

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Produção de insumos simplificados baseados em bactérias
recombinantes para uso em reações de amplificação de ácidos
nucleicos**

Dissertação de Mestrado

Magno Sinval Pereira Ribeiro

Porto Alegre, novembro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Produção de insumos simplificados baseados em bactérias recombinantes
para uso em reações de amplificação de ácidos nucleicos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Magno Sinval Pereira Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, novembro de 2022

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional (LAGEF) e no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos (LBMC), ambos situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio Grande do Sul (FAPERGS), da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES-RS), do Ministério da Saúde (MS), do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (Decit/SCTIE/MS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que defendem e acreditam na ciência. A ciência salva e preserva a vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e as boas energias que sempre me impulsionaram nessa longa jornada chamada VIDA.

Agradeço em especial a minha mãe, meu irmão, meu pai e minha avó que genuinamente acreditaram nos meus sonhos e nunca mediram esforços para que eu os alcançasse. Obrigado por sonharem e trilharem comigo cada passo dessa jornada. Em seguida, agradeço a todos os meus familiares.

À minha querida orientadora profa. Karina, por me receber tão bem em seu laboratório, acreditar e confiar em mim, sempre me incentivando e mostrando que posso fazer parte da ciência. Gratidão por todas as oportunidades, aprendizados e conselhos que levarei para vida. Muito obrigado por ser tão presente e me orientar com zelo e dedicação.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao PPGBCM, em pessoa de Silvia, por toda a disponibilidade e atenção.

Aos professores Arnaldo Zaha e Henrique Ferreira, e a Dra. Jéssica Paes, pelo apoio, contribuição e amizade ao longo desse tempo. Gratidão por tudo.

Aos meus amigos e colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, em especial a Cristine, Priscila, Marina e Bryan, pelos momentos de construção científica, cafés, risadas e sobretudo, o apoio e carinho na minha recepção e adaptação ao grupo de pesquisa. Muito obrigado, pessoal! Vocês tem um lugar especial no meu coração.

Aos alunos de Iniciação Científica, Ederson e Guilherme, que de uma contribuição extraordinária contribuíram grandemente para esse trabalho acontecer.

À todas as pessoas, amigos e colegas do Centro de Biotecnologia da UFRGS que direta e indiretamente contribuíram para a construção dessa dissertação e da minha formação. Não se faz ciência sozinho, estamos em partilha a todo momento.

Aos meus amigos e pessoas especiais que moram em meu coração. Muito obrigado pelo incentivo, otimismo, parceria e por me proporcionarem momentos de alegria e descontração. Amo todos vocês. Gratidão por tudo.

Epígrafe

“Aqui em casa pousou uma esperança. Não a clássica que tantas vezes verifica-se ser ilusória, embora mesmo assim nos sustente sempre. Mas a outra, bem concreta e verde: o inseto. Antes surpresa minha: esperança é coisa secreta e costuma pousar diretamente em mim, sem ninguém saber.”

Uma esperança, Clarice Lispector

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para o diagnóstico molecular de doenças infecciosas.....	11
1.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	13
1.3 Amplificação Isotérmica de DNA.....	18
1.4 Enzimas utilizadas na amplificação de ácidos nucleicos <i>in vitro</i>	21
1.4.1 DNA Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i> (<i>Taq</i> DNA-polimerase)	21
1.4.2 DNA Polimerase de <i>Bacillus stearothermophilus</i> (<i>Bst</i> DNA-polimerase)	22
1.4.3 Transcriptase Reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV-RT).....	23
1.5 Produção de insumos para uso em ensaio de amplificação de ácidos nucleicos.....	25
1.6 Metodologias alternativas para produção de insumos de baixo custo para NAATs.....	29
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Materiais e métodos.....	32
4. Resultados	37
5. Discussão	49
6. Perspectivas	55
7. Referências bibliográficas	56
8. Apêndice.....	64

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

5' UTR	Região 5' não traduzida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfato
mRNA	RNA mensageiro
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por um Loop
λ	Lambda
μ g	Microgramas
mL	Mililitro
RPM	Rotação Por Minuto
mM	Milimolar
%	Porcentagem
F	Forward
R	Reverse
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)
OMS	Organização Mundial da Saúde

Resumo

A expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* é vantajosa e viável devido a fácil manipulação genética, rápido crescimento, baixo custo e alta eficiência. Com os avanços da biotecnologia e a elevada demanda de ensaios moleculares de amplificação de ácidos nucleicos, como PCR e LAMP, a busca e competitividade por insumos proteicos fica evidente no mercado clínico e científico. Proteínas como as DNA-polimerases *Taq* e *Bst* e a transcriptase reversa MMLV-RT fazem parte da rotina de laboratórios moleculares. A produção simplificada baseada em bactérias recombinantes desses insumos apresentam vantagens como produção facilitada, baixo custo, alto rendimento e estabilidade a temperatura ambiente. Desta forma, objetivou-se produzir *Taq*, *Bst* e MMLV RT baseado em bactérias recombinantes para uso direto como células e extratos celulares em PCR e LAMP. Inicialmente, linhagens de *E. coli* foram transformadas com os respectivos plasmídeos das proteínas de interesse, seguida da padronização da expressão recombinante. Alíquotas das células expressando a *Taq* e a MMLV-RT foram utilizadas em PCR, qPCR e RT-PCR, e o extrato celular recombinante expressando a *Bst* foi utilizado no ensaio LAMP, ambas em substituição ao seu equivalente comercialmente disponível. Avaliamos a sensibilidade, especificidade e estabilidade das enzimas, as quais foram estáveis a temperatura ambiente e amplificaram o DNA molde, porém, nos ensaios de PCR e qPCR, efeitos negativos foram encontrados em ensaios com maior quantidade de células e menor concentração de DNA. No LAMP, foram obtidos bons resultados de amplificação utilizando o extrato celular da *Bst* recombinante. Em vista disso, a metodologia proposta é viável e acessível, sendo necessários mais estudos da aplicação dessa abordagem em ensaios moleculares.

Abstract

The expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* is advantageous and viable, due to easy genetic manipulation, rapid growth, low cost and high efficiency. With advances in biotechnology and the high demand for molecular nucleic acid amplification assays, such as PCR and LAMP, the demand and competitiveness for protein sample is evident in the clinical and scientific market. Proteins such as Taq and Bst DNA polymerases and MMLV-RT reverse transcriptase are part of the routine of molecular laboratories. The simplified production based on recombinant bacteria of these sample has advantages such as easy production, low cost, high yield and stability at room temperature. Thus, the objective was to produce Taq, Bst and MMLV RT based on recombinant bacteria for direct use as cells and cell extracts in PCR and LAMP. Initially, *E. coli* strains were transformed with the respective plasmids of the proteins of interest, followed by the standardization of protein expression. Aliquots of recombinant cells expressing Taq and MMLV-RT were used in PCR, qPCR and RT-PCR, and recombinant cell extract expressing Bst was used in the LAMP assay, both replacing their commercially available equivalent. We evaluated the sensitivity, specificity and stability of the enzymes, which were stable at room temperature and amplifying the DNA template, however, in the PCR and qPCR assays negative effects were found in assays with a greater number of cells and a lower concentration of DNA. In LAMP, good amplification results were obtained using the cell extract of recombinant Bst. In view of this, the proposed methodology is viable and accessible, requiring further studies to apply this approach in molecular assays.

1. Introdução

1.1 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para o diagnóstico molecular de doenças infecciosas

Globalmente, as doenças infecciosas são uma grande ameaça para a saúde pública e medidas que visem a vigilância e controle dessas enfermidades são fundamentais. As doenças infecciosas são causadas por bactérias, vírus, parasitas e/ou fungos, denominados coletivamente de patógenos. Segundo estudo de SMITH et al. (2014), um levantamento de 215 doenças causadas por agentes infecciosos, as bactérias e os vírus causaram 70% das infecções, além de serem responsáveis por 88% dos surtos ao longo do tempo (1980-2010) (SMITH et al., 2014). Recentemente, os casos de Zika, Ebola, Chikungunya e da atual pandemia da COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2, representam um cenário desafiador para conter a transmissão dos agentes infecciosos e monitorar o número de casos, impondo uma alta demanda de diagnóstico molecular viável, acessível e robusto (FAUCI et al., 2016; BASHA et al., 2017; PAUL et al., 2020).

Para controlar a disseminação das infecções, e até mesmo para iniciar um tratamento ou terapia, é necessária a rápida e precisa identificação do agente infeccioso. A Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta que todas as nações intensifiquem os sistemas de testagem e diagnóstico para retardar, controlar e monitorar a transmissão de doenças emergentes e reemergentes (KAMEDA et al., 2021). O diagnóstico precoce e preciso das doenças infecciosas é fundamental para maximizar o gerenciamento dos casos e adotar medidas sanitárias mais eficazes (PAUL et al., 2020).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs, do inglês: *Nucleic Acid Amplification Tests*) são denominados padrão ouro para o diagnóstico de doenças infecciosas devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Esses testes identificam com precisão informações genômicas dos agentes infecciosos e são capazes de diferenciar cepas e variantes patogênicas, o que não pode ser facilmente alcançado por outras técnicas, como o diagnóstico sorológico por cromatografia (Exemplo: teste rápido de antígeno), além de muitas vezes o diagnóstico molecular ser multiplexado para identificação simultânea de múltiplos patógenos (PAUL et al., 2020; BASHA et al., 2017). Com a pandemia da COVID-19, alguns testes NAATs foram autorizados para serem realizados nos pontos de atendimento (PoC, do inglês *Point of Care*), além de

rotineiramente já serem feitos em laboratórios equipados e com pessoal treinado (CDC, 2021). Essa flexibilidade evidencia o grande potencial da utilização dos testes de amplificação de ácidos nucleicos no diagnóstico, uma vez que conseguem discriminar entre positivo e negativo até mesmo em baixas concentração do ácido nucleico alvo, garantindo a confiabilidade do diagnóstico (PAUL et al., 2020).

A realização dos NAATs em países desenvolvidos se dá em laboratórios com ambientes controlados, com equipamentos complexos, pessoal qualificado e reagentes caros que dependem de uma cadeia fria para o manuseio e transporte. Já nos países em desenvolvimento e de baixa renda, os requisitos para realização dos testes são os mesmos, porém a aplicação dos NAATs fica restrita aos centros urbanos, o que limita o número de testes que podem ser realizados e o acesso para pacientes que vivem em regiões periurbanas e rurais (CANTERA et al., 2019).

Basicamente, para a realização dos NAATs são necessárias três etapas principais: extração e/ou isolamento do ácido nucleico, ou seja, processamento das amostras dos pacientes, a amplificação do ácido nucleico e um sistema de detecção do amplicon (produto da amplificação) (TORRES, 2020). As estratégias para o diagnóstico molecular tem como base a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e suas variantes como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), a PCR em tempo real quantitativa (qPCR,) e a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) que são considerados os métodos padrão ouro. Nos PoC ou em ambientes com recursos limitados não há uma total disponibilidade de equipamentos refrigerados, sendo que nesses locais, o uso de reagentes liofilizados seria interessante, pois garantem uma estabilidade dos insumos e o alto desempenho do ensaio (CHEN et al., 2010; CZILWIK et al., 2015). Devido a essas e outras limitações, como a necessidade de um termociclador, os métodos de amplificação isotérmica podem ser mais adequados, como a amplificação isotérmica mediada por um loop (LAMP, do inglês *Loop Mediated Isothermal Amplification*) e a RT-LAMP que acopla a transcrição reversa no ensaio de amplificação. Geralmente, o LAMP é mais tolerante a alguns inibidores do que a PCR, podendo amplificar diretamente os ácidos nucleicos de amostras brutas, como sangue total. O LAMP necessita apenas de um equipamento isotérmico, como um banho-maria, para a sua realização. Além disso, o LAMP permite a detecção visual dos resultados, como, por

exemplo, pelo uso de corantes. Estudos já demonstraram que os reagentes necessários para a realização do LAMP podem ser liofilizados (MA et al., 2019; ESTRELA et al., 2019).

1.2 Reação em cadeia da polimerase

A síntese de DNA *in vitro* teve um grande avanço após a invenção da PCR, técnica que conferiu o prêmio Nobel de química do ano de 1993 a Kary Mullis. A reação permite a síntese específica e exponencial de uma região do DNA alvo através do uso de dois iniciadores (do inglês, *primers*) que são projetados para hibridizarem especificamente com a molécula de ácido nucleico a ser amplificado, formando duas extremidades que serão utilizadas pela enzima DNA-polimerase para realizar a atividade de síntese (VAN PELT-VERKUIL et al., 2008). Além da DNA-polimerase, do ácido nucleico alvo e dos iniciadores, a técnica requer desorribonucleotídeos trifosfatados (dNTP), íons de Mg⁺² que são o cofator da enzima DNA-polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq) e uma solução tampão (Figura 1) (TORRES, 2020).

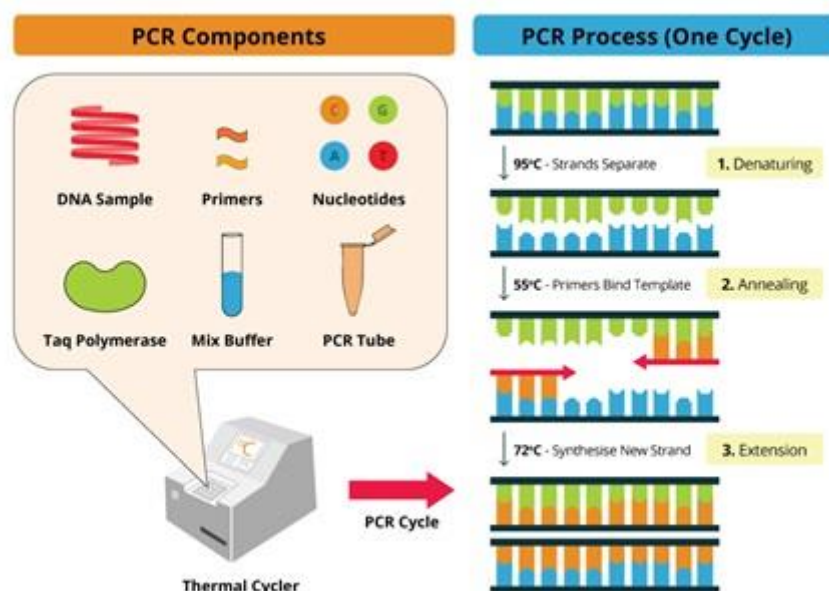


Figura 1: Reagentes e etapas da PCR convencional. Os reagentes necessários para a PCR são o DNA alvo/amostra de DNA, um par de iniciadores específicos (iniciador 5' ou *forward* e iniciador 3' ou *reverse*), os nucleotídeos, a enzima Taq DNA-polimerase e um tampão para a reação. É preparado um mix com todos em componentes em um volume determinado em tubo de reação e,

posteriormente, é adicionado em um termociclador. Fonte: Bosterbio (2022). Link de acesso: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr>

A síntese do DNA ocorre em ciclos térmicos que desnaturam o DNA molde (95 a 98°C); hibridizam os iniciadores às extremidades do fragmento do DNA alvo fornecendo o terminal 3' – hidroxil de fita dupla (50 a 72°C); e favorecem a atividade da DNA-polimerase na extensão da fita complementar do DNA (Figura 1 a direita e Figura 2). Todo o ciclo é repetido por um número determinado de vezes, geralmente 35 ciclos e, após as ciclagens de temperatura, obtém-se o DNA amplificado em uma taxa exponencial (MARINUS, 1976).

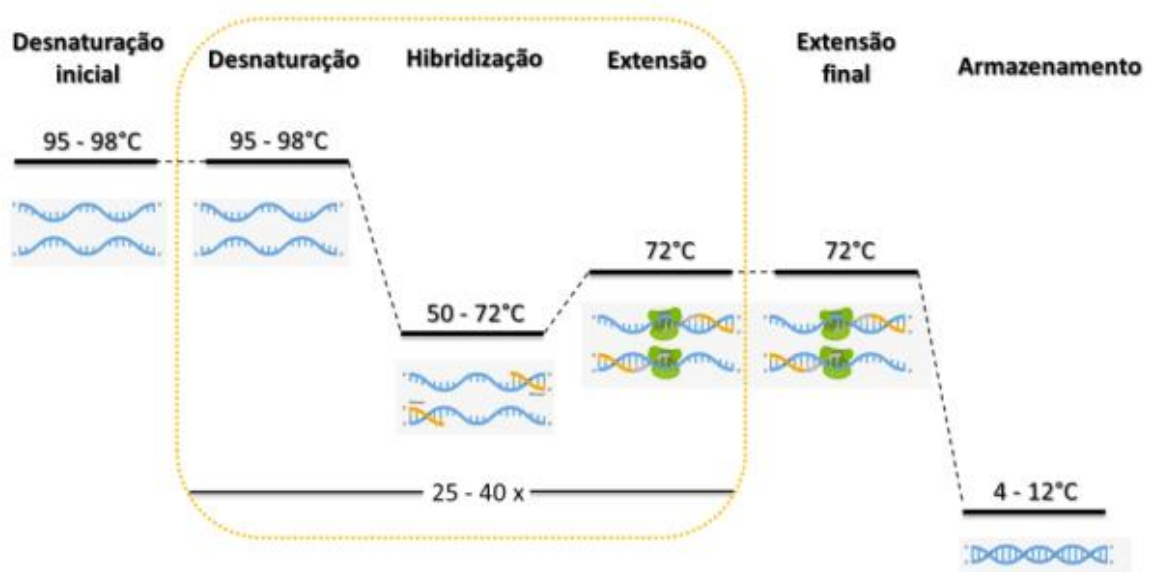


Figura 2: Esquema geral da PCR. O DNA molde é desnaturado em altas temperaturas e tem um iniciador anelado hibridizado com a diminuição de temperatura. Depois disso, a temperatura é ajustada para que a DNA-polimerase estenda o DNA molde (72°C). Após vários ciclos térmicos, o fragmento de DNA de interesse pode ser obtido em grande quantidade. Para melhores resultados, os ciclos de amplificação por PCR são iniciados por uma desnaturação longa e encerrados com a extensão final de qualquer fragmento incompleto. Fonte: Torres (2020).

Após os ciclos da reação, cada molécula de DNA de fita dupla recém-sintetizada (o amplicon) contém sequências terminais que são complementares às sequências dos iniciadores utilizados. Este processo permite que cada amplicon sirva como molde para replicação subsequentes na ciclagem de PCR (JAIN, 2002). Logo após esse processo, as amostras são submetidas a eletroforese em gel de agarose, possibilitando a identificação da presença ou ausência do DNA alvo, com base nas bandas de DNA que são resultado da migração eletroforética comparada com marcadores de peso molecular (DALY et al., 2018).

A reação de PCR pode ser utilizada para a amplificação de um fragmento de DNA específico de algum agente infeccioso, em uma reação enzimática simples, sensível e eficiente para diagnóstico de doenças. O método básico de PCR foi adaptado para expandir sua aplicação. O desenvolvimento da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) possibilitou a detecção e quantificação da sequência alvo em tempo real, enquanto ela está sendo sintetizada. Suas vantagens sobre a PCR convencional incluem a capacidade de visualizar quais reações funcionaram em tempo real sem a necessidade de um gel de agarose, além de permitir uma análise quantitativa e mais sensível (ADAMS, 2020).

Na PCR em tempo real, a quantificação da amplificação dos ácidos nucleicos ocorre por meio da emissão e captação de fluorescência que é propagada durante a ciclagem. A emissão da fluorescência gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. A qPCR requer um termociclador com sistema ótico para a excitação e captação da fluorescência, além de um computador com programas específicos e compatíveis com o sistema para análise final da reação (NOVAIS & ALVES, 2004).

Existem dois tipos de sistemas principais de fluorescências, o SYBR Green e as sondas TaqMan (Figura 3). O SYBR Green se intercala com a molécula de dupla fita amplificada e o sistema TaqMan consiste em uma sonda específica associada a um fluoróforo em uma das extremidades e na outra uma molécula *quencher*. Quando a enzima Taq DNA-polimerase encontra a sonda TaqMan, ela desloca e cliva o repórter 5'. Uma vez que o corante repórter foi separado do corante supressor (*quencher*), seu sinal fluorescente é mensurável no final de cada ciclo de qPCR e aumenta significativamente, sendo assim, durante a amplificação a luz é captada pelo aparelho. A medida que ocorre a reação, é gerada uma curva de amplificação (VALONES et al., 2009; ARYA et al., 2005).

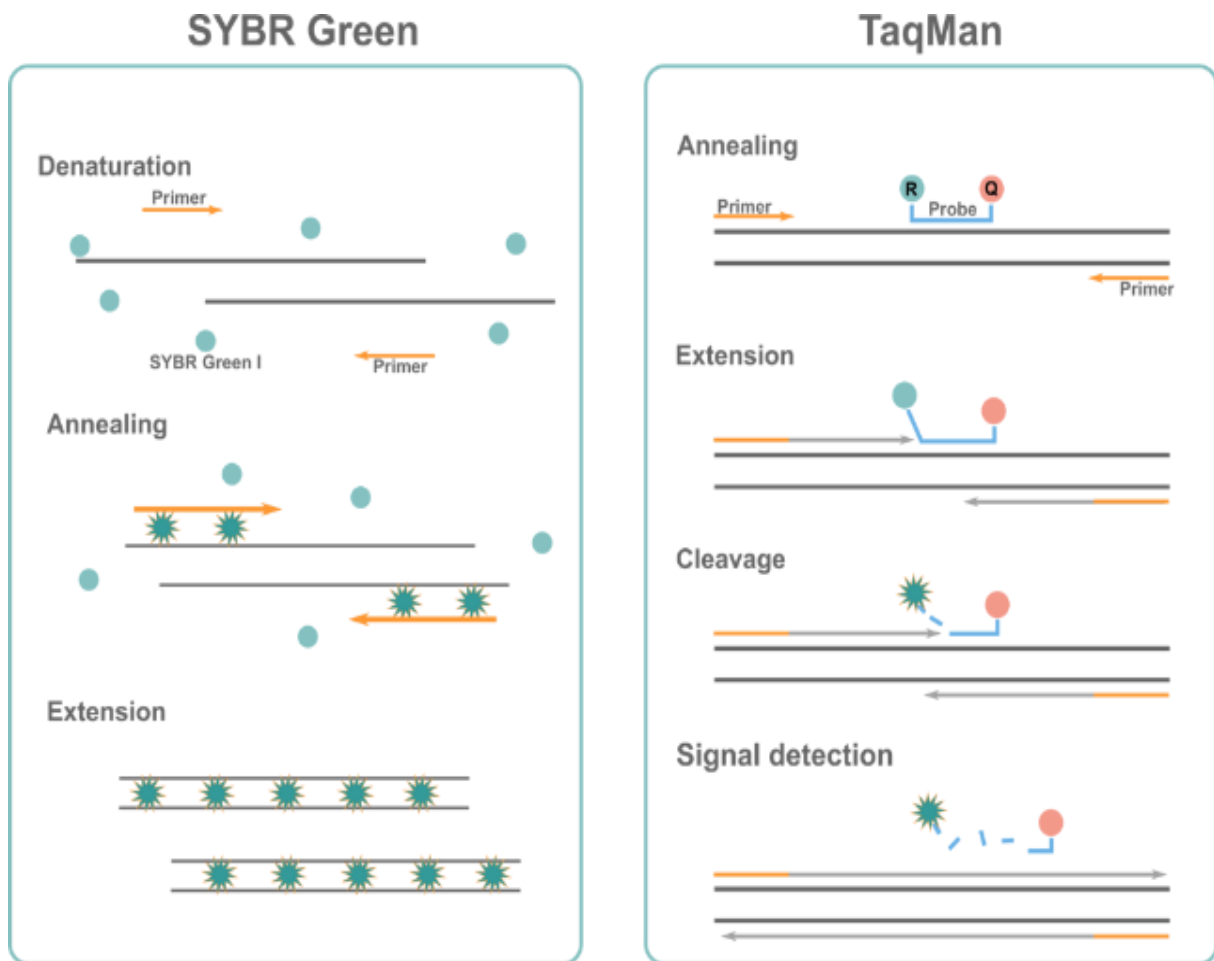


Figura 3: Comparação entre o sistema de detecção SYBR Green e sondas TaqMan. Fonte: Integra BioSciences (2022). Link de acesso: <https://www.integrabiosciences.com/japan/en/blog/article/qpcr-how-sybr-green-and-taqman-real-time-pcr-assays-work>

Outra variação é a reação em cadeia da polimerase acoplada a transcrição reversa (RT-PCR) (Figura 4), técnica usada para detectar e quantificar RNA, onde o RNA é sintetizado em cDNA (DNA complementar), servindo como molde para a amplificação (JALALI et al., 2017). A RT-PCR também pode estar acoplada à qPCR, denominada RT-qPCR, permitindo a análise e quantificação de RNA.

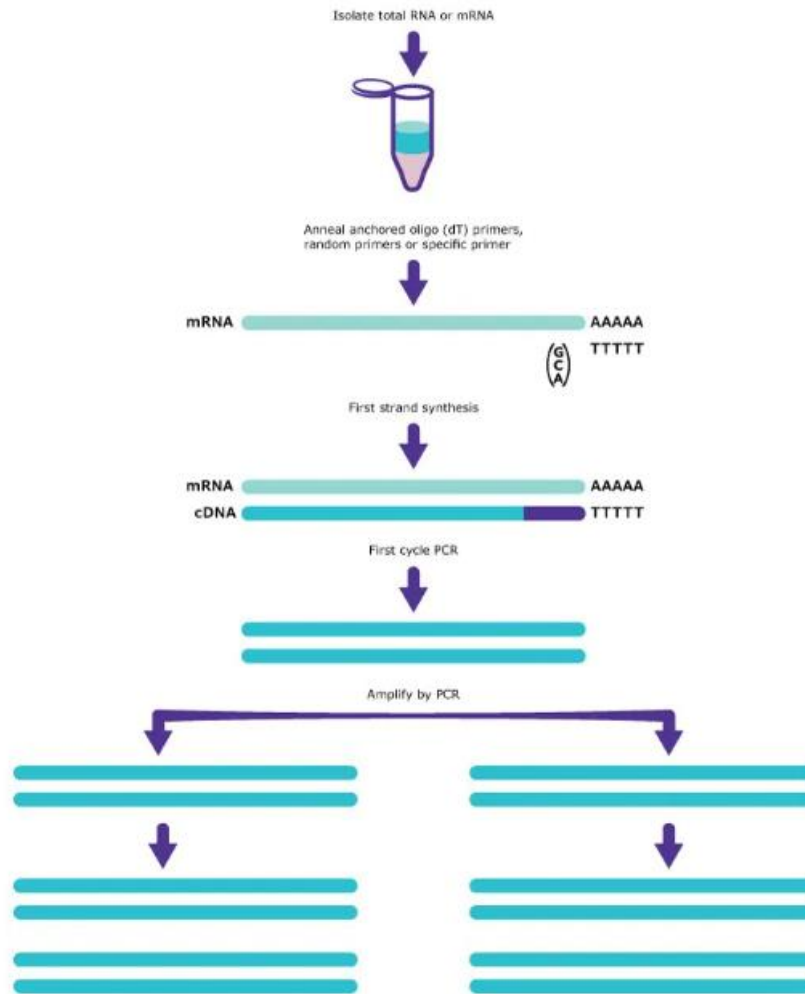


Figura 4: Esquema da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR). No RT-PCR, usa-se a transcriptase reversa, a amostra de RNA, iniciadores, dNTPs, tampão de reação, inibidor de ribonuclease e DTT (Dithiothreitol), além dos reagentes de PCR padrão. A mistura de reação é aquecida permitindo a produção de cópias de DNA complementares (cDNA) através da atividade da transcriptase reversa. Em seguida, na reação de amplificação, esse cDNA é hibridizado com os primers, levando à síntese da primeira fita, e seguido pela PCR padrão. Fonte: Sigma (2022). Link de acesso: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/genomics/pcr>

Essas técnicas e suas aplicações transformaram a pesquisa na área da biotecnologia e do diagnóstico molecular, pois conseguem detectar o ácido nucleico (DNA ou RNA) dos patógenos causadores de doenças (ADAMS, 2020). Em diagnósticos clínicos, a PCR é utilizada para amplificar regiões específicas dos ácidos nucleicos dos patógenos a partir de amostras de pacientes. Nesses casos, a amplificação positiva indica a presença do patógeno, através do seu material genômico nas amostras do paciente, como ocorre em testes de RT-PCR para os coronavírus, em especial SARS-CoV-2 (VALONES et al., 2009; KAMEDA,

2021). Como exemplo da importância clínica da PCR, desde 2014 as bolsas de sangue nos hemocentros do Brasil passam pelo teste do ácido nucleico para a detecção dos vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) e hepatite C no sangue do doador e, só após, são liberados ou não para transfusões sanguíneas (BRASIL, 2013).

1.3 Amplificação Isotérmica do DNA

Métodos alternativos de amplificação de ácidos nucleicos podem ser utilizados visando um diagnóstico molecular acurado, potencialmente rápido e com baixo custo-benefício. Os métodos de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos são mais simplificados por não necessitarem de termocicladores, podendo ser realizados em equipamentos de baixo custo, como um banho-maria, com um tempo de reação que varia de 15 a 60 minutos, além de possuir uma detecção visual através da adição de corantes fluorescentes (Figura 5) (WANG et al., 2013; NEVES et al., 2022).

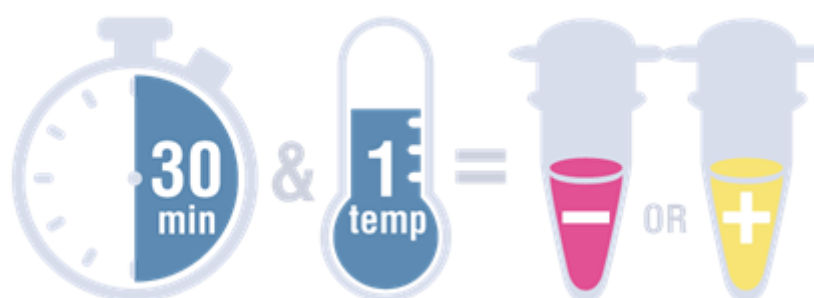


Figura 5: Esquema das principais vantagens do LAMP. A reação de LAMP pode ser realizada em um curto tempo, a uma única temperatura e com detecção visual, por exemplo, a detecção colorimétrica. Fonte: Uniscience (2022). Link de acesso: <https://www.uniscience.com.br/ensaio-de-lamp-colorimetrico-para-sars-cov-2-96-reacoes/p>

A técnica de amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP, do inglês *Loop-mediated isothermal amplification*) foi descrita por NOTOMI et al. (2000). A LAMP utiliza três pares de *primers* diferentes, sendo dois *primers* internos (Forward Internal Primer - FIP e Backward Internal Primer - BIP), dois *primers* externos (Forward Outer Primer - F3 e Backward Outer Primer - B3) e dois *primers* que anelam no loop (Forward Loop Primer - FLP, Backward Loop Primer - BLP), desenhados para amplificar regiões específicas do gene alvo (PERIDA et al., 2008). A enzima utilizada para a amplificação nesta técnica é a Bst

DNA-polimerase, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus* e que possui temperatura ótima de atividade em torno de 65°C (NJIRU, 2012).

Na PCR, as amostras biológicas que serão analisadas precisam ser processadas, ou seja, a extração de DNA é indispensável, pois alguns inibidores da própria amostra podem interferir na reação (KANEKO et al., 2007). Já na LAMP, as amostras podem ser parcialmente processadas ou até mesmo não processadas, reduzindo o tempo e custos para a LAMP (NJIRU, 2012). A LAMP ocorre em uma temperatura constante que varia de 60°C a 65°C dividida em duas etapas de amplificação: a etapa cíclica e a etapa não cíclica (PERIDA et al., 2008).

Na etapa não cíclica, a Bst DNA-polimerase na presença dos *primers* internos e externos produz um DNA de fita simples. Primeiramente, a Bst DNA-polimerase separa a dupla fita do DNA molde e o *primer* FIP hibridiza na região F2 da extremidade 3', iniciando assim a síntese de uma nova fita de DNA. A fita complementar ligada ao FIP é então liberada como fita simples devido ao deslocamento da próxima fita de DNA pelo *primer* F3 complementar a região F3c da extremidade 3'. A fita simples liberada forma uma alça devido à presença das regiões complementares F1c e F1. Então, este DNA de cadeia simples torna-se um molde para a síntese de DNA iniciada por BIP na extremidade 5', o qual faz uma da nova fita linear ao desfazer a alça formada pelo FIP. Subsequentemente o *primer* B3, complementar a região B3c, descola a fita originada por BIP e libera uma estrutura de DNA com alças nas extremidades que a torna semelhante a um "haltere" e que servirá como estrutura de partida para amplificação exponencial na etapa cíclica (Figura 6) (RIBEIRO et al., 2022; NOTOMI et al., 2000; PARIDA et al., 2008).

A etapa cíclica também pode ser designada de etapa de amplificação. Diferente da etapa anterior em que são utilizados quatro *primers*, nesta etapa são utilizados dois *primers* para reconhecer e se anelar a quatro regiões distintas do DNA. Inicialmente, FIP se liga a região F1 e F2c e com o auxílio da Bst DNA-polimerase, sintetiza uma nova fita. A nova fita gerada é amplificada na outra extremidade do haltere (B1 e B1c sendo complementares). Em seguida, são liberadas duas estruturas que serão reconhecidas pelo *primer* BIP através da extremidade B2c e B1 em forma de alça. Uma das estruturas irá produzir sequências que farão parte da amplificação cíclica (Figura 6) (RIBEIRO et al., 2022; NOTOMI et al., 2000; PARIDA et al., 2008).

Após a amplificação, o resultado pode ser observado no próprio tubo, dispensando o uso da eletroforese em gel de agarose, necessário para detectar os produtos da PCR convencional (KHAN et al., 2012). Os produtos do LAMP podem ser detectados visualmente pela turvação, fluorescência e alteração de cor dos produtos amplificados (SRIWORARAT et al., 2015). Adicionalmente, para observação destes resultados através da fluorescência, podem ser utilizados os corantes, como o SYBR Green, que é um reagente que possui relativamente um baixo custo, e que potencializa a observação do resultado da amplificação da amostra (PARIDA et al., 2008).

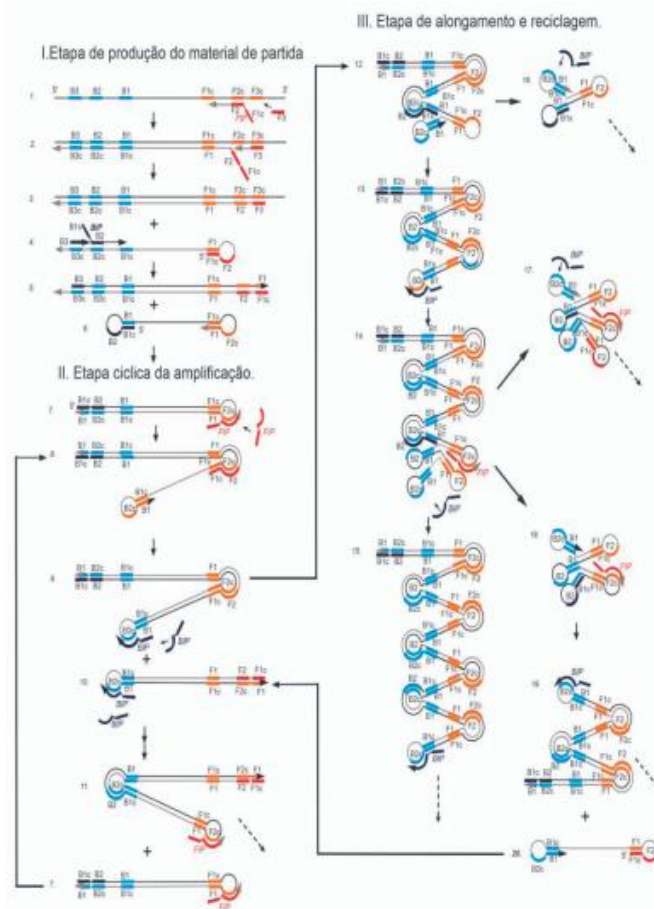


Figura 6: Esquema geral da reação de LAMP. Etapa cíclica e não cíclica da amplificação por LAMP. Para a LAMP, além dos *primers* e DNA molde, é necessário o MgSO₄ que é o cofator da enzima Bst DNA-polimerase, dNTPs e tampão de reação 10x. Fonte: Notomi et al. (2000).

A LAMP é uma ferramenta simples e prática para detecção e identificação de patógenos. Considerando as vantagens da rápida amplificação, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e fácil detecção, além de ser altamente específica, o LAMP tem aplicações

potenciais para diagnóstico clínico, assim como para vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento (MORI & NOTOMI, 2009; PARIDA et al., 2008).

Para maior aplicação da técnica, a reação foi estendida para diagnóstico de RNA e, para isso, foi desenvolvido o LAMP associado à transcrição reversa (RT-LAMP). A transcriptase reversa faz a síntese de cDNA que será usado para amplificação na técnica de LAMP. Este procedimento forneceu um amplo e novo panorama na detecção de uma infinidade de vírus de RNA (RIBEIRO et al., 2022). Na atual pandemia da COVID-19, o método RT-LAMP foi utilizado para detecção do RNA do SARS-CoV-2, promovendo uma triagem rápida e em larga escala dos casos (THOMPSON & LEI, 2020).

1.4 Enzimas utilizadas na amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*

1.4.1 DNA-polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq DNA-polimerase)

A enzima Taq DNA-polimerase foi isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* descoberta na década de 1960 através de investigações em um parque de fontes termais de Yellowstone, nos Estados Unidos (EOM & STEITZ, 1996). Já a enzima foi descrita entre 1970 e 1980 e, desde então, vem sendo utilizada na amplificação de DNA pela PCR, devido a sua característica de ser termoestável a temperaturas de até 94 °C, com temperatura ótima de 72 °C – 80 °C, e uma meia vida enzimática de aproximadamente 40 minutos a 94 °C (CHEIN et al., 1976; HO et al., 2004; MURALI et al., 1998).

A Taq recombinante consiste de um polipeptídeo com ~ 94 kDa, expresso a partir do gene da DNA-polimerase de *Thermus aquaticus* clonado em um vetor de expressão. A enzima sintetiza DNA a partir de um molde fita única na presença de iniciadores 5' Forward e iniciadores 3' Reverse (CHEIN et al., 1976).

A Taq DNA polimerase (Figura 7) possui dois domínios distintos: um domínio N-terminal (5'- nuclease) que possui atividade de nuclease de fita simples para remover iniciadores de RNA ou nucleotídeos de DNA danificados, e um domínio C-terminal (Klentaq) que possui atividade de DNA-polimerase. Portanto, a enzima catalisa a síntese de DNA de 5' - 3', possui atividade de exonuclease 5'- 3' e não possui atividade detectável e/ou conhecida de exonuclease 3'- 5' (atividade de revisão) (HO et al., 2004).



Figura 7: Estrutura da enzima Taq DNA-polimerase. Os subdomínios palma, dedos e polegar estão representados em vermelho, amarelo e verde, respectivamente. O domínio exonuclease 5'-3' é mostrado em azul escuro e o domínio 3'-5' exonuclease degenerado é mostrado em azul claro. A molécula de DNA ligada é apresentada em laranja. Fonte: Adaptado de Ho et al. (2004).

Devido alta demanda por Taq DNA polimerase em protocolos de amplificação de DNA, a sua produção por meio de expressão recombinante em *E. coli* se tornou algo corriqueiro e vantajoso na área da biotecnologia.

1.4.2 DNA-polimerase de *Bacillus stearothermophilus* (Bst DNA-polimerase)

A Bst DNA-polimerase (Figura 8) é a enzima empregada na amplificação de DNA pela técnica de LAMP. Foi isolada em 1968 da bactéria termofílica *Bacillus stearothermophilus* que se multiplica entre 39°C e 70°C (STENESH et al., 1968).

Assim como a Taq, a Bst possui alta sensibilidade e é termoestável, se tornando muito útil para reações de LAMP realizadas geralmente a 65 °C, e caracterizada pela utilização de quatro a seis iniciadores diferentes, especialmente desenhados para amplificar de seis a oito regiões distintas de uma sequência alvo de DNA. A enzima é composta por três domínios: domínio de atividade exonuclease 5' – 3', atividade de polimerização no sentido 5' – 3' e atividade exonuclease 3' – 5'. Os domínios II e III estão na porção C-terminal da Bst DNA-

polimerase, respectivamente denominado de fragmento grande (LF, do inglês *Large Fragment*) (MA et al., 2016).

Em específico, a Bst-LF (Large Fragment Bst DNA Pol) é um polipeptídeo de ~ 67,6 kDa, apresentando uma atividade de deslocamento e liberação da fita simples de DNA, que é essencial para a reação e LAMP (TOMITA et al., 2008).



Figura 8: Estrutura da Bst DNA-polimerase. Fragmento grande da DNA-polimerase I de *Bacillus stearothermophilus* em verde, com molde de DNA na cor laranja e roxo. Fonte: Adaptado de Invitrogen (2022).

Vale ressaltar que a Bst DNA-polimerase é comercializada por um preço elevado (\$ 230.00 dólares /1,600 U. Fonte: SBS Genetech Co Ltd., 2022) além de ser comercializado por poucas empresas. Sendo assim, é urgente a expressão e produção da Bst para atender a demanda científica e de diagnóstico molecular (MA et al., 2016).

1.4.3 Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MMLV-RT)

As Transcriptases Reversas (RT) são enzimas capazes de produzir DNA complementar (cDNA) a partir de RNA, sendo a MMLV-RT uma das primeiras transcriptase reversas a serem produzidas e comercializadas, possuindo alta fidelidade e eficiência (MOHR et al., 2013).

A enzima MMLV-RT (Figura 9) é um polipeptídeo de ~ 76 kDa, possuindo dois principais domínios: um de polimerase e outro de ribonuclease H (RNase H). O domínio de polimerase possui duas atividades catalíticas, compreendendo a síntese de DNA dependente de RNA e a síntese de DNA dependente de DNA (OSCORBIN & FILIPENKO, 2021). A temperatura ideal de reação de síntese de cDNA é de ~ 65°C.

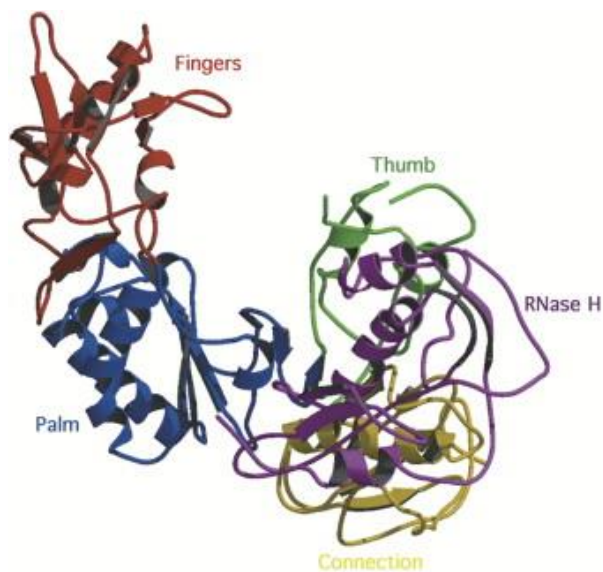


Figura 9: Estrutura da MMLV-RT. A MMLV RT é mostrada com o domínio dos dedos em vermelho, palma em azul, polegar em verde, conexão em amarelo e a RNase H em magenta. Fonte: Adaptado de Ooscorbin & Filipenko (2021).

Como mostrado na Figura 9, o sítio ativo da enzima para ação de DNA polimerase está no domínio dedos/palma/polegar, e o da ação RNase H está no domínio RNase H. O domínio RNase H é responsável pela hidrólise da porção de RNA dos híbridos RNA-DNA, e esta atividade requer a presença de cátions bivalentes (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) que se ligam ao seu sítio ativo. Para sua utilização na síntese de cDNA *in vitro*, a enzima MMLV-RT pode ser alvo de mutação no domínio de RNase H melhorando a estabilidade térmica da enzima em ensaios moleculares (MIZUNO et al., 2010).

1.5 Produção de insumos para uso em ensaios de amplificação de ácidos nucleicos

O desenvolvimento do DNA recombinante possibilitou uma nova era para produção de proteína, tanto para aplicações em pesquisa quanto para a indústria e diagnóstico. Uma característica importante dessa abordagem é a capacidade de expressar proteínas em bactérias como, por exemplo, utilizar *E. coli* como “fábricas” de proteínas, onde o microrganismo hospedeiro é modificado geneticamente para levar a expressão do produto de interesse (SANCHEZ et al., 2016).

Atualmente, existem variados sistemas de expressão que podem ser utilizados na produção de proteínas recombinantes, como células de mamíferos, leveduras, destacando *Saccharomyces cerevisiae*, células de inseto e bactérias. Segundo RADER (2008), dentre os hospedeiros utilizados na expressão de proteínas nos Estados Unidos e Europa, cerca de 40% compreendem bactérias, onde a maioria são linhagens da bactéria gram-negativa *E. coli*, que são escolhidas e selecionadas conforme padronização da expressão.

Como mencionado anteriormente, *E. coli* é a hospedeira mais utilizada para expressão de proteínas, devido a seu rápido crescimento em meio de baixo custo, com tempo de duplicação de aproximadamente 20 minutos, por sua genética ser bem caracterizada o que a torna hospedeira de fácil manipulação, e por possuir um grande número de linhagens mutantes disponíveis (Tabela 1), além da transformação em *E. coli* poder ser realizada em apenas 5 minutos (PETI & PAGE, 2007; SAHDEV et al., 2008). Definir a escolha do sistema de expressão, baseia-se no ponto em que condições para a produção de um determinado produto gênico podem não funcionar para outro produto gênico, sendo assim, diversas condições são testadas para otimizar o processo de expressão, entre elas a escolha bactéria e qual a sua linhagem, para assim obter alto rendimento da proteína desejada (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Alguns fatores podem afetar a expressão heteróloga em *E. coli*, como características da sequência de DNA exógena, a estabilidade e eficiência da tradução do mRNA (RNA mensageiro), a capacidade de enovelamento da proteína, formação de corpos de inclusão, a degradação da proteína por proteases celulares, a diferença do uso de códons entre organismos e a possível toxicidade da proteína produzida a bactéria hospedeiro (MAKRIDES, 1996; ROSANO & CECCARELLI, 2014). Diversas linhagens de *E. coli* já

foram modificadas, dando origem a novas características que beneficiam a produção de proteínas recombinantes, como as linhagens BL21 (DE3), que são deficientes em proteases, o que confere maior estabilidade para as proteínas heterólogas (CHEN, 2012; ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Tabela 1. Linhagens mutantes de *E. coli* e suas características.

Linhagem <i>E. coli</i>	Fonte	Resistência	Característica
BL21(DE3)	Agilent Technologies	Nenhum antibiótico	Linhagem de expressão.
BL21(DE3) Star	Life Technologies	Nenhum antibiótico	Possui mutação na RNase E para melhorar a estabilidade dos transcritos de mRNA.
BL21 Códon Plus (DE3) RP	Agilent Technologies	Cloranfenicol	Contém tRNAs para os códons raros Arg (AGA, AGG) e Pro (CCC) que muitas vezes restringem a tradução de genes ricos em GC.
BL21 Códon Plus (DE3) RIL	Agilent Technologies	Cloranfenicol	Contém tRNAs para os códons raros Arg (AGA, AGG), Ile (AUA) e Leu (CUA) que muitas vezes restringem a tradução de genomas ricos em AT.
Rosetta2 (DE3)	EMD Millipore/Novagen	Cloranfenicol	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raramente usados em <i>E. coli</i> . Contém tRNAs para 7 códons raros (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, CGG).

Fonte: Adaptado de Universidade Vanderbilt, EUA (2022). Acesso em: <https://www.vanderbilt.edu/csb/facilities/protein-characterization/e-coli-strains/>

Além da linhagem, a escolha do vetor é crucial. Segundo JIA & JEON (2016) para a escolha do vetor de expressão ideal para o sistema de *E. coli* deve-se considerar o marcador de seleção, como a resistência a antibióticos, a origem de replicação, um promotor transcricional forte para permitir a concentração da proteína recombinante maior ou igual a 10-30% do total de proteínas celulares, região 5' não traduzida (5' UTR) e local de início da tradução (Figura 10).

O sistema de expressão pET com promotor T7 é o mais utilizado para expressão em *E. coli*, pois permite o acúmulo de até 50% da proteína recombinante em meio intracelular, considerando o total de proteínas celulares. As cepas de *E. coli* DE3 são hospedeiros de expressão do sistema pET, e contém o gene da RNA-polimerase do fago T7 controlado pelo promotor lacUV5. Quando o cultivo celular é induzido por IPTG, a ligação de Lac I ao operador *lac* é inibida, permitindo a expressão da RNA-polimerase de T7, a qual transcreve o gene alvo e leva à produção de proteína recombinante (GRASLUND et al., 2008; STUDIER, 1986).

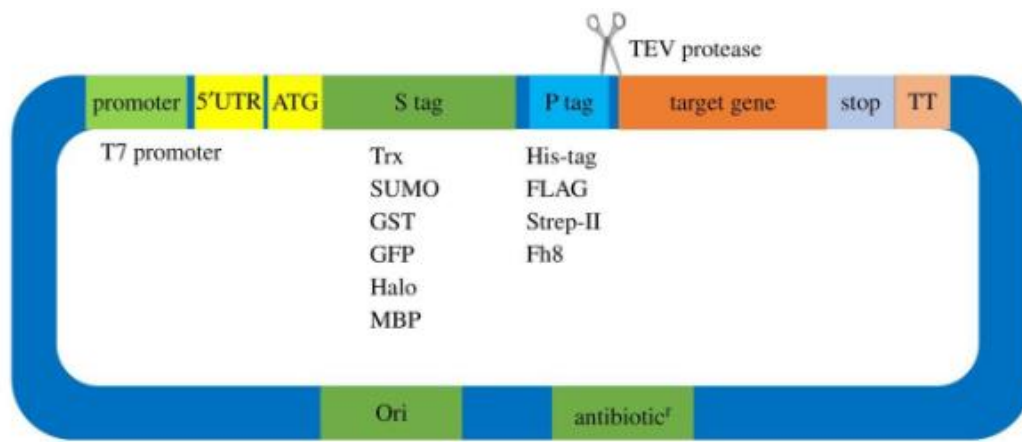


Figura 10: Representação esquemática de vetor pET para expressão de proteínas citoplasmáticas de alto rendimento em *E. coli*. O promotor T7 é usado para controlar a expressão da proteína na célula bacteriana. O ensaio de alto rendimento requer tags de afinidade em tandem. A protease TEV pode ser usada para remover as tags. Tag P: Tag de purificação; Tag S: Tag de solubilidade e de início da tradução; TT: Terminador de Transcrição; 5'UTR: região 5' não traduzida. Fonte: Adaptado de Jia & Jeon (2016).

Além dessas variáveis, para se obter bons rendimentos proteicos, deve-se considerar a concentração da molécula indutora, uma vez que altas concentrações de IPTG nem sempre levam a expressão máxima da proteína, podendo levar a um início precoce da fase estacionária, além de poder induzir muitas proteases levando à degradação proteolítica da proteína recombinante. Portanto, é necessário padronizar a concentração da molécula indutora a fim de obter bons rendimentos, considerando que o IPTG não é metabolizado dentro das células e que a sua concentração permanece a mesma durante todo o experimento (GLICK, 1995; WOOD & PERETTI, 2012; RIZKIA et al., 2015).

A temperatura também tem efeitos significativos no crescimento da linhagem de *E. coli* e na expressão de proteínas. Em temperaturas elevadas, a proteína recombinante pode sofrer degradação proteolítica e desnaturação pelo calor, ficando acumulada como corpos de inclusão no citoplasma, sendo assim, temperaturas padronizadas, previnem a degradação proteolítica, melhoram a estabilidade e permitem o dobramento correto da proteína, além de reduzir a superexpressão massiva (IFTICHAR, 2021). O tempo de indução deve ser otimizado de tal forma que não ocorra a expressão precoce da proteína e que garanta uma máxima expressão em razão do crescimento celular e disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo (GLICK, 2016; IFTICHAR, 2021).

Em alternativa a molécula indutora IPTG, pode-se induzir a expressão em meios de cultivo contendo glicose e lactose. A glicose é usada preferencialmente como fonte de carbono, e a lactose só é utilizada pelas células para induzir o promotor *lac* quando a glicose está esgotada, sendo necessário que as bactérias tenham um nível basal de atividade de β -galactosidases para usar a lactose como indutor (ZAHA et al., 2014; IFTICHAR, 2021). A lactose é tão eficiente quando o IPTG para a indução do promotor *lac*, e meios de cultivo de autoindução contendo quantidades padronizadas de glicose e lactose são promissores para a expressão de proteínas (IFTICHAR, 2021).

Nesse contexto, a utilização de *E. coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes já é bem estabelecido, sendo necessário adaptar os parâmetros de tempo, meio de cultivo, molécula indutora, densidade ótica e linhagem, para assim, padronizar a expressão da proteína de interesse garantindo que se tenha rendimentos máximos de uma proteína funcional, além da sua solubilidade, quando desejado.

Após a otimização da expressão das proteínas de interesse, a aplicabilidade desse produto proteico em processos biotecnológicos, como a utilização de proteínas recombinantes em ensaios e diagnósticos moleculares, é substancialmente importante. Porém, a purificação de enzimas recombinantes, como aquelas utilizadas em NAATs, é um processo complexo e que necessita de investimentos, equipamentos, infraestrutura e pessoal treinado. Além disso, esses insumos precisam de uma cadeia fria de armazenamento e transporte. Nesse cenário de alto investimento, esses insumos se tornam limitantes, o que pode inviabilizar a realização dos NAATs em países em desenvolvimento ou de baixa renda. Portanto, para melhorar a acessibilidade e a aplicação desses insumos proteicos, tem-se a

necessidade de desenvolver metodologias alternativas que simplifiquem a sua produção, eliminando a etapa de purificação e tornando-os estáveis a temperatura ambiente (BHADRA et al., 2018; MAGNO et al., 2020).

1.6 Metodologias alternativas para a produção de insumos a baixo custo para os NAATs

Embora as estratégias de clonagem e expressão de um gene sejam bem compreendidas e viáveis, a purificação da proteína em máximo rendimento e pureza é uma abordagem que requer infraestrutura especializada, experiência e equipamentos de alto custo (GUAN & CHEN, 2014; GO et al., 2016; BHADRA et al., 2018), além de serem realizadas principalmente em escala industrial (BHADRA et al., 2018).

A purificação de proteínas requer procedimentos complexos para lisar as bactérias e separar a proteína de interesse de todos os componentes celulares indesejados, usando um conjunto de tampões e resina cromatográfica de alto custo (GUAN & CHEN, 2014; JOSHI & JAIN, 2017). Geralmente, a purificação ocorre por meio de ligantes de alta afinidade que estão anexados como “tags” na proteína de interesse, as quais são usadas na separação cromatográfica e podem ser removidas após o procedimento, o que demanda tempo, investimento, infraestrutura, além poder ocorrer perda do rendimento proteico na etapa de purificação (ARNAU et al., 2006; MITAL et al., 2021; JOSHI & JAIN, 2017). Além desses procedimentos, a proteína de interesse deve ser manipulada e mantida em um sistema refrigerado, variando de 4°C a – 80°C, o que aumenta ainda mais o custo da purificação, armazenamento e transporte da proteína (BHADRA et al., 2018).

Com isso, os insumos proteicos podem ser de limitado acesso e os setores laboratoriais, tanto clínicos quanto de pesquisa, podem ficar com baixo volume de reagentes, justificado pela limitação de recursos, por não possuírem estrutura adequada para armazenamento e manipulação dos insumos purificados, além da competitividade internacional pela cadeia de suprimentos (LOAN et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Como alternativa viável e eficaz para aumentar a acessibilidade às enzimas recombinantes para NAATs para a pesquisa e diagnóstico, a simplificação da produção eliminando as etapas de purificação, minimiza os custos de produção tornando os insumos mais acessíveis aos laboratórios. Estudos recentes demonstraram que células e extratos de

bactérias expressando enzimas recombinantes podem ser utilizados diretamente em reações de amplificação de ácidos nucleicos em substituição às enzimas purificadas ou comercialmente disponíveis (BHADRA et al., 2018; LOAN et al., 2019). Esses insumos possuem produção, transporte e armazenamento simplificados, alto rendimento (10⁶ reações de PCR por litro de cultivo), além de serem estáveis a temperatura ambiente, pois podem ser liofilizados (LOAN et al., 2019).

A utilização desses insumos liofilizados em laboratórios clínicos e de pesquisa, pode maximizar resultados experimentais e de diagnóstico, justificado pelo baixo custo de produção e aquisição, viabilidade e facilidade de transporte, proporcionando assim que mais testes de amplificação de ácidos nucleicos sejam realizados.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral:

Produção de insumos simplificados baseados em bactérias recombinantes para uso em biologia molecular.

2.2 Objetivos específicos:

- I.** Otimização das condições de expressão das enzimas DNA-polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq) e de *Bacillus stearothermophilus* (Bst) e a transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV-RT) em *E. coli*;
- II.** Padronização de ensaios de PCR, RT-PCR e LAMP utilizando os insumos baseados em células e/ou extratos de bactérias recombinantes;
- III.** Avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes moleculares com insumos baseados em extratos brutos de bactérias em comparação com as enzimas purificadas e/ou comercialmente disponíveis;
- IV.** Avaliação da estabilidade dos insumos baseados em bactérias recombinantes.

7. Referências bibliográficas:

Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Apr;82(4):591-6. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0369.

Agustriana E, Nuryana I, Laksmi FA, Dewi KS, Wijaya H, Rahmani N, Yudiargo DR, Ismadara A, Helbert, Hadi MI, Purnawan A, Cameliawati Djohan A. Optimized expression of large fragment DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* expression system. *Prep Biochem Biotechnol.* 2022 Jul 6:1-10. doi: 10.1080/10826068.2022.2095573.

Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 2006 Jul;48(1):1-13. doi: 10.1016/j.pep.2005.12.002.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Mar;5(2):209-19. doi: 10.1586/14737159.5.2.209.

Basha IHK, Ho ETW, Yousuff CM, Hamid NHB. Towards Multiplex Molecular Diagnosis-A Review of Microfluidic Genomics Technologies. *Micromachines (Basel).* 2017 Aug 30;8(9):266. doi: 10.3390/mi8090266.

Bhadra S, Pothukuchy A, Shroff R, Cole AW, Byrom M, Ellefson JW, Gollihar JD, Ellington AD. Cellular reagents for diagnostics and synthetic biology. *PLoS One.* 2018 Aug 15;13(8):e0201681. doi: 10.1371/journal.pone.0201681.

Bhadra S, Riedel TE, Lakhota S, Tran ND, Ellington AD. High-Surety Isothermal Amplification and Detection of SARS-CoV-2. *mSphere.* 2021;6(3):e00911-20. Published 2021 May 19. doi:10.1128/mSphere.00911-20.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria No 1353, DE 13 DE JUNHO DE 2011. Aprova o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: https://www.bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt1353_13_06_2011.html/. Acesso em: 23 out 2022.

Burdukiewicz M, Spiess AN, Blagodatskikh KA, Lehmann W, Schierack P, Rödiger S. Algorithms for automated detection of hook effect-bearing amplification curves. *Biomol Detect Quantif.* 2018 Oct 16;16:1-4. doi: 10.1016/j.bdq.2018.08.001.

Calos MP. DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature.* 1978 Aug 24;274(5673):762-5. doi: 10.1038/274762a0.

Cantera JL, White H, Diaz MH, Beall SG, Winchell JM, Lillis L, Kalnoky M, Gallarda J, Boyle DS. Assessment of eight nucleic acid amplification technologies for potential use to detect infectious agents in low-resource settings. *PLoS One.* 2019 Apr 22;14(4):e0215756. doi: 10.1371/journal.pone.0215756.

Center for Disease Control and Prevention, CDC (2021). Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs). Available in: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/naats.html>

Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(11):2377-2381. doi:10.1093/nar/29.11.2377

Chen D, Mauk M, Qiu X, Liu C, Kim J, Ramprasad S, Ongagna S, Abrams WR, Malamud D, Corstjens PL, Bau HH. An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids. *Biomed Microdevices.* 2010 Aug;12(4):705-19. doi: 10.1007/s10544-010-9423-4.

Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv.* 2012 Sep-Oct;30(5):1102-7. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.

Chen Y, Xu W, Sun Q. A novel and simple method for high-level production of reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 2009 Jul;31(7):1051-7. doi: 10.1007/s10529-009-9977-5.

Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976 Sep;127(3):1550-7. doi: 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976.

Czilwik G, Messinger T, Strohmeier O, Wadle S, von Stetten F, Paust N, Roth G, Zengerle R, Saarinen P, Niittymäki J, McAllister K, Sheils O, O'Leary J, Mark D. Rapid and fully automated bacterial pathogen detection on a centrifugal-microfluidic LabDisk using highly sensitive nested PCR with integrated sample preparation. *Lab Chip.* 2015;15(18):3749-59. doi: 10.1039/c5lc00591d.

Daegelen P, Studier FW, Lenski RE, Cure S, Kim JF. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *J Mol Biol.* 2009;394(4):634-643. doi:10.1016/j.jmb.2009.09.022

Daly M, Ansari P, Häubl G, Rogers A, Brunner K. Assessing Almond and Peanut Allergens Using Commercially Available Immunoanalytical Kits and LC-MS/MS: A Case Study. *J AOAC Int.* 2018;101(1):96-101. doi:10.5740/jaoacint.17-0398

Desai UJ, Pfaffle PK. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechniques.* 1995;19(5):780-784.

Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* 1990;191(2):396-400. doi:10.1016/0003-2697(90)90238-5.

Eom SH, Wang J, Steitz TA. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature.* 1996;382(6588):278-281. doi:10.1038/382278a0

Estrela PFN, Mendes GM, de Oliveira KG, et al. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *J Virol Methods.* 2019;271:113675. doi:10.1016/j.jviromet.2019.113675

Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med.* 2016;374(7):601-604. doi:10.1056/NEJMp1600297

Gelfand DH, White TJ. Thermostable DNA polymerases. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (ed. Innes MA, et al.). 1990:121-141. Academic Press, San Diego

Giambernardi TA, Rodeck U, Klebe RJ. Bovine serum albumin reverses inhibition of RT-PCR by melanin. *Biotechniques*. 1998;25(4):564-566. doi:10.2144/98254bm03

Glick BR. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv*. 1995;13(2):247-261. doi:10.1016/0734-9750(95)00004-a

Go HC, Sobota RM, Ghadessy FJ, Nirantar S. Going native: Complete removal of protein purification affinity tags by simple modification of existing tags and proteases. *Protein Expr Purif*. 2016;129:18-24. doi:10.1016/j.pep.2016.09.001

Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büsow K, Gunsalus KC (2008). Protein production and purification. *Nat Methods*. 5 (2) :135-46. doi: 10.1038/nmeth.f.202.

Guan D, Chen Z. Challenges and recent advances in affinity purification of tag-free proteins. *Biotechnol Lett*. 2014;36(7):1391-1406. doi:10.1007/s10529-014-1509-2

Ho DL, Byrnes WM, Ma WP, Shi Y, Callaway DJ, Bu Z. Structure-specific DNA-induced conformational changes in Taq polymerase revealed by small angle neutron scattering. *J Biol Chem*. 2004;279(37):39146-39154. doi:10.1074/jbc.M404565200

Huang WH, Zhai F, Hong GF. Cloning, Expression, Characterization and Application of Bst DNA Polymerase Large Fragment. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 1999;31(4):379-384.

Iftikhar, A. Expression of Foreign Proteins in *Escherichia coli*. PREPRINT (Version 1) available at Research Square (2021) [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-274367/v1>].

Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol*. 2002;13(9):14-18.

Jalali M, Justyna Z, and Morteza J. The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. *Basic science methods for clinical researchers*. Academic Press. 2017. 1-18.

Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol*. 2016;6(8):160196. doi:10.1098/rsob.160196

Joshi H, Jain V. Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein. *Anal Biochem*. 2017;528:1-6. doi:10.1016/j.ab.2017.04.009

Kameda K, Barbeitas MM, Caetano R, et al. Testing COVID-19 in Brazil: fragmented efforts and challenges to expand diagnostic capacity at the Brazilian Unified National Health

System. Cad Saude Publica. 2021;37(3):e00277420. Published 2021 Apr 7. doi:10.1590/0102-311X00277420

Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods. 2007;70(3):499-501. doi:10.1016/j.jbbm.2006.08.008

Khan MG, Bhaskar KR, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. Parasites & Vectors. 2012;5:280. Published 2012 Dec 3. doi:10.1186/1756-3305-5-280

Loan TD, Easton CJ, Alissandratos A. DNA amplification with in situ nucleoside to dNTP synthesis, using a single recombinant cell lysate of *E. coli*. Sci Rep. 2019;9(1):15621. Published 2019 Oct 30. doi:10.1038/s41598-019-51917-z

Ma Y, Zhang B, Wang M, Ou Y, Wang J, Li S. Enhancement of Polymerase Activity of the Large Fragment in DNA Polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* by Site-Directed Mutagenesis at the Active Site. Biomed Res Int. 2016;2016:2906484. doi:10.1155/2016/2906484

Ma YD, Li KH, Chen YH, et al. A sample-to-answer, portable platform for rapid detection of pathogens with a smartphone interface. Lab Chip. 2019;19(22):3804-3814. doi:10.1039/c9lc00797k

Magno L, Rossi TA, Mendonça-Lima FW, et al. Challenges and proposals for scaling up COVID-19 testing and diagnosis in Brazil. Desafios e propostas para ampliação da testagem e diagnóstico para COVID-19 no Brasil. Cien Saude Colet. 2020;25(9):3355-3364. doi:10.1590/1413-81232020259.17812020

Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev. 1996;60(3):512-538. doi:10.1128/mr.60.3.512-538.1996

Marinus MG. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1976;128(3):853-854. doi:10.1128/jb.128.3.853-854.1976

Mascuch, S.J.; Fakhretaha-Aval, S.; Bowman, J.C.; Ma, M.T.H.; Thomas, G.; Bommarius, B.; Ito, C.; Zhao, L.; Newnam, G.P.; Matange, K.R.; Thapa, H.R.; Barlow, B.; Donegan, R.K.; Nguyen, N.A.; Saccuzzo, E.G.; Obianyor, C.T.; Karunakaran, S.C.; Pollet, P.; RothschildMancinelli, B.; Mestre-Fos, S.; Guth-Metzler, R.; Bryksin, A.V.; Petrov, A.S.; Hazell, M.; Ibberson, C.B.; Penev, P.I.; Mannino, R.G.; Lam, W.A.; Garcia, A.J.; Kubanek, J.; Agarwal, V.; Hud, N.V.; Glass, J.B.; Williams, L.D.; Lieberman, R.L. A blueprint for academic laboratories to produce SARS-CoV-2 quantitative RT-PCR test kits. J Biol Chem. 2020. 295(46):15438-15453. doi: 10.1074/jbc.RA120.015434.

Mavrogiannou E, Strati A, Stathopoulou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Lianidou ES. Real-time RT-PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase splice variants in tumor cell lines and non-small cell lung cancer. Clin Chem. 2007;53(1):53-61. doi:10.1373/clinchem.2006.073015

Mital S, Christie G, Dikicioglu D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing

implications. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):208. Published 2021 Oct 30. doi:10.1186/s12934-021-01698-w

Mizuno M, Yasukawa K, Inouye K. Insight into the mechanism of the stabilization of Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase by eliminating RNase H activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(2):440-442. doi:10.1271/bbb.90777

Moazen F, Rastegari A, Hoseini SM, Panjehpour M, Miroliaei M, Sadeghi HM. Optimization of Taq DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res.* 2012;1:82. doi:10.4103/2277-9175.103004

Moelling K. Characterization of Reverse Transcriptase and RNase H from friend-murine leukemia virus. *Virology.* 1974;62(1):46-59. doi:10.1016/0042-6822(74)90302-x

Mohr S, Ghanem E, Smith W, Sheeter D, Qin Y, King O, Polioudakis D, Iyer VR, Hunicke-Smith S, Swamy S, Kuersten S, Lambowitz AM. Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing. *RNA.* 2013;19(7):958-970. doi:10.1261/rna.039743.113

Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009;15(2):62-69. doi:10.1007/s10156-009-0669-9

Murali R, Sharkey DJ, Daiss JL, Murthy HM. Crystal structure of Taq DNA polymerase in complex with an inhibitory Fab: the Fab is directed against an intermediate in the helix-coil dynamics of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(21):12562-12567. doi:10.1073/pnas.95.21.12562

Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002;16(3):223-229. doi:10.1006/mcpr.2002.0415

Neves, CG, Ismail TSJ, Barros DR. Amplificação isotérmica mediada por loop para detecção de patógenos de plantas. *Journal: Revisão Anual de Patologia de Plantas.* 2022. 7-34.

Njiru ZK. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6):1-4 e1572. doi:10.1371/journal.pntd.0001572

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):1-7. doi:10.1093/nar/28.12.e63

Novais, CM, Alves, MP. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento,* 2004. 33:10–13.

Oscorbin IP, Filipenko ML. MMLV reverse transcriptase: Selected properties and improved mutants. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:6315-6327. Published 2021 Nov 22. doi:10.1016/j.csbj.2021.11.030

Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008;18(6):407-421. doi:10.1002/rmv.593

Paul R, Ostermann E, Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosens Bioelectron.* 2020;169:112592. doi:10.1016/j.bios.2020.112592

Peti W, Page R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr Purif.* 2007;51(1):1-10. doi:10.1016/j.pep.2006.06.024

Postma PW, Lengeler JW. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol Rev.* 1985;49(3):232-269. doi:10.1128/mr.49.3.232-269.1985

Rader RA. Expression Systems for Process and Product Improvement. *Bio Process International.* 2008. 6 (4): 4 - 9.

Ribeiro SA, Cruz AS, Cruz AD. LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY (LAMP): Uma revisão detalhada sobre a técnica. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde.* 2022. 48.1:8809.

Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal.* 2008;2(1-2):25-45. doi:10.1007/s12079-008-0026-2

Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. Published 2014 Apr 17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172

Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 2019;28(8):1412-1422. doi:10.1002/pro.3668

Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem.* 2008;307(1-2):249-264. doi:10.1007/s11010-007-9603-6

Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangués R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact.* 2016;15:33. Published 2016 Feb 9. doi:10.1186/s12934-016-0437-3

Schofield DA, Sharp NJ and Westwater C (2012). Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage* 2: 105–283.

Smith, K. F., Goldberg, M., Rosenthal, S., Carlson, L., Chen, J., Chen, C., & Ramachandran, S. Global rise in human infectious disease outbreaks. *Journal of the Royal Society, Interface.* 2014;11(101):20140950. doi:10.1098/rsif.2014.

Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova S, Siriyasatien P. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* 2015;8:591. Published 2015 Nov 14. doi:10.1186/s13071-015-1202-x

Stenesh J, Roe BA, Snyder TL. Studies of the deoxyribonucleic acid from mesophilic and thermophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1968;161(2):442-454. doi:10.1016/0005-2787(68)90121-4

Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986;189(1):113-130. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2

Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005;41(1):207-234. doi:10.1016/j.pep.2005.01.016

Studier FW. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods Mol Biol.* 2014;1091:17-32. doi:10.1007/978-1-62703-691-7_2

Thompson D, Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sens Actuators Rep.* 2020;2(1):100017. doi:10.1016/j.snr.2020.100017

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008;3(5):877-882. doi:10.1038/nprot.2008.57

Torres, N. U. Investigação das metodologias de produção de Taq DNA polimerase Hot Start e suas implicações na atividade da enzima. 2020. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol.* 2009 Jan;40(1):1-11. doi: 10.1590/S1517-83822009000100001.

Van Pelt-Verkuil, E.; Belkum, A.; Hays, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification. Rotterdam: Springer. 2008. ISBN: 978-1-4020-6240-7

Vermeire, J.; Naessens, E.; Vanderstraeten, H.; Landi, A.; Iannucci, V.; Nuffel, A.V.; Taghon, T.; Pizzato, M.; Verhasselt, B. Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PLoS One.* 7(12):e50859, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0050859.

Vincentelli R, Cimino A, Geerlof A, Kubo A, Satou Y, Cambillau C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. *Methods.* 2011;55(1):65-72. doi:10.1016/j.ymeth.2011.08.010

Wang Y, Wang G, Zhang D, Yin H, Wang M. Detection of acute toxoplasmosis in pigs using loop-mediated isothermal amplification and quantitative PCR. *Korean J Parasitol.* 2013;51(5):573-577. doi:10.3347/kjp.2013.51.5.573

Warton K, Xu Y, Ford CE. Target sequence heterogeneity causes the 'hook effect' in fluorescent dye-based quantitative PCR. *Biotechniques.* 2020;69(2):80-83. doi:10.2144/btn-2020-0016

Winkler HH, Wilson TH. Inhibition of beta-galactoside transport by substrates of the glucose transport system in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1967;135(5):1030-1051. doi:10.1016/0005-2736(67)90073-9

Wolfel, R., Corman, VM., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, MA., Niemeyer, D., Jones, TC., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C. Virological

assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020;581(7809):465-469. doi:10.1038/s41586-020-2196-x

Wood TK, Peretti SW. Effect of chemically-induced, cloned-gene expression on protein synthesis in *E. Coli*. *Biotechnol Bioeng*. 2012;38(4):397-412. doi:10.1002/bit.260380410.

Zaha, A.; Ferreira, H. B.; Passaglia, L. M. P.; *Biologia Molecular Básica*. 5ª edição. Porto. Alegre: Artmed, 2014.

Zhang, H. L., Omondi, M. W., Musyoka, A. M., Afwamba, I. A., Swai, R. P., Karia, F. P., Muiruri, C., Reddy, E. A., Crump, J. A., Rubach, M. P. Challenges of Maintaining Good Clinical Laboratory Practices in Low-Resource Settings: A Health Program Evaluation Framework Case Study From East Africa. *Am J Clin Pathol*. 2016;146(2):199-206. doi:10.1093/ajcp/aqw083

8. Apêndice

Curriculum Vitae

RIBEIRO, Magno Sinval Pereira; RIBEIRO, M S P.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Magno Sinval Pereira Ribeiro.

Local e data de nascimento: Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, 26/11/1996.

Endereço profissional: Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, salas 204/206. Campus do Vale – Agronomia. Porto Alegre, RS – Brasil. CEP: 91501-970.

E-mail profissional: magnosribeiro@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros (2015-2021) com período de intercâmbio na Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT-UC/Portugal) no período de 2016-2017.

3. ESTÁGIOS

Período de 2015-2016: Aluno de iniciação científica no Laboratório de Educação Ambiental e Ecologia Humana (LEAEH) da Universidade Estadual de Montes Claros.

Bolsista: CNPq

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Glinfskoi Thé

Atividades desenvolvidas: Trabalho de campo etnobiológico em comunidades tradicionais do Norte de Minas Gerais, com a observação de como essas populações usam de forma sustentável os recursos naturais, além do manejo ecológico do meio ambiente e a soberania alimentar.

Período de nov-dez 2016: Estágio voluntário no Laboratório de Genética Humana no Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS), do Departamento de Ciências da Vida na Universidade de Coimbra.

Bolsista: Voluntário

Orientador: PhD Antônio Carriço Portugal.

Atividades desenvolvidas: Desenvolvimento e aplicações de técnicas de biologia molecular para estudos de variabilidade genética humana.

Período de 2018-2019: Aluno de iniciação científica voluntária no Laboratório de Morfologia Microscópica da Universidade Estadual de Montes Claros.

Bolsista: Voluntário

Orientadora: Prof MsC. Ricardo Rodrigues Bacchi.

Atividades desenvolvidas: Produção científica de materiais educacionais (atlas) no projeto Arquivo de Morfologia Microscópica: Citologia, Histologia e Embriologia.

Período de 2019-2021: Aluno de iniciação científica voluntária no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CPDI) da Universidade Estadual de Montes Claros e Hospital Universitário Clemente de Faria.

Bolsista: Voluntário

Orientadora: Profa Dra. Thallyta Maria Vieira

Atividades desenvolvidas: Atuando nas áreas de parasitologia e saúde única. Título do Projeto: Detecção e identificação molecular de Leishmania em pacientes com leishmaniose visceral no Norte de Minas. Além de participar de projetos como: Expresso Chagas XXI realizado pelo Sami-Trop e mediando parcerias entre projetos do laboratório e a Secretaria Municipal de Saúde de Montes Claros.

4. EXPERIÊNCIA DIDÁTICA ANTERIOR:

Monitoria acadêmica - 2018: Monitoria no Departamento de Biologia Geral na disciplina Ecologia dos Indivíduos e das Populações. Orientação: Prof. Dr. Maurício Lopes de Faria.

Monitoria acadêmica – 1/2019: Monitoria no Departamento de Biologia Geral na disciplina Biologia Celular, atuando no campo teórico e prático da disciplina. Orientação: Profa. Dra. Fabiana da Silva Vieira Matrangolo.

Monitoria acadêmica – 2/2019: Monitoria no Departamento de Biologia Geral na disciplina Parasitologia, atuando nas aulas teóricas e práticas. Orientação: Profa. Dra. Thallyta Maria Vieira.

Monitoria acadêmica - 1/2021: Monitoria no Departamento de Biologia Geral na disciplina Biologia Molecular (forma remota), atuando na carga horária teórica e prática. Orientação: Profa. Dra. Fabiana da Silva Vieira Matrangolo.

Professor-acadêmico – 2018-2019: Professor de biologia no projeto NAP- UNIMONTES (Núcleo de Atividades para Promoção da Cidadania da Universidade Estadual de Montes Claros) ministrando aulas para alunos do Ensino Médio (1º, 2º e 3º anos).

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

NEVES, F. V.; RIBEIRO, M. S. P.; SILVA, P. D. C.; DE PAULA JR, W.; DAMASCENO, E. M. A. . Percepção dos profissionais de uma unidade de Estratégia da Saúde da Família frente a pacientes que apresentam fatores de risco de suicídio. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy*. v. 2, p. 13-19, 2020.

BARBOSA, S. V. P.; RIBEIRO, M. S. P.; GUEDES, L. F. P.; DE PAULA JR, W. . Estudo da estabilidade de amostras de solução oral contendo o hormônio coriônico gonadotrófico (HCG) como princípio ativo. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy*, v. 01, p. 17-22, 2019.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

RIBEIRO, M. S. P.; XAVIER, E. M. S.; SANTOS, L. R. S.; SANTOS, T. A. X.; MATOS, R. L. F. R.; MENEZES, A. S. S.; VIEIRA, T. M. . Comorbidade relacionadas aos óbitos por Covid-19 no estado de Minas Gerais. In: 14º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG), 2020, Montes Claros. 14º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG). Montes Claros: Editora Unimontes, 2020. v. 14.

RIBEIRO, M. S. P.; BAHIA, N. S.; MARTINS, A. P.; ZUBA, A. P. S.; ANTUNES, L. F.; ALKMIM, B. R.; CANGUSSU, E. O.; ALVES, J. M. S. Vacina, necessário ou Fake News?.

In: VII Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 16º Fórum, 2019, Montes Claros. VII Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 16º Fórum. Montes Claros: Editora Unimontes. v. v.12.

RIBEIRO, M. S. P.; BAHIA, N. S.; MARTINS, A. P.; ZUBA, A. P. S.; ANTUNES, L. F.; ALKMIM, B. R.; CANGUSSU, E. O.; VIEIRA, T. M. Descobrimos sobre Chagas Leish. In: VII Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 16º Fórum, 2019, Montes Claros. VII Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 16º Fórum. Montes Claros: Editora Unimontes, 2019. v. 12º.

RIBEIRO, M. S. P.; MATRANGOLO, F. S. V. Relato de experiência biologia celular: importância da monitoria acadêmica, desafios e aprendizagem. In: 13º FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG), 2019, Montes Claros. 13º FEPEG, 2019.

RIBEIRO, M. S. P.; BAHIA, N. S.; SILVA, J. O.; FONSECA, M. C. A.; CUNHA, K. A.; MATOS, D. D. F.; FROES, A. C. P.; ABREU, N. S.; PIRES, F. F.; MATRANGOLO, F. S. V. Epidemiologia e Quimioterapia dos casos de Leishmaniose Visceral atendido no Hospital Universitário Clemente de Faria no período de 2014 a 2017. In: 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, CHAGASLEISH 2019, 2019, Belo Horizonte. MedTrop Parasito 2019, 2019.

BAHIA, N. S.; RIBEIRO, M. S. P.; XAVIER, E. M. S.; VIEIRA, T. M.; SOUZA, N. N. Análise do número de casos de leishmaniose visceral humana notificados no município de Montes Claros-MG de 2007 a 2017. In: 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia e CHAGASLEISH 2019, 2019, Belo Horizonte. Med-Trop Parasito 2019, 2019.

MARTINS, A. P.; RIBEIRO, M. S. P.; BACCHI, R. R.; SILVA, J. D.; LUIS, P. F.; BARBOSA, T. G. Avaliação da eficácia do uso de imagens morfológicas em alta resolução aos acadêmicos das áreas de saúde e biológicas. In: 13º FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG), 2019, Montes Claros. 13º FEPEG, 2019.

RIBEIRO, M. S. P.; MARTINS, A. P.; JESUS, M. C. M.; BACCHI, R. R. Aspecto embriológico no atlas morfológico para o ensino superior. In: 12º FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG), 2018, Montes Claros. 12º FÓRUM DE

ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG). Montes Claros: Editora Unimontes, 2018. v. 12°.

RIBEIRO, M. S. P.; JESUS, M. C. M.; MARTINS, A. P.; BACCHI, R. R. Conhecimento dos mecanorreceptores: Importância para o diagnóstico da fibromialgia. In: 12° FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG), 2018, Montes Claros. FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG). Montes Claros: Editora Unimontes, 2018.

RIBEIRO, M. S. P.; BAHIA, N. S.; ZUBA, J. G. IST/AIDS? Como a juventude está lidando com esta realidade? In: Biotemas na Educação Básica, 2018, Montes Claros. VI Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 15° Fórum. Montes Claros: Editora Unimontes, 2018. v. 15°.

RIBEIRO, M. S. P.; VIANNA, A. L. A.; BAHIA, N. S.; MARQUES, D. L. F.; THE, Ana Paula Glinfskoi. Paleodieta e a soberania alimentar. In: Biotemas na Educação Básica, 2018, Montes Claros. VI Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 15° Fórum. Montes Claros: Editora Unimontes. v. 15°.

RIBEIRO, M. S. P.; VIANNA, A. L. A.; LOPES, S. L.; ZUBA, J. G.; MARQUES, D. L. F.; RIBEIRO, B.; ASSUNCAO FILHO, M. A. ; THE, Ana Paula Glinfskoi . Etnoecologia: comunidades tradicionais e recursos naturais. In: Biotemas na Educação Básica, 2018, Montes Claros. VI Congresso BIOTEMAS na Educação Básica e 15° Fórum. Montes Claros: Editora Unimontes, 2018. v. 15°.

RIBEIRO, M. S. P.; MARTINS, A. P.; JESUS, M. C. M.; BACCHI, R. R. Contribuições da utilização de fotomicrografias no processo de ensino aprendizagem. In: FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG), 2018, Montes Claros. 12° FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG). Montes Claros: Editora Unimontes, 2018.

RIBEIRO, M. S. P.; VIANNA, A. L. A.; MARQUES, D. L. F.; THE, Ana Paula Glinfskoi. A variedade de plantas em quintais domésticos e a sua relação com as alternativas sustentáveis. In: FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG), 2018, Montes Claros. 12° FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO (FEPEG). Montes Claros: Editora Unimontes, 2018. v. 12°.

RIBEIRO, M. S. P.; BICALHO, G. O. D.; BAHIA, N. S.; BARROS, J. K. P. Transgenia, faz parte de seu cotidiano. In: 12º Fórum Projeto Biotemas na Educação Básica, 2015, Montes Claros. Anais Biotemas. Montes Claros: Editora Unimontes, 2015. v. 14º.

ALKMIM, B. R.; MOURA, A. P. V.; FREITAS, C. S.; CARDOSO, E. R.; CANGUSSU, E. O.; PAULA JR, W.; VASCONCELOS, V. O.; BARRETO, N. A. P.; ROCHA, R. M.; ANTUNES, L. F.; SANTANA, N. A.; OLIVEIRA, J. L.; RIBEIRO, M. S. P.; LIMA NETO, F. F.; CARMO, D. A. B.; PEDAIS, H. R. B.; BARBOSA, H. C. O.; SOARES, R. V. T.; REIS, R. L. M. F.; MENDES, V. L. F. Foundation of the Immunology League of the Infectious and Self-immune Diseases of the State University of Montes Claros. In: XLIV Congress of the Brazilian Society of Immunology - Immunotherapy: recent advances and future for therapeutic interventions, IMMUNO, 2019, Florianópolis. Immunotherapy 2019, 2019.

RIBEIRO, M. S. P.; LULA, J. F.; CARVALHO, S. F. G.; MENEZES, A. S. S.; VIEIRA, T. M. Papel do Hospital Universitário Clemente de Faria frente a leishmaniose visceral. In: X Encontro de Pesquisa em Parasitologia - Resiliência e Pesquisa: um olhar para as origens, caminhos para o futuro, 2019, Belo Horizonte. X Encontro de Pesquisa em Parasitologia. Belo Horizonte, 2019.

RIBEIRO, M. S. P.; VIEIRA, T. M.; VELOSO, A. C. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, T. A. X. EVALUATION OF THE PRESCRIPTIONS OF ANTIDEPRESSANTS DISPENSED BY A DRUGSTORE IN THE MANGA'S COUNTY, MG. In: II Congresso Internacional em Ciências da Saúde, I Congresso Internacional em Biotecnologia e I Congresso Internacional em Cuidado Primário em Saúde, 2019, Montes Claros. Revista Unimontes Científica. Montes Claros: Editora Unimontes, 2019.