

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**MARIELY CORDEIRO ESTRELA**

**AVALIAÇÃO DE UMA ANÁLISE AUTOMATIZADA PARA  
DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA**

**2017**

**MARIELY CORDEIRO ESTRELA**

**AVALIAÇÃO DE UMA DE ANÁLISE AUTOMATIZADA PARA  
DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Francisco Pichorim.

Co-orientadora: Dra. Cristina Reinert.

**CURITIBA**

**2017**

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

---

E82a Estrela, Mariely Cordeiro  
2017 Avaliação de uma análise automatizada para determinação de atividade enzimática / Mariely Cordeiro Estrela.-- 2017. 79 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.  
Texto em português, com resumo em inglês.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Curitiba, 2017.  
Bibliografia: f. 73-78.

1. Enzimas - Avaliação. 2. DNA polimerases. 3. Reação em cadeia polimerase. 4. Eletroferose em gel. 5. Controle de processo. 6. Processamento de imagens - Técnicas digitais. 7. Métodos de simulação. 8. Instituto de Biologia Molecular do Paraná - Controle de qualidade. 9. Engenharia biomédica - Dissertações. I. Pichorim, Sérgio Francisco, orient. II. Reinert, Cristina, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 610.28

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ



Campus Curitiba



*Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica*

Título da Dissertação Nº 86

**“Avaliação de uma análise automatizada para determinar a atividade enzimática”.**

Por

**Mariely Cordeiro Estrela**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Engenharia Biomédica]

LINHA DE PESQUISA: Biotecnologia.

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA (M.Sc.)** – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB), – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Curitiba, às 9h00min do dia 31 de março de 2017. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores:

---

Prof. Sérgio Francisco Pichorim, Dr.  
(Presidente – UTFPR)

---

~~Prof.~~ Viviane Monteiro Góes, Dr<sup>a</sup>.  
(IBMP)

---

Prof. Fabio Kurt Schneider, Dr.  
(UTFPR)

Visto da coordenação:

---

Prof<sup>a</sup>. Leandra ~~Ulbricht~~, Dr<sup>a</sup>.  
(Coordenadora do PPGEB)

- A Folha de Aprovação assinada encontra-se arquivada na Secretaria Acadêmica -

Dedico este trabalho à minha mãe  
Maria Lúcia (*in memoriam*), a maior  
incentivadora dos meus estudos, ao meu  
esposo Rafael e minha filha Laura, pelos  
momentos de ausência.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível se não fosse a colaboração e apoio de muitas pessoas, as quais dedico meus sinceros agradecimentos.

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Francisco Pichorim, pela paciência, apoio e confiança.

À minha co-orientadora Dra. Cristina Reinert, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná, pelo apoio e pelos dados cedidos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Benvenuto Borba por ter abraçado essa causa.

Ao Mayko, por ter desenvolvido o programa e por toda ajuda.

Às meninas do Controle de Qualidade do IBMP, por toda ajuda e apoio.

À Dra. Viviane, por me amparar nos momentos de desespero e também por não me deixar desistir.

À minha amiga Priscila Zanette, que me ouviu com paciência e me deu dicas valiosas.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

*O saber se aprende com os mestres.  
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.*

*Cora Coralina*

## RESUMO

ESTRELA, Mariely C. **Avaliação de uma análise automatizada para determinar a atividade enzimática.** 2017. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

O Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) atua na produção de insumos para detecção de doenças. Em parceria com Bio-Manguinhos (Fiocruz) é atualmente responsável pelo fornecimento do módulo de amplificação do KIT NAT Brasileiro para o diagnóstico molecular de HIV (AIDS), HCV (Hepatite C) e HBV (Hepatite B), entre outros produtos para diagnóstico *in vitro*. O teste molecular consiste basicamente, na amplificação do material genético do vírus (DNA ou RNA) através da técnica de PCR (reação em cadeia pela polimerase) em tempo real, que possibilita a detecção do agente patógeno a partir de pequenas quantidades de ácido nucleico presente na amostra. A reação de PCR ocorre pela atividade da Taq DNA Polimerase, uma enzima termostável amplamente utilizada para replicação seletiva de fragmentos de DNA. Esta enzima foi isolada a partir de uma bactéria termofílica, denominada *Thermus aquaticus* e é produzida pelo IBMP, sendo considerada um insumo de alta criticidade. Uma das etapas de controle do processo produtivo dessa enzima é a avaliação do extrato bruto enzimático e a determinação da atividade da enzima purificada. O método de quantificação consiste em avaliar a atividade enzimática através da metodologia de PCR convencional, seguida por uma análise do perfil eletroforético das amostras em gel de agarose. No entanto, a metodologia empregada atualmente apresenta uma grande subjetividade, visto que a interpretação dos resultados pode sofrer variações quando analisados por diferentes operadores. O objetivo do presente trabalho é avaliar a implementação de uma análise automatizada dos resultados através do processamento digital de imagens, que além de facilitar sobremaneira as rotinas laboratoriais, pode ser a chave para resultados com maior grau de precisão e repetibilidade, eliminando assim o viés subjetivo do analista. A nova metodologia de análise implica em menor interferência do analista na interpretação dos resultados. O método proposto foi testado em um conjunto de imagens e os resultados obtidos foram comparados com os valores da análise manual atualmente utilizada. Os resultados foram considerados promissores, pois a análise automatizada, além de reduzir significativamente o tempo de análise, possibilita uma padronização dos resultados.

**Palavras-chave:** Taq DNA Polimerase. PCR. Eletroforese em Gel. Processamento Digital de Imagens.



## ABSTRACT

ESTRELA, Mariely C. **Evaluation of new method for automatized analysis to determine the enzymatic activity.** 2017. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

The Molecular Biology Institute of Paraná (IBMP) acts in the production of inputs for detection of diseases. In partnership with Bio-Manguinhos (Fiocruz), it is currently responsible for manufacturing the amplification module of the Brazilian NAT KIT for HIV (AIDS), HCV (Hepatitis C) and HBV (Hepatitis B), besides other products for molecular diagnostics. The molecular test basically consists of amplifying the genetic material of the virus (DNA or RNA) through the real-time PCR (polymerase chain reaction) technique, which enables detection of the pathogen from small amounts of nucleic acid present in the sample. The PCR reaction occurs by the activity of Taq DNA Polymerase, a thermostable enzyme widely used for selective replication of DNA fragments. This enzyme was isolated from a thermophilic bacterium, called *Thermus aquaticus* and is produced by the IBMP, being considered an input of high criticality. One of the steps in controlling the production process of this enzyme is the evaluation of the enzymatic extract and the determination of the activity of the purified enzyme. The quantification method consists in evaluating the enzymatic activity through the conventional PCR methodology, followed by an analysis of the electrophoretic profile of the agarose gel samples. However, the methodology currently used presents a great subjectivity, since the interpretation of results can suffer variations when analyzed by different operators. The objective of the present work is to evaluate the implementation of an automated analysis of the results through digital image processing, which in addition to facilitating the laboratory routines, can be the key to results with a greater degree of precision and repeatability, thus eliminating the subjective bias of the analyst. The new methodology of analysis implies less interference of the analyst in the interpretation of the results. The proposed method was tested in a set of images and the obtained results were compared with the values of the manual analysis currently used. The results were considered promising because the automated analysis, besides significantly reducing the analysis time, allows a standardization of the results.

**Keywords:** Taq DNA polymerase. PCR. Gel electrophoresis. Digital Image Processing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema indicando o sentido de crescimentos da cadeia de DNA. ....	23
Figura 2 - Etapas da reação de PCR .....	30
Figura 3 - Exemplos de problemas comuns na determinação de iniciadores .....	31
Figura 4 - Estrutura química da agarose .....	34
Figura 5 - Esquema de migração dos fragmentos de DNA no gel .....	35
Figura 6 - Esquema de visualização das bandas em gel de agarose .....	36
Figura 7 - Estrutura molecular do brometo de etídio .....	37
Figura 8 - Exemplo de imagem de gel de agarose capturada, em níveis de cinza, pelo fotodocumentador .....	37
Figura 9 - Ilustração da molécula de SYBR® Green intercalada entre as fitas da molécula de DNA .....	39
Figura 10 - Ilustração de uma sonda TaqMan® .....	40
Figura 11 - Ilustração das etapas da reação de PCR em tempo real, utilizando uma sonda TaqMan® .....	40
Figura 12 - Etapas básicas do Processamento de Imagens .....	43
Figura 13 - Exemplo de pré-processamento de imagem .....	44
Figura 14 - Exemplo de histograma bimodal .....	46
Figura 15 - Representação de um histograma unimodal .....	47
Figura 16 - Processo para determinar o limiar ( <i>threshold</i> ) a partir da intensidade do histograma .....	48
Figura 17 - Fluxograma básico do processo padrão para determinação da atividade enzimática utilizado pelo Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP .....	51
Figura 18 - Etapas de preparo do gel de agarose .....	53
Figura 19 - Imagem de cuba de eletroforese .....	54
Figura 20 - Imagem de um equipamento fotodocumentador .....	55
Figura 21 - Imagem de gel de eletroforese proveniente do Teste de Atividade da Taq DNA Polimerase, produzida pelo IBMP e obtida através do fotodocumentador .....	56
Figura 22 - Linha de base (azul) entre a primeira e a última banda .....	57
Figura 23 - Exemplo de como são realizadas as medidas da altura das bandas .....	57

Figura 24 - Fluxograma básico contendo as etapas principais do método desenvolvido para automatizar a medição das bandas em gel de eletroforese. ....	58
Figura 25 - Projeção vertical da imagem 2D .....	59
Figura 26 - Projeções vertical e horizontal de uma banda e sua respectiva altura....	60
Figura 27 - Ilustração do processo de medição das bandas. ....	61
Figura 28 - Média da concentração expressa em U/ $\mu$ L e o desvio padrão de cada análise realizada pelos diferentes operadores. ....	63
Figura 29 - Correlação de Pearson .....	65
Figura 30 - Imagem 11 - Exemplo de um perfil eletroforético distorcido .....	67
Figura 31 - Avaliação da concordância entre métodos de Bland-Altman. ....	69
Figura 32 - Regressão Passing Bablok .....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número teórico de ciclos necessários para PCR .....	32
Tabela 2 - Intervalo de separação de moléculas de DNA kb (quilobase) em função da concentração de agarose presente no gel. ....	34
Tabela 3 - Resultados de concentração da atividade da enzima Taq DNA polimerase obtidos a partir da reanálise manual de algumas imagens e expressos em U/ $\mu$ L.....	62
Tabela 4 - Resultados obtidos através da medição manual padrão utilizada pelo IBMP em comparação aos valores resultantes da medição automática, ambos expressos em U/ $\mu$ L.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

## LISTA DE SIGLAS

ATCC	Coleção de Microrganismos Norte Americana (do original <i>American Type Culture Collection</i> )
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCD	Dispositivo de carga coplada (do original <i>charge-coupled device</i> )
cDNA	DNA complementar (do original <i>complementary DNA</i> )
dATP	DesoxiAdenosina Trifosfatada (do original <i>DeoxyAdenosine triphosphate</i> )
dCTP	DesoxiCitosina Trifosfatada (do original <i>DeoxyCytosine triphosphate</i> )
dGTP	DesoxiGuanina Trifosfatada (do original <i>DeoxyGuanine triphosphate</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do original <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (do original <i>Deoxyribonucleic triphosphate</i> )
dTTP	DesoxiTimina Trifosfatada (do original <i>DeoxyThymine triphosphate</i> )
EtBr	Brometo de etídio (do original <i>Ethidium Bromide</i> )
HBV	Vírus da Hepatite B (do original <i>Hepatitis B Virus</i> )
HCV	Vírus da Hepatite C (do original <i>Hepatitis C Virus</i> )
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana (do original <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
IBMP	Instituto de Biologia do Paraná
JPG	Sigla em inglês para <i>Joint Photographic Experts Group</i> (JPEG)
LCQ	Laboratório de Controle de Qualidade
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase (do original <i>Polymerase Chain Reaction</i> )

PDI	Processamento Digital de Imagens
PPGEB	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica
RNA	Ácido Ribonucleico (do original <i>Ribonucleic Acid</i> )
RT	Transcriptase Reversa (do original <i>Reverse Transcriptase</i> )
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
T <sub>m</sub>	Temperatura de desnaturação (do original <i>melting temperature</i> )

### LISTA DE ACRÔNIMOS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do original <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Labien	Laboratório de Imagem e Instrumentação Eletrônica
NAT	Teste de Ácido Nucleico (do original <i>Nucleic Acid Test</i> )
TIFF	Sigla em inglês para <i>Tagged Image File Format</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
SUS	Sistema Único de Saúde

### LISTA DE SÍMBOLOS

U/μL	unidades por microlitro
mA	miliampere
kb	quilobase
mg	miligrama
mm	milímetro
pb	pares de base
V	volts

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	17
1.2	A TAQ DNA POLIMERASE .....	18
1.3	JUSTIFICATIVA.....	19
1.4	OBJETIVOS.....	20
1.4.1	Objetivo geral.....	20
1.4.2	Objetivos específicos .....	21
1.5	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS .....	21
1.6	ESTRUTURA DO TEXTO.....	21
2	ENZIMA Taq DNA POLIMERASE .....	22
2.1	A DESCOBERTA DA BACTÉRIA <i>Thermus aquaticus</i> .....	24
2.2	PRODUÇÃO DA ENZIMA Taq DNA POLIMERASE .....	26
2.3	INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE PCR .....	26
2.3.1	Princípios do Método .....	28
2.3.2	PCR convencional – Eletroforese em Gel de Agarose .....	33
2.4	APLICAÇÃO DA Taq DNA POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR	38
3	PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS.....	42
3.1	AQUISIÇÃO DIGITAL DE IMAGEM.....	43
3.2	TÉCNICAS DE PRÉ-PROCESSAMENTO .....	43
3.3	SEGMENTAÇÃO.....	44
3.4	DETECÇÃO DE BANDAS EM IMAGENS DE GEL DE AGAROSE.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
4.1	PREPARO DO GEL DE AGAROSE E OBTENÇÃO DA IMAGEM .....	52
4.2	TESTE DE ATIVIDADE Taq DNA POLIMERASE.....	53
4.3	ELETROFORESE EM GEL .....	54

4.4	AQUISIÇÃO DA IMAGEM .....	55
4.5	ANÁLISE DA IMAGEM .....	56
4.6	MEDIÇÃO AUTOMÁTICA DAS BANDAS.....	58
4.7	MEDIÇÃO AUTOMÁTICA DAS BANDAS.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
6	CONCLUSÕES.....	72
7	REFERÊNCIAS .....	75



## 1 INTRODUÇÃO

O Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) nasceu em 2001 a partir de uma parceria entre a Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) e o governo do Estado do Paraná, com a finalidade de desenvolver pesquisa aplicada e inovação tecnológica.

Em 2009, a partir de uma demanda do Ministério da Saúde em implantar o teste de ácido nucleico (NAT) para triagem em bolsas de sangue, o IBMP foi reinaugurado como planta de produção industrial de insumos e *kits* de diagnóstico molecular para o Sistema Único de Saúde (SUS), mantendo sua forte vocação em desenvolvimento tecnológico. Configurado como instituição privada sem fins lucrativos, o IBMP passa a ser uma ponte para o abismo existente no país entre a pesquisa, o conhecimento gerado, e a materialização da inovação em produtos de qualidade para a Saúde Pública brasileira (IBMP, 2016).

Nesse cenário, um dos principais desafios do IBMP na área de inovação no Brasil é a forte dependência tecnológica externa que o país ainda possui.

O IBMP é atualmente responsável pelo fornecimento de insumos para produtos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) - Fiocruz, entre eles, o KIT NAT Brasileiro para detecção de HIV (AIDS), HCV (Hepatite C) e HBV (Hepatite B), que consiste, basicamente, na amplificação do material genético do vírus (RNA ou DNA) através da metodologia de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) em tempo real, que permite a detecção do agente infeccioso a partir de pequenas quantidades de cópias de ácido nucleico presente na amostra. O teste NAT foi implementado para complementar os testes sorológicos, já realizados na triagem de bolsas sanguíneas, visando o aumento da segurança transfusional, pois o exame reduz a chamada janela imunológica, tempo em que o vírus não pode ser detectado no organismo por métodos sorológicos (SGQ IBMP, 2016).

A Instituição tem como foco a melhoria contínua de processos e produtos, requisito obrigatório para o desenvolvimento tecnológico e produção. Todos os insumos fornecidos pelo IBMP são cuidadosamente fabricados em Boas Práticas de Fabricação (BPF), com Sistema da Qualidade certificado pela Anvisa e rígido controle de qualidade.

O Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP é responsável pela análise e liberação para uso desde matérias-primas básicas como água até as mais

complexas, pelo monitoramento de desempenho dos insumos fabricados, pelos estudos de estabilidade dos produtos, pelo monitoramento ambiental das áreas fabris, entre outras atividades. São realizados testes físico-químicos, microbiológicos e muitas técnicas na área de biologia molecular, tais como PCR convencional, PCR em tempo real, extração de ácidos nucleicos, entre outros (SGQ IBMP, 2016).

### 1.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) consiste na amplificação enzimática de um fragmento específico de DNA visando a produção de milhões de cópias desta sequência *in vitro* (BRUCE, *et al.*, 1999).

Essa técnica foi descrita por Kary Mullis na década de 1980 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise dos genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências (BRUCE, *et al.*, 1999).

Após o reconhecimento da PCR, a técnica foi aperfeiçoada em muitos aspectos, dos quais sem dúvida, o mais significativo foi a utilização da enzima DNA polimerase de uma bactéria termofílica (*Thermus aquaticus*) que vive em altas temperaturas. Esta bactéria foi encontrada em fontes hidrotermais e possui temperatura ótima de atividade a 72°C, sendo razoavelmente estável mesmo a 94°C. Esta enzima foi denominada Taq DNA Polimerase (COOPE e HAUSMAN, 2007).

A primeira DNA polimerase foi isolada em 1976, porém, era utilizada a enzima DNA Polimerase da *Escherichia coli*, a qual possui atividade máxima a 37°C. Esta enzima era adicionada a cada ciclo de amplificação, pois era inativada no passo de desnaturação, onde a temperatura atinge cerca de 94°C (SAIKI, *et al.*, 1988). A descoberta da Taq DNA Polimerase possibilitou a amplificação *in vitro* de moléculas de DNA, processo este ainda realizado manualmente em banho-maria até a década de 1980. A automação da PCR veio pelo uso de termocicladores, equipamentos programáveis para comandar o tempo e a temperatura da PCR, otimizando o aumento progressivo de moléculas alvo de DNA.

A PCR em tempo real (Real-Time PCR) desenvolvida em 1995, representa outro avanço na tecnologia da PCR, pois quantifica a amplificação da molécula-alvo

continuamente durante a reação. A possibilidade de monitoramento ao longo da reação da quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e de quantificar este produto durante a sua fase ótima de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à PCR em tempo real quando comparado com a PCR convencional (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

## 1.2 A TAQ DNA POLIMERASE

A Taq DNA polimerase é um componente essencial nas metodologias relacionadas à pesquisa de ácidos nucleicos. Esta enzima é produzida pelo IBMP em um processo de fermentação, em que a cultura inoculada passa por etapas que envolvem desde a transformação da célula, a extração da proteína, até sua purificação para obtenção da enzima (PRODUÇÃO IBMP, 2016).

Durante a produção da enzima, o Laboratório de Controle de Qualidade realiza ensaios para a avaliação do extrato bruto enzimático e determinação da atividade da enzima purificada. O ajuste de concentração da enzima para o nível padrão é realizado pelo Setor de Produção com base nos resultados do Controle de Qualidade.

Concluída a etapa de determinação e ajuste de concentração da Taq DNA Polimerase, essa é utilizada como insumo fundamental na formulação de produtos que irão compor diferentes *Kits* de diagnóstico produzidos pelo IBMP.

A determinação da atividade da Taq DNA Polimerase no IBMP é realizada através da metodologia de PCR convencional, seguida de eletroforese em gel de agarose e posterior análise da imagem do gel. A metodologia empregada atualmente é fruto de uma transferência de tecnologia e apresenta uma grande subjetividade, visto que a interpretação dos resultados depende totalmente da análise visual do operador (LCQ IBMP, 2016).

Embora existam outras metodologias de quantificação desta enzima como, por exemplo, o protocolo descrito por Sambrook e Russel que utiliza nucleotídeos marcados com radioatividade seguida por precipitação da proteína com ácido tricloroacético (SAMBROOK e RUSSEL, 2001), deve-se considerar que insumos para a área de biotecnologia são, em grande maioria, importados. Estabelecer uma rotina

laboratorial baseada nessa metodologia implica em um alto risco para o processo, pois, a demora nos processos de importação de matérias-primas associada à validade curta de materiais radioativos e, ocasionalmente, avarias no transporte podem comprometer o produto. Outro ponto são os altos custos associados ao tipo de equipamento utilizado para esse método, em comparação com o custo de produção do insumo.

Por este motivo, é de fundamental importância a busca por uma solução que viabilize a interpretação dos resultados dos testes atualmente empregados no IBMP, com o objetivo de facilitar a rotina de ensaios, bem como estabelecer uma padronização dos resultados.

A área de processamento digital de imagem vem de encontro com essa demanda. A necessidade de extrair informações das imagens e interpretar seus conteúdos tem sido um dos fatores impulsionadores do desenvolvimento do processamento de imagens e da visão computacional nas últimas décadas e suas aplicações já permeiam praticamente todos os ramos de atividade. Na medicina, o uso de imagens no diagnóstico tornou-se rotineiro, alguns exemplos de utilização são as modalidades de diagnóstico por imagem, tais como: radiografia digital, tomografia, ressonância, ultrassom. Na indústria, sistemas de processamento de imagens têm sido usados com sucesso em sistemas de fabricação para muitas tarefas, sistemas de segurança, bem como no controle de qualidade. Na biologia por sua vez, pode ser utilizada para contagem de células presentes em uma amostra, a partir de uma imagem obtida em microscópio (MARQUES, 2011).

A metodologia de ensaio atualmente utilizada para determinação da atividade da enzima, no IBMP, aliada a uma análise automática dos resultados através do processamento digital de imagens, além de facilitar sobremaneira as tarefas laboratoriais, pode ser a chave para ensaios com maior grau de precisão e maior repetibilidade ao eliminar o viés subjetivo do operador.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

Empresas que trabalham na fronteira da inovação em Biotecnologia enfrentam inúmeras dificuldades, desde fornecedores de matérias-primas até

métodos para avaliação de seus produtos. Como, infelizmente, ainda muito do conhecimento gerado vem de experiência externa, cabe à indústria nacional buscar conhecimento para vencer seus desafios em diversas frentes.

Na área de *kits* de diagnóstico não é diferente. A Taq DNA polimerase, base da problemática aqui apresentada, é insumo fundamental para todas as metodologias relacionadas à pesquisa de ácidos nucleicos em infinitas aplicações, desde as técnicas mais corriqueiras de PCR e suas derivações até os mais modernos conceitos.

A metodologia padrão empregada no IBMP para a determinação da atividade da enzima tem sido identificada como muito frágil do ponto de vista de Qualidade, pois utiliza-se uma reação de PCR convencional com diluições seriadas da enzima, que são submetidas à análise em gel de agarose (processo detalhado no Capítulo 2). Em seguida, a imagem do gel é analisada e as bandas, que são raias que delineiam a migração dos diferentes fragmentos do ácido nucleico na matriz do gel, são milimetricamente medidas por, pelo menos, 3 operadores. Uma planilha de cálculo é aplicada para que seja determinada a atividade enzimática.

As medidas realizadas sobre as bandas são extremamente subjetivas, onde a variação de operador para operador pode alterar o resultado final. Como não existem bordas bem delimitadas, o local da medição interfere na interpretação e, com base nessa informação, o produto é ajustado pela Produção.

A implementação de um método mais robusto para determinar a atividade da enzima tem a finalidade de melhorar, principalmente, a qualidade de um insumo amplamente utilizado em diversas técnicas e ainda reduzir tempo de execução do teste.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é a avaliação de um programa computacional para automatizar a interpretação dos resultados do teste de quantificação de atividade da enzima Taq DNA Polimerase produzida no IBMP.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- 1) Avaliação do uso de um programa computacional para medição das bandas automaticamente;
- 2) Comparação dos resultados obtidos utilizando o programa com a metodologia atual;
- 3) Padronização dos resultados para conferir mais confiabilidade, reprodutibilidade e robustez na determinação da atividade da enzima Taq DNA polimerase.

#### 1.5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A fundamentação teórica foi baseada em pesquisa bibliográfica. O programa computacional para automatização da medição de bandas e determinação da concentração da atividade da enzima foi desenvolvido especificamente para este projeto pelo aluno Mayko Min Ian Lie do Labien (Laboratório de Imagem e Instrumentação Eletrônica) sob orientação do Professor Dr. Gustavo Benvenuto Borba da UTFPR. As imagens analisadas e resultados de testes foram cedidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP.

#### 1.6 ESTRUTURA DO TEXTO

O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre a enzima Taq DNA Polimerase, características e aplicações; no Capítulo 3 são abordados os princípios básicos sobre processamento digital de imagens; o Capítulo 4 apresenta os materiais e métodos utilizados na pesquisa, resultados, discussões e conclusão, em seguida as referências utilizadas.

## 2 ENZIMA TAQ DNA POLIMERASE

Muito antes da estrutura do DNA tornar-se conhecida, cientistas admiravam a habilidade dos organismos em criar cópias fidedignas de si próprios e a habilidade das células em produzir muitas cópias idênticas de macromoléculas complexas. A especulação sobre essas questões centrava sobre o conceito de um molde, uma estrutura que permitiria o alinhamento de moléculas em uma ordem específica e unidas para criar uma macromolécula com uma única sequência e função. Na década de 1940, já se sabia que o DNA era a molécula genética, mas até que James Watson e Francis Crick deduzissem a sua estrutura, não estava claro como essa molécula poderia atuar como um molde para a replicação e a transmissão da informação genética (NELSON e COX, 2014).

As propriedades fundamentais do processo da replicação do DNA e os mecanismos usados pelas enzimas que o catalisam foram provados ser essencialmente idênticos em todos os organismos. Cada fita do DNA funciona como um molde para a síntese de uma nova fita, produzindo duas novas moléculas de DNA, cada uma com uma fita nova e uma antiga.

A procura de uma enzima que pudesse sintetizar DNA foi iniciada na década de 1950. O trabalho de Arthur Kornberg e colaboradores levou à purificação e à caracterização da DNA polimerase das células de *Escherichia coli*, uma enzima de cadeia polipeptídica única, atualmente chamada de DNA Polimerase I (NELSON e COX, 2014).

A DNA polimerase é um componente essencial nas metodologias relacionadas à pesquisa de ácidos nucleicos em testes de diagnóstico molecular.

A DNA polimerase é uma enzima que faz a síntese de uma nova fita de DNA. Essa classe de enzimas possui a capacidade de adicionar nucleotídeos na extremidade 3'OH de uma região pareada do DNA, possibilitando o crescimento da cadeia no sentido 5'-3' (ZAHA, FERREIRA e PASSAGLIA, 2014).

A Figura 1 apresenta um esquema indicando o sentido em que ocorre a síntese da fita pela DNA Polimerase. Em uma extremidade da fita do DNA está livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra está livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose. Na fita complementar este sentido é invertido.

Durante a duplicação do DNA, fundamental para a divisão celular, a DNA polimerase sintetiza as fitas de DNA sempre no sentido 5'- 3'.

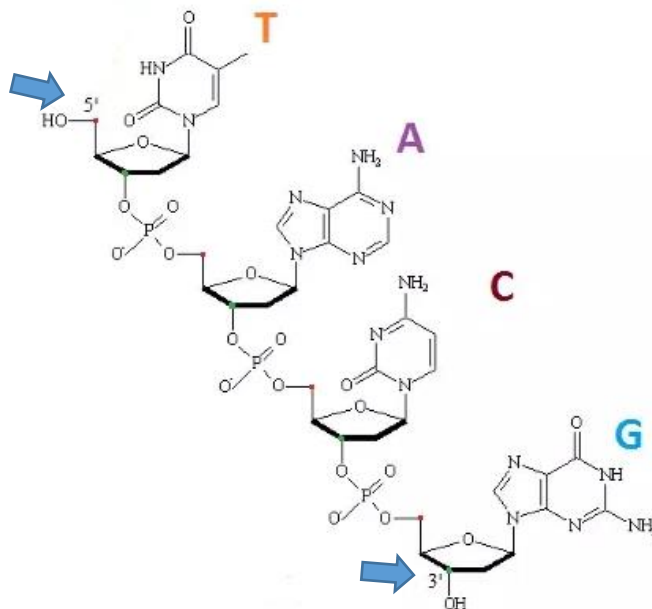


Figura 1 – Esquema indicando o sentido de crescimento da cadeia de DNA. Uma das extremidades da fita do DNA apresenta hidroxila (grupo -OH) do carbono-5 da primeira pentose e na outra está livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose. O símbolo (') diferencia os carbonos da pentose (açúcar) dos demais átomos de carbono da molécula. Na fita complementar este sentido é invertido. Porém, durante a duplicação do DNA a DNA polimerase sintetiza as fitas de DNA sempre no sentido 5'- 3'. Fonte: Adaptado de Kojouharov,2015.

Estudos minuciosos da DNA polimerase I revelaram características do processo de síntese de DNA, que se provaram comuns a todas as DNA polimerases (NELSON e COX, 2014).

A partir desses estudos, DNA polimerases foram isoladas de outros microrganismos e atualmente enzimas termoestáveis têm sido empregadas em diversos processos, principalmente da biologia molecular.

A maioria das enzimas DNA Polimerase termoestáveis foram isoladas a partir do microrganismo *Thermus aquaticus* e são conhecidas como *Taq* DNA polimerase. A enzima obtida a partir da *T. aquaticus* possui uma massa molecular aproximadamente entre  $6,6 \times 10^4$  e  $9,4 \times 10^4$  daltons<sup>1</sup>. A *Taq* DNA polimerase catalisa a incorporação de dNTPs em DNA. Para isso é necessária a utilização de uma fita de DNA molde, um iniciador, em presença do cátion bivalente de magnésio ( $Mg^{++}$ ).

<sup>1</sup> 1 Da =  $1,66 \times 10^{-27}$  kg (INMETRO, 2013).



A temperatura ótima de atividade da Taq é de 75 a 80°C, com uma meia vida de 9 minutos em 97,5°C, e uma taxa de replicação de  $10^3$  pares de base de fita de DNA em menos de 10 segundos a 72°C (ROYAYEI e GALEHADARI, 2008).

A concentração de uma enzima é medida pela atividade enzimática expressa em unidades por mL (U/mL).

Uma unidade de Taq DNA Polimerase é definida como a quantidade necessária de enzima para incorporar 10 nmol do total de dNTP em DNA precipitável por ácido em um período determinado de tempo e a uma dada temperatura (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, 2005).

## 2.1 A DESCOBERTA DA BACTÉRIA *Thermus aquaticus*

Em 1966, Thomas Brock um microbiologista da Universidade de Wisconsin, descobriu um tipo de bactéria presente em fontes hidrotermais do Parque Nacional de Yellowstone capaz de sobreviver em altas temperaturas. A partir dessa bactéria foi possível extrair uma enzima estável em temperaturas de quase ebulição, a Taq DNA Polimerase (BROCK, 1997).

Thomas estava focado em um programa de estudos mais ecológicos sobre o controle térmico e os limites fisiológicos da fotossíntese. No entanto, acabou fazendo uma descoberta ainda maior do ponto de vista da biologia molecular. Ele estudou um grande número de piscinas que proporcionavam gradientes térmicos, desde a ebulição até a temperatura ambiente, encontrando uma variada microbiota. Brock observou que mesmo as fontes com temperaturas mais elevadas não eram desprovidas de vida.

Brock juntamente com o colaborador Hudson Freeze isolaram a cultura de um novo microrganismo, a partir de uma amostra coletada em uma nascente a uma temperatura entre 70 e 73°C chamada "Mushroom Spring". Esta é a cultura que é utilizada atualmente como fonte de Taq polimerase para PCR e especificada na patente de Taq polimerase (BROCK, 1997).

Em meados de 1968, Brock havia obtido e caracterizado uma grande quantidade de culturas de *T. aquaticus*.

Após um longo e detalhado estudo sobre bactérias termofílicas ele constatou que maioria das bactérias descritas anteriormente pertenciam a um grupo de organismos formadores de esporos, porém a nova bactéria definitivamente não apresentava essa característica e estava claro que pertencia a um novo gênero de bactérias. Inicialmente, o nome escolhido para este novo gênero foi *Caldobacter trichogenes*, devido ao fato de o organismo viver em água quente (em italiano, *Caldo* significa quente) e sob algumas condições formar filamentos (*Trichos*, deriva do Grego para filamento). No entanto, o nome considerado por eles demasiadamente fantasioso, foi substituído para *Thermus aquaticus*, quando o artigo descrevendo esse organismo foi publicado em 1969 (BROCK e FREEZE, 1969; BROCK, 1997).

Juntamente com outros extremófilos encontrados por Brock em Yellowstone, a cultura foi devidamente registrada e enviada para a American Type Culture Collection (ATCC 25104), onde foi disponibilizada para que outros cientistas pudessem estudar (BROCK, 1997).

A descoberta de vida microbiana em altas temperaturas era controversa naquele tempo, mas mostrou mais tarde ser completamente prevalente como evidenciado pelo isolamento de cepas de *Thermus* de *habitats* térmicos artificiais, como a água quente da torneira, e de outras fontes. A subsequente descoberta e caracterização da DNA polimerase de *Thermus aquaticus* resultou no desenvolvimento de ferramentas de amplificação e sequenciamento que revolucionaram quase todos os campos da biologia e da medicina (BRUMM, *et al.*, 2015).

A Taq DNA Polimerase é uma importante enzima, termoestável, muito utilizada na biologia molecular, tanto para amplificação de sequências de DNA *in vitro* quanto para sequenciamento, através da técnica de PCR (ROYAYEI e GALEHADARI, 2008).

Quase cinco décadas após a descoberta da *T. aquaticus*, a enzima Taq DNA polimerase ainda é essencial na técnica de PCR, que atualmente é a base de um negócio multimilionário com aplicações que vão desde o diagnóstico de doenças até técnicas de medicina forense (NELSON e COX, 2014).

## 2.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA Taq DNA POLIMERASE

O baixo rendimento de enzima extraída do organismo hospedeiro nativo (0,01-0,02%) e o aumento da procura de polimerases termoestáveis para diversas pesquisas acionaram uma busca por métodos para aumentar o rendimento e atividade. A tecnologia encontrada e utilizada atualmente para isolar o gene da Taq foi DNA recombinante expresso em *Escherichia coli* (BOUZARI e RECHINSKY, 1998).

A Taq DNA polimerase recombinante expressa em *E. coli* apresenta características idênticas à Taq nativa de *T. aquaticus* em relação à atividade, especificidade, termostabilidade e desempenho em PCR (ROYAYEI e GALEHADARI, 2008).

Para a obtenção da enzima é utilizado um plasmídeo contendo o gene da Taq DNA polimerase clonado em células competentes de *Escherichia coli*, possibilitando um alto nível de expressão e permitindo a produção em escala industrial e comercialização do produto. A cultura passa por uma série de etapas que envolvem a transformação das células de *E. coli*, fermentação, lise das células para obtenção de extrato bruto da enzima e purificação.

## 2.3 INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE PCR

A reação em cadeia da polimerase é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA visando a produção de milhões de cópias *in vitro* (BRUCE, *et al.*, 1999).

Essa técnica foi descrita por Kary Mullis no ano de 1984 e tem revolucionado a genética molecular, pois apresenta uma ampla gama de aplicações em vários ramos da pesquisa científica. Essa reação possibilita uma nova estratégia na análise dos genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de fragmentos específicos, o que facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas do que as tradicionalmente utilizadas (OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

A técnica de PCR tem sido muitas vezes comparada ao desenvolvimento da Internet, e embora isso extrapole o impacto da PCR fora da comunidade científica, a comparação funciona bem em vários níveis. Ambas as invenções são consideradas revolucionárias até o ponto em que é difícil imaginar a vida sem elas. Ambas cresceram muito além dos limites de seu projeto original e criaram oportunidades inimagináveis antes de sua invenção. É difícil acreditar que a técnica, que formou a base do projeto do genoma humano e é fundamental para muitos protocolos atuais de laboratório de biologia molecular, foi descoberta há mais de 30 anos (BARTLETT e STIRLING, 2003).

O conceito original para PCR, como muitas boas ideias, era uma combinação de vários componentes já existentes: a síntese de comprimentos curtos de DNA de cadeia simples (oligonucleotídeos), bem como o uso destes para conduzir a síntese específica de alvo de novas cópias de DNA usando uma enzima DNA polimerase que já eram ferramentas padrão no repertório dos biólogos moleculares da época. A novidade no conceito de Mullis foi a utilização da justaposição de dois oligonucleotídeos, complementares a cadeias opostas do DNA, para amplificar especificamente a região entre eles e para conseguir isto de uma maneira repetitiva de modo que o produto do primeiro ciclo sirva como molde para o segundo, do segundo para o terceiro, e assim sucessivamente, ou seja, uma reação em cadeia (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Após o reconhecimento da PCR, a técnica foi aperfeiçoada em muitos aspectos, sendo o mais significativo a utilização da enzima DNA polimerase proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* (COOPER e HAUSMAN, 2007).

A DNA polimerase originalmente utilizada por Mullis para realizar a PCR foi extraída da bactéria *Escherichia coli*. Embora esta enzima tenha sido uma ferramenta valiosa para uma vasta gama de aplicações e permitiu a explosão das tecnologias de sequenciamento de DNA, ela apresentava algumas desvantagens. Na PCR, a reação deve ser aquecida para desnaturar as fitas de DNA de cadeia dupla após cada ciclo de síntese. Infelizmente, o aquecimento também causava a inativação irreversível da enzima de *E. coli*, sendo assim, era necessário a adição manual da enzima no início de cada ciclo de amplificação (BARTLETT e STIRLING, 2003).

A técnica era realizada com a utilização de banho-maria e toda a manipulação para adição de alíquotas da enzima aumentava significativamente o trabalho, bem

como a probabilidade de contaminação. Outra desvantagem era a quantidade de amplificação inespecífica, devido à termossensibilidade da enzima (MELO, 2006).

A utilização da enzima termoestável, proveniente da *Thermus aquaticus*, permitiu a automação do processo, não sendo mais necessária a adição da enzima ao final de cada ciclo, reduzindo os riscos de contaminação e aumentando a fidelidade da reação, diminuindo assim formação de bandas inespecíficas. Com isso, passou-se a utilizar equipamentos automáticos e programáveis, os termocicladores (MELO, 2006).

Uma característica importante da PCR é sua capacidade de trabalhar com quantidades minúsculas de DNA inicial. Isto significa que a PCR pode ser utilizada para obter sequências a partir de vestígios de DNA presentes em cabelos, manchas de sangue, ossos e outros restos preservados em sítios arqueológicos. No diagnóstico clínico, a PCR é capaz de detectar a presença do material genético viral muito antes do vírus ter atingido os níveis necessários para iniciar uma resposta imunológica à doença (BROWN, 2002).

### 2.3.1 Princípios do Método

A PCR permite a amplificação de segmentos curtos da molécula de DNA com aproximadamente 100 a 500 pb<sup>2</sup> (ZAHA, FERREIRA e PASSAGLIA, 2014).

Geralmente, os insumos utilizados nessa reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas (OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

A PCR baseia-se em ciclos que se repetem com três etapas que ocorrem em diferentes temperaturas, conforme ilustrado na Figura 2. Toda a reação acontece em um único tubo, na presença de reagentes termoestáveis e o DNA molde. Os insumos essenciais para que a reação ocorra são: iniciadores, também denominados *primers*, que são sequências sintéticas de oligonucleotídeos complementares ao DNA molde e que delimitam a região de amplificação; uma mistura de quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), em quantidades

---

<sup>2</sup> pb = pares de bases.

equivalentes; a enzima termoestável Taq DNA Polimerase em solução tampão; cloreto de magnésio (co-fator da reação) e a sequência alvo (*template*).

Os componentes da reação são misturados e a amostra é colocada em um termociclador, equipamento que possibilita o aquecimento e resfriamento rápido das amostras repetidas vezes (ZAHA, FERREIRA e PASSAGLIA, 2014).

Na primeira etapa, denominada **desnaturação**, as moléculas de DNA de fita dupla são submetidas a uma temperatura de 94°C por cerca de 1 a 2 minutos, nessa fase as fitas das moléculas de DNA são completamente separadas, transformando-se em fitas simples que servem como molde para os iniciadores e para a Taq DNA polimerase. A ligação entre as fitas da molécula de DNA ocorre por pontes de hidrogênio, que por serem relativamente fracas, quebram-se quando submetidas à alta temperatura, já as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, são fortemente unidas por ligações covalentes e, por isso, permanecem intactas (LUDWIG, 2010; UHLMAN, *et al.*, 1998).

A segunda etapa, denominada **anelamento**, é onde ocorre a ligação dos iniciadores, ou seja, os pequenos fragmentos (15 a 20 bases) complementares às fitas molde anelam na sequência alvo. Esta fase ocorre em uma temperatura entre 50 e 60°C, dependendo da temperatura média de desnaturação ( $T_m$ , do inglês, *melting temperature*) dos iniciadores, sendo essa uma variável importante para garantir a especificidade da reação (LUDWIG, 2010).

Na terceira e última etapa, denominada **extensão**, ocorre a síntese de uma fita complementar de DNA pela Polimerase, a partir do complexo DNA-iniciador e a mistura de nucleotídeos (dNTPs). A cada ciclo, todo o DNA serve como molde para o próximo ciclo, numa reação em cadeia, dobrando teoricamente a quantidade de DNA no ciclo seguinte (KIM, *et al.*, 2002).

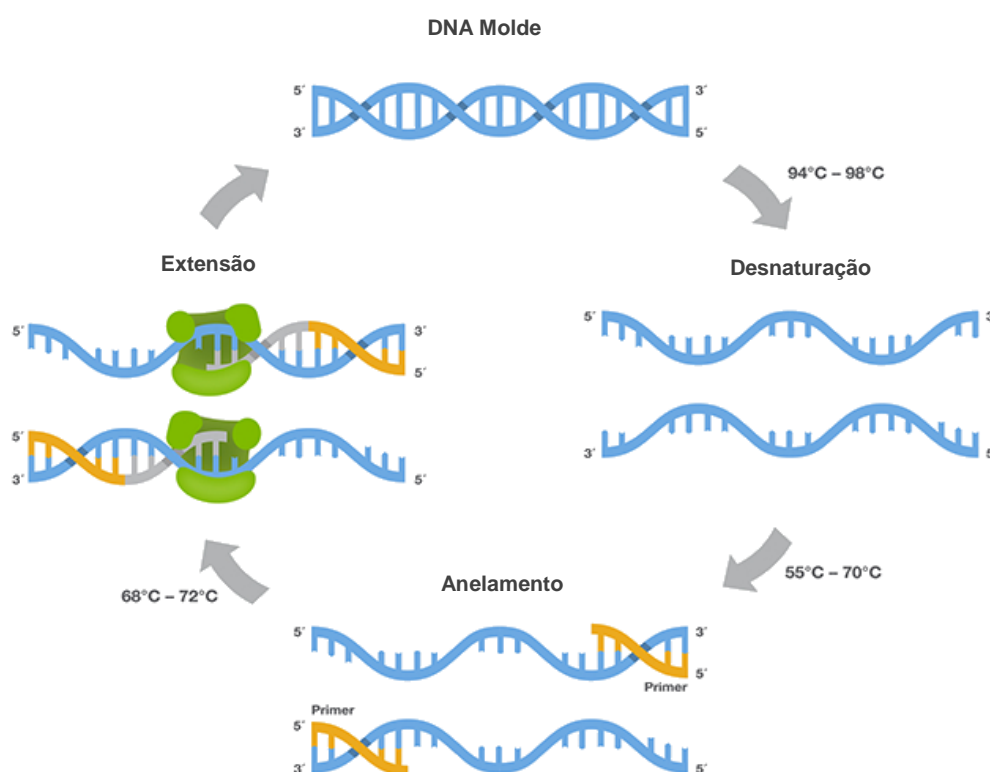


Figura 2 - Etapas da reação de PCR: desnaturação, é a primeira etapa da PCR, ocorre entre 94 a 98°C e consiste na abertura da dupla fita do DNA molde; anelamento, é a segunda etapa da reação, ocorre em temperatura entre 55 e 70°C, é a fase em que os iniciadores se ligam às fitas do DNA molde; extensão, terceira e última etapa, ocorre entre 68 e 72°C, é a fase onde acontece a incorporação de nucleotídeos na fita pela DNA Polimerase. Fonte: Adaptado de ThermoFisher, 2017.

É possível ainda a amplificação *in vitro* de fragmentos de moléculas de RNA através da técnica de PCR (RT-PCR, reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase). Para isso é necessária uma etapa inicial que requer uma enzima transcriptase reversa (RT) presente geralmente em retrovírus. Essa enzima sintetiza uma cadeia de cDNA (DNA complementar) a partir do molde de RNA, permitindo assim que a molécula seja reconhecida pela DNA polimerase e a reação ocorra normalmente (UHLMAN, *et al.*, 1998).

A eficiência da reação depende de alguns fatores, dentre eles destaca-se o desenho de iniciadores adequados. Ao projetar um conjunto de iniciadores para uma região específica da molécula de DNA, um dos iniciadores deve anelar à cadeia positiva, que por convenção é orientada na direção  $5' \rightarrow 3'$  (também conhecida como cadeia *sense*) e o outro iniciador deve anelar na cadeia negativa, que está orientada na direção  $3' \rightarrow 5'$  (cadeia *antisense*). Os problemas mais comuns que surgem ao

projetar iniciadores são: 1) auto-anelamento do iniciador, formando estruturas secundárias tais como um grampo de cabelo, cujo termo técnico é *hairpin*, conforme evidenciado na Figura 3-a; 2) anelamento de um iniciador no outro, formando dímeros de iniciador, conforme Figura 3-b; 3) Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) diferentes para cada iniciador, dificultando a seleção de uma única temperatura de anelamento, que permita que ambos os iniciadores se liguem eficientemente à sua sequência complementar, no DNA molde (LORENZ, 2012).

a)



b)

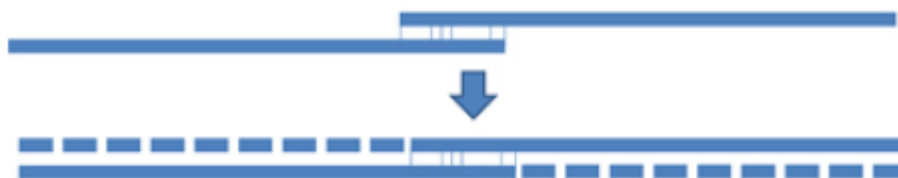


Figura 3 - Exemplos de problemas comuns na determinação de iniciadores específicos. a) auto-anelamento do iniciador, resultando em uma estrutura secundária, conhecida como *hairpin*. b) formação de dímeros de *primer*, através do anelamento dos dois iniciadores e extensão pela DNA polimerase. Fonte: Adaptado de Lorenz, 2012.

A temperatura utilizada no passo de anelamento é extremamente crítica, pois se for muito elevada a ligação pode ser muito fraca, acarretando em perda de sensibilidade, no entanto se a temperatura for muito baixa pode ocorrer o anelamento inespecífico, resultando em amplificação de fragmentos não desejados de DNA, diminuindo assim a eficiência da reação (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

O anelamento de oligonucleotídeos ocorre geralmente sob uma temperatura entre 3 e 5 °C abaixo da temperatura de *melting*, ou seja, quando há dissociação dos iniciadores do molde. Existem diversas fórmulas para calcular a temperatura de



*melting*, porém nenhuma delas garante precisão para iniciadores de todos os tamanhos e sequências (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

O número de ciclos necessários para a amplificação depende do número inicial de cópias do DNA molde presente na reação, da eficiência dos iniciadores e da taxa de amplificação. Na fase exponencial, a reação procede até a extinção dos componentes. Neste ponto, a sensibilidade de amplificação de produtos específicos deve ser máxima, no entanto amplificações inespecíficas podem ser formadas. Na maioria das vezes, após aproximadamente 30 ciclos de PCR a quantidade da sequência alvo amplificada é de cerca de  $10^5$  cópias do DNA molde. Ao menos 25 ciclos são necessários para apresentar um nível aceitável em número de cópias do fragmento alvo, denominado *amplicon*.

A Tabela 1 apresenta o número teórico de ciclos (arredondados) necessários para atingir 10 ng de DNA (baseado em um produto de PCR de 200 pb) em vários níveis de eficiência (Y) em função da quantidade de DNA molde presente no início da reação (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

Tabela 1 – Número teórico de ciclos necessários para PCR

Y	DNA MOLDE					
	1	10	100	1000	10000	100000
<b>1,00</b>	34	30	27	24	20	17
<b>0,90</b>	36	33	29	26	22	18
<b>0,80</b>	40	36	32	28	24	20
<b>0,70</b>	44	40	35	31	27	22
<b>0,60</b>	49	45	40	35	30	25
<b>0,50</b>	57	52	46	40	35	29
<b>0,40</b>	69	62	55	48	42	35

Fonte: Adaptado de Sambrook e Russel, 2001

### 2.3.2 PCR convencional – Eletroforese em Gel de Agarose

O procedimento mais comum para a análise de ácidos nucleicos é a eletroforese em gel. Ao término da reação no termociclador, o produto da PCR (*amplicon*) é geralmente analisado através de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida. Esta é uma abordagem altamente flexível que fornece informação sobre o tamanho da molécula de DNA e sob certas condições pode ser utilizada para discriminar sequências diferentes do mesmo tamanho (BARTLETT e STIRLING, 2003).

A eletroforese em gel é comumente utilizada para separar, identificar e purificar principalmente fragmentos de DNA e de proteínas. O método consiste na separação de moléculas ionizadas (aminoácidos, peptídeos, proteínas, nucleotídeos, ácidos carboxílicos e outras substâncias de interesse biológico) em uma matriz de acordo com a sua carga elétrica e seu peso molecular. Moléculas com carga negativa migram para o polo positivo, enquanto que as moléculas com carga positiva migram para o polo negativo (OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

Em geral, os géis de poliacrilamida são mais úteis para separar fragmentos menores de DNA (300-500 pb) e para aplicações onde é necessária uma resolução elevada (apenas 1 pb), sendo indicada para análise de microsatélites. Os géis de poliacrilamida podem ser administrados mais rapidamente e a uma temperatura mais elevada do que os géis de agarose. No entanto, a acrilamida é uma neurotoxina e apresenta um perigo para a segurança tanto dos usuários como para o meio ambiente (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Os géis de agarose, por sua vez, são mais robustos e fáceis de preparar e não apresentam toxicidade. Embora proporcione uma menor resolução, a eletroforese convencional em agarose pode separar fragmentos de DNA de 200 a 50.000 pb, o que é mais do que indicado para sistemas baseados em PCR (BARTLETT e STIRLING, 2003).

A agarose é um polissacarídeo extraído da parede celular de determinadas algas, composto por resíduos alternados de D- e L-galactose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1→3) e  $\beta$ -(1→4), conforme demonstrado na Figura 4 (LONZA, 2010).

As cadeias de agarose formam fibras helicoidais que se agregam em estruturas super enroladas com um raio de 20 a 30 nm, sua estrutura química resulta em uma malha tridimensional de filamentos finos entrelaçados formando canais que

atuam como peneiras moleculares. A dimensão dos poros pode ser ajustada pela variação da concentração de agarose, ou seja, quanto maior a concentração, menor o diâmetro dos poros (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

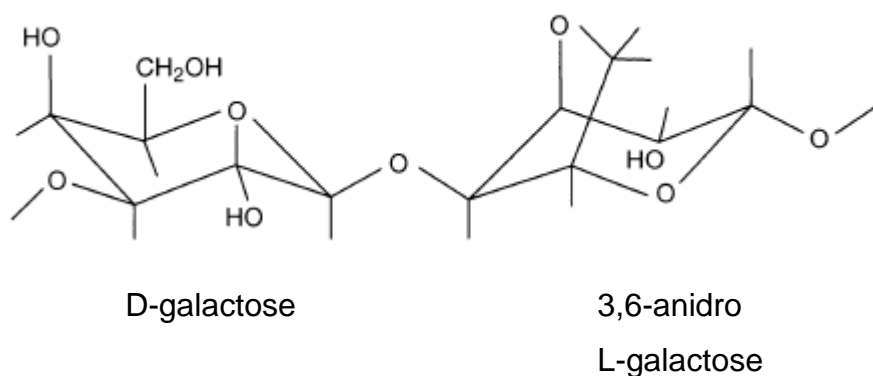


Figura 4 - Estrutura química da agarose. Fonte: Lonza, 2010.

A concentração de agarose é um fator determinante na separação eletroforética, pois determina o tamanho dos fragmentos de DNA que podem ser separados. As relações entre a concentração de agarose e o intervalo de separação de moléculas lineares de DNA são apresentadas na Tabela 2 (OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Intervalo de separação de moléculas de DNA kb (quilobase) em função da concentração de agarose presente no gel.

Concentração de agarose no gel (%)	Intervalo de separação de Moléculas de DNA (kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Fonte: Sambrook e Russel, 2001.

O fluxo migratório no gel é determinado pelo peso molecular. Moléculas de menor peso migram mais rápido de que as de maior peso, formando bandas características que podem ser visualizadas posteriormente, conforme demonstrado na

Figura 5-b. Os fragmentos indicados pela letra X possuem maior peso molecular do que os fragmentos representados pela letra Y, que por sua vez apresentam um peso molecular maior em relação aos fragmentos Z.

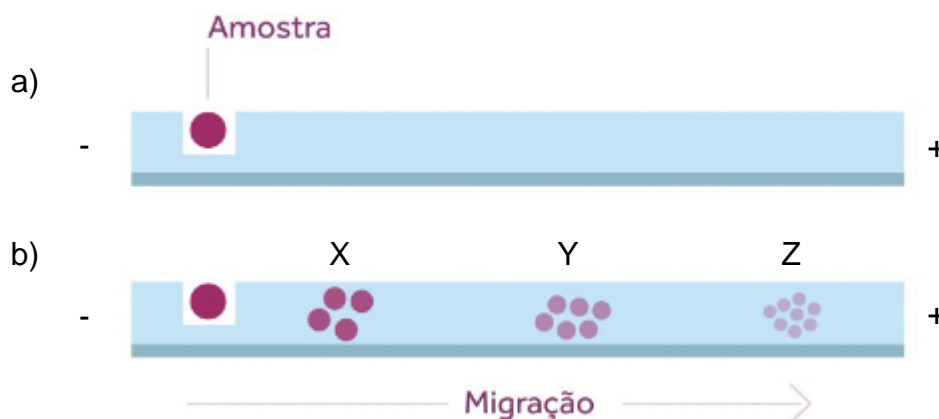


Figura 5 - Esquema de migração dos fragmentos de DNA no gel conforme peso molecular. a) Indica o campo elétrico no tempo zero, onde a amostra foi apenas inserida no poço. b) Indica o sentido durante a migração dos fragmentos, devido à carga negativa dos ácidos nucleicos a migração sempre ocorrerá em direção ao polo positivo. Os fragmentos que possuem maior peso molecular migram mais lentamente que os fragmentos de menor peso. Fonte: Adaptado de Kasvi, 2017.

Para ocorrer a migração, é preciso estabelecer um desequilíbrio no potencial elétrico entre duas regiões extremas em um meio contendo eletrólitos. Para tanto, é estabelecida uma diferença de potencial entre dois eletrodos ligados aos terminais de uma fonte de corrente contínua e dispostos em dois compartimentos contendo uma solução tampão. O meio físico de separação, igualmente tamponado, se comunica através de suas extremidades com as soluções-tampão dos eletrodos, fechando um circuito elétrico. A corrente elétrica, ao passar pelo meio, conduzida pelos pequenos íons presentes na solução, provoca o deslocamento da amostra (OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

A taxa de migração dos fragmentos de DNA através do gel é proporcional à tensão aplicada. O aumento de tensão faz com que a taxa de migração de grandes fragmentos de DNA seja maior do que a de pequenos fragmentos. Conseqüentemente, tensões maiores são menos efetivas na separação de grandes fragmentos de DNA (OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

Os ácidos nucleicos, por possuírem carga negativa, devido ao grupamento fosfato, migram sempre em direção ao polo positivo (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A localização do DNA no gel pode ser determinada por coloração com corantes intercalantes fluorescentes, tais como brometo de etídio ou SYBR® Gold. As bandas, após coradas, podem ser visualizadas diretamente em luz ultravioleta, conforme esquema na Figura 6. Se necessário podem ser recuperadas e utilizadas para diversos fins (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

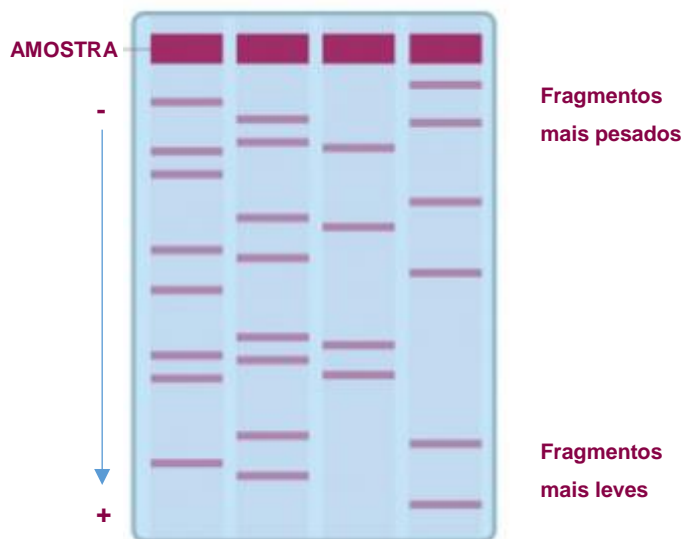


Figura 6 - Esquema de visualização das bandas em gel de agarose de quatro amostras distintas. Os fragmentos de DNA que apresentam maior peso molecular migram mais lentamente do que os fragmentos de menor peso molecular. Fonte: Adaptado de Kasvi, 2017.

O brometo de etídio (EtBr) é o corante não radioativo mais comumente utilizado como marcador para visualização de ácidos nucléicos em gel de agarose. Consiste em um composto aromático da classe da fenantridina, cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 7. Trata-se de um sólido de aspecto vermelho escuro, cristalino, não volátil e solúvel em água, que fluoresce quando exposto à luz ultravioleta, sendo estável em condições normais de temperatura e pressão (ROCHA, 2014).

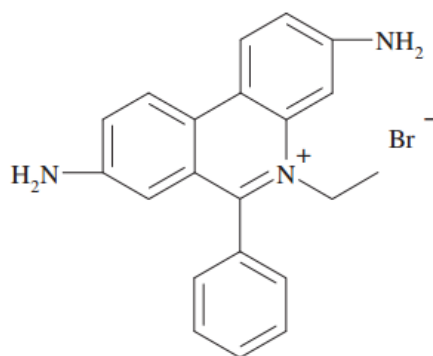


Figura 7 - Estrutura molecular do brometo de etídio (Fórmula C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br, Peso Molecular 394,31). Fonte: ZHANG *et al*, 2013.

O brometo de etídio, que é geralmente utilizado em solução aquosa em uma concentração de 1%, intercala na molécula de DNA promovendo a deformação da estrutura da molécula atenuando efeitos intramoleculares que causam a diminuição da fluorescência e removendo as moléculas de água (que é um agente supressor de fluorescência altamente eficiente) possibilitando, assim, um aumento de cerca de 20 vezes na intensidade de fluorescência após a ligação. No entanto, a sua capacidade de se intercalar aos pares de bases do DNA acaba também lhe conferindo características perigosas, como a mutagênese e a carcinogênese (ROCHA, 2014).

Ao término da eletroforese o gel é exposto à luz ultravioleta e fotografado (níveis de cinza) por um equipamento denominado fotodocumentador.

A Figura 8 apresenta um exemplo de imagem de um gel obtida pelo fotodocumentador.

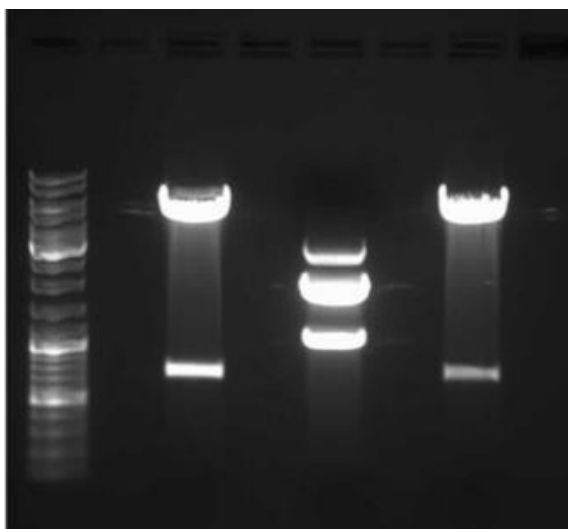


Figura 8 - Exemplo de imagem de gel de agarose capturada, em níveis de cinza, pelo fotodocumentador. Fonte: IBMP, 2016.

## 2.4 APLICAÇÃO DA Taq DNA POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A partir de uma demanda do Ministério Público em incluir os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT) em todas as amostras de sangue de doadores no país, o IBMP passou a produzir a enzima Taq DNA polimerase que é incorporada à Mistura de PCR, insumo componente dos vários *kits* para diagnóstico molecular fabricados pelo IBMP. A técnica utilizada no diagnóstico através da detecção do material genético do agente patógeno é a metodologia de PCR em Tempo Real.

Após a publicação no Diário Oficial da União da Portaria nº. 2.712, de 12 de novembro de 2013, que “redefine o regulamento técnico e de procedimentos hemoterápicos no Brasil” e institui a obrigatoriedade da realização do teste NAT em todo o País, tanto no âmbito público quanto no privado, o novo método diagnóstico passou a ser utilizado em paralelo à sorologia, visando aumentar a segurança transfusional no país (DOU, 2013).

A PCR em tempo real (*Real-Time PCR*) é uma evolução da técnica, pois permite o monitoramento da amplificação da molécula-alvo continuamente durante a reação (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Os equipamentos destinados à realização de PCR em tempo real associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utiliza os mesmos reagentes de uma PCR convencional acrescido de fluoróforos intercalados em cadeias de DNA, como o SYBR® Green, ou presentes em sondas de hibridização específicas, como na metodologia TaqMan (SCHIMITTGEN, *et al.*, 2000). Na presença de produto amplificado, os fluoróforos excitados por uma fonte de luz emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de sequências-alvo presentes na reação de amplificação (WATSON, 2009).

O SYBR® Green, assim como o brometo de etídio, é uma molécula que intercala entre os pares de base da dupla fita do DNA, conforme ilustrado na Figura 9, e quando exposto a luz ultravioleta emite uma fluorescência verde. As principais vantagens na utilização do SYBR® Green são o baixo custo da reação, a sensibilidade e a facilidade no uso, porém a especificidade da reação é consideravelmente baixa,

uma vez que o método não é seletivo, ou seja, as moléculas de SYBR® Green possuem a capacidade de se ligar mesmo ao menor fragmento, podendo intercalar em dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recém-formado. Assim, a reação pode ser monitorada continuamente. O aumento da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de sonda ligada. Na etapa de desnaturação do DNA as moléculas de SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal de fluorescência (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

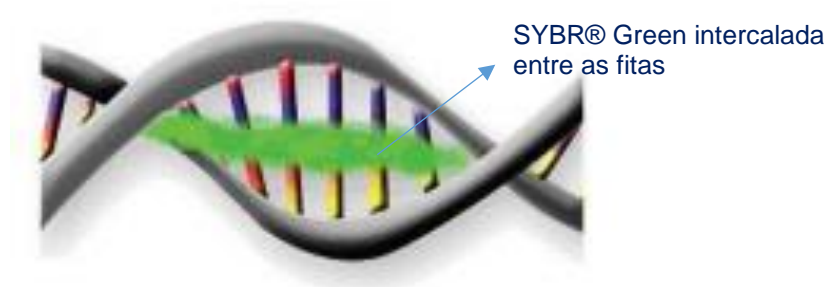


Figura 9 - Ilustração da molécula de SYBR® Green intercalada entre as fitas da molécula de DNA. Fonte: adaptado de Novais e Pires-Alves, 2004.

A utilização de sondas de hibridização Taqman é específica e confere maior precisão aos resultados da PCR, no entanto é uma tecnologia mais cara, pois o desenho da sonda, assim como os iniciadores, é baseado na sequência alvo. Nessa metodologia, um pequeno fragmento de DNA marcado, de fita simples, com cerca de 20 bases é utilizado para hibridizar outra molécula de DNA. Esta sonda apresenta em uma de suas extremidades um fluoróforo e na outra um repórter (*quencher*), conforme mostrado na Figura 10. Enquanto a sonda está intacta o *quencher* absorve a energia do fluoróforo em forma de luz e a dissipa em forma de calor. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada pela atividade exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase.

Na etapa de anelamento ocorre a ligação da sonda em sua sequência complementar no DNA molde. No processo de amplificação a sonda é degradada pela Taq, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a etapa de extensão. Essa cisão faz com que o *quencher* deixe de absorver a energia do fluoróforo, conforme ilustrado na Figura 11, resultando em um aumento exponencial da

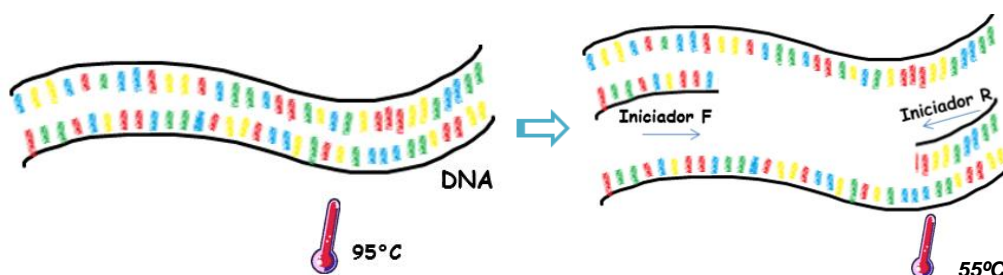


intensidade de fluorescência livre que é capturada pelo leitor de fluorescência e pode ser interpretada através de um gráfico (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).



Figura 10 - Ilustração de uma sonda TaqMan®, onde F representa o fluoróforo e Q o *quencher*. Enquanto a molécula permanece intacta a luz emitida pelo fluoróforo é absorvida pelo *quencher*. No momento em que a molécula sofre alguma degradação o *quencher* não mais absorve a energia do fluoróforo que passa a emitir uma fluorescência livre, que é então capturada pelo equipamento e representada em através de um gráfico. Fonte: Novais e Pires-Alves, 2004.

a)



b)

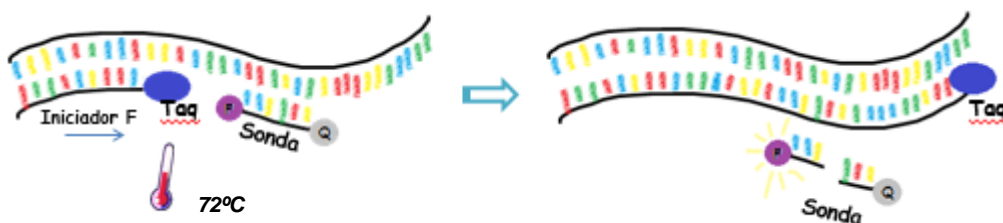


Figura 11 - Ilustração das etapas da reação de PCR em tempo real, utilizando uma sonda TaqMan®. a) Etapas de desnaturação da dupla fita do DNA e anelamento de iniciadores. b) Sonda TaqMan® hibridizada, polimerização da fita pela Taq DNA polimerase e cisão da sonda pela atividade exonucleásica da enzima. Fonte: Autoria própria

No diagnóstico molecular geralmente utilizam-se sondas de hibridização específicas (TaqMan) por ser uma metodologia que apresenta maior seletividade e

especificidade. Para isso, o material genético do agente patógeno (vírus, bactérias, protozoários) deve ser sequenciado e a partir dessa sequência uma região específica é selecionada. Com base nessa sequência específica são desenvolvidos iniciadores e sondas que possibilitam o diagnóstico da doença.

A importância da aplicação do teste de ácido nucléico (NAT) é justamente porque a técnica de PCR é bastante sensível, permitindo a detecção logo no início da infecção.

A grande vantagem do NAT, é que se observa uma considerável redução da janela imunológica, que é o intervalo de tempo entre a infecção pelo agente patógeno (antígeno) e a produção de anticorpos no sangue em níveis detectáveis pelos testes sorológicos atuais. No teste NAT esse período de tempo passa de 19 a 22 dias para 10 dias no caso do HIV e de 60 dias para 11 dias para HCV e HBV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A implementação da tecnologia NAT para triagem em bancos de sangue reduz o risco de transmissão de agentes virais transmissíveis por transfusão, uma vez que é possível a detecção mais precocemente dos antígenos em doações realizadas durante o período posterior a soro-conversão, porém, ainda em janela imunológica para sorologia.

O Kit NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro, desenvolvido com tecnologia totalmente nacional, tem capacidade de processar 96 reações, destas duas são controles negativos, duas controles positivos e 92 reações que podem ser processadas em *pool* de seis amostras, permitindo assim o processamento de 552 amostras em uma única rotina. Em caso de resultado positivo as seis amostras que compõem a reação deverão ser processadas individualmente em uma próxima rotina para identificação da amostra positiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

### 3 PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS

O Processamento Digital de Imagens (PDI) é uma área da teoria de sinais, da Eletrônica e da Informática. O PDI consiste na conversão de imagens de entradas em resultados que podem ser outras imagens, o reconhecimento de um padrão, a detecção de objetos, ou mesmo cálculos de grandezas físicas como velocidade, tamanho. Alguns exemplos de aplicação do processamento digital de imagens são: biometria, detecção de fases ou objetos, diagnóstico e análises de imagens médicas.

Uma imagem digital é composta por um número finito de elementos, cada um dos quais tem uma localização e valor específicos. Esses elementos são chamados elementos de imagem ou pixels. Pixel é o termo usado mais amplamente para denotar os elementos de uma imagem digital (GONZALEZ e WOODS, 2008). A partir desta matriz de pixels que representa a imagem, diversos tipos de processamento digital podem ser implementados por algoritmos computacionais (ESQUEF, ALBUQUERQUE e ALBUQUERQUE, 2003).

O interesse em métodos de processamento digital de imagens decorre de duas categorias principais de aplicação: a melhoria de informação contida na imagem para facilitar a interpretação humana, como por exemplo acompanhamento do feto durante a gestação por ultrassom; e a análise automática de dados e/ou objetos extraídos de uma imagem, como por exemplo radares de trânsito (GONZALEZ e WOODS, 2008).

Na Figura 12 são apresentadas algumas das principais etapas para processamento de imagens digitais. A primeira delas consiste na aquisição da imagem de forma analógica ou digital. Após a imagem ser digitalizada e armazenada, são aplicadas técnicas de pré-processamento para melhoria da qualidade, que consistem geralmente, de transformações lineares e não lineares aplicadas para aumento de contraste, remoção de ruídos, reamostragem de pixels em uma nova escala, extração de informações da imagem para segmentação, entre outras.

Após a etapa de pré-processamento, o próximo passo consiste na segmentação dos objetos de interesse presentes na cena. Uma vez segmentados os objetos, são aplicadas técnicas de análise, que dependem do que se pretende obter com o PDI (MANTIN NETO, VAZ e CRESTANA, 2007).



Figura 12 - Etapas básicas do Processamento de Imagens. Fonte: Adaptado de Martin Neto, Vaz e Crestana, 2007.

### 3.1 AQUISIÇÃO DIGITAL DE IMAGEM

Uma imagem digital pode ser definida como uma cena real que foi digitalizada, ou seja, convertida em uma função de representação discreta. O processo de discretização faz uma amostragem na cena e converte-a em uma imagem digital que pode ser representada por uma matriz de  $M$  por  $N$  pontos, cujo elemento fundamental é o pixel, cada pixel recebe um valor discreto de intensidade ou de cor. A resolução espacial determina o nível de detalhamento de objetos, ou seja, quanto mais pixels, mais detalhes podem ser observados na imagem (MANTIN NETO, VAZ e CRESTANA, 2007).

Atualmente, o dispositivo mais utilizado para aquisição de imagens é a câmera CCD (*charge-coupled device*), que consiste em uma matriz de células semicondutoras fotossensíveis, que atuam como capacitores, fazendo um armazenamento da carga elétrica proporcional à energia luminosa incidente em cada célula (FERNANDES JR, KANAAN e GOMES, 2002).

Os valores destas cargas são transferidos para a saída através de sequências de linhas e colunas pelo deslocamento destas cargas entre as células vizinhas. Este processo de deslocamento é repetido até todos os pixels sejam lidos na saída e digitalizados (SOUZA e CARDOZA, 2012).

### 3.2 TÉCNICAS DE PRÉ-PROCESSAMENTO

O pré-processamento é a etapa que visa melhorar a qualidade da imagem, corrigindo efeitos provenientes da aquisição e destacando detalhes ou objetos de interesse, de modo a facilitar sua visualização.

Dependendo do processo de aquisição a imagem pode apresentar diversas imperfeições, tais como: presença de pixels ruidosos, contraste e/ou brilho inadequados, contornos não definidos, objetos interrompidos ou indevidamente conectados, entre outros (MARQUES FILHO e VIEIRA NETO, 1999).

A Figura 13 ilustra um pré-processamento simples: aplicação de um filtro mediana, para redução de ruídos e em seguida aplicação de um filtro passa-alta, para realçar os contornos dos objetos de interesse presentes na imagem (ESQUEF, ALBUQUERQUE e ALBUQUERQUE, 2003).

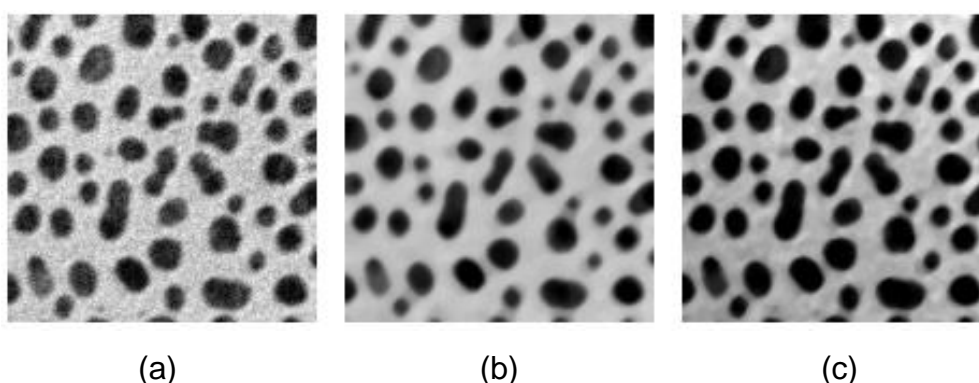


Figura 13 - Exemplo de pré-processamento de imagem.(a) Imagem original corrompida com ruído gaussiano; (b) imagem após aplicação de um filtro mediana para minimização do ruído; e (c) Imagem após aplicação de um filtro passa-alta para realce dos contornos. Fonte: Esquef, Albuquerque e Albuquerque, 2003.

### 3.3 SEGMENTAÇÃO

Segmentar uma imagem significa, de modo simplificado, separar a imagem como um todo em partes que a constituem e que se diferenciam entre si. Os procedimentos de segmentação dividem uma imagem em seus componentes ou objetos. Em geral, a segmentação autônoma é uma das tarefas mais difíceis no processamento de imagens digitais. Um procedimento de segmentação robusto geralmente possibilita a solução bem-sucedida de problemas de imagem que exigem que os objetos sejam identificados individualmente. Por outro lado, algoritmos de segmentação fracos ou erráticos quase sempre garantem falha eventual. Em geral, quanto mais precisa a segmentação, maior a probabilidade de sucesso (GONZALEZ e WOODS, 2008).

A técnica de separação de um objeto em uma imagem, mais conhecida como segmentação de imagens, não é uma tarefa muito fácil e muitas vezes requer filtros elaborados para que se consiga atingir resultados eficientes.

Dentre todas as etapas do processamento de imagem, a segmentação é considerada a mais crítica do tratamento da informação, pois é na etapa de segmentação que são definidas as regiões de interesse para posterior processamento e análise. Como consequência deste fato, quaisquer erros ou distorções presentes nesta etapa refletem nas etapas seguintes, de forma a produzir ao final do processo resultados não desejados que podem contribuir de forma negativa para a eficiência de todo o processamento (ESQUEF, ALBUQUERQUE e ALBUQUERQUE, 2003).

O método inicial comumente utilizado por sistemas de processamento digital de imagens é a limiarização, cujo princípio consiste em destacar o objeto do fundo através da escolha de um ponto de corte (*threshold*), separando-os em duas classes: o fundo e o objeto, através do agrupamento de regiões homogêneas ou de detecção de bordas (LOPES, 2003).

A limiarização é a transformação da imagem de entrada  $f(x,y)$  gerando uma imagem de saída  $g(x,y)$ , sendo

$$g(x, y) \begin{cases} = 1 & \text{se } f(x, y) \geq T \\ = 0 & \text{se } f(x, y) < T \end{cases} \quad (1)$$

onde  $T$  representa o limiar (*Threshold*) determinado para estabelecer a segmentação. O resultado obtido é uma imagem binária em que geralmente os pixels da região de interesse são rotulados com o valor “1” e restante da imagem com o valor “0” (MANTIN NETO, VAZ e CRESTANA, 2007).

Ao longo dos anos, muitas técnicas de limiarização de imagens têm sido desenvolvidas e essa evolução contínua se deve ao fato de que nenhum dos métodos é capaz de garantir um excelente desempenho sob quaisquer condições. Embora estejam disponíveis muitas técnicas baseadas em diferentes princípios, todas operam sob certos pressupostos implícitos ou explícitos. Um requisito para uma operação bem-sucedida de algoritmos de limiar de dois níveis é a presença duas modas distintas no histograma de intensidades, ou seja, picos bem definidos, separados por um vale e que não devem ser muito diferentes em tamanho (ROSIN, 2001).

O histograma da imagem digital é uma ferramenta bastante útil na etapa de pré-processamento, pois fornece uma visão estatística sobre a distribuição dos pixels, bem como sobre o contraste da imagem e os níveis de iluminação, sendo bastante utilizado na etapa de segmentação, principalmente quando se aplicam técnicas que utilizam a similaridade entre os pixels (GONZALEZ e WOODS, 2008).

A caracterização prévia do histograma correspondente à imagem a ser avaliada é de fundamental importância, principalmente quando há a utilização de um algoritmo para segmentação binária. Em estatística, uma “Moda” é um valor que ocorre com maior frequência em um determinado conjunto de dados. Os histogramas de imagens em níveis de cinza podem ser classificados devido ao seu comportamento modal, bimodal ou multimodal. A Figura 14 apresenta um exemplo de um histograma onde ocorrem dois picos bem definidos. Este tipo de histograma é chamado de bimodal (MOREIRA, 2001).

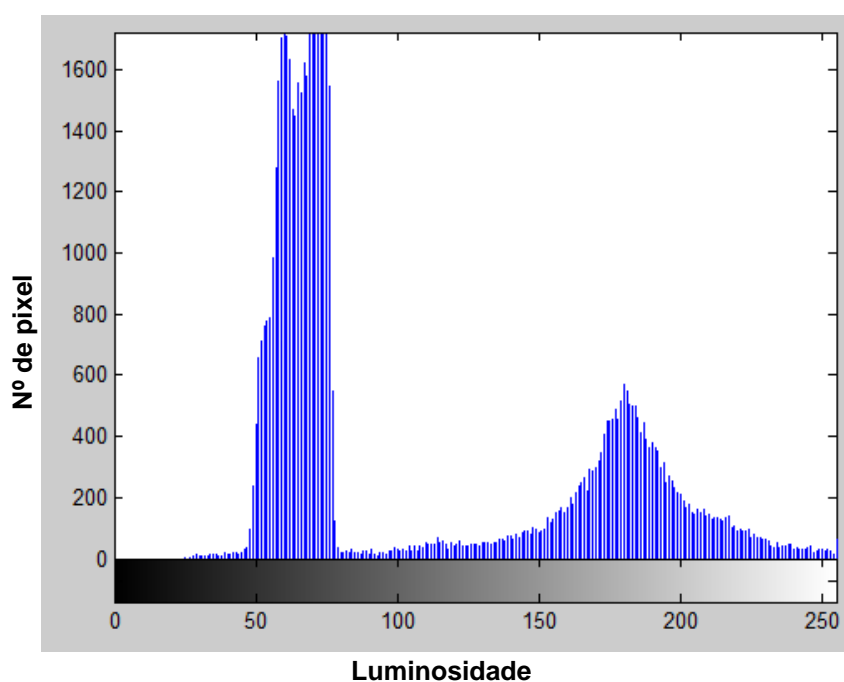


Figura 14 - Exemplo de histograma bimodal. Onde o zero indica os pixels na cor preta e o 255 indica pixels na cor branca. Os picos indicam uma concentração de uma maior quantidade de pixels no mesmo nível de cinza. Fonte: Autoria própria.

Embora exista uma ampla gama de técnicas de limiar de imagens disponíveis, estas podem ser aplicadas mais facilmente em imagens que apresentam histogramas de intensidade bimodais ou multimodais. No entanto existem algumas exceções que consideram explicitamente o caso de histograma com distribuição unimodal, ou seja,

o segundo pico é muito pequeno ou está submerso no pico principal, conforme evidenciado na Figura 15 (ROSIN, 2001).

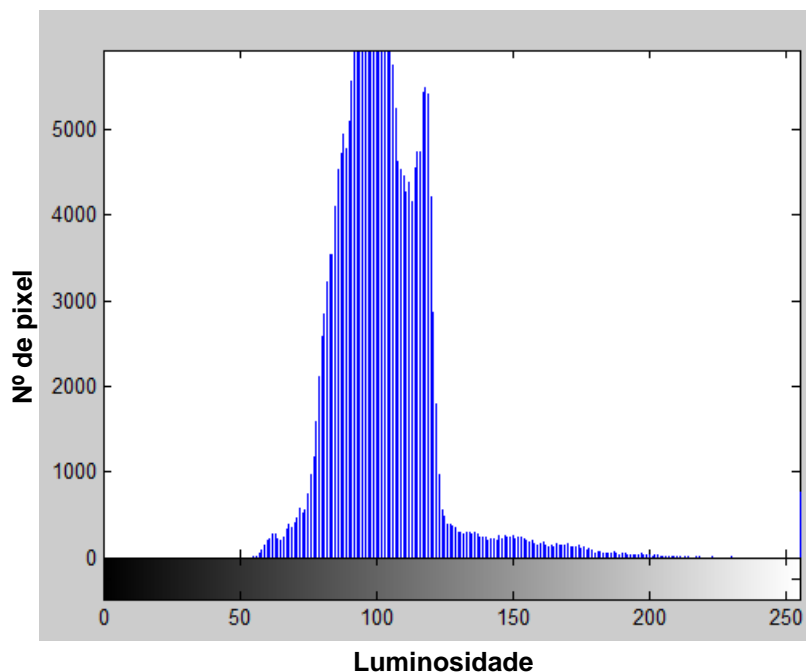


Figura 15 - Representação de um histograma unimodal, proveniente de uma imagem de gel de eletroforese. O vale entre os picos é pouco acentuado, ou seja, o segundo pico está praticamente inserido no pico principal. Fonte: autoria própria.

O limiar é uma das técnicas mais importantes e eficazes e desempenha um papel fundamental ao segmentar imagens com níveis de cinza distintos. Contudo, a dificuldade reside na escolha do limiar a ser adotado.

Um dos métodos globalmente utilizados é o método de Otsu, que consiste na escolha do limite ótimo ao maximizar a variância entre classes dos níveis de cinza nas porções de objeto e fundo (SHEEBA e MANIKANDAN, 2014).

No método de Tsai o limiar é localizado detectando uma descontinuidade no histograma. Isso é conseguido primeiramente aplicando um filtro gaussiano<sup>3</sup> para suavizar o histograma. Em seguida, é encontrado um máximo local de curvatura do histograma. As desvantagens deste esquema estão na necessidade de especificar

---

<sup>3</sup> Filtro Gaussiano consiste em um operador que permite a varredura da imagem por uma máscara, é utilizado para suavizar as imagens e remover ruídos (NASCIMENTO, 2012).



parâmetros, tais como: (1) a quantidade de suavização aplicada ao histograma, e (2) o tamanho da região de suporte sobre a qual a curvatura do histograma é calculada, pois valores incorretos farão com que o limite seja perdido (ROSIN, 2001).

O método de limiarização proposto por Rosin (2001), destinado à limiarização de imagens com histograma essencialmente unimodal, consiste em um algoritmo de limiar de dois níveis extremamente simples. Supõe que há uma população dominante na imagem que produz um pico principal único, localizado na extremidade inferior do histograma em relação à população secundária. O limiar escolhido por este método é o valor do histograma que maximiza a distância perpendicular entre a curva que representa a distribuição de frequência dos níveis de cinza da imagem e a reta que passa pelo valor mínimo do histograma. Em outras palavras, uma linha reta (R) é traçada a partir do pico (P) do histograma até o final da cauda (C), e o limiar (*threshold*) é selecionado no ponto do histograma mais distante da linha reta, conforme ilustrado na Figura 16.

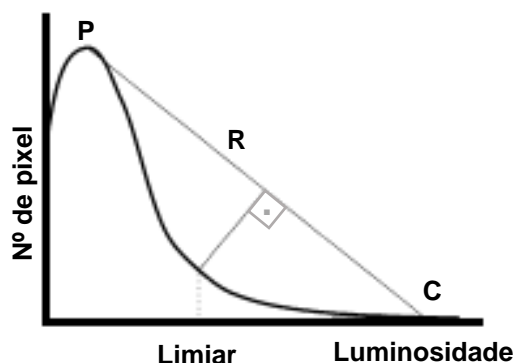


Figura 16 - Processo para determinar o limiar (*threshold*) a partir da intensidade do histograma. Fonte: adaptado de Rosin, 2001.

Este método fornece resultados adequados em muitos casos, mas tende a ser sensível a parâmetros tais como as flutuações estatísticas do histograma e a posição do nível de cinza mais elevado (COUDRAY, BUESSLER e URBAN, 2010)

### 3.4 DETECÇÃO DE BANDAS EM IMAGENS DE GEL DE AGAROSE

As imagens de eletroforese em gel digitalizadas são amplamente utilizadas para extrair informações valiosas do material biológico em muitas aplicações de biologia molecular (PARK, *et al.*, 2012).

Diversas abordagens têm sido propostas para minimizar o problema da inspeção visual em imagens de gel de agarose que é um processo lento, impreciso e completamente dependente da experiência do analista.

O primeiro passo para uma análise automatizada de imagens de gel de agarose é geralmente a identificação das bandas.

Utilizando técnicas de processamento de imagens é possível identificar, classificar e mensurar, por exemplo, o peso molecular de RNA, DNA, proteínas e enzimas, utilizando padrões estabelecidos (OLIVEIRA, *et al.*, 2012).

O método proposto por Oliveira e colaboradores, apresenta um algoritmo base para detecção do marcador (pequenas frações de DNA que servem para balizar o tamanho dos fragmentos presentes na amostra) e das colunas presentes no gel de eletroforese, com objetivo de criar bases para desenvolvimento de ferramentas futuras que possam auxiliar os pesquisadores. A metodologia abordada para detectar o marcador faz uso da imagem segmentada e da informação contida em cada coluna. Após binarização, a imagem é submetida a um operador morfológico. Em seguida, cada coluna é representada por um vetor e baseado em seu conteúdo as colunas são delimitadas (OLIVEIRA, *et al.*, 2012).

Para Machado e outros, o problema pode ser colocado como a determinação do número, localização e orientação das bandas na imagem, com base na análise da intensidade dos níveis de cinza. Sendo assim, foi proposto um novo algoritmo iterativo de filtragem considerando a periodicidade do padrão de projeção da imagem. Após a filtragem, a projeção apresenta muitos máximos locais que podem indicar a presença de bandas na imagem. Esses máximos podem ser determinados tomando a derivada de segunda ordem da função (MACHADO, *et al.*, 1997).

Um outro método computacional para comparação e identificação de perfis idênticos entre as amostras foi desenvolvido por Park *et al.* O método utiliza diversas técnicas de processamento de imagens sendo aplicado para segmentar as colunas e bandas em imagens de gel de eletroforese. As colunas são convertidas em vetores

de posição que indicam as posições das bandas, permitindo a identificação com precisão de colunas idênticas, facilitando o trabalho dos pesquisadores ao analisar diversas amostras em uma mesma imagem (PARK, *et al.*, 2011).

Outros trabalhos ainda, apresentam métodos para detecção de raias em gel de agarose, com objetivo de automatizar a comparação entre as amostras e identificação de perfis idênticos, dentre eles pode-se citar: Burn e Kiel, que apresentam uma abordagem para identificação de raias através da aplicação de histogramas de projeção na segmentação de imagens de eletroforese (BURN e KIEL, 2010); Paulino e Boaventura, cujo método proposto utiliza projeções e aplicação de filtro de Kalman para suavizar a função de projeção (PAULINO e BOAVENTURA, 2007).

Após descrever os principais fundamentos do PDI e suas formas básicas de processamento, bem como, fazer uma revisão bibliográfica sobre as técnicas de detecção de bandas em imagens de gel de agarose, no próximo Capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados nesta dissertação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa dissertação é fruto de uma parceria do Instituto de Biologia do Paraná com a UTFPR através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB), na perspectiva de integração de diferentes áreas de conhecimento, com o objetivo de potencializar inovações tecnológicas, diminuir a dependência de tecnologias externas do país e possibilitar o aumento da competitividade em setores estratégicos.

Após a purificação da enzima Taq DNA polimerase, pelo Setor de Produção do IBMP, o Controle de Qualidade realiza um teste para determinação da atividade enzimática. A Figura 17 apresenta um fluxograma básico do procedimento padrão utilizado atualmente pelo IBMP para quantificação da Taq DNA Polimerase. O processo é composto por cinco etapas, sendo: I) Preparo do gel de agarose, II) Teste de Atividade, que consiste no preparo das amostras e reação de PCR, III) Aplicação das amostras no gel e eletroforese, IV) Aquisição da imagem e V) Análise do perfil eletroforético da imagem. A duração média de cada etapa é de aproximadamente 15 min, 60 min, 65 min, 5-10 min, 30-40 min, respectivamente. Deste modo, todo o processo consome em torno de 3 horas.

Nas subseções abaixo serão detalhadas cada uma destas etapas.

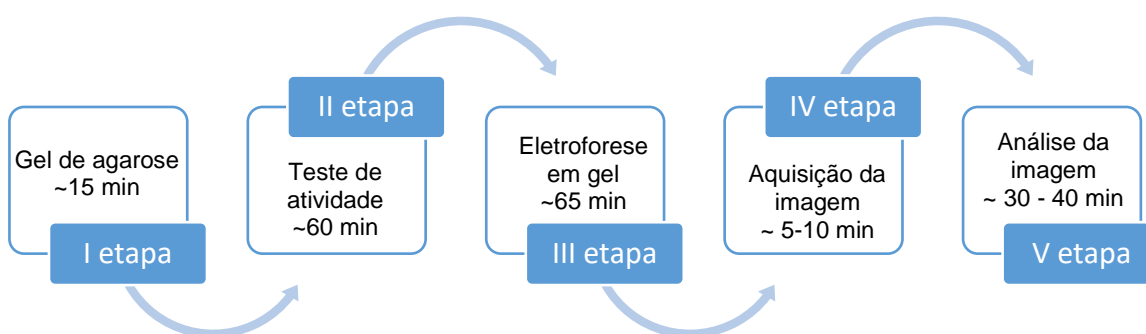


Figura 17 - Fluxograma básico do processo padrão para determinação da atividade enzimática utilizado pelo Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP.

Os equipamentos utilizados nesse procedimento foram: Balança de Precisão Mettler Toledo (PB01502-L), Cabine de Segurança Biológica (Veco-Seg09), micropipetadores (Eppendorf Reserach Plus) devidamente calibrados, um Termociclador (Gene Amp PCR System 9700 – Applied Biosystems) devidamente

qualificado, uma fonte de eletroforese EPS-601 GE Helthcare, e um sistema de fotodocumentação UVP BIODOC-IT.

#### 4.1 PREPARO DO GEL DE AGAROSE E OBTENÇÃO DA IMAGEM

Na primeira etapa do processo deve-se preparar o gel de agarose. O preparo do gel é realizado basicamente através da dissolução de agarose em solução tampão em um forno de micro-ondas, por aproximadamente 4 minutos. Neste teste é utilizado um gel com 0,75% de agarose. Após a completa dissolução da agarose, o gel é resfriado até aproximadamente 60°C, em seguida o brometo de etídio é adicionado e a solução é despejada em um suporte para cuba de eletroforese (Figura 18 a). Sobre a solução ainda morna, coloca-se um pente (tira de teflon denteada que permanecerá a 1 mm do fundo do suporte). Isto serve como molde para formação de cavidades (poços) no gel, conforme apresentado na Figura 18 b. Ao esfriar, o gel fica com aspecto ligeiramente turvo e com resistência mecânica diretamente proporcional à concentração de agarose (NAOUM, CORREA e POSSIK, 2011).

Ao despejar o gel de agarose na cuba é de extrema importância avaliar se não há bolhas na malha do gel. Outro fator que deve ser considerado é que a cuba contendo o gel ainda morno deve ser colocada em uma bancada nivelada, para evitar que o gel fique assimétrico.

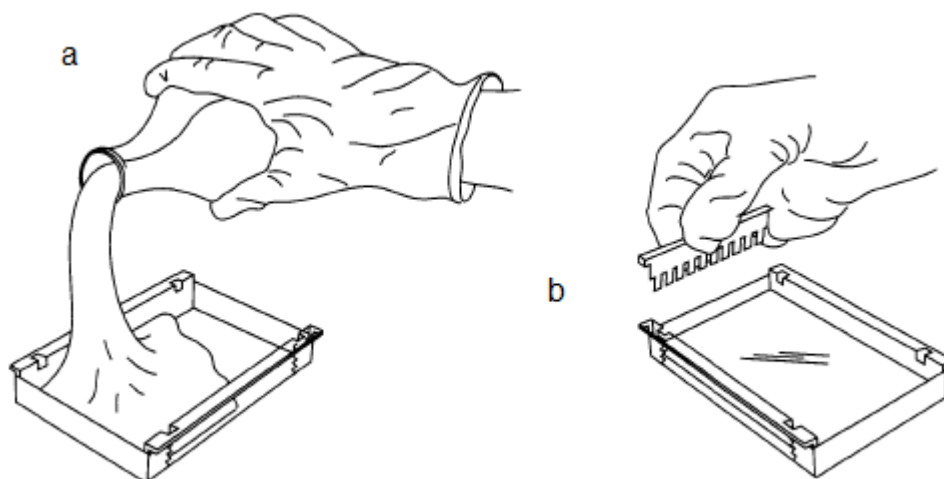


Figura 18 - Etapas de preparo do gel de agarose. Primeiramente, a agarose é dissolvida e fundida em uma solução tampão, sob uma fonte de calor (ex.: micro-ondas), a) a solução ainda morna é vertida em uma cuba de eletroforese, b) inserção do pente que formará os poços onde as amostras serão aplicadas. Ao solidificar a agarose forma uma matriz onde ocorrerá a migração das moléculas de DNA. Fonte: Sambrook e Russel, 2001.

#### 4.2 TESTE DE ATIVIDADE Taq DNA POLIMERASE

Na segunda etapa do processo as amostras são preparadas e inseridas no termociclador, esse processo ocorre enquanto o gel de agarose solidifica na cuba. O teste de atividade consiste em um procedimento padrão do Laboratório de Controle de Qualidade e é realizado para determinação da concentração em unidades da enzima Taq DNA Polimerase produzida no IBMP. A metodologia utilizada para quantificação da enzima consiste, basicamente, na amplificação de uma fita simples de um DNA molde pela Taq DNA Polimerase, em comparação com uma enzima de referência previamente quantificada. A metodologia aplicada é a PCR convencional. A faixa de aceitação estabelecida para este teste é de 45 a 55 U/ $\mu$ L no cálculo final.

Primeiramente, são realizadas diluições seriadas das enzimas de referência e de teste em paralelo. Essas diluições são pipetadas em um tubo contendo a mistura de insumos necessários para que a reação de PCR ocorra, conforme apresentado no Capítulo 2. Os tubos contendo todos os insumos são inseridos no termociclador e

submetidos a uma ciclagem padrão. Ao término da reação, as amostras são aplicadas em um gel de agarose para posterior análise.

### 4.3 ELETROFORESE EM GEL

Após a solidificação do gel, o suporte é colocado em uma cuba de eletroforese contendo a mesma solução tampão utilizada para fundir a agarose, em quantidade suficiente para que o gel fique totalmente submerso.

As amostras de DNA, amplificadas na etapa anterior, são aplicadas nos poços juntamente com um tampão de amostra de alta densidade, geralmente preparado a partir de uma solução de glicerol e corante, utilizado apenas para facilitar a aplicação e auxiliar no monitoramento da corrida.

A cuba (Figura 19) contendo o gel é ligada em uma fonte de eletroforese e submetida a uma tensão de aproximadamente 100 V e uma corrente de cerca de 250 mA. As amostras de DNA migram do polo negativo para o positivo. Ao término da eletroforese, após um período de tempo pré-estabelecido de uma hora, a eletroforese é interrompida.



Figura 19 - Imagem de cuba de eletroforese. Fonte: SpinLab, 2014.

#### 4.4 AQUISIÇÃO DA IMAGEM

Durante o processo de eletroforese, o gel aquece ligeiramente. Ao retirá-lo da cuba, deve ser resfriado por cerca de 5 minutos para que os vapores provenientes do aquecimento não comprometam a captura da imagem pela câmera do equipamento.

O gel é levado ao fotodocumentador e a visualização da imagem é realizada através de uma luz ultravioleta (UV). O gel é fotografado pelo fotodocumentador que consiste em uma câmara escura contendo uma iluminação UV sob a base e uma câmera CCD acoplada na parte superior do equipamento. A Figura 20 apresenta uma imagem de um fotodocumentador.

O gel contendo o brometo de etídio é posicionado na base do equipamento, a luz ultravioleta excita as moléculas de brometo intercaladas ao DNA, emitindo um brilho laranja que pode ser fotografado pela câmera em níveis de cinza. A Figura 21 apresenta, como exemplo, uma imagem de gel de agarose, proveniente do teste de atividade da Taq DNA Polimerase.

As imagens são impressas em papel fotográfico termossensível.

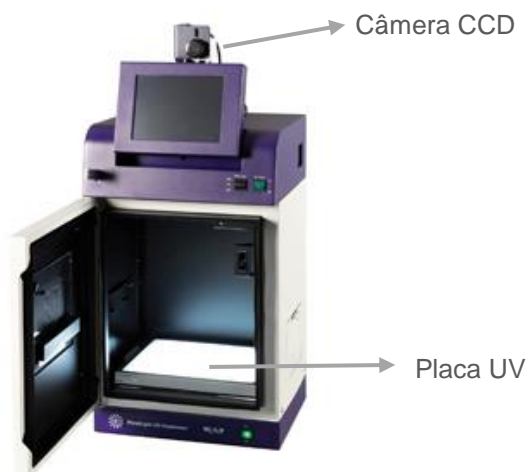


Figura 20 - Imagem de um equipamento fotodocumentador. Fonte: Adaptado de UVP, 2016.



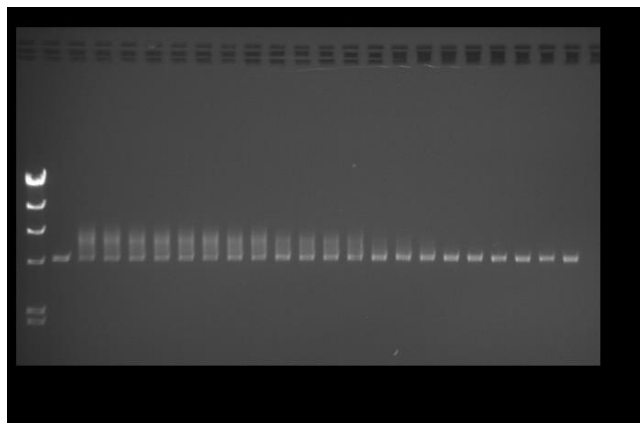


Figura 21 - Imagem de gel de eletroforese proveniente do Teste de Atividade da Taq DNA Polimerase, produzida pelo IBMP e obtida através do fotodocumentador.

#### 4.5 ANÁLISE DA IMAGEM

A última etapa desse processo consiste na avaliação do perfil eletroforético da imagem, a partir dessa análise é obtida a quantificação da enzima.

O fato de o teste utilizar-se de apenas um ciclo de amplificação favorece a formação de um rastro, que são chamados de bandas. Isso se dá porque em um único ciclo de amplificação são gerados diversos fragmentos de tamanhos diferentes e que migram na matriz do gel de acordo com o tamanho, possibilitando a quantificação da enzima. A metodologia padrão utilizada pelo IBMP para determinação da atividade enzimática é obtida a partir da análise e medição da altura das bandas visualizadas na imagem do gel com auxílio de uma régua milimétrica comum. Cada imagem é composta por duas bandas de controle negativo e sete conjuntos de bandas que correspondem às enzimas de referência e teste, intercaladas. O processo de medição é realizado por no mínimo 3 operadores, visando reduzir variações de subjetividade.

Primeiramente uma linha é traçada na base entre a primeira e a última banda, que representam os controles negativos da reação e por isso não apresentam a formação de um rastro (posições 1 e 9), conforme mostra a Figura 22.

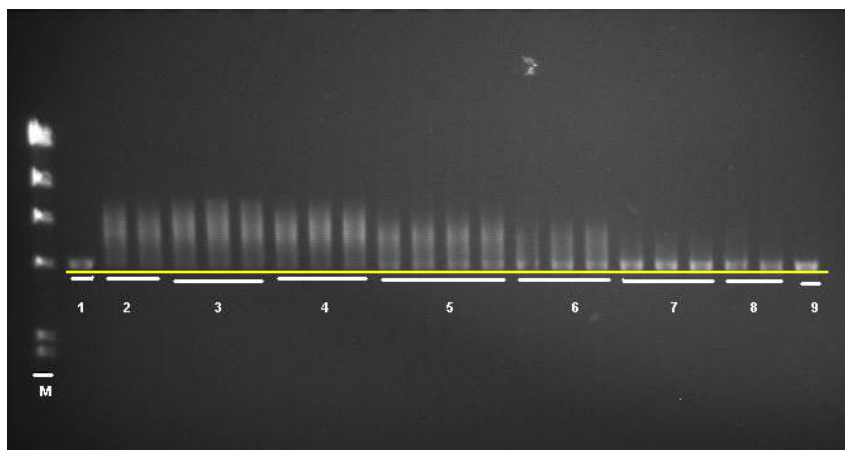


Figura 22 - Linha de base (amarela) entre a primeira e a última banda, que correspondem aos controles negativos. As bandas 2 a 8 correspondem às diluições (em diferentes concentrações) das enzimas referência e teste, utilizadas no ensaio de quantificação. A letra M representa as bandas do marcador, que permite estimar o tamanho dos fragmentos em pares de base (pb).

Dentre as bandas, a altura de apenas 16 são medidas em mm (milímetro) individualmente a partir da linha de base, conforme representado na Figura 23. Somente são medidas as bandas de 2 a 8, que correspondem às diluições em diferentes concentrações das enzimas (referência e teste) utilizadas no ensaio. A posição M representa o marcador, que serve para orientar o tamanho dos fragmentos presentes no gel.

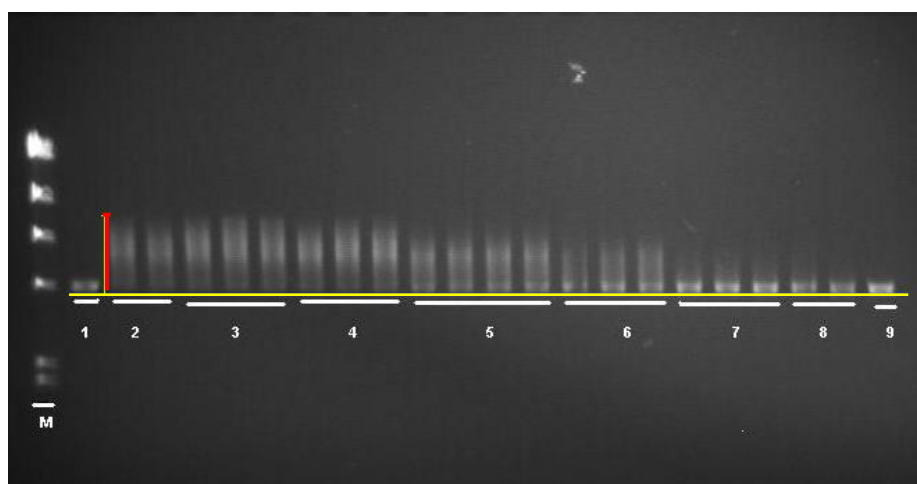


Figura 23 - Exemplo de como são realizadas as medidas da altura das bandas (em vermelho).

A atividade é determinada com base nas alturas de cada banda em comparação com as alturas das bandas da enzima de referência.

Os valores das alturas das 16 bandas medidas são inseridos em uma planilha de cálculo (MSEXCEL®), vide modelo no Anexo A.

A partir da atividade (expressa em U/ $\mu$ L) estimada neste teste, a enzima é ajustada pelo Setor de Produção e utilizada para o preparo de insumos que irão compor os diversos *Kits* diagnósticos produzidos pelo IBMP.

#### 4.6 DETECÇÃO AUTOMÁTICA DAS BANDAS

Na tentativa de minimizar a subjetividade da técnica apresentada no item anterior (item 4.5), buscou-se a aplicação de um programa computacional que viabilizasse a medição automática das bandas possibilitando a padronização dos resultados, uma vez que um sistema de visão artificial pode efetuar medições mais exatas e uniformizadas, baseadas na contagem de pixels.

O programa computacional foi desenvolvido pelo aluno Mayko Min Ian Lie, no Laboratório Labien sob a orientação do Professor Dr. Gustavo Benvenuto Borba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (LIE, 2016).

As etapas básicas do método desenvolvido para medição automática das bandas são apresentadas no fluxograma da Figura 24.

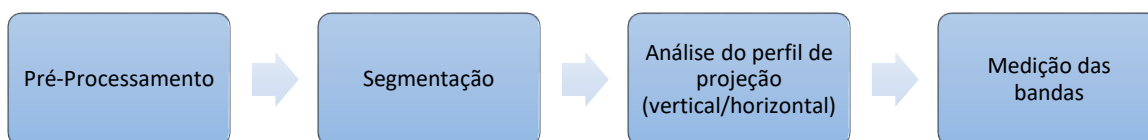


Figura 24 - Fluxograma básico contendo as etapas principais do método desenvolvido para automatizar a medição das bandas em gel de eletroforese.

Em uma etapa inicial, todas as linhas e colunas com intensidade zero, que não fazem parte da análise, são eliminadas da imagem. Em seguida é aplicado um filtro Gaussiano, que consiste em um método para suavização de imagem e eliminação de ruídos. Em alguns casos, as imagens apresentam iluminação irregular e para correção deste problema foi aplicado um filtro *top hat*, com um elemento estruturante em forma de disco, para remover a iluminação de fundo irregular (ESTRELA, *et al.*, 2015).

Após as etapas de pré-processamento as imagens foram submetidas a um processo de segmentação, nesse caso foi utilizado o método de limiarização automática de Rosin (2001), destinado à segmentação de imagens com histograma essencialmente unimodal. O método consiste em traçar uma reta a partir do pico do histograma até o final da cauda, o limite é selecionado no ponto do histograma mais distante da linha reta, conforme mostrado na Figura 16. Em seguida, é aplicada uma abertura morfológica para remoção de pequenas protuberâncias indesejadas. Devido à irregularidade das bandas, estas são substituídas por *bounding-boxes*, que servem para delimitar a área e facilitar a medição (LIE, 2016).

A localização das bandas é dada pela varredura e localização dos picos em um perfil de projeção vertical.

Nesta projeção, todos os valores dos pixels de cada coluna são somados, criando um vetor unidimensional, onde cada valor corresponde a uma coluna da imagem 2D, conforme representado na Figura 25. Cada pico determina o centro de uma banda.

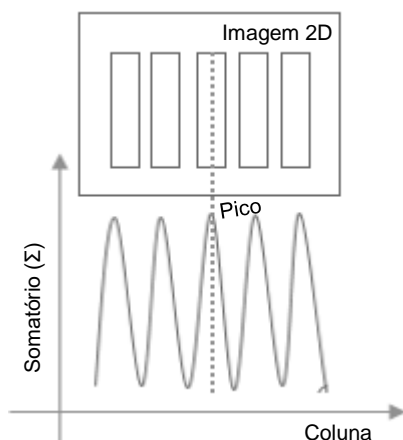


Figura 25 - Projeção vertical da imagem 2D. Fonte: Autoria própria.

Após a localização de cada banda, uma projeção horizontal é utilizada para detecção da altura da banda (ESTRELA, *et al.*, 2015). A Figura 26 ilustra esse processo.

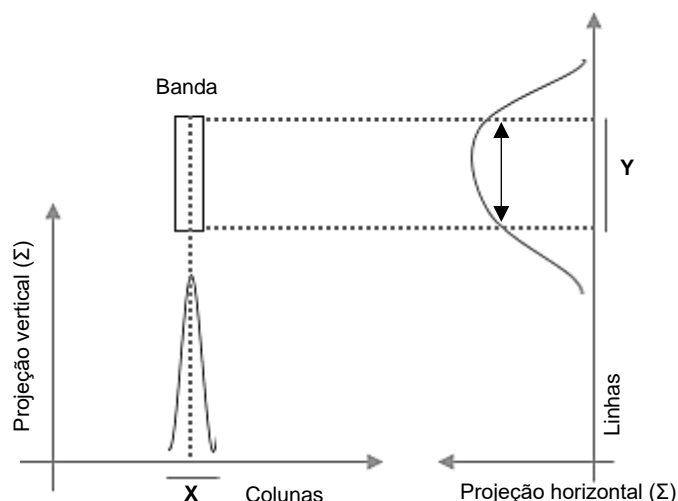


Figura 26 - Projeções vertical e horizontal de uma banda e sua respectiva altura, onde X representa a coluna analisadas na projeção horizontal e Y representando a altura da banda. Fonte: Autoria própria.

O programa, desenvolvido em MatLab®, além de realizar a medição milimétrica das alturas das bandas, também incorpora os cálculos para determinação da atividade enzimática ( $U/\mu L$ ), seguindo as mesmas equações disponíveis na planilha em Excel, conforme mencionado no item 4.5 (LIE, 2016).

#### 4.7 MEDIÇÃO AUTOMÁTICA DAS BANDAS

O programa foi aplicado em 60 imagens, cedidas pelo Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP. Os resultados obtidos, bem como discussões e conclusões serão apresentados no próximo capítulo.

Todas as imagens que foram analisadas estavam no formato “.jpg”. Isso porque são imagens de procedimentos anteriores a este trabalho e que já haviam sido utilizadas.

O método proposto seguiu o preconizado no procedimento operacional padrão que descreve a metodologia para determinação da atividade enzimática da Taq DNA Polimerase, produzida pelo IBMP. Sendo assim, para a medição automática das bandas, foram utilizados os mesmos critérios de medição, ou seja, uma reta é traçada entre as bandas do controle negativo (posições 1 e 9) que serve como uma linha de base para as medições e a altura de cada banda é medida a partir da distância

vertical entre a linha de base e o centro da sua face superior, conforme ilustrado na Figura 27.

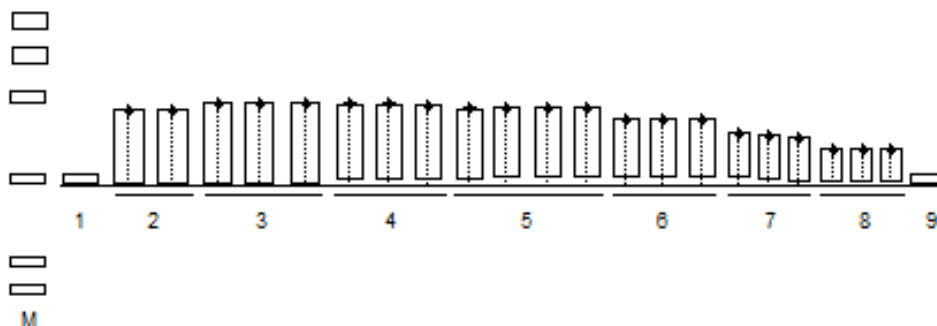


Figura 27 - Ilustração do processo de medição das bandas. As linhas pontilhadas indicam a medida das bandas, partindo da linha de base. As bandas do controle negativo (1 e 9) não são medidas, servem apenas como guia para estabelecer a linha de base. Fonte: Autoria própria.

Para avaliação da diferença entre as medidas obtidas por diferentes operadores e comparação entre os métodos, quatro analistas distintos participaram do processo de reanálise manual de algumas imagens, seguindo os padrões do IBMP.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados da comparação entre os métodos descritos no capítulo anterior.

No total, 60 (sessenta) imagens diferentes de testes realizados foram analisadas através do programa. Dentre as imagens submetidas à análise, 16 (dezesesseis) foram reanalisadas manualmente por quatro diferentes operadores, apenas para avaliar a diferença entre os resultados obtidos.

A Tabela 3 apresenta o resultado da medição manual feita por quatro operadores do IBMP no conjunto de 16 imagens.

Uma das desvantagens desta metodologia manual é a subjetividade da técnica, considerando que as bandas não apresentam bordas bem delimitadas, não só na imagem gerada, mas no próprio rastro de migração formado na matriz do gel de agarose. Além disso, a análise será sempre realizada por diferentes operadores.

Tabela 3 - Resultados de concentração da atividade da enzima Taq DNA polimerase obtidos a partir da reanálise manual de algumas imagens e expressos em U/ $\mu$ L.

Imagem	Analista 1 (U/ $\mu$ L)	Analista 2 (U/ $\mu$ L)	Analista 3 (U/ $\mu$ L)	Analista 4 (U/ $\mu$ L)
1	37,38	48,08	48,91	48,91
2	37,39	34,89	34,89	34,34
3	54,56	50,93	52,59	52,87
4	46,91	51,03	50,48	51,74
5	53,63	50,03	48,93	46,16
6	40,49	40,49	40,14	39,59
7	43,69	52,58	50,87	50,28
8	27,17	25,44	24,19	25,09
9	40,72	48,48	48,09	48,91
10	62,69	36,9	36,9	37,71
11	53,63	51,71	49,16	49,81
12	43,09	43,09	49,45	49,13
13	39,95	42,08	40,28	37,63
14	48,41	45,69	46,91	48,22
15	49,41	49,94	49,41	50,71
16	41,3	47,92	47,92	42,2

Cabe salientar que os valores somente podem ser comparados entre os operadores para análise de uma mesma imagem, pois os resultados representam

análises em diferentes diluições da enzima. Como por exemplo, a imagem 8 apresenta valores obtidos a partir de uma diluição bem menos concentrada da enzima. Por outro lado, os resultados para a imagem 3 foram obtidos a partir de uma enzima com maior concentração.

Um resumo estatístico pode ser visto na Figura 28, onde a média e o desvio padrão dos valores apresentados na Tabela 3 foram calculados. A média dos resultados foi considerada apenas para fins de representação do desvio-padrão para os valores determinados pelos Analistas 1, 2, 3 e 4. Na prática, os valores discrepantes são desconsiderados da média.

Como pode ser observado na Figura 28, a medição manual, conforme mencionado anteriormente, pode apresentar grandes discrepâncias entre os operadores. Tal fato ocorre devido à dificuldade do analista em visualizar as bordas de cada banda durante as medições, uma vez que são difíceis de distinguir. Sendo assim, ainda que os analistas recebam o mesmo treinamento, cada um estabelece seu próprio padrão de medição que vai sendo corrigido de acordo com a maioria conforme o operador adquire experiência.

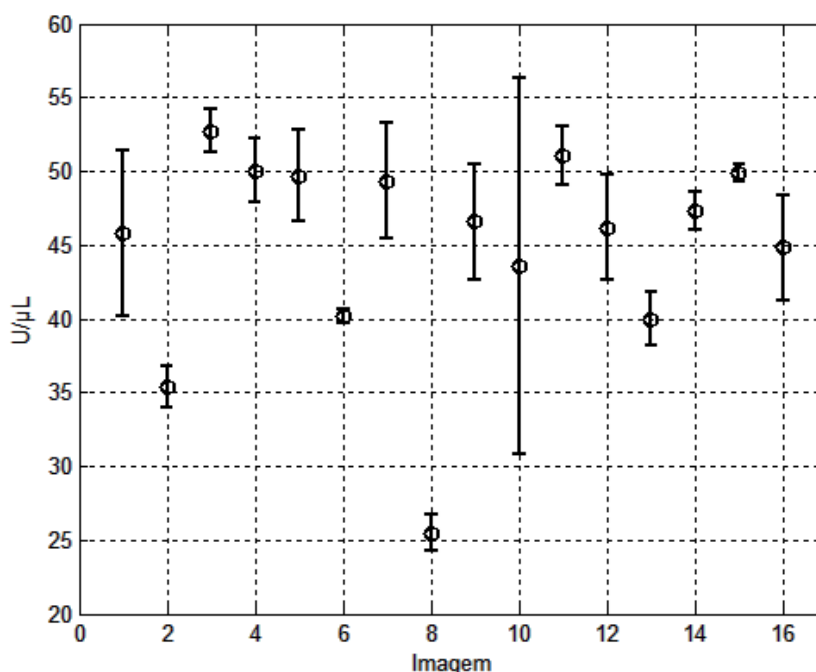


Figura 28 - Média da concentração expressa em U/μL e o desvio padrão de cada análise realizada pelos diferentes operadores. Dados da Tabela 3.

Além da qualidade da imagem, parâmetros simples de edição, tais como, brilho, contraste e saturação, podem afetar diretamente as medições. Deste modo, as



imagens submetidas ao programa para comparação entre os resultados obtidos através da medição manual *versus* a medição automatizada, foram as mesmas imagens analisadas pelos operadores na ocasião do teste, ou seja, não passaram por edição prévia.

Apesar de as imagens de saída do equipamento apresentarem o formato “.tiff” e possuírem uma melhor resolução por não serem submetidas à processos de compressão de imagem, não foi possível a análise de imagens nesse formato através do programa, pois como eram imagens antigas já haviam sido editadas para inserção de legendas e salvas no formato “.jpg”. No entanto, deve-se levar em consideração que a qualidade e resolução da imagem são primordiais para análise automatizada.

Uma ferramenta estatística utilizada para avaliar a relação entre duas variáveis quantitativas é a correlação. Esta medida varia entre -1 e 1, valores próximos de -1 ou 1 indicam uma alta correlação entre os dados (FIGUEIREDO FILHO e SILVA JUNIOR, 2009). A correlação de Pearson é utilizada para mensurar o grau de associação entre duas variáveis (FIGUEIREDO FILHO e SILVA JUNIOR, 2009).

A Figura 29 apresenta a correlação de Pearson entre as medições realizadas por quatro analistas distintos e seus respectivos diagramas de dispersão. Os analistas 2, 3 e 4 apresentam um alto grau de correlação, com coeficiente próximo a 1, ao passo que as medições do analista 1 apresentaram uma correlação média com um coeficiente próximo a 0,5 em relação a cada um dos demais operadores. Com esse resultado, pode-se supor que o analista 1 tenha um padrão de medição distinto dos outros três.

A metodologia utilizada para quantificação da enzima depende muito mais da interpretação dos resultados pelos operadores do que do instrumento de medição utilizado. Embora os analistas 2, 3 e 4 apresentem uma forte correlação, isso não significa necessariamente que os valores obtidos por eles estejam corretos.

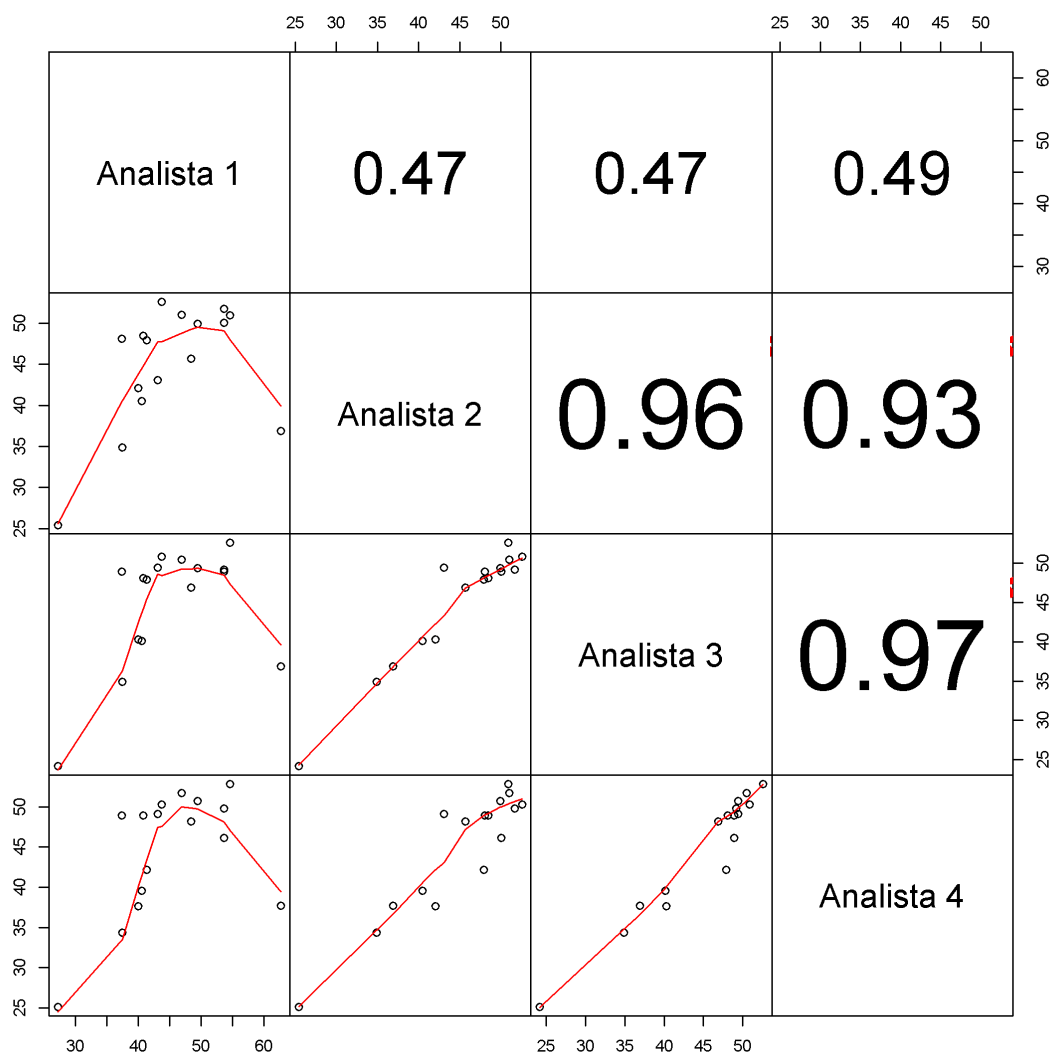


Figura 29 – Correlações de Pearson entre os quatro operadores e seus respectivos diagramas de dispersão, observa-se uma forte correlação entre os analistas 2, 3 e 4. O Analista 1 apresenta uma correlação apenas média em relação aos demais. Dados da Tabela 3.

Os resultados obtidos pela análise automática foram comparados com os resultados obtidos através da análise manual padrão. A Tabela 4 apresenta os resultados de concentração da atividade da enzima ( $U/\mu L$ ) obtidos através da aplicação dos dois métodos.

Tabela 4 - Resultados obtidos através da medição manual padrão utilizada pelo IBMP em comparação aos valores resultantes da medição automática, ambos expressos em U/ $\mu$ L.

Imagem	Medição Manual	Medição Automática	Imagem	Medição Manual	Medição Automática
1	49,15	40,44	31	43,04	46,55
2	33,98	29,82	32	49,12	51,24
3	52,66	49,83	33	48,07	48,28
4	49,31	44,07	34	27,47	34,92
5	46,55	46,75	35	28,26	42,43
6	39,06	38,97	36	44,05	43,97
7	50,18	51,26	37	45,44	42,06
8	24,49	22,26	38	50,23	44,07
9	49,00	47,11	39	25,12	21,21
10	37,68	43,55	40	28,98	37,61
11	49,04	64,12	41	28,10	30,59
12	48,59	44,54	42	49,29	52,40
13	39,95	38,85	43	50,69	50,72
14	48,41	50,94	44	43,36	42,90
15	50,02	48,99	45	46,09	44,05
16	45,71	41,24	46	43,64	44,32
17	41,75	37,24	47	57,84	53,17
18	39,50	35,42	48	53,19	55,10
19	48,30	54,30	49	39,63	41,40
20	47,18	42,42	50	52,49	60,89
21	20,94	23,53	51	50,03	46,87
22	49,10	46,62	52	46,67	46,75
23	25,82	26,12	53	50,00	53,94
24	47,25	49,94	54	48,46	47,54
25	49,41	50,03	55	51,17	55,29
26	47,72	43,07	56	27,91	25,29
27	34,99	36,05	57	59,20	62,47
28	54,71	47,32	58	38,27	40,81
29	49,90	56,39	59	46,24	48,73
30	52,72	54,90	60	39,82	42,19

Ao observar a Tabela 4 nota-se que algumas imagens apresentaram maior discrepância entre os resultados (manual *versus* automática), como por exemplo, as imagens número 11 e 35. Ao analisar individualmente estas imagens, pode-se perceber que há uma distorção nas bandas na imagem, como evidenciado na Figura 30.

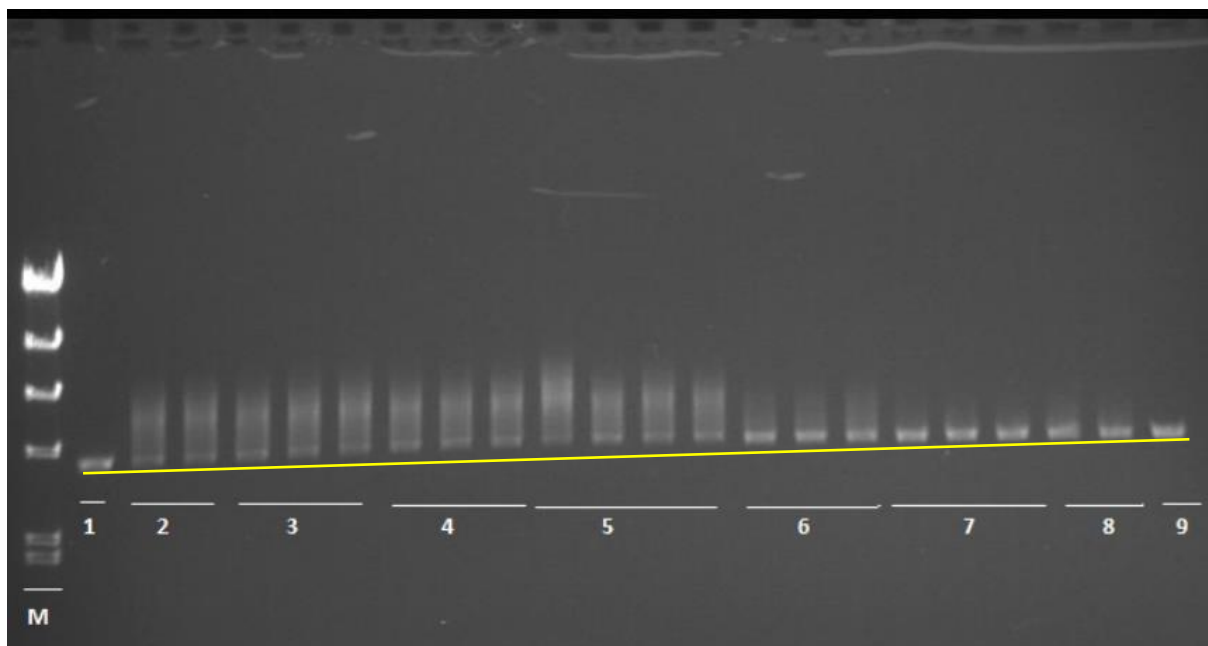


Figura 30 - Imagem 11 – Exemplo de um perfil eletroforético distorcido. As extremidades inferiores de algumas bandas apresentam-se bastante deslocadas da linha de base.

Essa distorção das bandas resulta em um afastamento da extremidade inferior em relação à linha de base. Na medição manual, quando ocorre um afastamento muito grande das bandas em relação à linha de base, as medidas são realizadas partindo da base da banda e não mais da linha de base. No entanto, como as medições feitas pelo programa sempre partem da linha de base, essa distância entre a linha e o início da banda pode gerar um valor superestimado de atividade da enzima.

Esse fato não pode ser ignorado, pois tanto a falta ou o excesso de enzima na reação pode comprometer a qualidade do ensaio. A escassez do insumo no produto final pode amplificar fracamente ou não amplificar o DNA alvo, gerando bandas de difícil visualização e/ou resultado falso negativo. Ao passo que o excesso facilita a amplificação de produtos inespecíficos que acabam utilizando grandes quantidades dos reagentes disponíveis dificultando assim a amplificação da região específica (QIAGEN, 2010).

Não é possível afirmar que fatores que causam essa distorção de algumas bandas nas imagens, o que torna difícil a resolução do problema. Nesse caso, para que se tenha um resultado confiável, imagens que apresentam essa característica somente poderão ser analisadas pelo método automático se o programa for alterado para que as medidas partam da base da banda sem considerar a linha de base.

Ao realizar uma comparação entre os valores obtidos através das duas técnicas utilizadas, verificou-se que 80% dos resultados apresentaram uma diferença de até 5 U/ $\mu$ L (para mais ou para menos). Do ponto de vista prático, uma variação de 5 unidades na medição da enzima não seria um problema, pois a faixa de aceitação do teste assume 5 unidades acima e abaixo do alvo.

Para avaliar a concordância entre os dois métodos, que deveriam apresentar o mesmo resultado, os valores da Tabela 4 foram submetidos a uma análise de concordância entre métodos de Band-Altman. Essa ferramenta compara graficamente a diferença entre os dois métodos de avaliação. As linhas horizontais representam a diferença média entre os métodos, bem como os limites de concordância que correspondem à  $\pm 1,96$  vezes o desvio padrão. Se os valores das diferenças apresentam distribuição normal, é esperado que 95% dos valores da diferença estejam entre os limites de concordância (HIRAKATA e CAMEY, 2009).

No entanto se a faixa de variação desse intervalo for grande, conclui-se não haver concordância entre os dois métodos. Diferenças próximas de zero indicam que os dois métodos obtiveram medidas com valores próximos e podem ser considerados concordantes entre si (HIRAKATA e CAMEY, 2009).

Na Figura 31 estão representados os resultados da análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. Através da análise visual do gráfico, observa-se que apesar de a média da diferença ser de apenas 0,48, pode-se observar uma certa dispersão dos dados. O intervalo de concordância variou de -8,66 a 9,62, sugerindo uma concordância média entre os métodos. Os dois pontos externos ao limite de concordância podem ser considerados valores aberrantes (*outliers*) e são possivelmente provenientes de imagens com bandas afastadas da linha de base, conforme mencionado anteriormente.

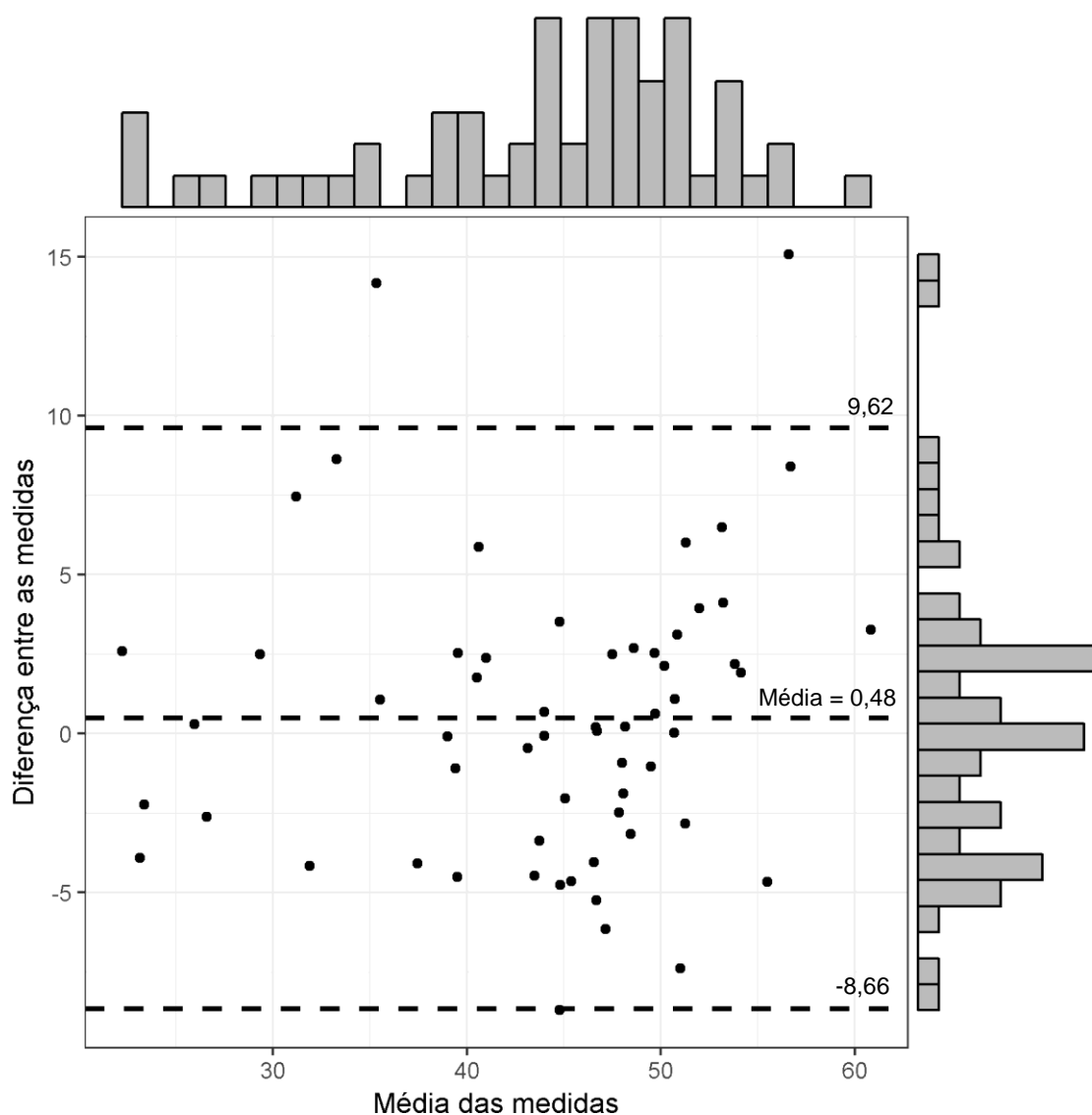


Figura 31 - Avaliação da concordância entre métodos de Bland-Altman, relacionando as médias dos dois métodos  $(X + Y)/2$ , de 0,48 no eixo X, e a diferença entre eles  $X - Y$  no eixo Y. As linhas pontilhadas representam a diferença média entre os métodos e os limites de concordância, que correspondem a  $\pm 1,96$  vezes o desvio padrão mais e menos a média.

Os dados disponíveis na Tabela 4 foram submetidos a uma regressão de Passing Bablok, que descreve uma regressão linear. Numa situação de concordância perfeita entre dois métodos o intercepto seria igual a zero e o coeficiente de relação igual a 1. O intercepto muito diferente de zero indica uma diferença sistêmica e um valor de coeficiente de relação muito distante de 1 representa uma diferença proporcional (BILIC-ZULLE, 2011).

Na Figura 32, a linha azul representa a regressão de Passing e Bablok, o sombreamento azul indica o respectivo intervalo de confiança de 95% para esta regressão. A linha pontilhada representa a identidade, ou seja, a linha que todos os

pontos deveriam estar no caso de medidas perfeitamente iguais entre os dois métodos para cada avaliação. Nos casos de comparação de métodos assume-se a linearidade, em vista disso, a correlação de Pearson é aplicada, neste caso uma correlação de 0,872 com  $p < 0,0001$  pode-se dizer que os analistas e o método automático no geral são lineares e concordantes.

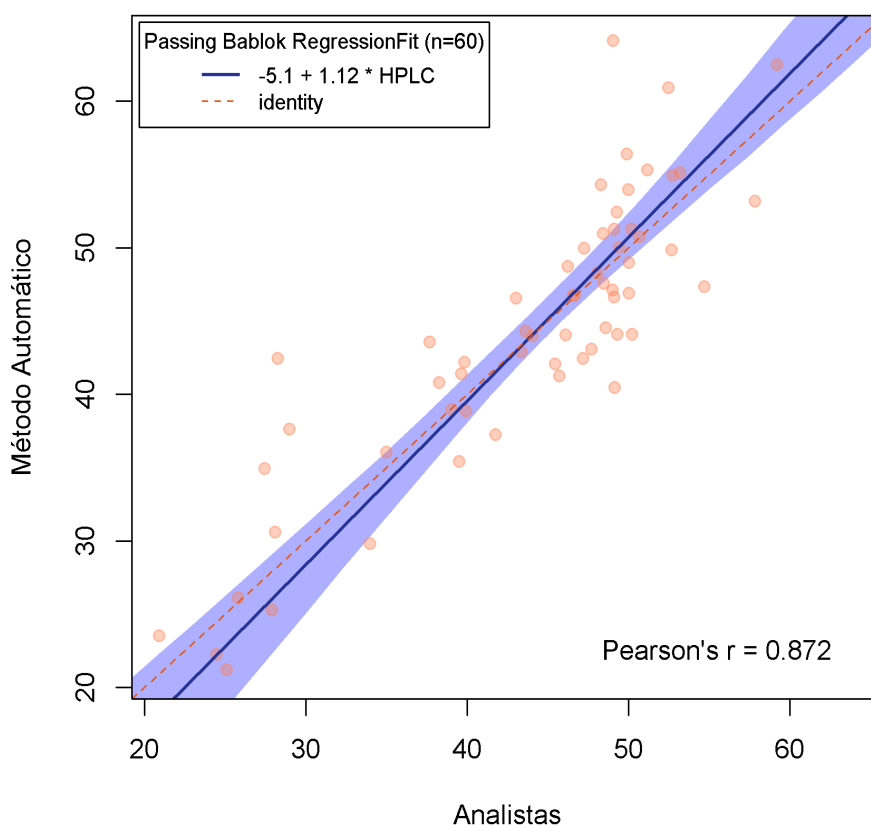


Figura 32 - Regressão Passing Bablok dos resultados de concentração da enzima obtidos através da análise manual *versus* automática (expresso em U/ $\mu$ L). A correlação de Pearson é de 0,8722, indicando uma forte correlação entre os métodos.

O tempo médio gasto para análise e medição das bandas pelos quatro operadores foi estimado em cerca de 30 a 40 minutos, após a impressão da imagem. O programa, por sua vez, possui alta capacidade de processamento, possibilitando a análise de 60 imagens em aproximadamente 30 segundos. Isso indica uma redução grande de tempo para as atividades do laboratório.

Além disso, a medição automática se mostrou interessante e prática, uma vez que além do tempo menor para execução da atividade, a variação das medições entre os operadores pode ser ainda maior, conforme evidenciado anteriormente na Figura 28.

Ainda que o método automático apresente diferença em relação ao método manual, cabe ressaltar que existe uma faixa de aceitação estabelecida para este teste, sendo de 45 a 55 U/ $\mu$ L no cálculo final (LCQ IBMP, 2016).



## 6 CONCLUSÕES

A dificuldade encontrada na interpretação dos resultados da metodologia utilizada pelo Laboratório de Controle de Qualidade do IBMP para quantificação da Enzima Taq DNA Polimerase é a subjetividade da técnica, ou seja, a interpretação pode sofrer variações quando analisada por diferentes operadores. A análise de correlação de Pearson aplicada para os resultados de diferentes analistas corrobora com este dado, pois apesar de todos os operadores receberem o mesmo treinamento, cada um estabelece seu próprio padrão de medição.

Embora exista um alto grau de concordância entre três dos analistas que avaliaram as imagens, como o método de quantificação da enzima depende muito mais do operador do que do instrumento utilizado para medição, deve-se assegurar que o procedimento seja sempre executado da mesma maneira, que seja reproduzível.

A automatização da interpretação dos resultados implica em menos interferência do operador, possibilitando uma padronização dos resultados. Desta forma, o resultado da quantificação independe da experiência do colaborador.

O método proposto para automatização dos resultados, além de facilitar sobremaneira a rotina laboratorial, também proporciona uma redução significativa no tempo de análise, estimado em 40 minutos no método manual, a partir da impressão da imagem. Ao passo que a medição automatizada pode ser realizada em segundos, a partir da aquisição da imagem.

Os métodos comparados apresentaram concordância, de um modo geral e o coeficiente de correlação entre eles foi de 0,872, o que indica uma forte correlação entre os resultados. Isso indica que a metodologia tem eficiência e segurança para ser aplicada na rotina laboratorial.

No entanto, apesar da facilidade de operação do programa, para implementação da análise automatizada faz-se necessária a validação do método como um todo. Um dos requisitos mínimos necessários é que usuário não consiga fazer intervenções no código fonte de maneira não rastreável. Sendo assim, primeiramente o programa precisa ser transformado em um executável que permita a operação como um aplicativo independente, de modo a não expor o código fonte no momento das análises.

Os resultados apresentados são bastante promissores. No entanto, o programa computacional deve ser avaliado também na prática, ou seja, faz-se necessária a realização e testes de ajuste de concentração da enzima com base nos valores obtidos automaticamente em paralelo ao método atualmente utilizado. Somente após essa validação, o programa computacional poderá ser finalmente implantado na rotina laboratorial.

## 7 PERSPECTIVAS

Como sugestões para implementação do método automático para quantificação da atividade enzimática, pode-se apontar:

- Transformar o programa em um executável que possibilite a operação como um aplicativo independente e se possível com uma interface com algum programa de visualização de imagem;
- Utilizar as imagens no formato “.tiff”, tal como é capturada pela câmera do equipamento, pois este formato possui uma melhor resolução por não passar por processos de compressão de imagem como as imagens em formato “.jpg” utilizadas;
- Realizar ajustes no programa de modo que imagens com bandas afastadas da linha de base possam ser melhor analisadas;
- Realização de ajustes de concentração da enzima de acordo os resultados obtidos através do programa em paralelo ao método atual;
- Avaliar os resultados obtidos através da medição automatizada da Taq na Mistura de PCR, produto em que a enzima é utilizada;
- Realizar a validação do método.

## 8 REFERÊNCIAS

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **Methods in molecular biology**. In: **PCR Protocols**. [S.l.]: Human Press, 2003.

BILIC-ZULLE, L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. **Biochemia Medica**, Rijeka, v. 21(1), p. 49-52, Janeiro 2011.

BOUZARI, S.; RECHINSKY, V. O. Cloning and Expression of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Gene, Using a Thermo-Inducible Expression Vector. **Iranian Biomedical Journal**, abril 1998. 79-82.

BROCK, T. D. The value of Basic Research: Discovery of *Thermus aquaticus* and Other Extreme Thermophiles. **Genetics Society of America**, 1997.

BROCK, T. D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Non-sporulating Extreme Thermophile. **Journal of Bacteriology**, Janeiro 1969. 289-297.

BROWN, T. A. **Genomes**. 2<sup>a</sup>. ed. Manchester: Oxford: Wiley-Liss, 2002.

BRUCE, A.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RASS, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

BRUMM, P. J.; MONSMA, S.; KEOUGH, B. J.; SCHOENFELD, T.; LODES, M.; MEAD, D. Complete Genome Sequence of *Thermus aquaticus* Y51MC23. **Plos One**, 14 Outubro 2015. 1-30.

BURN, A. L.; KIEL, G. Ferramenta computacional para determinação de espécies em imagens de eletroforese. In: **II Simpósio de Computação Aplicada (SCA)**, Passo Fundo, 2010.

COOPER, G.; HAUSMAN, R. **A Célula: uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

COUDRAY, N.; BUESSLER, J. L.; URBAN, J. P. Robust threshold estimation for images with unimodal histograms. **Elsevier**, Mulhouse, 04 Janeiro 2010. 1010-1019.

DOU. Diário Oficial da União. **JusBrasil**, 2013. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/61650953/dou-secao-1-13-11-2013-pg-106>>. Acesso em: 17 Novembro 2016.

ESQUEF, I. A.; ALBUQUERQUE, M. P.; ALBUQUERQUE, M. P. Processamento Digital de Imagens. **Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas**, 18 Fevereiro 2003. 1-12.

ESTRELA, M. C.; PICHORIM, S.; REINERT, C.; LIE, M.; BORBA, G.; GAMBA, H. Detecção, Identificação e Medição Automática de Raias em Imagens de Gel Eletroforese. In: **7º Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas (SIIM) da UNICAMP**, Campinas, Outubro 2015. 1-4.

FERNANDES JR, R. C.; KANAAN, A.; GOMES, J. M. S. M. As ferramentas do Astrônomo. **Observatórios Virtuais**, Florianópolis, Março 2002. 1-10.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JUNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). **Revista Política Hoje**, v. 18, p. 115-146, 2009.

GONZALEZ, R. C.; WOODS. R. E. **Digital Image Processing**. New Jersey: Upper Saddle River, 2008.

HIRAKATA, V. N.; CAMEY, S. A. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. **HCPA**, Porto Alegre, v. 29, n. 3, p. 261-268, Novembro 2009.

IBMP. Instituto de Biologia Molecular do Paraná, 2016. Disponível em: <<http://www.ibmp.org.br/pt-br/>>. Acesso em: 15 Novembro 2016.

INMETRO. Portaria nº 590, de 02 de dezembro de 2013 , 2013. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC002050.pdf>>. Acesso em: 14 Março 2017.

KASVI. Você sabe como é preparado o gel de agarose na eletroforese?, 2017. Disponível em: <<http://www.kasvi.com.br/como-preparado-gel-de-agarose-eletroforese/>>. Acesso em: 15 Janeiro 2017.

KIM, Y.; FLYNN, T. R.; DONOFF, R. B.; WONG, D. T.; TODD, R. The Gene: The Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Application. **J Oral Maxillofac Surg**, p. 808-815, 2002.

KOJOUHAROV, B. What does prime stands for 5'-3' in DNA? **Quora**, 2015. Disponível em: <<https://www.quora.com/What-does-prime-stands-for-5-3-in-DNA>>. Acesso em: 02 Janeiro 2017.

LCQ IBMP. **IT LCQ-001 - Teste de Atividade BioM Taq DNA Polimerase**. IBMP. Curitiba. 2016.

LIE, M. M. I. Programa MatLab. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <gustavobborba@utfpr.edu.br> em 26 junho 2016.

LONZA. **Molecular Biology Research Products Catalog and Sourcebook for Eletrophoresis**. [S.l.]. 2010. (32 (0) 87 321 611).

LOPES, F. M. **Um Modelo Perceptivo de Limiarização de Imagens**. Dissertação de Mestrado em Informática, Universidade Federal do Paraná, 2003. 129 p.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, p. 1-15, 2012.

LUDWIG, J. B. **Clonagem, Expressão e Produção da DNA Polimerase de alta Fidelidade de Pyrococcus furiosus**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. 52 p.

MACHADO, A. M. C.; CAMPOS, M.; SIQUEIRA, A.; CARVALHO, O. An iterative algorithm for segmentatin lanes in gel electrophoresis images. **Proceedings X Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing, IEEE**, p. 140-146, Outubro 1997.

MANTIN NETO, L.; VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S. **Intrumentação avançada em ciência do solo**. 1ª. ed. São Carlos: Embrapa, 2007.

MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. **Processamento Digital de Imagens**. Rio de Janeiro: Brasport, 1999.

MARQUES, O. **Practical Image and Video Processing Using Matlab**. Florida: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de Métodos Moleculares Baseados em PCR para a detecção de Schistosoma Mansoni**. Tese de Doutorado em Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, 2006. 114 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Teste de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) para detecção dos vírus da Inunodeficiência Humana (HIV) e da Hepatite C (HCV)**. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (COMITEC). [S.l.], p. 1-14. 2012. (Relatório N° 26).

MOREIRA, A. C. Métodos para segmentação binária para imagens em tons de cinza. **LFNATEC - Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada**, Londrina, 02 Outubro 2001.

NAOUM, P. C.; CORREA, E. M.; POSSIK, A. **Eletroforeses: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA**. São Paulo: Editora Santos, 2011.

NASCIMENTO, J. D. Detecção e reconhecimento de placa automotiva com baixo custo, Brasília, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Julho/Dezembro 2004. 10-13.

OLIVEIRA, L. F.; JOANICO, W.; NARLOCH, A.; HASS, I. Análise Automatizada em Géis de Eletroforese Unidimensionais (AAGEU). Etapa 1: Detecção das colunas e do marcador. **Biblioteca Digital Brasileira de Computação**, Curitiba, p. 1-6, 2012.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L.C; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M.; TIMÓTEO, W. H.; JARDIM, S.N. **Fundamentos Teórico-práticos e Protocolos de Extração e de Amplificação de DNA por meio da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

PARK, S. C.; NA, I.; HAN, T.; KIM, S.; LEE, G. Lanes Detection in PCR Gel Electrophoresis Images. **International Conference on Computer and Information Technology, IEEE**, p. 306-313, 2011.

PARK, S. C.; NA, I.; KIM, S.; LEE, G.; OH, K.; KIM, J. Lane detection and tracking in PCR gel electrophoresis images. **Elsevier**, Gwangju, 26 Janeiro 2012. 85-91.

PAULINO, A. A.; BOAVENTURA, M. Detecção de canaletas em imagens de géis de eletroforese utilizando filtro de Kalman. In: **XXX CNMAC (Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional)**, Florianópolis, Setembro 2007. 1-7.

PRODUÇÃO IBMP. **MAN-033 - Manual de Produção Compilado - BioM Taq DNA Polimerase Concentrada**. IBMP. Curitiba. 2016.

QIAGEN. **Taq PCR Handbook**. Qiagen. Hilden. 2010. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=c73208eb-a83e-40c4-a9b6-ea5c4c94b9f4&lang=en>>. Acesso em: 22 Janeiro 2017.

ROCHA, C. C. **Degradação do Brometo de Etídio em Solução Aquosa via Ozonização**. Dissertação de Mestrado em *Magister Scientiae*, Universidade Federal de Viçosa, 2014. 100 p.

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. Taq DNA Polymerase, 2005. Disponível em: <<http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/RocheTaqPolymerase.pdf>>. Acesso em: 15 Janeiro 2017.

ROSIN, P. L. Unimodal thresholding. **Pattern Recognition**, Cardiff, 2001. 2083-2096.

ROYAYEI, M.; GALEHADARI, H. Cloning and Expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, jan. 2008. 1-5.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K.; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239, 29 Janeiro 1988. 487-491.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B.; MILLS, A.; GORN, V.; SINGER, M.; REED, M. Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. **Analytical Biochemistry**, 15 Outubro 2000. 194-204.



SGQ IBMP. **MAN-001 - Manual da Qualidade**. IBMP. Curitiba. 2016.

SHEEBA, A.; MANIKANDAN, S. **Image segmentation using bi-level thresholding**, Kovilpatti, 2014. 1-5. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6892783/>>. Acesso em: 27 Fevereiro 2017.

SOUZA, J. S.; CARDOZA, J. A. S. Sensores de imagens digitais CCD e CMOS. **In: VII CONNEPI - Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**, Palmas, 2012. 1-8.

SPINLAB. SpinLab - Equipamento e Produtos para Laboratório, 2014. Disponível em: <<http://www.spinlab.com.br/eletroforese-3/>>. Acesso em: 15 Janeiro 2017.

THERMOFISCHER SCIENTIFIC. PCR Cycling Parameters. **ThermoFischer Scientific**, 2017. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>>. Acesso em: 17 Janeiro 2017.

UHLMAN, V.; SILVA, I.; LUTTICH, K.; PICTON, S.; O'LEARY, J. In cell amplification. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, p. 119-130, 1998.

UVP. **UVP - An Analytik Jena Company**, 2016. Disponível em: <<https://www.uvp.com/biodocit.html>>. Acesso em: 15 Janeiro 2017.

WATSON, J. D. **DNA Recombinante: Genes e Genomas**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZHANG, C.; LIU, L.; WANG, J. R.; FU, D. Electrochemical degradation of ethidium bromide using boron-doped diamond electrode. **Elsevier**, 29 Janeiro 2013. 91-101.

## ANEXO A – Tabela de Quantificação da Enzima Taq DNA Polimerase

**Completar todas as células em amarelo!**

**Cálculo das diluições - Enzima Referência**

Migração (em mm)			Média	Desvio Padrão	Unidades
9,0	9,0	9,0	9,0	0,000	0,050
9,0	8,5	8,0	8,5	0,500	0,040
6,0	5,0	6,0	5,7	0,577	0,020
4,0	4,0	4,0	4,0	0,000	0,010

**Linha de Regressão**

Inclinação (Slope) 0,00761434

Intercepção -0,02171

Coefficiente de Determinação 0,97717

**Cálculo das diluições - Enzima Teste**

Migração (em mm)	Unidades	Unidades/ $\mu$ L
8,0	0,039	6,5
7,0	0,032	5,3
8,0	0,039	6,5
8,0	0,039	6,5
Média	7,8	0,037
Desvio Padrão	0,50	0,004

Equivante à **51,91** U/ $\mu$ L da enzima concentrada.

Fonte: IBMP