *et al.*, 2019; BOSTER, 2021).

Figura 9. Representação esquemática PCR. Figura ilustrativa dos componentes necessários para uma reação PCR a esquerda, são necessários a amostra de DNA de interesse, *primers* ou iniciadores, dNTPs, *Taq* DNA polimerase, tampão dentro de um microtubo. As etapas correspondentes a um ciclo estão representadas ao lado direito, onde é possível visualizar a desnaturação da fita de DNA, seguido do anelamento dos *primers* e extensão da enzima *Taq* polimerase.



Fonte: Boster (2021).

Os iniciadores utilizados em todos os experimentos estão descritos no Quadro 1, enquanto que a amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 2 minutos, seguido por 36 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos; anelamento dos primers a 55°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto e extensão final a 72°C durante 5 minutos. A reação ocorreu em um aparelho termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler). O produto da PCR convencional é visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose.

Quadro 1. Iniciadores utilizados para amplificação do gene Rv1419

Iniciadores	Sequência
<i>Forward</i>	5' GGAATTCCATATGGGTGAATTACGGTTG 3'
<i>Reverse</i>	5' CCGCTCGAGCGGCACGCTATCCCA 3'

Fonte: elaborada pela autora (2021).

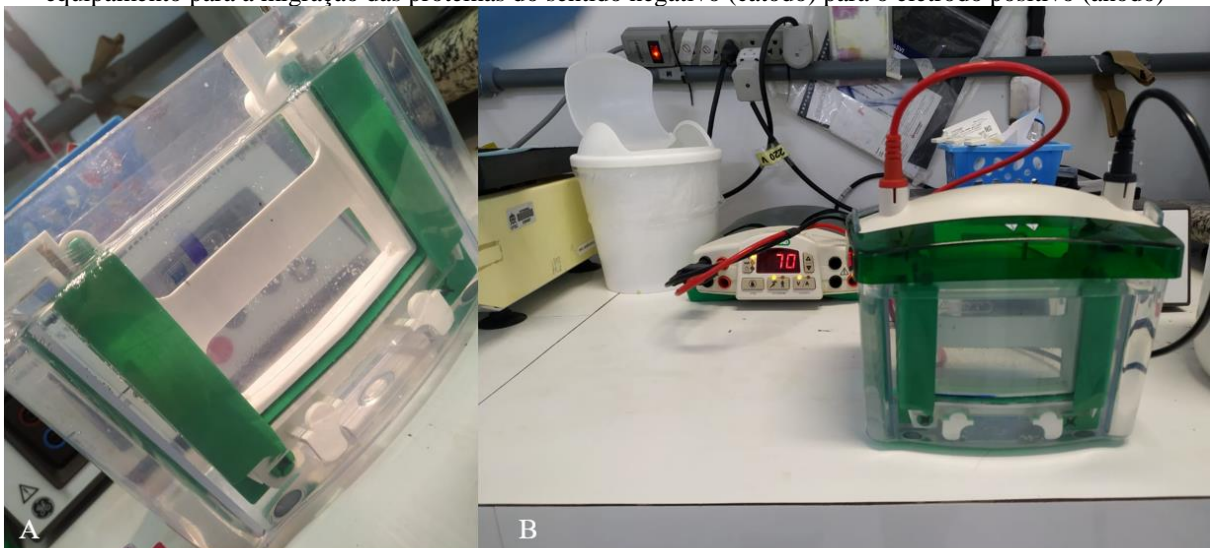
3.4.1.8 Eletroforese em gel

A eletroforese é um método altamente utilizado nas práticas de biologia molecular, pois permite a separação e caracterização de proteínas e fragmentos de ácidos nucleicos, sob influência de um campo elétrico. Basicamente existem dois tipos de eletroforese: em géis de

agarose e em géis de poliacrilamida. Em ambos os casos, as substâncias utilizadas criam tramas de poros de tamanhos variáveis, capazes de separar os componentes de uma amostra, sendo que a sua eficiência dependerá da concentração do polímero e da força da voltagem e amperagem aplicadas (OLIVEIRA, 2015; BARKER, 2002).

Géis de poliacrilamida, são empregados para análise de proteínas em extratos complexos. Muitas vezes, são utilizados associados a detergentes aniônicos como o dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), pois as cargas negativas no SDS destroem a maior parte das estruturas complexas das proteínas, permitindo que essas moléculas sejam fortemente atraídas para um ânodo (eletrodo com carga positiva) em um campo elétrico. O gel de poliacrilamida é composto por um sistema de dois géis, denominados concentrador e separador, dos quais são responsáveis por concentrar a amostra e distribuir as proteínas de acordo com o seu peso molecular (kDa), respectivamente (Figura 10). Ao concluir a etapa de separação de amostras, esse gel pode ser submetido a diversas análises, entre elas podemos citar a de *Western Blot* (CHANDEL; PAHADIYA, 2005).

Figura 10. Fotos representativas de um experimento com eletroforese SDS-PAGE 15%. A) aplicação da amostra das canaletas da porção concentradora do gel de poliacrilamida. B) Aplicação de uma voltagem de 70V no equipamento para a migração das proteínas do sentido negativo (cátodo) para o eletrodo positivo (ânodo)



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

A eletroforese em gel de agarose tem como finalidade separar fragmentos de DNA, que variam de 100 pb a 25 kb. O processo de separação ocorre devido a presença de um grupo fosfato na molécula de DNA (e RNA) carregado negativamente, visto isso, quando colocados em um campo elétrico, os fragmentos migrarão para o ânodo carregado positivamente. Logo, as moléculas de DNA são separadas por tamanho dentro do gel através de um padrão em que a

distância percorrida é inversamente proporcional ao seu peso molecular (Figura 11) (YILMAZ; OZIC; GOK, 2012).

Figura 11. Fotos representativas de um experimento de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A) Aplicação das amostras contendo DNA plasmidial nas canaletas de um gel de agarose. B) Através da aplicação de uma voltagem de 100V as moléculas migram no sentido negativo para o positivo.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.4.1.9 WESTERN BLOT

A técnica de *Western Blot* (WB), também conhecida como *Protein Blotting* ou *Immunoblotting*, é uma ferramenta da biologia molecular utilizada para a imunodeteção de proteínas após separação destas por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido da transferência para uma membrana de nitrocelulose. O ensaio de WB consiste em um conjunto de várias etapas, como demonstrado na figura 12 (YANG; MAHMOOD, 2012).

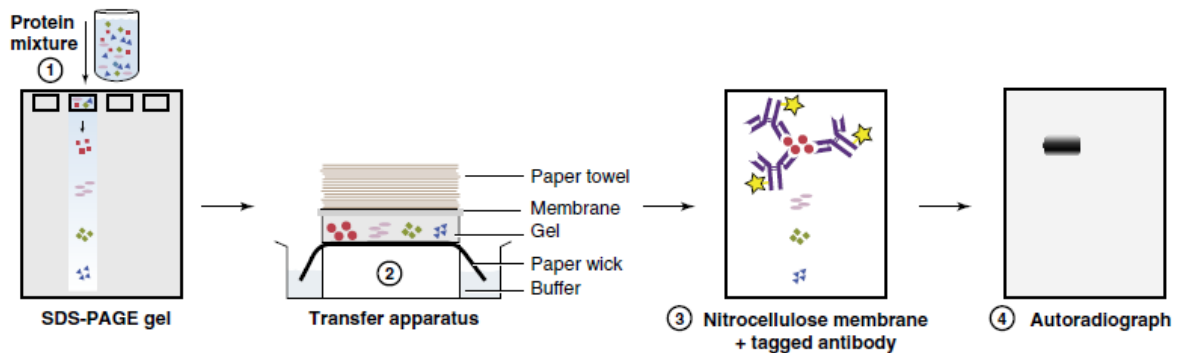
As amostras são inicialmente preparadas e desnaturadas a temperatura de 100°C durante 10 minutos, para que posteriormente sejam aplicadas no gel. Da mesma forma, os controles positivos e negativos também são adicionados no gel para que seja possível confirmar a identidade da proteína, bem como a atividade do anticorpo. Após a preparação da amostra, as

proteínas são separadas de acordo com as suas propriedades físicas e peso molecular à medida que passam por uma corrente elétrica. Posteriormente, as proteínas são transferidas para uma membrana, que é a terceira etapa do *Western Blot*. No processo de transferência, a voltagem as proteínas se movem para fora do gel de poliacrilamida e se ligam fortemente na membrana, onde pode ser observado. O processo inclui ainda a utilização de papel filtro e almofadas porosas para facilitar a transferência (YANG; MAHMOOD, 2012; BARKER, 2002).

A quarta etapa do WB é a sondagem de anticorpos, no entanto, para que isso seja possível deve-se utilizar primeiramente uma solução de bloqueio a fim de evitar ligações inespecíficas à proteína de interesse. As substâncias mais comumente utilizadas, são leite desidratado sem gordura ou albumina de soro bovino diluída em Tris Buffered Saline Tween (TBST). A partir da etapa de bloqueio, a membrana é incubada *overnight* com o anticorpo primário específico para a proteína, esse anticorpo é diluído em uma solução contendo TBST-BSA 5%. Após a incubação, é necessário a marcação com um anticorpo secundário que se liga a uma porção espécie-específica do anticorpo primário. Além disso, a mesma é conjugada com uma enzima reveladora, como a HRP (enzima Horseradish peroxidase), responsável por gerar um sinal fotométrico quando a membrana é revelada (YANG; MAHMOOD, 2012; BARKER, 2002).

A metodologia do WB foi empregada durante o período de estágio final para a detecção da proteína sMTL-13, bem como a avaliação de diferentes amostras de anticorpos anti-sMTL-13.

Figura 12. Representação esquemática das principais etapas da metodologia de *Western Blot*. 1) Separação da mistura de proteínas por SDS-PAGE; 2) Transferência; 3) Bloqueio e marcação com anticorpos; 4) Revelação.



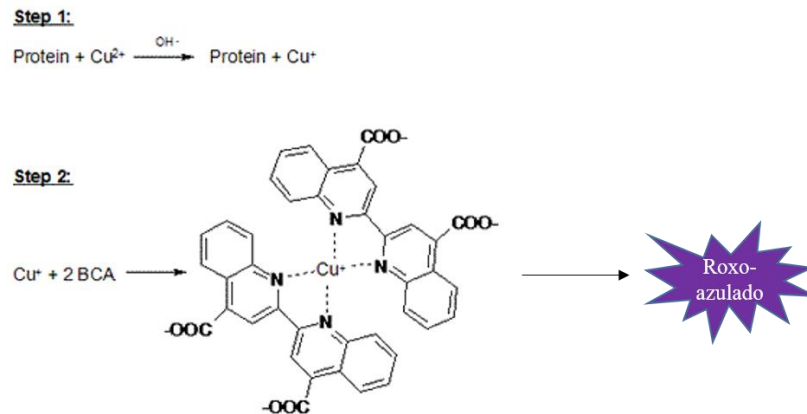
Fonte: Mak, Saunders e Jett (2013).

3.5 OUTRAS ATIVIDADES

3.5.1 Quantificação de proteínas pelo método BCA

O ensaio de ácido bicinconínico (BCA) é um método empregado na rotina laboratorial para a quantificação total de proteínas. De acordo com Smith e colaboradores (1985) a determinação das concentrações proteicas ocorre através da reação de redução dos íons $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ pelas proteínas em meio alcalino. O Cu^+ , por sua vez, forma um complexo com o ácido bicinconínico, exibindo uma cor roxo-azulado, do qual é proporcional a quantidade de proteínas totais presentes na amostra (figura 11) (SMITH *et al.*, 1985; RADIC´, 2015).

Figura 13. Redução do Cu^{2+} e reação com BCA formando complexo roxo-azulado



Fonte: Adaptado de Radic´ (2015).

Resumidamente, o método BCA foi realizado durante o período de estágio final com a finalidade de quantificar proteínas (sMTL-13) e anticorpos (anti-sMTL-13) de soluções com a rotulagem incompleta. Para isso, adaptou-se o protocolo do fabricante, com objetivo de uma menor quantidade, tanto dos reagentes quanto das amostras. Para elaboração da curva padrão, foi utilizado a solução estoque de albumina bovina (BSA) a 2 mg/mL, a qual foi submetida a diluições seriadas para obtenção das concentrações finais nos poços de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 e 0.03125 mg/mL. Em paralelo, também realizou-se a diluição da proteína sMTL-13 em microtubos contendo 180 μl de água Milli-Q, nas concentrações 1x, 10x, 100x. Enquanto que para a solução contendo anticorpos a diluição foi realizada da seguinte forma: 1x, 1:1, 10x, 100x e 1000x. Ambas as amostras e padrões foram incubados a 37 ° C por 30 min e a

absorbância foi medido a 540 nm em leitor de placas. Os resultados foram ajustados no programa GraphPad PRISM.

3.5.2 Cultura Celular

Foram ainda acompanhadas algumas práticas envolvendo cultivo celular. A célula utilizada foi a THP-1, uma linhagem celular de monócitos derivada do sangue periférico humano para investigações da estrutura e função destas células quando em contato com o agente causador da tuberculose humana (*M. tuberculosis*). Geralmente as células são mantidas em garrafas próprias para cultura celular e mantidas em uma estufa incubadora em uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂.

Células THP-1 pertence a uma linhagem celular contínua, da qual apresenta uma elevada taxa de crescimento e alta eficiência clonal. Além disso, são células independentes de fixação para a proliferação celular. Esse tipo de crescimento muitas vezes possibilita a obtenção de um grande número de células e a facilidade de captação das mesmas (BOSSHART; HEINZELMANN, 2016; BARKER, 2002).

Os experimentos acompanhados envolveram as técnicas de: descongelamento e ajuste de densidade celular. O descongelamento é uma etapa relativamente simples que consiste em retirar os criotubos mantidos em nitrogênio líquido e descongelar em banho-maria a uma temperatura de 37°C. Posteriormente, essas células passam por centrifugação para retirar o meio de congelamento, do qual contém meio de cultura RPMI 1640, com cerca de 10 a 20% de soro fetal bovino (FBS) e 5 a 10% de glicerol ou DMSO. O ajuste de densidade é uma etapa posterior ao descongelamento, sendo necessário que as células estejam em uma concentração de entre 3×10^5 a 5×10^5 , pois quando ultrapassam esse valor as células podem aumentar além da capacidade do recipiente e o meio não poderá sustenta-las (BARKER, 2002).

3.5.3 Preparação de Meio

Os microrganismos precisam de nutrientes, fonte de energia e certas condições ambientais para crescer e se reproduzir. No ambiente natural, os micróbios se adaptaram aos habitats mais adequados às suas necessidades. No laboratório, entretanto, esses requisitos devem ser atendidos por meios de cultura. Um meio de cultura é basicamente uma solução aquosa à qual foram adicionados todos os nutrientes necessários. Para isso, a preparou-se meios

TB (Terrific Broth), LB (Luria Bertani) e SOC (adaptação do meio SOB enriquecido com glicose) para o crescimento de colônias bacterianas. Todos esses meios foram utilizados para a cultura de microrganismos, principalmente *E. coli*.

Para a preparação dos meios, LB, TB e SOC foram necessárias as seguintes medidas:

Quadro 2. Composição dos meios de cultura utilizados nas práticas de expressão heteróloga em sistema bacteriano

TERRIFIC BROTH (TB)	
Triptona	12 g/L
Extrato de Levedura	24 g/L
Glicerol 100%	4 mL
Água Milli-Q	900 mL
Fosfato de Potássio	100 mL
LURIA-BERTANI (LB)	
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
Cloreto de Sódio	10 g/L
Água Milli-Q	1000 mL
MEIO SOC	
Meio SOB*	98 mL
MgCl ₂ 2 M	1 mL
Glicose 2 M	1 mL
*Todos os meios precisaram ser autoclavados para evitar qualquer contaminação	

Meio SOB: Bactotripton 20 g; Extrato de levedura 5 g; NaCl 0,584 g; KCl 0,186 g; Água mq qsp. 1 L; ajustar o pH para 7.0 e autoclavar. Fonte: Elaborada pela autora (2021);

4 CONCLUSÃO

A etapa que compreende o estágio curricular obrigatório é imprescindível para a vida do acadêmico pois possibilita o mesmo a vivenciar a futura área de atuação, além de permitir uma melhor assimilação dos conteúdos vistos em sala de aula de forma mais intensa, dinâmica e completa. Essas características em conjunto acabam sendo determinantes para os alunos, tornando-os mais aptos para o mercado de trabalho posteriormente.

REFERÊNCIAS

BARKER, K. **Na Bancada**: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.

BioRender (2021). **Bacterial Chemical Transformation**. Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5fda6dba8c41295288bbf0b7-bacterial-chemical-transformation>

BOSSHART, H.; HEINZELMANN, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. **Annals Of Translational Medicine**, v. 4, n. 21, p. 438-438, nov. 2016. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>.

BOSTER. **PCR Principle**. 2021. Disponível em: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/pcr-principle>. Acesso em: 10 abr. 2021.

CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, Santos, v. 12, n. 26, p. 41-53, jan/mar. 2015.

CECCHETELLI, A. **Plasmids 101: Protein Expression**. 2018. Disponível em: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-protein-expression>. Acesso em: 26 abr. 2021.

CHANDEL, K. K.; PAHADIYA, S. **Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis**. 2005.

CHANG, A Y. *et al.*, Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. **Undergraduate Methods Paper**, v. 1, p. 22-25, jun. 2017.

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética**: conceitos básicos, ferramentas e aplicações. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003, 43 p.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular**, por Liziane Maria de Lima. Campina Grande, 2008, 27p.

FERENC, M. **Common Lab E. coli Strains**. 2014. Disponível em: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains>. Acesso em: 26 abr. 2021.

JORDÃO, M. F. **Caracterização da resposta humoral contra a proteína N do SARS-CoV-2**. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, 2020.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M.; JETT, B. D. **Primer to Immune Response**. 2. ed. Academic Cell, 2013. 702 p.

OLIVEIRA, E. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 1129-1149, jan. 2015.

RADIĆ, C. **Nitric oxide synthase expression and activity in cell models relevant to human pathophysiology**. 2015. 49 f. Tese (Doutorado) - University of Zagreb, Zagreb, 2015.

RAJAPAKSHA, P. *et al.* A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. **The Analyst**, v. 144, n. 2, p. 396-411, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8an01488d>.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers In Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 17 abr. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.

SINGH, J. *et al.* A critical review on PCR, its types and applications. **International Journal Of Advanced Research In Biological Sciences**, v. 1, n. 7, p. 65-80, 2014.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, out. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

STUDIER, F. W. *et al.* Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods In Enzymology**, p. 60-89, 1990. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c).

SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 195-201, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00199-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00199-3).

TAYLOR-PARKER, J. ***E. coli* Strains for Protein Expression**. 2015. Disponível em: https://blog.addgene.org/plasmids-101-e-coli-strains-for-protein-expression?_ga=2.59624173.1568848381.1619320922-1005505781.1611878779. Acesso em: 26 abr. 2021.

YANG, P. C.; MAHMOOD, T. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal Of Medical Sciences*, v. 4, n. 9, p. 429, 2012. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

YILMAZ, M.; OZIC, C.; GOK, İ. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. **Gel Electrophoresis-Principles and Basics**, v. 4, p. 33, 2012.