

DANIELLA PANIAGO JARDIM

**GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DE UM ÚNICO NUCLEOTÍDEO
DIRETAMENTE DO SORO POR qPCR ALELO-ESPECÍFICO COM “AMPLICONS”
DE TAMANHO REDUZIDO**

BRASÍLIA

2018

DANIELLA PANIAGO JARDIM

**GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS DE UM ÚNICO NUCLEOTÍDEO
DIRETAMENTE NO SORO POR qPCR ALELO-ESPECÍFICO USANDO
“AMPLICONS” DE TAMANHO REDUZIDO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra

Brasília

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por todo amor e cuidado que Ele tem por mim. Por me guiar pela estrada da vida e por conduzir a minha trajetória com tanto carinho e proteção. Sinto-me poderosamente abençoada e privilegiada por ser filha de um Deus tão amoroso e presente.

Aos meus pais Oliveiros e Maria Helena, minha irmã Laryssa e a todos os meus familiares pelo carinho, orações e ensinamentos ao longo dos anos.

Ao meu querido orientador Dr. Gustavo Barra, palavras não serão suficientes para expressar minha eterna gratidão. Sua orientação foi um divisor de águas na minha vida. Obrigada por abrir essa porta, pelos ensinamentos e conselhos, pela paciência e por ter sido sempre tão presente e acessível durante essa trajetória.

Aos queridos amigos Ticiane e Pedro, agradeço a amizade, paciência e respeito que tiveram por mim. Na viagem da vida não podemos fazer o percurso sozinhos e, assim como no livro “O peregrino” de John Bunyan, vocês foram essenciais nessa jornada.

À minha grande companheira de mestrado e amiga-irmã Camila. Sem o seu fundamental apoio e ajuda, meu caminho teria sido muito mais difícil. Vou levar nossa amizade para sempre e nunca esquecerei tudo o que você fez por mim.

Ao Laboratório Sabin pela disponibilização de estrutura e recursos para que a pesquisa fosse desenvolvida. Agradeço imensamente Dra. Sandra Costa, Dra. Janete Vaz, Dra. Lidia, Dr. Rafael, Dra. Lara, Dra. Graciella, Dra. Natalia, Dra. Thallita, Dra. Julia e aos amigos do Sabin, especialmente da Biologia Molecular e da Gerência da Qualidade.

À Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e aos grandes professores os quais tive a honra de conhecer e aprender em cada disciplina.

Aos meus grandes amigos Mira Dalmagro e Léo Assad por todo o incentivo e por acreditarem que eu poderia ir muito além. Nossas conversas naquela viagem em 2015 foram o início de grandes mudanças na minha vida e vocês fazem parte disso.

Agradeço a todos pela torcida, incentivo e orações.

RESUMO

A importância clínica em genotipar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) está relacionada na avaliação da suscetibilidade genética no desenvolvimento de doenças e possui foco na medicina preventiva e personalizada. Sabemos que a concentração de DNA genômico livre de células no soro é relativamente alta. Assim, neste estudo, pretendemos estimar a quantidade e avaliar o tamanho de DNA genômico livre de células no soro, testar se o soro cru (sem extração de DNA) poderia ser usado diretamente como fonte de DNA para qPCR e investigar se polimorfismos poderiam ser genotipados diretamente do soro cru isolado do sangue capilar usando uma centrífuga de papel operada pela força das mãos. Observou-se que alvos genômicos de tamanhos variados (65, 101, 202 e 688 pares de bases) poderiam ser amplificados com sucesso a partir do DNA extraído do soro, e que a quantidade de DNA genômico aumenta no soro com sua incubação na presença do coágulo à temperatura ambiente. Ademais, apenas os alvos genômicos de 65 e 101 pares de bases puderam ser amplificados a partir de soro cru (sem extração de DNA). A incubação por 4 dias à temperatura ambiente foi necessária para a amplificação de alvos maiores que 101 pares de bases. Em relação a genotipagem de SNPs, o soro foi separado com sucesso do sangue capilar usando uma centrífuga de papel e os genótipos foram atribuídos testando o soro cru, usando ARMS-qPCR com amplicons de tamanhos pequenos, que estavam totalmente de acordo com os genótipos atribuídos testando o DNA extraído do sangue capilar. Assim, o soro pode ser usado diretamente como “template” para reações de qPCR simplificando a fase pré-analítica e eliminando a etapa de extração na genotipagem de SNPs. Esses atalhos no processo podem futuramente promover diagnóstico molecular por teste laboratorial remoto (“point-of-care”).

Palavras-chave: Polimorfismo de um único nucleotídeo; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Soro

ABSTRACT

The clinical importance of genotyping single nucleotide polymorphisms (SNPs) is related to the assessment of genetic susceptibility in disease development and focuses on preventive and personalized medicine. We know that the mean concentration of cell-free genomic DNA (gDNA) in serum is relatively high. Thus, in this study, we aimed to evaluate the amount and gDNA size in serum; to test if crude serum (without DNA extraction) can be directly used as source of gDNA for qPCR and to investigate if single nucleotide polymorphisms could be genotyped directly from crude serum isolated from capillary blood using a hand-powered paper centrifuge. All tested PCR targets (65, 101, 202 and 688 base-pairs) could be successfully amplified from DNA extracted from serum irrespective of their amplicon size and the genomic DNA yields increased in serum with the incubation at room temperature. Only 65 and 101 base pairs PCR targets could be amplified from crude serum soon after the coagulation. Incubation for 4 days at room temperature was necessary for the amplification of PCR targets larger than 101 base pairs. Serum was successfully separated from capillary blood using the paper centrifuge. The genotypes assigned by testing the crude serum using ARMS qPCR producing small amplicon sizes were in complete agreement with the genotypes assigned by testing the DNA extracted from whole blood. Thus, the serum could be directly used as template in qPCR simplifying the pre-analytic phase and eliminating the extraction steps of the SNP genotyping. These shortcuts in the process could promote in the future molecular point-of-care diagnostics.

Key words: Single nucleotide polymorphism; Real-time polymerase chain reaction; Serum

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental da etapa de avaliação da quantidade e do tamanho do DNA livre de células no soro (extraído) e soro direto sem pré-tratamento na reação de PCR

Figura 2 - Delineamento experimental da etapa de genotipagem de SNPs por PCR diretamente no soro sem pré-tratamento e comparação dos resultados com DNA extraído a partir do sangue capilar coletado por punção digital

Figura 3 - A) Centrífuga de papel (“paperfuge”) descrita por Bhamla e colaboradores adaptada com 4 microtubos de 200 μ L e “QR code” com vídeo da sua construção; B) Processo de centrifugação dos microtubos por 4 minutos; C) Soro separado do coágulo após a centrifugação pela “paperfuge”

Figura 4 – Estratégias de amplificação usadas nos métodos 1, 2 e 3 para a genotipagem dos polimorfismos (SNPs) desse estudo utilizando ARMS qPCR

Figura 5 - Valores do ciclo quantitativo (Cq) para “amplicons” de diferentes tamanhos dos alvos RNASE P, JAK2, SBP2 e ALMS usando DNA extraído do soro (círculos fechados) e soro cru direto (círculos abertos) como “template” para qPCR. A linha representa o valor da mediana.

Figura 6 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs1801131 (alelos A ou C) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

Figura 7 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs4939827 (alelos T ou C) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

Figura 8 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs4779584 (alelos C ou T) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

Figura 9 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs3802842 (alelos C ou A) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conjuntos de “primers” e sondas usados nos experimentos para avaliar a quantidade e tamanho do DNA no soro.

Tabela 2 - SNPs incluídos nesse estudo

Tabela 3 - Conjunto de primers usados para genotipagem de SNPs

Tabela 4 - SNPs incluídos nesse estudo e tamanho do amplicon para os métodos utilizados

Tabela 5 - Distribuição genotípica para os SNPs deste estudo nos 54 voluntários e concordância com os métodos comparativos

LISTA DE SIGLAS

gDNA “Genomic DNA”

DNA Ácido desoxirribonucleico

PCR Reação em cadeia da polimerase

QPCR PCR em tempo real

SNPs “Single nucleotide polymorphisms”

Cq Ciclo quantitativo

MAF “Minor allele frequency”

ARMS “Amplification Refractory Mutation System”

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

PB Pares de base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MÉTODOS.....	14
3.1. Coleta de amostras e armazenamento.....	14
3.2. Avaliação da quantidade e do tamanho do DNA genômico livre de células no soro ao longo do tempo.....	16
3.3. Extração de DNA do sangue.....	17
3.4. Separação do soro a partir do sangue capilar usando uma centrífuga de papel movida pela força das mãos.....	17
3.5. SNPs selecionados	20
3.6. Genotipagem de SNPs diretamente do soro por qPCR.....	20
3.6.1. Método utilizado (ARMS-qPCR).....	20
3.6.2. Estratégia para validação dos resultados obtidos no soro: diminuição do tamanho dos amplicons e comparação entre os métodos.....	21
3.6.3. A reação de ARMS-qPCR.....	24
3.7. Análise dos dados	25
3.8. Aspectos éticos	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Quantidade e tamanho do DNA genômico livre de células no soro e uso do soro diretamente na reação de PCR dispensando a extração de DNA.....	26
4.2. Genotipagem de SNPs diretamente do soro isolado a partir do sangue capilar usando uma centrífuga de papel movida pela força das mãos.....	27
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE I – PREMIAÇÕES.....	41
APÊNDICE II – VALORES DE CQ E GENÓTIPOS ATRIBUÍDOS AOS VOLUNTÁRIOS PARA CADA SNP INCLUÍDO NO ESTUDO	42
ANEXO I – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	48

1. INTRODUÇÃO

O sequenciamento do genoma humano mostrou que o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) é o tipo de variação genética mais comum no DNA humano (1, 2). Atualmente, sabe-se que os SNPs estão associados ou são a causa de doenças. Uma lista extensa de SNPs clinicamente relevantes pode ser encontrada no “Online Mendelian Inheritance of Man” (OMIM) (3). Este conhecimento, juntamente com o avanço da medicina preventiva, faz com que o desempenho, a qualidade e o tempo de processamento na detecção de SNPs clinicamente relevantes tornem-se importantes questões de pesquisa para que haja o aprimoramento destes testes (4).

Espera-se que existam no genoma humano mais de 5 milhões de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) com frequência do menor alelo superior a 10%. Alguns desses SNPs podem estar associados ao risco de desenvolver doenças comuns (5).

Sobre a importância clínica em genotipar polimorfismos na área da oncologia, a identificação de SNPs pode servir como biomarcadores de suscetibilidade genética no desenvolvimento de doenças como, por exemplo, câncer de tireóide. Tal identificação pode contribuir na avaliação do aumento do risco e, eventualmente, a otimização de procedimentos na prevenção de câncer e na medicina personalizada (6). Em relação a outros tipos de câncer, a predição do risco de câncer de mama por meio de SNPs em conjunto com outros algoritmos estão atualmente sendo explorados em diferentes configurações na abordagem da terapia preventiva (7).

Além disso, a farmacogenética representa uma promissora ferramenta para a individualização de terapias. Vários estudos publicados investigaram o potencial do papel preditivo das variantes genéticas C677T e A1298C do gene Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) na toxicidade e eficácia de fármacos na tentativa de otimizar a terapia com drogas específicas (8).

Em relação às análises laboratoriais de exames, a fase pré-analítica é a que menos recebe atenção científica e é responsável por 70% dos erros diagnósticos (9). Diminuir etapas e, conseqüentemente, o tempo de processamento, eliminar o preparo de alíquotas e pipetagens privilegiando o uso do tubo primário com a identificação primária dos pacientes são atitudes simples, mas que impactam significativamente a qualidade das análises laboratoriais e a segurança dos pacientes (10). Assim, a fase

pré-analítica e a diminuição de etapas para genotipagem de SNPs são o foco deste trabalho.

O sangue total colhido em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é a espécie de escolha para detecção de SNPs, pois possui grande quantidade de DNA que é oriunda dos leucócitos periféricos (11) e esse anticoagulante inibe as DNAses do sangue garantindo a estabilidade da amostra (12). Entretanto, apesar da grande quantidade de DNA no sangue total-EDTA, a etapa de extração de ácidos nucleicos é indispensável para que a hemoglobina, outros componentes celulares e o EDTA sejam eliminados (13). A hemoglobina, o derivado da sua degradação (hematina) e o EDTA são conhecidos inibidores da amplificação de DNA (14) e impedem o uso direto desta espécie na reação de PCR. Assim, a necessidade de extração de ácido nucleico impede o uso do tubo primário na genotipagem de SNPs e acrescenta o preparo de alíquotas e pipetagens ao processo, mesmo se a extração for automatizada (15).

O soro é a fase aquosa do sangue que se separa dos eritrócitos, dos leucócitos e dos fatores de coagulação durante o processo de formação do coágulo (16). Protocolos utilizando esta espécie diretamente nas reações de PCR quantitativo (qPCR) para detecção de agentes infecciosos foram publicados (11, 17) indicando que o soro é compatível com o uso direto em qPCR. Em relação à genotipagem de SNPs diretamente do soro, Ulvik e colaboradores descreveram em 2001 um protocolo com esse propósito. No entanto, a matriz precisava ser secada antes da reação de qPCR para evitar sua completa inibição (18). Atualmente, o uso do soro cru (sem nenhum tratamento) diretamente na reação de qPCR para a genotipagem de SNPs seria mais factível porque componentes e/ou enzimas modificadas que diminuem cada vez mais impacto dos inibidores sobre reação foram adicionados aos “master mixes” de qPCR atuais (19-22).

Ademais, a concentração de DNA genômico livre de células (gDNA) presente no soro é maior do que no plasma, porque o processo de coagulação do sangue rompe os leucócitos liberando seu conteúdo na fase líquida desta espécie (23, 24). Além disso, concentração de gDNA no soro aumenta ao longo do armazenamento do tubo de coleta a 4°C (24). Isto indica que existe uma liberação contínua de gDNA do coágulo sanguíneo para o soro devido a morte de células nucleadas que poderia ser explorado para o enriquecimento de gDNA nessa espécie *ex-vivo*. Esta crescente

quantidade de gDNA do soro poderia permitir o uso direto desta espécime nas qPCR para genotipagem de SNPs clinicamente relevantes dispensando a extração de DNA.

Além das vantagens de usar o tubo primário e diminuir as etapas do processo, a isenção da extração de DNA poderia promover os testes laboratoriais remotos de diagnóstico molecular como, por exemplo, ensaios de genotipagem rápidas e úteis para terapias personalizadas (25, 26), especialmente se a amostra testada puder ser facilmente coletada e processada. Neste sentido, uma centrífuga de papel de baixo custo e operada pela força das mãos usada para a separação do soro do coágulo sanguíneo foi descrita recentemente (27). A separação completa do plasma por essa centrífuga permitiu a avaliação da fração volumétrica das hemácias e a leitura direta do hematócrito, sendo uma medida usada para diagnosticar anemia. Além disso, a separação do “buffy coat” pode ser útil para identificação de hematoparasitas em doenças como malária e tripanossomíase africana.

Caso o soro possa ser usado diretamente nas reações de PCR, esta centrífuga manual poderia ser usada na separação do soro e, assim, um processo pré-analítico para genotipagem de SNPs remota poderia começar a ser vislumbrado.

Por outro lado, sabe-se que as DNAses do sangue estão ativas no soro (28). Consequentemente, o gDNA fragmentado pode ser mais prevalente do que o DNA de alto peso molecular nessa matriz, o que significa que uma maior sensibilidade poderia ser alcançada por meio do desenho de iniciadores de PCR (“primers”) que amplifiquem os produtos (“amplicons”) de tamanhos pequenos.

Em relação à genotipagem de SNPs, o sistema de mutação refratária de amplificação (“Amplification Refractory Mutation System” ou ARMS), também conhecida como PCR alelo específico (29) adaptado para qPCR é comumente utilizado. Nessa metodologia ocorre o atraso da amplificação causado por “mismatches” na extremidade 3'-OH do “primer” alelo-específico. Os “primers” alelo-específicos são confeccionados de forma que o último nucleotídeo de extremidade 3'-OH coincida com o local da variante genética, um correspondente ao alelo referência e o outro o nucleotídeo alternativo.

Diante das observações descritas acima, hipotetizou-se que o DNA liberado dos leucócitos a partir do coágulo poderia ser amplificado diretamente do soro e como é grande a possibilidade deste DNA encontrar-se fragmentado a diminuição do tamanho dos “amplicons” poderia facilitar sua detecção.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar se o soro sem pré-tratamento pode ser uma fonte de ácidos nucleicos alternativa ao DNA extraído do sangue para genotipagem de polimorfismos clinicamente relevantes por PCR.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Estimar a quantidade e avaliar o tamanho do DNA genômico livre de células no soro ao longo de uma semana de armazenamento à temperatura ambiente.

B) Verificar se soro (sem pré-tratamento) pode ser usado diretamente como fonte de DNA genômico livre de células para qPCR, dispensando a extração de ácidos nucleicos, e avaliar a influência do tempo após a coleta sobre esta detecção.

C) Analisar se polimorfismos de um único nucleotídeo clinicamente relevantes podem ser genotipados diretamente do soro extraído do sangue capilar coletado por punção digital e isolado usando uma centrífuga de papel operada pela força das mãos.

3. MÉTODOS

3.1. COLETA DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO

O estudo envolveu 69 voluntários saudáveis, 15 para os experimentos que avaliam quantidade e tamanho do DNA livre de células no soro e 54 para os experimentos que avaliaram a genotipagem dos SNPs diretamente no soro.

O sangue venoso dos 15 voluntários selecionados para os experimentos que avaliam quantidade e tamanho do DNA livre de células no soro foi coletado por punção venosa em cinco tubos de 4mL Vacuette Z soro com ativador de coágulo (Greiner-bio-one). Cada tubo foi armazenado durante 0, 1, 2, 4 ou 7 dias à temperatura ambiente antes da separação do soro (Figura 1).

O sangue capilar dos 54 voluntários selecionados para a genotipagem dos SNPs diretamente no soro foi coletado por punção digital e gotejamento em dois tubos de microcentrifuga diferentes (1,5 mL e 200 µL). O tubo de 1,5 mL continha 1 mL de água destilada, uma exigência do protocolo de extração de DNA utilizado. Foram coletados aproximadamente 100 µl de sangue em cada tubo. O sangue dos tubos de 1,5ml foi submetido ao método de extração com resina Chelex-100 (item 3.3) no mesmo dia da coleta e armazenadas a -20°C até o dia da análise, sendo o seu conteúdo submetido aos métodos 2 e 3 (métodos comparativos). O sangue do tubo de 200 µl foi centrifugado 4 horas após a coleta e o soro direto sem pré-tratamento submetido a análise no mesmo dia (Figura 2), sendo o seu conteúdo submetido ao método 1 (método teste). Os métodos 1, 2 e 3 serão detalhadamente descritos no item 3.6.2.

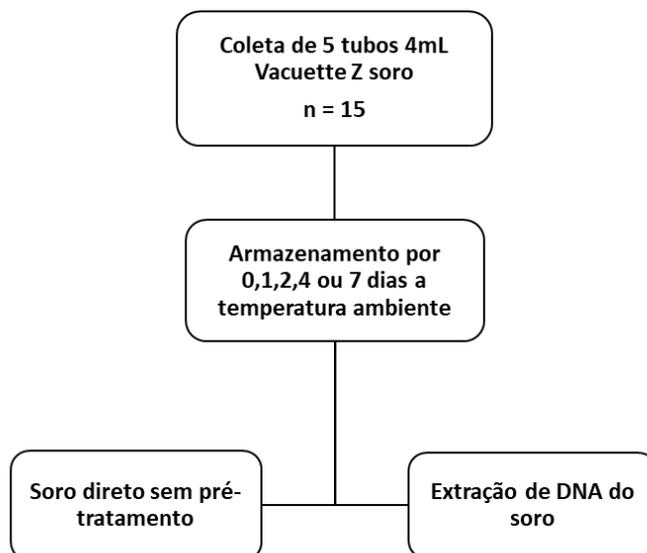


Figura 1 - Delineamento experimental da etapa de avaliação da quantidade e do tamanho do DNA livre de células no soro (extraído) e soro direto sem pré-tratamento na reação de PCR

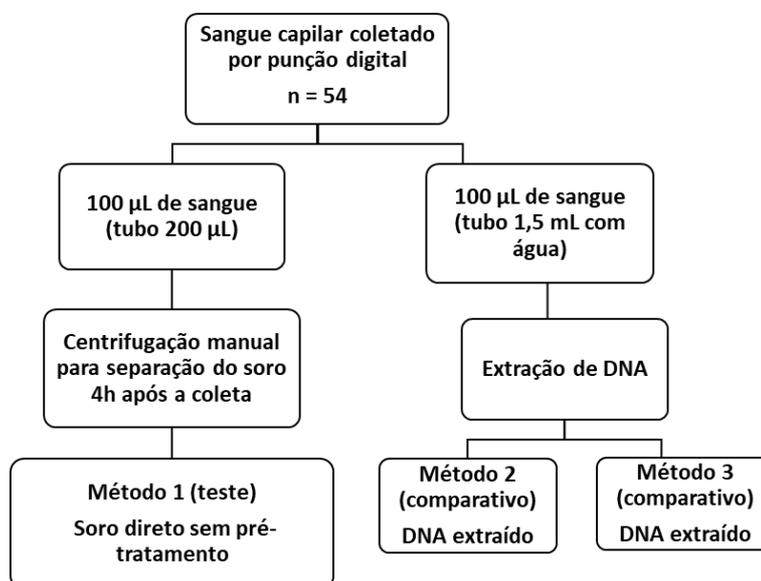


Figura 2 - Delineamento experimental da etapa de genotipagem de SNPs por PCR diretamente no soro sem pré-tratamento e comparação dos resultados com DNA extraído a partir do sangue capilar coletado por punção digital

3.2. AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E DO TAMANHO DO DNA GENÔMICO LIVRE DE CÉLULAS NO SORO AO LONGO DO TEMPO

O sangue venoso dos cinco tubos de 4 mL de cada um dos 15 voluntários foi armazenado durante 0, 1, 2, 4 ou 7 dias à temperatura ambiente antes da separação do soro (2000 x g por 10 minutos). O soro (2 µL) foi utilizado diretamente nas reações de qPCR ou submetido à extração de DNA (900 µL) usando o “Nuclisens Easymag System” (Biomérieux) com o protocolo genérico 2.1.1 e adição de 50 µL de suspensão de partículas de sílica magnética e eluição em 110 µL. O DNA extraído (5 µL) e o soro cru (2 µL) foram submetidos a quatro reações distintas de qPCR para amplificação de alvos que apresentavam diferentes pesos moleculares em pares de base (pb) (65 pb, 101 pb, 202 pb e 688 pb). As reações de qPCR consistiram em 10 µL de “Maxima probe/ROX qPCR master mix” (Thermo Scientific), 1 µM de cada “primer”, 0,5 µM de sonda (IDT DNA Technologies), 5 µL de DNA extraído do soro ou 2 µL soro cru em um volume total de 20 µL (suplementado com água isenta de nuclease). Os conjuntos de primers e sondas usados nesse experimento estão descritos na tabela 1. A ciclagem térmica foi realizada em um sistema de PCR em tempo real “StepOne™” (AppliedBiosystems) com as seguintes condições de execução: desnaturação por 10 min a 95 °C; seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C com uma única medição de fluorescência no final da etapa de extensão.

Tabela 1 - Conjuntos de “primers” e sondas usados nos experimentos para avaliar a quantidade e tamanho do DNA no soro.

Amplicon	Sequência primer/sonda 5'- 3'	Alvo
65 pb	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT HEX/TTCTGACCT/ZEN/GAAGGCTCTGCGCG/IABKFQ	Gene RNASE P
101 pb	AGATTTGGACCTGCGAGCG GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA HEX/TGAGCAAGC/ZEN/TTTCTCACAAGCATTGGTTT/3IABKFQ	Gene JAK2
202 pb	CTTTGAAGCAGCAAGTATGA CGCTTTGCTGTGACGCACTT HEX/CTTGCCGGA/ZEN/CAGACAAAGCGTTTC/IABKFQ	Gene SBP2
688 pb	GCAGGCGGACGGACTGAG ATGGACCCTTGGCTGTCAGAATTA HEX/AGCAGAAGG/ZEN/TAGAAGGCAAAGCCA/IABKFQ AATGGTGTTCCTCACATGGTCATC	Gene ALMS

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA DO SANGUE

Cerca de 100 μL de sangue capilar de 54 voluntários foi retirado por punção digital e coletado por gotejamento em dois tubos de microcentrífuga diferentes (1,5 mL e 200 μL), conforme já mencionado no item 3.1. O tubo de 1,5 mL continha 1 mL de água para induzir hemólise e os glóbulos brancos remanescentes foram submetidos ao método de extração de DNA Chelex-100 (30).

Na extração de DNA por Chelex-100 (Biorad) a mistura de sangue com a água foi centrifugada à 8000 x g por 3 min. Após o descarte do sobrenadante, esse procedimento foi repetido uma vez. Em seguida, foram adicionados 200 μL de uma suspensão de chelex-100 a 5%. Após homogeneização, a amostra foi incubada a 56°C por 30 min, a 100°C por 8 min e o material foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.4. SEPARAÇÃO DO SORO A PARTIR DO SANGUE CAPILAR USANDO UMA CENTRÍFUGA DE PAPEL MOVIDA PELA FORÇA DAS MÃOS

Uma centrífuga de papel descrita por Bhamla e colaboradores e nomeada “paperfuge” (27) foi adaptada para tubos de microcentrífuga de 200 μL . Essa centrífuga foi inspirada no brinquedo conhecido como “corrupio”. A “paperfuge” adaptada (figura 3) é composta por um disco de papel (12 cm de diâmetro) feito de papel “Kraft” plastificado (gramatura de 240 g/m^2) com dois botões de quatro furos (20 mm de diâmetro) fixados no centro, um de cada lado do disco. Uma linha de pesca trançada de polietileno de 0,48 mm é passada por cada um dos furos do botão por vez deixando 15-20 cm de linha em cada lado do disco de papel. Dois lápis de madeira foram presos em cada extremidade da linha para permitir a aplicação da força manual. Quatro cortes transversais equidistantes (em relação ao diâmetro perpendicular do círculo) de 1 cm foram feitos a 1 cm da borda para segurar os tubos. Assim, quatro tubos podem ser centrifugados ao mesmo tempo. Os tubos contendo cerca de 100 μL de sangue coagulado foram colocados nos cortes transversais descritos acima e centrifugados durante quatro minutos para separação do soro. Durante a centrifugação propriamente dita, a linha e o disco de papel permaneceram nas posições vertical e horizontal, respectivamente. A força é aplicada puxando um lápis

para cima e o outro para baixo por cada mão. O sangue foi coletado 4 horas antes da separação do soro e 2 μL do soro foram utilizados diretamente na reação de qPCR.

Um vídeo que mostra a construção da centrífuga pode ser encontrado em (<https://www.youtube.com/watch?v=sYnqwb12R3k>) ou no “QR code” apresentado na figura 3.

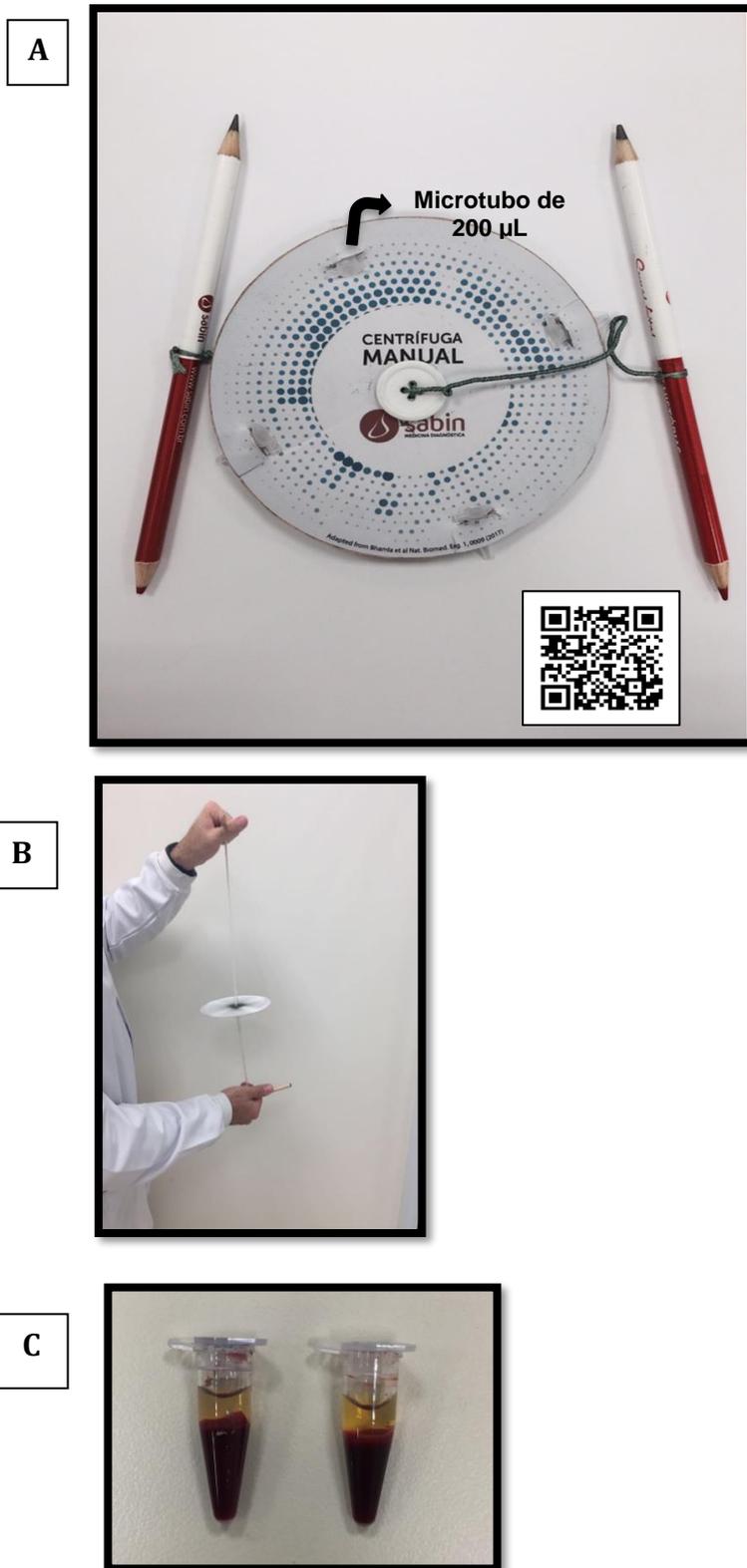


Figura 3 – A) Centrífuga de papel (“paperfuge”) descrita por Bhambhani e colaboradores adaptada com 4 microtubos de 200 μ L e “QR code” com vídeo da sua construção; B) Processo de centrifugação dos microtubos por 4 minutos; C) Soro separado do coágulo após a centrifugação pela “paperfuge”

3.5. SNPs SELECIONADOS

Quatro variantes genéticas foram selecionadas para a genotipagem diretamente do soro cru (Tabela 2). A seleção das variantes foi executada na database dbSNP do “National Center for Biotechnology information” (NCBI). Os critérios utilizados na busca foram a frequência global do menor alelo (“Minor Allele Frequency” ou MAF) superior a 25% (0,25) para cada variante, a fim de que todos os genótipos possíveis pudessem ser encontrados com um pequeno número de amostras e também a associação clínica com citação no “Pubmed”. Diversas variantes genéticas atenderiam estes critérios e quatro foram selecionadas aleatoriamente e apresentavam associação clínica aplicável na área de oncologia (câncer colorretal) e resposta ao tratamento de fármacos.

Tabela 2 – SNPs incluídos nesse estudo

Variante	Gene	MAF Global	MAF em diferentes populações (dbSNP)	Associação clínica	Referência
rs1801131	MTHFR	0,25	0,15 - 0,41	Resposta a fluoruracila, leucovorina e oxaliplatina	(31, 32)
rs4939827	SMAD7	0,35	0,16 - 0,59	Câncer colorretal	(33-35)
rs4779584	SMAD7	0,49	0,16 - 0,82	Câncer colorretal	(33-35)
rs3802842	COLCA1	0,28	0,20 - 0,50	Câncer colorretal	(33-35)

3.6. GENOTIPAGEM DE SNPs DIRETAMENTE DO SORO POR qPCR

3.6.1. Método utilizado (ARMS-qPCR)

Os SNPs selecionados foram genotipados usando o sistema de mutação refratária de amplificação (“Amplification Refractory Mutation System” ou ARMS) (29) adaptado para qPCR. Este sistema de genotipagem é baseado no atraso da amplificação causado por “mismatches” na extremidade 3'-OH do “primer” alelo-específico. São utilizados dois “primers” alelos-específicos e estes são projetados de forma que o último nucleotídeo de extremidade 3'-OH coincida com o local da variante genética. Cada “primer” tem na sua extremidade 3'-OH um nucleotídeo específico para um dos possíveis alelos; um “primer” tem na sua extremidade 3'-OH o nucleotídeo correspondente ao alelo referência e o outro o nucleotídeo alternativo.

Esses “primers” alelos-específicos são combinados com um “primer” comum em reações distintas. Portanto, a genotipagem exige que duas reações sejam executadas em paralelo. A extremidade 3'-OH do “primer” anelada ou não-anelada com o DNA genômico produz uma amplificação seletiva que reflete o genótipo. Assim, a genotipagem é baseada no comprometimento da amplificação de nenhum, de um, ou do outro primer alelo-específico. Se a reação do alelo referência amplificar, o genótipo é homozigoto para esse alelo. Se ambas as reações amplificam, o genótipo é heterozigoto. Se apenas a reação do alelo alternativo amplificar, o genótipo é homozigoto para o alelo alternativo.

Este método foi desenvolvido para PCR convencional e análise em gel de agarose. Para que a discriminação genotípica fosse possível era necessário parar a reação em um ciclo específico, pois na verdade o “mismatch” não impede (refrata) a amplificação, ele apenas atrasa a amplificação do alvo específico (36). A migração do método para o qPCR permitiu sua execução com um excesso de ciclos, pois trata-se de uma reação cinética em que a amplificação pode ser acompanhada ao longo do tempo de modo que ambas as reações alelo-específicas amplificam o mesmo alvo genômico, em ciclos semelhantes ou distintos - a depender do genótipo. Assim, uma reação funciona como controle interno para a outra, pois amplificam o mesmo produto (curvas de dissociação devem ser iguais). Os genótipos são atribuídos considerando a reação com menor ciclo quantitativo (Cq), no caso dos genótipos homozigotos. Se forem observados Cqs semelhantes em ambas as reações trata-se de um genótipo heterozigoto (vide figuras 6, 7, 8, e 9 e o apêndice II).

3.6.2. Estratégia para validação dos resultados obtidos no soro: diminuição do tamanho dos amplicons e comparação entre os métodos

Nos experimentos para genotipagem das variantes genéticas desse estudo mostradas na Tabela 2, conjuntos de “primers” produzindo “amplicons” de tamanhos pequenos foram desenhados para que o soro pudesse ser usado diretamente para análise no mesmo dia da coleta. Estes conjuntos de “primers” foram denominados método 1 (Tabela 3). Os resultados observados com o método 1 foram comparados aos resultados de outros dois conjuntos de primers distintos que produzem amplicons

de tamanhos convencionais (métodos 2 e 3). Os métodos 2 e 3 foram aplicados ao DNA genômico extraído do sangue. A estratégia de amplificação de todos os três métodos pode ser encontrada na figura 4. Como os métodos 1 e 3 compartilham os mesmos primers alelos-específicos (responsáveis pela discriminação alélica), um terceiro sistema de genotipagem composto por primers alelos-específicos distintos foi empregado (método 2), para garantir a completa independência entre os métodos comparados.

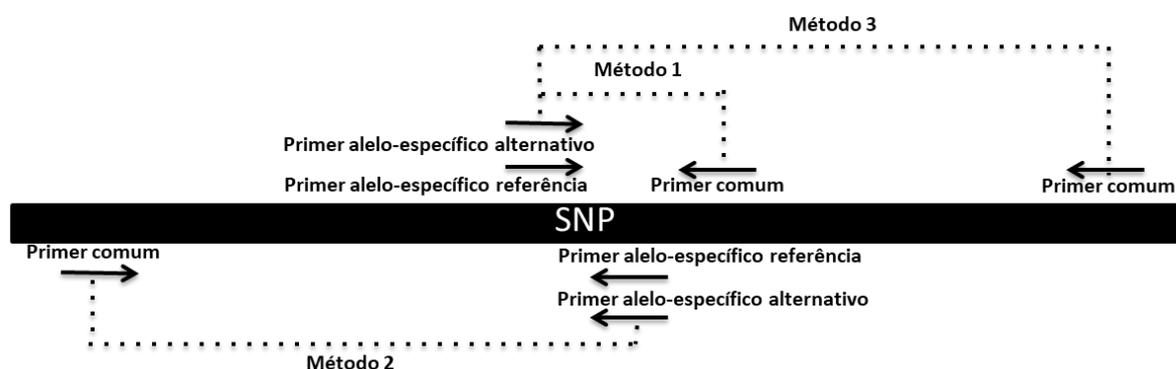


Figura 4 - Estratégias de amplificação usadas nos métodos 1, 2 e 3 para a genotipagem dos polimorfismos (SNPs) desse estudo utilizando ARMS qPCR

Tabela 3 - Conjunto de primers usados para genotipagem de SNPs (continua na página 23)

Variante	Sequência do primer 5'- 3'	Comentário
rs1801131	Método 1 (DNA do soro)	
	GGG AGG AGC TGA CCA GTG AAa A	Primer - alelo referência
	GGG AGG AGC TGA CCA GTG AAa C	Primer - alelo alternativo
	GGT AAA GAA CGA AGA CTT CAA AGA CA	Primer comum
	Método 2 (gDNA)	
	GAA CGA AGA CTT CAA AGA CAC TcT	Primer - alelo referência
	GAA CGA AGA CTT CAA AGA CAC TcG	Primer - alelo alternativo
	CTC TTC TAC CTG AAG AGC AAG TCC	Primer comum
	Método 3 (gDNA)	
CAG CAT CAC TCA CTT TGT GAC CAT T	Primer comum	
	Usado em conjunto com primers específicos do método 1	
rs4939827	Método 1 (DNA do soro)	
	TCACAGCCTCATCCAAAAGAGGAAtT	Primer - alelo referência
	TCACAGCCTCATCCAAAAGAGGAAtC	Primer - alelo alternativo
	AGTCTGAGGGAGCTCTGGGGT	Primer comum

	Método 2 (gDNA) TGAGGGAGCTCTGGGGTCCaA TGAGGGAGCTCTGGGGTCCaG CCAGTGCCAATCCATCCCATCTATTC	Primer - alelo referência Primer - alelo alternativo Primer comum
	Método 3 (gDNA) GTTTCCTCCATGAGGAACTCACTCTAAAC Usado em conjunto com primers específicos do método 1	Primer comum
rs4779584	Método 1 (DNA do soro) TCCTGTGTGTATAGTTATGGTTTCTGTTgG TCCTGTGTGTATAGTTATGGTTTCTGTTgA CAGTAGAACTTGTTGATAAGCCATTCTTC	Primer - alelo referência Primer - alelo alternativo Primer comum
	Método 2 (gDNA) CAGTAGAACTTGTTGATAAGCCATTCTTtC CAGTAGAACTTGTTGATAAGCCATTCTTtT GATGAGTCCTAACAAGGAAGGTGAC	Primer - alelo referência Primer - alelo alternativo Primer comum
	Método 3 (gDNA) GAGCTGCTATAAGATGGGCTGAGTT Usado em conjunto com primers específicos do método 1	Primer comum
rs3802842	Método 1 (DNA do soro) CCCTAAAATGAGGTGAATTTCTGGGtG CCCTAAAATGAGGTGAATTTCTGGGtT CCCTTGCAGACCCATAGAAAATCT	Primer - alelo referência Primer - alelo alternativo Primer comum
	Método 2 (gDNA) CCCTTGCAGACCCATAGAAAATCcC CCCTTGCAGACCCATAGAAAATCcA AGGATGTTCCACACAGATGCTATCC	Primer - alelo referência Primer - alelo alternativo Primer comum
	Método 3 (gDNA) CTTCTCTGCTGTTCCCTATGACTTC Usado em conjunto com primers específicos do método 1	Primer comum

As letras minúsculas indicam os “mismatches” deliberadamente introduzidos no segundo nucleotídeo a partis a extremidade 3'-OH para aumentar a discriminação alélica (29).

A etapa de confecção destes primers foi executada utilizando as ferramentas de bioinformática tradicionais, o banco de dados REFSEQ do NCBI (37) e primer-BLAST (38), e as recomendações clássicas para desenho de "primers (39), sendo que os “primers” alelos-específicos foram desenhados com a ferramenta on-line WASP (40). A tabela 4 descreve os tamanhos dos amplicons de cada método para cada SNP incluído no estudo.

Tabela 4 - SNPs incluídos nesse estudo e tamanho do amplicon para os métodos utilizados

Variante	Gene	"Amplicon" Método 1 (DNA soro)	"Amplicon" Método 2 (gDNA)	"Amplicon" Método 3 (gDNA)
rs1801131	MTHFR	51 pb	97 pb	96 pb
rs4939827	SMAD7	50 pb	213 pb	105 pb
rs4779584	SMAD7	59 pb	191 pb	147 pb
rs3802842	COLCA1	51 pb	86 pb	274 pb

3.6.3. A reação de ARMS-qPCR

A reação de ARMS-qPCR consistiu em 10 µL de 2x Maxima SYBR green/ROX qPCR master mix (Thermo Scientific), 1 µM do primer comum e 1 µM de um primer alelo-específico (IDT DNA Technologies) (descrito na tabela 3), 5 µL de DNA extraído ou 2 µL de soro cru em um volume total de 20 µL (suplementado com água livre de nuclease). Duas reações paralelas são necessárias para a genotipagem, uma específica para cada alelo do SNP (alelo referência e alelo alternativo). A ciclagem térmica foi realizada em um sistema de PCR em tempo real StepOne™ (Thermo Fisher) com as seguintes condições: desnaturação por 10 min a 95 °C; seguido por 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (para DNA genômico) ou 1 minuto a 50°C (DNA direto no soro) com uma única medição de fluorescência no final da etapa de extensão. As especificidades dos amplicons foram analisadas utilizando curvas de dissociação que consistiram de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e um aumento gradual da temperatura de 60°C a 95°C em acréscimos de 0,3°C com leitura de fluorescência após cada acréscimo de 0,3°C. Como descrito no item 3.6.1, os genótipos são atribuídos considerando a reação com menor ciclo quantitativo (Cq), no caso dos genótipos homocigotos. Se forem observados Cqs semelhantes em ambas as reações trata-se de um genótipo heterocigoto. Os dados brutos de todas as genotipagens feitas neste estudo constam no Apêndice II, o Cq sublinhado corresponde ao genótipo atribuído.

3.7. ANÁLISE DOS DADOS

Por se tratar de uma comparação de métodos avaliou-se o grau de concordância entre eles. Os termos sensibilidade e especificidade não são aplicáveis neste caso, pois o resultado verdadeiro é desconhecido (ambos métodos comparados podem estar errados) (41). Assim, o grau de concordância dos genótipos atribuídos pelo método teste (soro) e pelos métodos comparativos (DNA extraído) foram quantificados usando a estatística kappa com três categorias - homocigoto para o alelo referência, heterocigoto e homocigoto para o alelo alternativo - usando a ferramenta on-line disponível no site (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/?K=3>). Acesso em: 20 de novembro de 2017.

3.8. ASPECTOS ÉTICOS

O comitê de ética de pesquisa do Hospital de Oftalmológico de Brasília (HOB) aprovou este estudo (registro CAAE 50111515.0.0000.5667) e o consentimento informado por escrito foi obtido de cada participante.

4. RESULTADOS

4.1. QUANTIDADE E TAMANHO DO DNA GENÔMICO LIVRE DE CÉLULAS NO SORO E USO DO SORO DIRETAMENTE NA REAÇÃO DE PCR DISPENSANDO A EXTRAÇÃO DE DNA

Utilizando o DNA extraído do soro como “template”, todos os alvos genômicos testados puderam ser amplificados com sucesso, independentemente do tamanho do “amplicon” (65 pb, 101 pb, 202 pb e 688 pb) (Figura 5 - A, B, C, D; círculos fechados). Para todos os alvos, os valores de Cq mostraram um declínio gradual ao longo do eixo da abcissa nos gráficos sugerindo que a quantidade de DNA genômico aumenta no soro ao longo dos dias com a incubação à temperatura ambiente. Além disso, as reações com “amplicons” pequenos (65 pb) (Figura 5 A; círculos fechados) geraram valores de Cq menores quando comparados as reações com “amplicons” maiores (101 pb, 202 pb e 688 pb) (Figura 5 B, C, D; círculos fechados) sugerindo uma maior quantidade de fragmentos de DNA pequenos no soro.

Utilizando o soro cru como “template”, os alvos de PCR de 65 pb e 101 pb puderam ser amplificados (dispensando a extração de DNA) do dia 0 ao dia 7 em todos os 15 voluntários testados (Figura 5 A e B; círculos abertos). O alvo de PCR de 202 pb pôde ser detectado em 2 de 15 voluntários no dia 2, em 10 de 15 voluntários no dia 4 e em 14 de 15 voluntários no dia 7 (Figura 5 C; círculos abertos). O alvo de PCR de 688 pb não pôde ser detectado em nenhuma ocasião (Figura 5 D). Estes resultados sugerem que os alvos de PCR com tamanhos de “amplicon” pequenos (<101 pb) podem ser amplificados diretamente a partir de soro cru logo após a coagulação. A incubação por pelo menos 4 dias à temperatura ambiente seria necessária para a amplificação de alvos genômico com peso molecular superior a 101 pb.

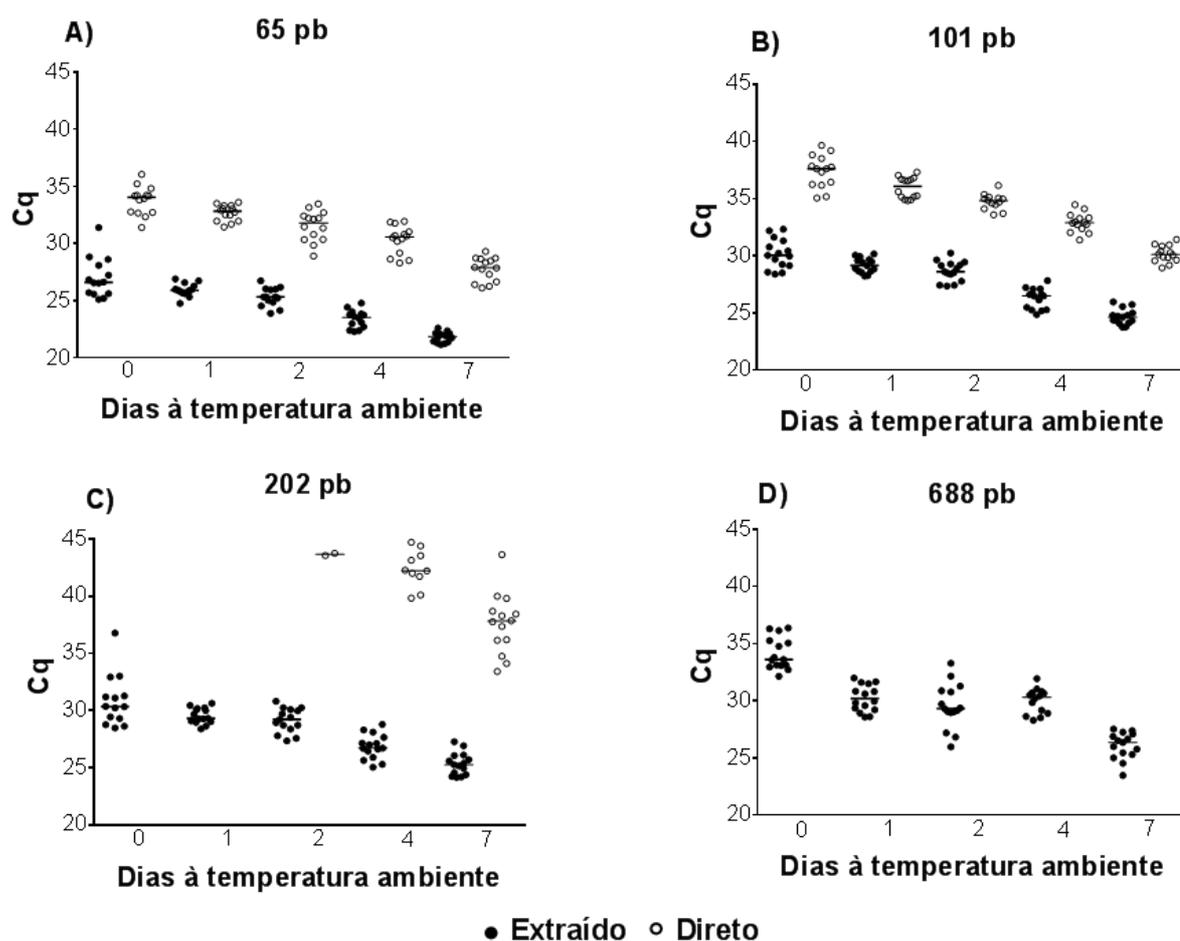


Figura 5 - Valores do ciclo quantitativo (Cq) para “amplicons” de diferentes tamanhos dos alvos RNASE P, JAK2, SBP2 e ALMS usando DNA extraído do soro (círculos fechados) e soro cru direto (círculos abertos) como “template” para qPCR. A linha representa o valor da mediana.

4.2. GENOTIPAGEM DE SNPs DIRETAMENTE DO SORO ISOLADO A PARTIR DO SANGUE CAPILAR USANDO UMA CENTRÍFUGA DE PAPEL MOVIDA PELA FORÇA DAS MÃOS

O soro dos 54 voluntários foi separado com êxito do sangue capilar usando a centrífuga de papel proposta. Considerando o método 1, os genótipos puderam ser atribuídos para todos os voluntários usando o soro cru e a estratégia com “amplicons” de tamanho pequeno, sendo que essa reação de ARMS-qPCR foi realizada no mesmo

dia da coleta (Tabela 5). Seis reações para o rs4779584 e duas para o rs1801131 não funcionaram na primeira tentativa e foram repetidas com sucesso no dia seguinte. Os genótipos atribuídos pelo método 1 apresentaram concordância completa com os genótipos atribuídos pelo método 2 e pelo método 3 (Kappa = 1, concordância perfeita, para ambas comparações). As figuras 6, 7, 8 e 9 contém curvas de amplificação representativas das genotipagem por ARMS-qPCR dos SNPs rs1801131, rs4939827, rs4779584 e rs3802842 usando o soro cru e o DNA extraído como “template”. Os dados brutos de todas as genotipagens feitas neste estudo constam no Apêndice II.

Tabela 5 - Distribuição genotípica para os SNPs deste estudo dos 54 voluntários e concordância com os métodos comparativos

Variante	Genótipo atribuído pelo método 1	Concordância com o método 2	Concordância com o método 3	MAF
rs1801131	26 (48%) AA 19 (35%) AC 9 (17%) CC	Perfeita, Kappa = 1	Perfeita, Kappa = 1	0,34
rs4939827	15 (28%) TT 20 (37%) CT 19 (35%) CC	Perfeita, Kappa = 1	Perfeita, Kappa = 1	0,46
rs4779584	28 (52%) CC 22 (41%) CT 4 (7%) TT	Perfeita, Kappa = 1	Perfeita, Kappa = 1	0,28
rs3802842	2 (4%) CC 21 (39%) AC 31 (57%) AA	Perfeita, Kappa = 1	Perfeita, Kappa = 1	0,23

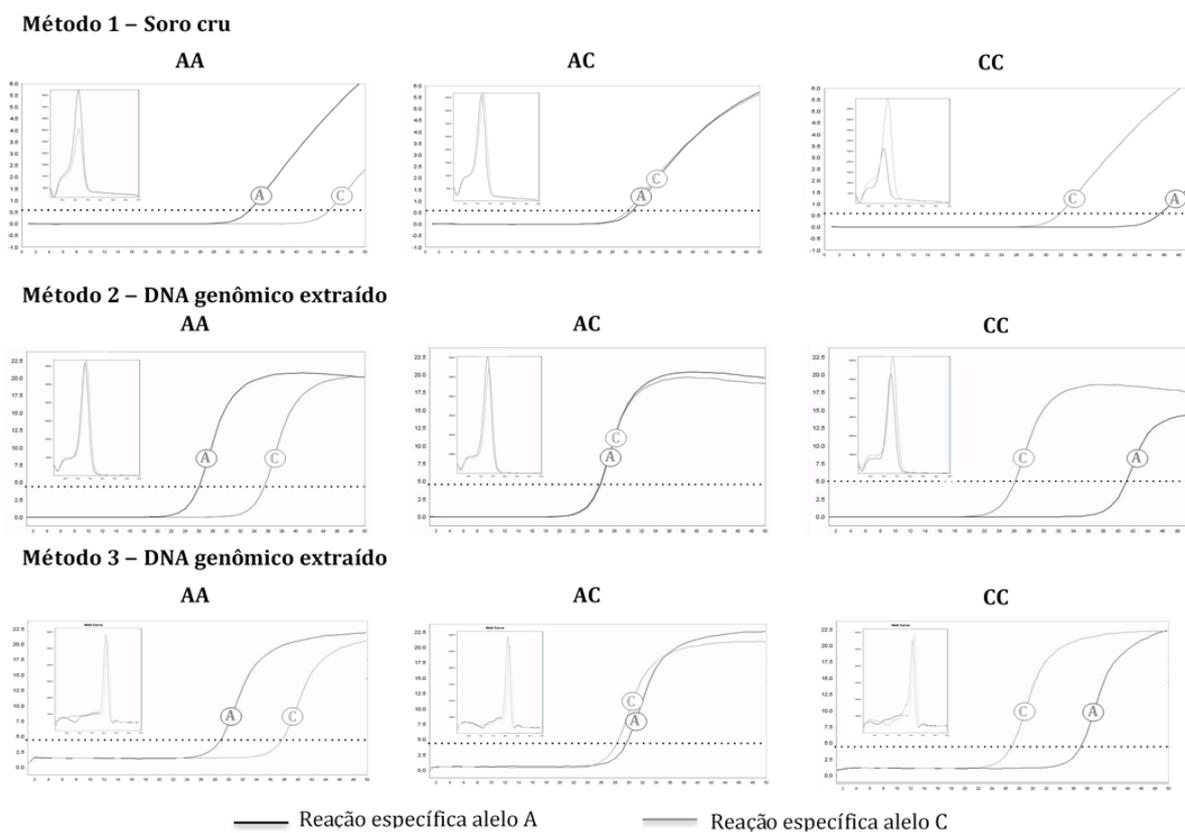


Figura 6 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs1801131 (alelos A ou C) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

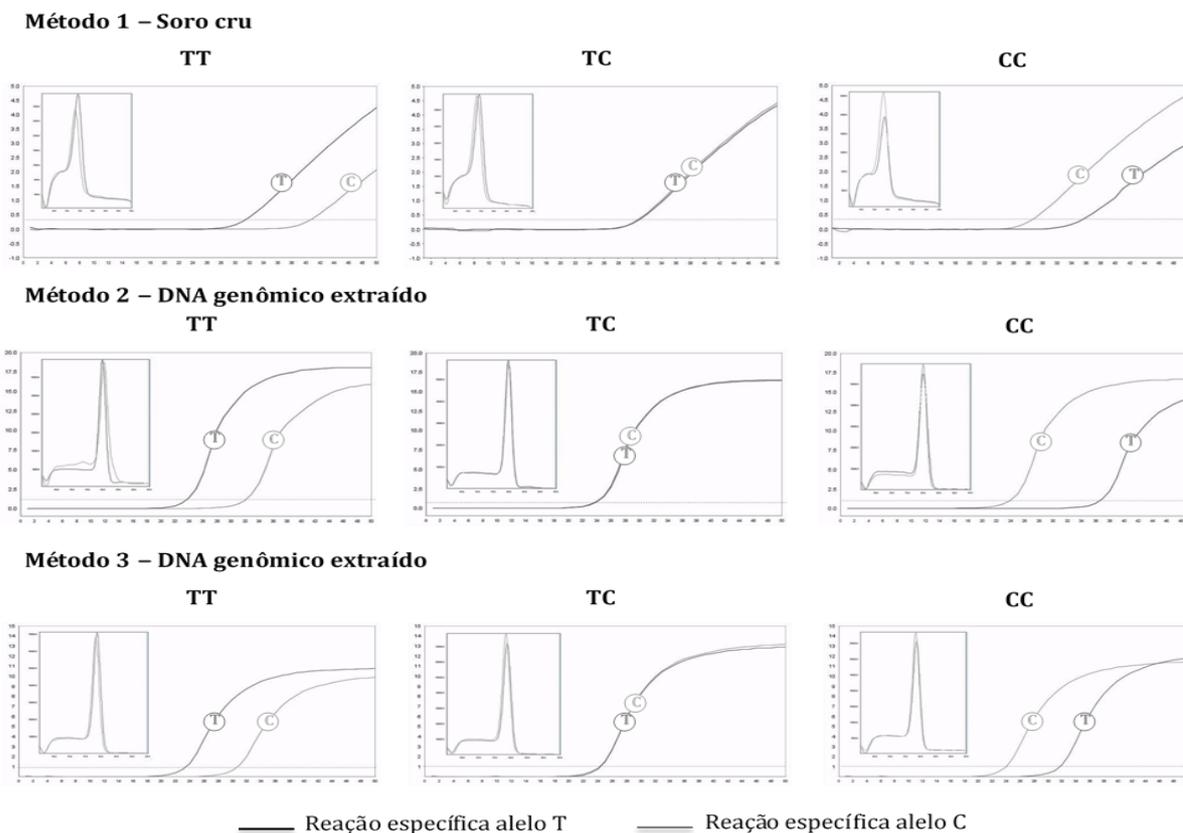


Figura 7 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs4939827 (alelos T ou C) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

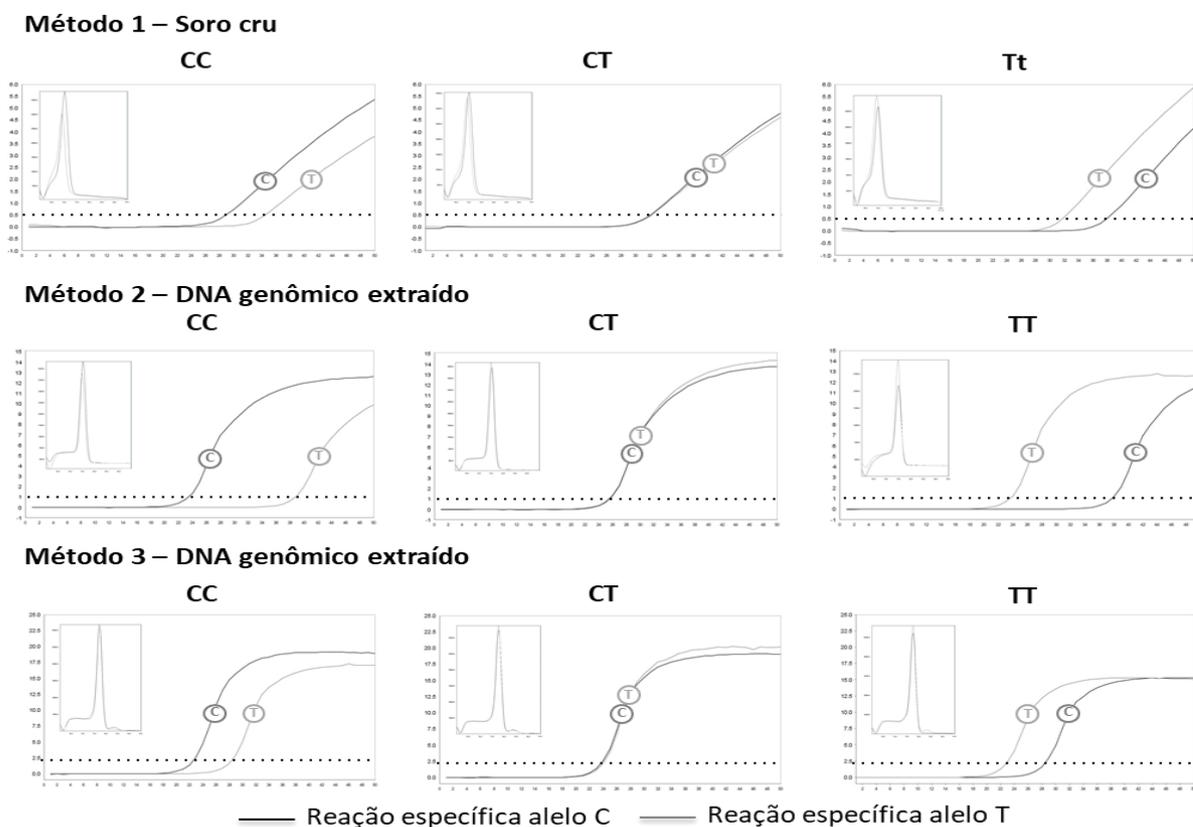
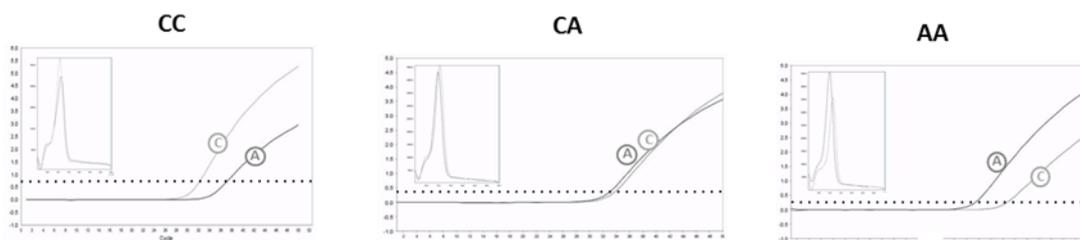
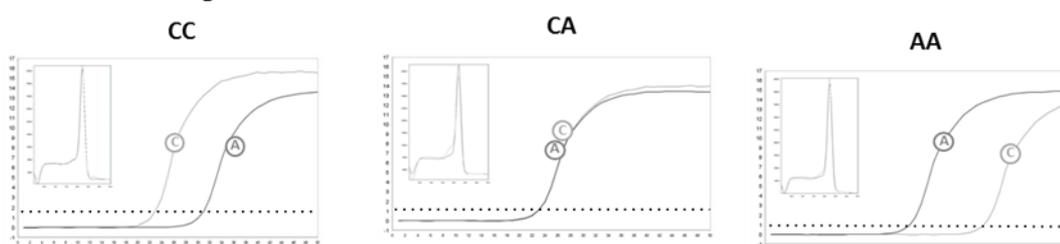
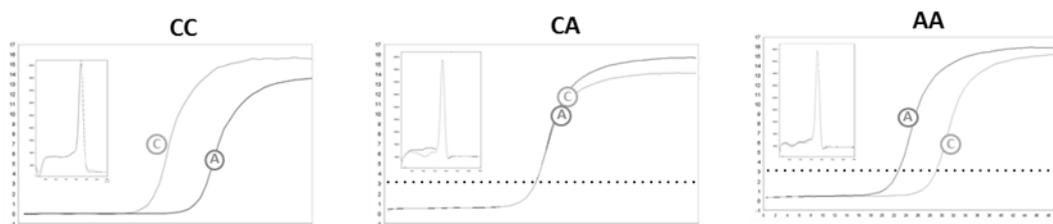


Figura 8 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs4779584 (alelos C ou T) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

Método 1 – Soro cru**Método 2 – DNA genômico extraído****Método 3 – DNA genômico extraído**

— Reação específica alelo A - - - Reação específica alelo C

Figura 9 - Curvas de amplificação e de dissociação representativas da genotipagem por ARMS-qPCR do SNP rs3802842 (alelos C ou A) usando o soro cru e o DNA extraído do sangue como “template”.

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho avaliou-se quantidade e tamanho de DNA genômico livre de células no soro ao longo de uma semana de armazenamento à temperatura ambiente. Os resultados demonstraram que “amplicons” de tamanhos diferentes poderiam ser gerados usando DNA genômico extraído do soro como “template”. Os tamanhos de “amplicons” testados são suficientes para a maioria das aplicações genômicas. Além disso, houve correlação direta entre o tamanho do amplicon e os valores de Cq sugerindo que fragmentos de DNA pequenos (<101 pb) são mais prevalentes no soro em comparação aos fragmentos de maior peso molecular (Figura 5). No entanto, não podemos excluir que os valores de Cq menores para “amplicons” pequenos são secundários à melhor eficiência de amplificação para alvos com menos pares de base.

Além disso, a quantidade de DNA genômico pode ser enriquecida no soro se a espécime permanecer em contato com o coágulo sanguíneo à temperatura ambiente (o coágulo sanguíneo era a única fonte disponível de DNA no tubo). Assim, a comunidade de diagnósticos moleculares pode explorar esse fenômeno para aumentar os níveis de gDNA na amostra de soro primário (por exemplo, realizando o transporte da amostra à temperatura ambiente). O soro é mais amigável para a maioria dos métodos de extração de DNA em comparação ao sangue total, além disso tem menos conteúdo celular e proteico e menos inibidores de PCR conhecidos (EDTA e hemoglobina) podendo ser uma alternativa ao sangue total para ensaios moleculares.

Observou-se também que o soro cru (sem pré-tratamento) poderia ser usado diretamente como “template” para qPCR dispensando a extração de DNA. Geralmente, a extração de DNA é o passo mais laborioso no processo de genotipagem de SNPs. Assim, o uso de soro cru tornariam esses testes mais práticos. Além disso, a amostra do paciente é transferida para múltiplos tubos durante a extração do DNA. O uso de soro cru diretamente do tubo de coleta primário aumentaria a garantia de qualidade dos ensaios de genotipagem devido à menor chance de erros de pipetagem. Resumindo, as vantagens do uso direto da amostra primária em qPCR consistem na liberação de exames mais rapidamente por diminuir uma etapa do processo e garantir a rastreabilidade da amostra por se trabalhar diretamente com o tubo primário.

Apesar dessas vantagens, a amplificação do DNA genômico diretamente do soro é restrita pelo tamanho do “amplicon”. Apenas “amplicons” com menos de 101 pb puderam ser gerados consistentemente a partir de soro cru logo após a coagulação. Para o aumento significativo de DNA e uma amplificação consistente de “amplicons” maiores foi necessária uma incubação de quatro dias à temperatura ambiente. Em algumas situações, esse período poderia fazer com que o tempo de liberação do resultado do ensaio seja impraticável. Assim, um tamanho de “amplicon” pequeno (menor que 101 pb) é recomendado para qPCR direto do soro. Além disso, esses resultados reforçam a observação de que fragmentos de DNA com menos de 101 pb são mais prevalentes no soro em comparação com fragmentos de DNA de tamanhos maiores. Isso porque, provavelmente, o DNA no soro é clivado em tamanhos de fragmentos mononucleossômicos pelas DNAses do sangue (42), que estão ativas nesta espécie (28). Além disso, a apoptose dos glóbulos brancos no coágulo sanguíneo é o mecanismo provável responsável pelo enriquecimento do DNA no soro (43, 44). A apoptose libera DNA degradado (45, 46).

Em seguida, reduzimos os tamanhos de “amplicons” de alguns conjuntos de “primers” alelo-específicos para testar se mutações clinicamente relevantes poderiam ser genotipadas diretamente do soro cru. Os resultados observados com o uso de “amplicons” de tamanhos pequenos no soro estavam totalmente de acordo com os resultados observados usando “amplicons” de tamanhos regulares produzidos a partir do DNA extraído do sangue capilar. Para a separação do soro, utilizou-se uma centrífuga de papel de baixo custo, portátil e operada pela força das mãos. Essa centrífuga de papel atinge altas velocidades e pode ser utilizada para a separação do soro usando apenas a força humana (27). No entanto, foi necessário adaptá-la para tubos de 200 µL.

O soro separado do sangue capilar pela centrífuga de papel pode ser usado diretamente como “template” para qPCR simplificando a fase pré-analítica e eliminando a etapa de extração DNA. Esses atalhos no processo poderiam promover diagnóstico molecular por teste laboratorial remoto (“point of care”) e liberação de resultados com maior rapidez. Por exemplo, identificação dos portadores dos alelos ABCB1 3435, CYP2C19*2 e CYP2C19*17 na terapia de síndromes coronarianas agudas e ajustes na abordagem farmacológica adequada (25), especialmente em

cenários com poucos recursos. Além disso, abre oportunidades para aplicações em educação científica e trabalhos de campo.

Além da economia de tempo e de custo operacional, gerando maior acessibilidade da população, o uso do soro direto para genotipagem de polimorfismos possui relevância clínica, podendo ser útil na área de oncologia e esse potencial deve ser explorado. Nesse trabalho os polimorfismos escolhidos para genotipagem direta no soro apresentam associação clínica aplicável na área de oncologia (câncer colorretal) e otimização de resposta ao tratamento dos fármacos fluoruracila, leucovorina e oxaliplatina (31-35), podendo ser abordada na medicina preventiva e personalizada.

Em relação às limitações dos ensaios, a maioria das amostras foram processadas no mesmo dia, mas algumas não apresentaram resultado na primeira tentativa, necessitando de nova reação 24h após a coleta. No entanto, não é possível excluir se a não amplificação foi inerente ao método ou se está relacionada ao processo técnico (erro de pipetagem, por exemplo), já que as mesmas amostras apresentaram amplificação nos demais SNPs testados.

Por fim, o uso de “Sybr green” como corante de DNA para detecção dos produtos amplificados na genotipagem de SNPs determina que cada alelo seja avaliado em poços separados, não permitindo que os ensaios sejam realizados em um único poço (sistema multiplex). A vantagem de usar corantes de DNA nas reações de ARMS-qPCR em relação às sondas de fluorescência é devido ao menor custo. A principal desvantagem é a inespecificidade desses corantes de DNA, podendo gerar sinais de produtos inespecíficos nas reações (47). Para resolver essa questão e garantir a especificidade dos ensaios, foi realizado a curva de dissociação (curva de “melting”) no final de cada reação de qPCR desse estudo, sendo este um critério de controle de qualidade para que os genótipos pudessem ser atribuídos (ambas reações alelo-específicas devem gerar o mesmo “amplicon”).

6. CONCLUSÕES

- A quantidade de DNA genômico livre de células pode aumentar gradualmente no soro ao longo dos dias quando permanece em contato com o coágulo à temperatura ambiente favorecendo a amplificação da sequência alvo em questão.
- Fragmentos pequenos de DNA genômico livre de células são mais facilmente detectados no soro.
- O soro sem pré-tratamento pode ser usado como fonte de ácidos nucleicos alternativa ao DNA extraído do sangue para genotipagem de polimorfismos clinicamente relevantes por PCR, desde que a sequência do “amplicon” seja pequena (< 101 pb).
- A centrífuga de papel adaptada para esse estudo pode ser usada para separação do soro e essa espécie pode ser usada como “template” para qPCR simplificando a fase pré-analítica e eliminando as etapas de extração na genotipagem de SNPs.

7. REFERÊNCIAS

1. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers*. 2001;17(2):89-98.
2. Taylor JG, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. *Trends Mol Med*. 2001;7(11):507-12.
3. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM(R)), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D789-98.
4. Tsongalis GJ, Coleman WB. Clinical genotyping: the need for interrogation of single nucleotide polymorphisms and mutations in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*. 2006;363(1-2):127-37.
5. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet*. 2003;33(4):518-21.
6. Santos LS, Silva SN, Gil OM, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J. Mismatch repair single nucleotide polymorphisms and thyroid cancer susceptibility. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6715-26.
7. Cuzick J, Brentnall A, Dowsett M. SNPs for breast cancer risk assessment. *Oncotarget*. 2017;8(59):99211-2.
8. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer*. 2009;45(8):1333-51.
9. Plebani M. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *Clin Biochem Rev*. 2012;33(3):85-8.
10. Howanitz PJ. Errors in laboratory medicine: practical lessons to improve patient safety. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(10):1252-61.
11. Abe K. Direct PCR from serum: application to viral genome detection. *Methods Mol Biol*. 2003;226:161-6.
12. Barra GB, Santa Rita TH, Vasques JA, Chianca CF, Nery LF, Costa SS. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clinical biochemistry*. 2015.
13. Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Shirasaki Y, Kondoh K, et al. Various applications of direct PCR using blood samples. *Clinical laboratory*. 2002;48(7-8):377-84.
14. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113(5):1014-26.

15. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, Egensperger R, Schmid KW, Brockmeyer NH, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J Clin Lab Anal.* 2007;21(4):244-8.
16. Dye WE, Bull WF. Plasma levels of viomycin in man after single intramuscular injection. *Am J Clin Pathol.* 1953;23(1):56-9.
17. Kang K, Yang K, Zhong J, Tian Y, Zhang L, Zhai J, et al. A direct real-time polymerase chain reaction assay for rapid high-throughput detection of highly pathogenic North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China without RNA purification. *J Anim Sci Biotechnol.* 2014;5(1):45.
18. Ulvik A, Ueland PM. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real-time PCR: application to SNPs affecting homocysteine and folate metabolism. *Clin Chem.* 2001;47(11):2050-3.
19. Abu Al-Soud W, Radstrom P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4463-70.
20. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(5):e40.
21. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(3):1102-6.
22. Soejima T, Xiao JZ, Abe F. A novel mechanism for direct real-time polymerase chain reaction that does not require DNA isolation from prokaryotic cells. *Sci Rep.* 2016;6:28000.
23. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YM. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem.* 2005;51(4):781-4.
24. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion.* 2001;41(2):276-82.
25. Marziliano N, Notarangelo MF, Cereda M, Caporale V, Coppini L, Demola MA, et al. Rapid and portable, lab-on-chip, point-of-care genotyping for evaluating clopidogrel metabolism. *Clin Chim Acta.* 2015;451(Pt B):240-6.
26. Wirth F, Zahra G, Xuereb RG, Barbara C, Fenech A, Azzopardi LM. Comparison of a rapid point-of-care and two laboratory-based CYP2C19*2 genotyping assays for personalisation of antiplatelet therapy. *Int J Clin Pharm.* 2016;38(2):414-20.
27. Bhamla MS, Benson B, Chai C, Katsikis G, Johri A, Prakash M. Hand-powered ultralow-cost paper centrifuge. *Nature Biomedical Engineering* 2017;1.

28. Barra GB, Santa Rita TH, de Almeida Vasques J, Chianca CF, Nery LF, Santana Soares Costa S. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem.* 2015;48(15):976-81.
29. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2503-16.
30. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991;10(4):506-13.
31. Boige V, Mendiboure J, Pignon JP, Loriot MA, Castaing M, Barrois M, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2556-64.
32. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento JL, Francoual M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;69(1):58-66.
33. Giraldez MD, Lopez-Doriga A, Bujanda L, Abuli A, Bessa X, Fernandez-Rozadilla C, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2012;33(3):613-9.
34. Mates IN, Csiki I, Mates D, Constantinescu V, Badea P, Dinu D, et al. Association of common genetic variants with colorectal cancer risk in a Romanian sample. *Chirurgia (Bucur).* 2010;105(6):749-57.
35. He J, Wilkens LR, Stram DO, Kolonel LN, Henderson BE, Wu AH, et al. Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(1):70-81.
36. Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes TH, Schutten M. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn.* 2010;12(1):109-17.
37. Pruitt KD, Tatusova T, Brown GR, Maglott DR. NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D130-5.
38. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
39. Noguera DR, Wright ES, Camejo P, Yilmaz LS. Mathematical tools to optimize the design of oligonucleotide probes and primers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(23):9595-608.

40. Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, Ruangrit U, Chanprasert J, Assawamakin A, et al. WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*. 2007;8:275.
41. EP12-A2 User protocol for evaluation of qualitative test performance: approved guideline - Second edition, (2008).
42. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):108-16.
43. Angert RM, LeShane ES, Lo YM, Chan LY, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem*. 2003;49(1):195-8.
44. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-30.
45. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):12-8.
46. Matassov D, Kagan T, Leblanc J, Sikorska M, Zakeri Z. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. *Methods Mol Biol*. 2004;282:1-17.
47. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006;363(1-2):32-47.

APÊNDICE I – PREMIAÇÕES

- Selecionado para apresentação oral no 44º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas em João Pessoa-PB em junho de 2017. Contemplado com o Prêmio SBAC de melhor trabalho com vistas a melhoria técnica do Laboratório Clínico.
- Selecionado para apresentação oral no 69th AACCC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo da associação Americana de Química Clínica ocorrido na cidade de San Diego, Califórnia, nos Estados Unidos em Agosto de 2017. Contemplado com o prêmio da categoria estudante pela divisão de patologia molecular da entidade.
- Selecionado para apresentação oral no 51º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (51º CBPC/ML) em São Paulo em setembro de 2017.

APÊNDICE II – VALORES DE CQ E GENÓTIPOS ATRIBUÍDOS AOS VOLUNTÁRIOS PARA CADA SNP INCLUÍDO NO ESTUDO

Valores de Cq e genótipos atribuídos ao polimorfismo rs1801131 nos três métodos avaliados nesse estudo (continua na página 43)

Amostra	Método 1			Método 2			Método 3		
	Cq A	Cq C	Genótipo	Cq T	Cq G	Genótipo	Cq A	Cq C	Genótipo
1	<u>27,85</u>	34,15	AA	<u>26,81</u>	37,06	AA	<u>22,42</u>	29,68	AA
2	<u>30,23</u>	<u>29,63</u>	AC	<u>28,32</u>	<u>26,78</u>	AC	<u>23,76</u>	<u>23,63</u>	AC
3	43,52	<u>28,92</u>	CC	36,93	<u>25,45</u>	CC	35,19	<u>22,11</u>	CC
4	<u>28,75</u>	40,36	AA	<u>27,65</u>	38,32	AA	<u>22,68</u>	30,10	AA
5	26,36	36,26	AA	<u>27,88</u>	38,96	AA	<u>23,09</u>	30,75	AA
6	<u>28,55</u>	<u>29,23</u>	AC	<u>28,58</u>	<u>26,84</u>	AC	<u>23,84</u>	<u>23,77</u>	AC
7	<u>26,90</u>	<u>26,25</u>	AC	<u>28,48</u>	<u>26,73</u>	AC	<u>23,96</u>	<u>23,89</u>	AC
8	<u>27,73</u>	<u>26,85</u>	AC	<u>28,02</u>	<u>26,20</u>	AC	<u>23,54</u>	<u>23,31</u>	AC
9	<u>30,22</u>	<u>29,56</u>	AC	<u>28,50</u>	<u>26,84</u>	AC	<u>24,02</u>	<u>23,91</u>	AC
10	<u>26,36</u>	34,98	AA	<u>27,51</u>	33,81	AA	<u>22,83</u>	29,76	AA
11	<u>29,53</u>	<u>29,52</u>	AC	<u>29,10</u>	<u>27,79</u>	AC	<u>24,92</u>	<u>24,79</u>	AC
12	47,39	<u>28,67</u>	CC	36,06	<u>25,81</u>	CC	36,47	<u>22,85</u>	CC
13	<u>24,95</u>	33,45	AA	<u>27,81</u>	40,94	AA	<u>23,25</u>	30,66	AA
14	<u>29,58</u>	40,89	AA	<u>24,13</u>	38,04	AA	<u>22,98</u>	30,83	AA
15	<u>29,40</u>	35,33	AA	<u>25,07</u>	41,96	AA	<u>23,78</u>	31,27	AA
16	41,60	<u>28,35</u>	CC	37,06	<u>25,92</u>	CC	37,08	<u>23,05</u>	CC
17	<u>25,14</u>	33,36	AA	<u>27,14</u>	39,63	AA	<u>22,57</u>	30,19	AA
18	<u>25,95</u>	33,90	AA	<u>27,33</u>	37,01	AA	<u>22,66</u>	30,19	AA
19	<u>25,62</u>	33,88	AA	<u>24,31</u>	40,69	AA	<u>22,86</u>	30,45	AA
20	36,52	<u>27,49</u>	CC	37,61	<u>25,94</u>	CC	33,68	<u>22,51</u>	CC
21	<u>28,51</u>	<u>28,35</u>	AC	<u>28,31</u>	<u>26,55</u>	AC	<u>23,65</u>	<u>23,60</u>	AC
22	<u>27,60</u>	33,21	AA	<u>26,75</u>	36,90	AA	<u>22,05</u>	29,60	AA
23	<u>27,91</u>	34,73	AA	<u>27,85</u>	38,09	AA	<u>22,77</u>	30,47	AA
24	<u>28,14</u>	<u>27,91</u>	AC	<u>28,30</u>	<u>26,51</u>	AC	<u>23,60</u>	<u>23,61</u>	AC
25	<u>30,74</u>	<u>30,19</u>	AC	<u>28,59</u>	<u>26,71</u>	AC	<u>23,82</u>	<u>23,89</u>	AC
26	<u>28,26</u>	39,47	AA	<u>30,53</u>	37,90	AA	<u>24,72</u>	32,61	AA
27	<u>27,55</u>	37,68	AA	<u>27,60</u>	36,75	AA	<u>22,31</u>	30,02	AA
28	<u>27,65</u>	37,05	AA	<u>27,84</u>	38,26	AA	<u>23,33</u>	30,89	AA
29	<u>30,02</u>	<u>29,02</u>	AC	<u>28,54</u>	<u>26,64</u>	AC	<u>23,68</u>	<u>24,27</u>	AC
30	<u>30,21</u>	<u>30,25</u>	AC	<u>27,76</u>	<u>26,14</u>	AC	<u>22,90</u>	<u>22,85</u>	AC
31	<u>28,62</u>	<u>28,00</u>	AC	<u>24,72</u>	<u>26,99</u>	AC	<u>24,09</u>	<u>24,23</u>	AC
32	<u>30,23</u>	<u>29,59</u>	AC	<u>28,58</u>	<u>26,75</u>	AC	<u>23,68</u>	<u>23,64</u>	AC
33	<u>29,69</u>	35,29	AA	<u>28,30</u>	38,47	AA	<u>23,55</u>	31,01	AA
34	<u>26,32</u>	33,94	AA	<u>27,80</u>	37,78	AA	<u>23,20</u>	30,82	AA
35	43,46	<u>27,35</u>	CC	37,51	<u>25,89</u>	CC	35,90	<u>23,20</u>	CC
36	<u>27,69</u>	35,45	AA	<u>23,74</u>	36,42	AA	<u>22,52</u>	30,16	AA
37	<u>31,16</u>	40,28	AA	<u>24,49</u>	38,74	AA	<u>23,06</u>	30,72	AA
38	<u>27,95</u>	35,64	AA	<u>27,23</u>	38,23	AA	<u>22,47</u>	29,75	AA
39	40,60	<u>24,62</u>	CC	37,06	<u>25,70</u>	CC	35,87	<u>22,93</u>	CC

40	<u>28,59</u>	<u>28,01</u>	AC	<u>28,82</u>	<u>27,02</u>	AC	<u>23,98</u>	<u>23,92</u>	AC
41	<u>30,83</u>	<u>30,28</u>	AC	<u>28,01</u>	<u>26,55</u>	AC	<u>23,43</u>	<u>23,69</u>	AC
42	<u>28,19</u>	36,9	AA	<u>27,94</u>	36,95	AA	<u>22,88</u>	30,60	AA
43	37,67	<u>27,08</u>	CC	36,24	<u>25,44</u>	CC	35,22	<u>22,14</u>	CC
44	<u>26,53</u>	32,78	AA	<u>27,79</u>	36,67	AA	<u>23,11</u>	30,47	AA
45	<u>27,68</u>	<u>26,74</u>	AC	<u>29,50</u>	<u>27,47</u>	AC	<u>24,59</u>	<u>24,58</u>	AC
46	<u>27,78</u>	39,29	AA	<u>27,56</u>	36,52	AA	<u>22,63</u>	30,35	AA
47	<u>28,45</u>	37,93	AA	<u>28,58</u>	39,64	AA	<u>22,89</u>	30,52	AA
48	41,71	<u>28,31</u>	CC	37,66	<u>25,99</u>	CC	37,20	<u>22,93</u>	CC
49	39,44	<u>26,81</u>	CC	39,17	<u>27,48</u>	CC	37,95	<u>23,64</u>	CC
50	<u>27,90</u>	<u>27,73</u>	AC	<u>23,78</u>	<u>26,25</u>	AC	<u>23,01</u>	<u>23,06</u>	AC
51	<u>28,99</u>	38,75	AA	<u>27,26</u>	38,32	AA	<u>22,47</u>	30,10	AA
52	<u>28,93</u>	<u>28,55</u>	AC	<u>26,00</u>	<u>29,35</u>	AC	<u>24,66</u>	<u>28,95</u>	AC
53	<u>28,18</u>	<u>27,98</u>	AC	<u>28,65</u>	<u>26,95</u>	AC	<u>23,78</u>	<u>23,63</u>	AC
54	<u>29,17</u>	34,39	AA	<u>28,06</u>	38,26	AA	<u>22,97</u>	30,42	AA

Valores de Cq e genótipos atribuídos ao polimorfismo rs4939827 nos três métodos avaliados nesse estudo (continua na página 44)

Amostra	Método 1			Método 2			Método 3		
	Cq C	Cq T	Genótipo	Cq G	Cq A	Genótipo	Cq C	Cq T	Genótipo
1	<u>27,99</u>	<u>28,79</u>	CT	<u>23,35</u>	<u>23,39</u>	CT	<u>23,44</u>	<u>23,20</u>	CT
2	<u>28,34</u>	36,32	CC	<u>22,90</u>	35,77	CC	<u>22,22</u>	29,53	CC
3	<u>28,71</u>	36,88	CC	<u>22,82</u>	35,87	CC	<u>22,19</u>	29,44	CC
4	<u>29,09</u>	<u>29,36</u>	CT	<u>24,18</u>	<u>24,10</u>	CT	<u>23,24</u>	<u>23,39</u>	CT
5	32,96	<u>26,09</u>	TT	33,84	<u>23,26</u>	TT	30,68	<u>22,97</u>	TT
6	<u>27,25</u>	35,69	CC	<u>23,06</u>	35,88	CC	<u>22,22</u>	29,85	CC
7	<u>26,53</u>	<u>26,37</u>	CT	<u>24,18</u>	<u>23,99</u>	CT	<u>23,62</u>	<u>23,85</u>	CT
8	<u>27,24</u>	<u>27,48</u>	CT	<u>23,79</u>	<u>23,61</u>	CT	<u>23,10</u>	<u>22,75</u>	CT
9	<u>28,77</u>	34,93	CC	<u>23,38</u>	37,71	CC	<u>22,41</u>	29,83	CC
10	<u>25,80</u>	33,11	CC	<u>23,22</u>	41,34	CC	<u>22,38</u>	29,62	CC
11	37,79	<u>27,08</u>	TT	33,37	<u>23,88</u>	TT	31,26	<u>23,13</u>	TT
12	33,94	<u>29,45</u>	TT	32,74	<u>22,97</u>	TT	30,77	<u>22,23</u>	TT
13	<u>24,84</u>	32,75	CC	<u>23,83</u>	35,92	CC	<u>23,05</u>	30,58	CC
14	35,40	<u>29,27</u>	TT	31,82	<u>23,33</u>	TT	30,35	<u>22,41</u>	TT
15	<u>28,94</u>	36,93	CC	<u>24,66</u>	46,24	CC	<u>22,93</u>	30,32	CC
16	<u>28,32</u>	37,43	CC	<u>23,60</u>	36,81	CC	<u>22,48</u>	29,64	CC
17	<u>24,84</u>	32,67	CC	<u>23,47</u>	37,43	CC	<u>22,16</u>	29,80	CC
18	31,89	<u>25,68</u>	TT	31,98	<u>23,30</u>	TT	29,97	<u>22,12</u>	TT
19	<u>26,04</u>	34,08	CC	<u>23,46</u>	35,90	CC	<u>22,00</u>	30,04	CC
20	<u>27,26</u>	35,15	CC	<u>23,71</u>	34,13	CC	<u>22,61</u>	29,28	CC
21	33,96	<u>28,01</u>	TT	30,86	<u>22,98</u>	TT	29,75	<u>22,40</u>	TT
22	<u>29,16</u>	<u>29,47</u>	CT	<u>23,64</u>	<u>24,09</u>	CT	<u>22,76</u>	<u>22,75</u>	CT
23	<u>32,08</u>	<u>29,92</u>	CT	<u>33,48</u>	<u>23,65</u>	CT	<u>29,94</u>	<u>21,16</u>	CT
24	<u>28,77</u>	<u>28,82</u>	CT	<u>24,29</u>	<u>24,23</u>	CT	<u>23,29</u>	<u>22,29</u>	CT

25	<u>30,63</u>	<u>31,63</u>	CT	<u>24,19</u>	<u>24,46</u>	CT	<u>23,26</u>	<u>23,23</u>	CT
26	35,91	<u>27,80</u>	TT	34,31	<u>25,64</u>	TT	32,77	<u>24,56</u>	TT
27	35,53	<u>26,93</u>	TT	32,52	<u>23,14</u>	TT	30,62	<u>22,09</u>	TT
28	<u>30,03</u>	<u>29,55</u>	CT	<u>24,57</u>	<u>24,60</u>	CT	<u>23,94</u>	<u>23,98</u>	CT
29	<u>30,54</u>	<u>29,38</u>	CT	<u>24,49</u>	<u>24,94</u>	CT	<u>23,10</u>	<u>23,21</u>	CT
30	40,03	<u>29,03</u>	TT	31,38	<u>22,46</u>	TT	29,35	<u>21,50</u>	TT
31	<u>29,38</u>	<u>29,46</u>	CT	<u>24,33</u>	<u>24,39</u>	CT	<u>23,51</u>	<u>23,37</u>	CT
32	<u>30,51</u>	<u>30,60</u>	CT	<u>24,16</u>	<u>24,10</u>	CT	<u>23,43</u>	<u>23,51</u>	CT
33	<u>29,03</u>	35,83	CC	<u>23,85</u>	37,57	CC	<u>23,38</u>	30,91	CC
34	33,39	<u>27,32</u>	TT	31,73	<u>23,18</u>	TT	30,16	<u>22,20</u>	TT
35	<u>30,69</u>	<u>30,22</u>	CT	<u>24,25</u>	<u>24,17</u>	CT	<u>23,59</u>	<u>23,32</u>	CT
36	<u>27,13</u>	33,97	CC	<u>22,50</u>	35,20	CC	<u>21,93</u>	29,07	CC
37	34,85	<u>31,20</u>	TT	31,52	<u>23,92</u>	TT	31,10	<u>23,35</u>	TT
38	34,09	<u>27,69</u>	TT	30,70	<u>22,59</u>	TT	30,01	<u>21,78</u>	TT
39	<u>24,84</u>	32,46	CC	<u>23,13</u>	38,83	CC	<u>22,13</u>	29,62	CC
40	<u>28,09</u>	<u>28,38</u>	CT	<u>24,10</u>	<u>24,13</u>	CT	<u>23,44</u>	<u>23,27</u>	CT
41	<u>30,14</u>	<u>30,85</u>	CT	<u>23,60</u>	<u>24,12</u>	CT	<u>23,15</u>	<u>22,78</u>	CT
42	<u>28,18</u>	36,69	CC	<u>23,35</u>	37,18	CC	<u>22,67</u>	30,14	CC
43	<u>27,18</u>	33,42	CC	<u>22,16</u>	33,97	CC	<u>21,84</u>	29,23	CC
44	<u>26,02</u>	33,85	CC	<u>22,83</u>	37,65	CC	<u>22,73</u>	29,74	CC
45	<u>27,36</u>	<u>27,24</u>	CT	<u>24,50</u>	<u>24,63</u>	CT	<u>24,07</u>	<u>24,06</u>	CT
46	35,66	<u>27,37</u>	TT	30,73	<u>22,60</u>	TT	29,68	<u>21,74</u>	TT
47	<u>27,52</u>	36,64	CC	<u>22,67</u>	35,98	CC	<u>21,83</u>	29,43	CC
48	<u>29,38</u>	<u>29,30</u>	CT	<u>24,05</u>	<u>23,89</u>	CT	<u>22,99</u>	<u>23,23</u>	CT
49	<u>27,99</u>	33,93	CC	<u>24,34</u>	40,18	CC	<u>24,30</u>	31,55	CC
50	<u>27,71</u>	<u>27,93</u>	CT	<u>23,12</u>	<u>23,29</u>	CT	<u>22,23</u>	<u>22,52</u>	CT
51	<u>28,88</u>	<u>29,25</u>	CT	<u>23,33</u>	<u>24,20</u>	CT	<u>22,55</u>	<u>22,82</u>	CT
52	<u>28,67</u>	<u>28,90</u>	CT	<u>28,31</u>	<u>28,22</u>	CT	<u>27,87</u>	<u>28,07</u>	CT
53	<u>28,51</u>	<u>28,0</u>	CT	<u>23,77</u>	<u>23,79</u>	CT	<u>22,68</u>	<u>22,10</u>	CT
54	34,07	<u>28,35</u>	TT	29,76	<u>23,17</u>	TT	30,78	<u>22,40</u>	TT

Valores de Cq e genótipos atribuídos ao polimorfismo rs4779584 nos três métodos avaliados nesse estudo (continua na página 45)

Amostra	Método 1			Método 2			Método 3		
	Cq G	Cq A	Genótipo	Cq C	Cq T	Genótipo	Cq G	Cq A	Genótipo
1	<u>27,84</u>	30,37	GG	<u>19,87</u>	25,76	GG	<u>22,08</u>	35,27	GG
2	<u>28,72</u>	33,67	GG	<u>20,60</u>	26,67	GG	<u>23,42</u>	36,13	GG
3	<u>30,33</u>	<u>30,63</u>	GA	<u>20,87</u>	<u>21,25</u>	GA	<u>23,73</u>	<u>23,45</u>	GA
4	<u>28,70</u>	33,69	GG	<u>20,60</u>	26,18	GG	<u>22,90</u>	36,17	GG
5	<u>27,03</u>	<u>27,34</u>	GA	<u>21,59</u>	<u>21,86</u>	GA	<u>24,39</u>	<u>24,70</u>	GA
6	<u>27,22</u>	30,76	GG	<u>20,49</u>	25,99	GG	<u>22,90</u>	36,11	GG
7	<u>25,80</u>	28,98	GG	<u>20,48</u>	26,08	GG	<u>22,94</u>	36,78	GG
8	32,34	<u>27,18</u>	AA	21,83	<u>19,99</u>	AA	30,66	<u>21,94</u>	AA

9	33,38	<u>29,11</u>	AA	22,48	<u>20,64</u>	AA	31,54	<u>22,83</u>	AA
10	<u>25,59</u>	31,40	GG	<u>20,63</u>	26,48	GG	<u>23,24</u>	35,57	GG
11	35,13	<u>29,30</u>	AA	23,27	<u>21,60</u>	AA	32,81	<u>23,79</u>	AA
12	<u>29,74</u>	31,88	GG	<u>20,53</u>	26,25	GG	<u>23,33</u>	35,97	GG
13	<u>25,95</u>	<u>26,15</u>	GA	<u>21,98</u>	<u>22,17</u>	GA	<u>24,42</u>	<u>24,36</u>	GA
14	<u>29,18</u>	33,05	GG	<u>20,29</u>	26,17	GG	<u>23,51</u>	37,25	GG
15	<u>30,38</u>	<u>29,92</u>	GA	<u>21,85</u>	<u>22,41</u>	GA	<u>24,89</u>	<u>24,72</u>	GA
16	<u>28,60</u>	33,94	GG	<u>20,52</u>	26,33	GG	<u>23,00</u>	38,00	GG
17	<u>26,22</u>	29,22	GG	<u>20,21</u>	25,88	GG	<u>22,56</u>	36,99	GG
18	<u>25,54</u>	29,73	GG	<u>20,44</u>	26,36	GG	<u>22,87</u>	35,80	GG
19	<u>26,44</u>	30,09	GG	<u>20,37</u>	26,21	GG	<u>22,88</u>	36,43	GG
20	<u>29,27</u>	<u>29,37</u>	GA	<u>21,40</u>	<u>21,60</u>	GA	<u>26,05</u>	<u>24,61</u>	GA
21	<u>25,97</u>	31,26	GG	<u>20,42</u>	25,92	GG	<u>22,44</u>	36,95	GG
22	<u>26,83</u>	31,70	GG	<u>19,85</u>	25,36	GG	<u>22,23</u>	36,64	GG
23	<u>27,57</u>	31,98	GG	<u>20,80</u>	26,34	GG	<u>22,99</u>	48,19	GG
24	<u>27,10</u>	31,99	GG	<u>20,52</u>	25,85	GG	<u>22,49</u>	36,15	GG
25	<u>29,99</u>	<u>29,76</u>	GA	<u>21,44</u>	<u>21,51</u>	GA	<u>23,82</u>	<u>23,32</u>	GA
26	<u>29,25</u>	<u>29,10</u>	GA	<u>23,13</u>	<u>23,42</u>	GA	<u>25,45</u>	<u>24,94</u>	GA
27	<u>28,23</u>	<u>28,41</u>	GA	<u>21,54</u>	<u>21,58</u>	GA	<u>23,53</u>	<u>23,14</u>	GA
28	<u>28,99</u>	<u>29,22</u>	GA	<u>21,74</u>	<u>21,99</u>	GA	<u>24,47</u>	<u>24,56</u>	GA
29	<u>29,68</u>	<u>30,50</u>	GA	<u>21,32</u>	<u>21,74</u>	GA	<u>23,96</u>	<u>23,73</u>	GA
30	<u>29,25</u>	34,68	GG	<u>19,95</u>	25,66	GG	<u>21,79</u>	37,51	GG
31	<u>28,80</u>	<u>28,94</u>	GA	<u>21,59</u>	<u>21,84</u>	GA	<u>24,05</u>	<u>23,45</u>	GA
32	<u>29,77</u>	<u>30,49</u>	GA	<u>21,40</u>	<u>21,73</u>	GA	<u>23,68</u>	<u>23,04</u>	GA
33	<u>28,42</u>	<u>28,52</u>	GA	<u>22,22</u>	<u>22,69</u>	GA	<u>25,27</u>	<u>24,37</u>	GA
34	<u>28,81</u>	<u>28,66</u>	GA	<u>21,73</u>	<u>21,91</u>	GA	<u>23,87</u>	<u>23,91</u>	GA
35	<u>31,10</u>	<u>30,92</u>	GA	<u>21,60</u>	<u>21,80</u>	GA	<u>24,06</u>	<u>23,52</u>	GA
36	<u>28,25</u>	33,99	GG	<u>20,20</u>	25,94	GG	<u>22,34</u>	37,72	GG
37	<u>31,40</u>	<u>32,03</u>	GA	<u>21,96</u>	<u>22,31</u>	GA	<u>24,37</u>	<u>24,37</u>	GA
38	<u>28,54</u>	<u>28,69</u>	GA	<u>21,19</u>	<u>21,51</u>	GA	<u>23,61</u>	<u>23,06</u>	GA
39	<u>25,60</u>	30,96	GG	<u>20,68</u>	27,08	GG	<u>22,88</u>	36,59	GG
40	<u>27,76</u>	32,25	GG	<u>20,87</u>	27,08	GG	<u>23,40</u>	37,15	GG
41	<u>30,94</u>	<u>31,13</u>	GA	<u>21,28</u>	<u>21,60</u>	GA	<u>23,27</u>	<u>23,26</u>	GA
42	<u>28,18</u>	34,51	GG	<u>21,01</u>	26,98	GG	<u>23,05</u>	37,57	GG
43	<u>27,57</u>	30,87	GG	<u>19,67</u>	26,70	GG	<u>22,17</u>	34,94	GG
44	<u>26,44</u>	30,41	GG	<u>20,87</u>	26,38	GG	<u>23,29</u>	36,00	GG
45	<u>28,08</u>	<u>28,29</u>	GA	<u>22,24</u>	<u>22,52</u>	GA	<u>24,78</u>	<u>24,09</u>	GA
46	<u>29,42</u>	<u>28,94</u>	GA	<u>21,45</u>	<u>21,78</u>	GA	<u>23,73</u>	<u>22,90</u>	GA
47	<u>28,51</u>	33,00	GG	<u>20,93</u>	26,49	GG	<u>22,44</u>	35,55	GG
48	<u>29,89</u>	<u>30,36</u>	GA	<u>22,15</u>	<u>22,25</u>	GA	<u>23,30</u>	<u>23,08</u>	GA
49	<u>28,18</u>	31,99	GG	<u>22,18</u>	27,92	GG	<u>24,15</u>	36,96	GG
50	<u>27,09</u>	31,75	GG	<u>20,38</u>	25,93	GG	<u>21,63</u>	34,70	GG
51	<u>28,29</u>	33,03	GG	<u>20,74</u>	26,28	GG	<u>21,99</u>	36,23	GG
52	33,42	<u>28,19</u>	AA	25,89	<u>23,52</u>	AA	34,16	<u>25,53</u>	AA
53	<u>27,28</u>	32,68	GG	<u>20,98</u>	26,71	GG	<u>22,69</u>	35,32	GG
54	<u>29,50</u>	<u>29,39</u>	GA	<u>21,88</u>	<u>21,92</u>	GA	<u>23,60</u>	<u>22,91</u>	GA

Valores de Cq e genótipos atribuídos ao polimorfismo rs3802842 nos três métodos avaliados nesse estudo (continua na página 47)

Amostra	Método 1			Método 2			Método 3		
	Cq T	Cq G	Genótipo	Cq A	Cq C	Genótipo	Cq T	Cq G	Genótipo
1	<u>29,51</u>	<u>29,38</u>	TG	<u>23,24</u>	<u>23,04</u>	TG	<u>20,7</u>	<u>20,82</u>	TG
2	<u>29,98</u>	35,12	TT	<u>22,97</u>	28,63	TT	<u>20,45</u>	32,01	TT
3	<u>30,87</u>	<u>31,65</u>	TG	<u>23,15</u>	<u>23,49</u>	TG	<u>21,29</u>	<u>21,33</u>	TG
4	<u>29,76</u>	33,94	TT	<u>22,74</u>	28,48	TT	<u>20,72</u>	32,92	TT
5	<u>28,28</u>	<u>28,15</u>	TG	<u>24,19</u>	<u>24,34</u>	TG	<u>21,65</u>	<u>21,77</u>	TG
6	<u>28,57</u>	<u>28,97</u>	TG	<u>23,89</u>	<u>23,85</u>	TG	<u>21,54</u>	<u>21,53</u>	TG
7	<u>27,81</u>	<u>27,64</u>	TG	<u>23,95</u>	<u>23,82</u>	TG	<u>21,63</u>	<u>21,99</u>	TG
8	<u>27,74</u>	29,86	TT	<u>22,34</u>	27,89	TT	<u>19,90</u>	33,66	TT
9	<u>29,81</u>	32,78	TT	<u>22,82</u>	28,47	TT	<u>20,69</u>	32,45	TT
10	<u>28,33</u>	<u>28,02</u>	TG	<u>23,87</u>	<u>23,77</u>	TG	<u>21,61</u>	<u>21,83</u>	TG
11	<u>30,49</u>	<u>30,16</u>	TG	<u>24,75</u>	<u>24,72</u>	TG	<u>22,77</u>	<u>22,73</u>	TG
12	<u>30,75</u>	<u>30,30</u>	TG	<u>23,81</u>	<u>23,83</u>	TG	<u>21,82</u>	<u>21,78</u>	TG
13	<u>25,94</u>	<u>25,83</u>	TG	<u>24,06</u>	<u>24,18</u>	TG	<u>22,07</u>	<u>21,90</u>	TG
14	<u>29,82</u>	<u>30,60</u>	TG	<u>24,00</u>	<u>24,01</u>	TG	<u>21,47</u>	<u>21,45</u>	TG
15	<u>29,91</u>	<u>30,15</u>	TG	<u>25,03</u>	<u>25,05</u>	TG	<u>22,70</u>	<u>22,68</u>	TG
16	<u>29,41</u>	32,35	TT	<u>22,96</u>	28,71	TT	<u>20,75</u>	32,99	TT
17	<u>25,85</u>	30,18	TT	<u>22,66</u>	28,22	TT	<u>19,95</u>	33,01	TT
18	<u>25,91</u>	29,45	TT	<u>22,67</u>	28,27	TT	<u>20,32</u>	32,71	TT
19	<u>24,86</u>	31,63	TT	<u>22,81</u>	28,56	TT	<u>20,22</u>	32,85	TT
20	<u>27,90</u>	31,54	TT	<u>22,98</u>	28,69	TT	<u>20,85</u>	33,01	TT
21	<u>27,43</u>	32,30	TT	<u>22,74</u>	28,63	TT	<u>20,40</u>	31,98	TT
22	<u>27,25</u>	31,64	TT	<u>22,09</u>	27,82	TT	<u>20,16</u>	31,90	TT
23	<u>27,89</u>	35,59	TT	<u>23,03</u>	28,51	TT	<u>20,91</u>	33,39	TT
24	<u>28,57</u>	<u>28,26</u>	TG	<u>23,25</u>	<u>23,60</u>	TG	<u>21,66</u>	<u>21,34</u>	TG
25	<u>29,96</u>	<u>29,85</u>	TG	<u>23,84</u>	<u>23,84</u>	TG	<u>21,80</u>	<u>21,73</u>	TG
26	<u>30,97</u>	36,40	TT	<u>24,56</u>	30,96	TT	<u>23,00</u>	35,36	TT
27	<u>30,05</u>	35,32	TT	<u>22,57</u>	28,03	TT	<u>20,67</u>	32,23	TT
28	<u>30,99</u>	35,96	TT	<u>23,26</u>	28,97	TT	<u>21,36</u>	33,81	TT
29	<u>32,30</u>	<u>31,95</u>	TG	<u>23,89</u>	<u>23,84</u>	TG	<u>21,77</u>	<u>22,09</u>	TG
30	<u>32,04</u>	37,13	TT	<u>21,80</u>	27,91	TT	<u>19,96</u>	32,50	TT
31	31,76	<u>27,51</u>	GG	34,47	<u>23,21</u>	GG	29,18	<u>21,26</u>	GG
32	<u>29,43</u>	<u>29,42</u>	TG	<u>23,73</u>	<u>23,65</u>	TG	<u>21,63</u>	<u>21,93</u>	TG
33	<u>28,35</u>	33,71	TT	<u>23,70</u>	29,53	TT	<u>21,69</u>	35,76	TT
34	<u>26,88</u>	31,59	TT	<u>23,34</u>	28,82	TT	<u>20,87</u>	33,42	TT
35	<u>30,97</u>	<u>29,98</u>	TG	<u>24,03</u>	<u>24,27</u>	TG	<u>21,92</u>	<u>21,80</u>	TG
36	<u>28,88</u>	<u>28,72</u>	TG	<u>23,51</u>	<u>23,43</u>	TG	<u>21,39</u>	<u>21,12</u>	TG
37	<u>31,53</u>	33,72	TT	<u>23,08</u>	28,82	TT	<u>22,92</u>	35,92	TT
38	<u>27,57</u>	31,35	TT	<u>22,61</u>	28,21	TT	<u>20,65</u>	32,49	TT
39	<u>25,85</u>	31,16	TT	<u>22,86</u>	28,48	TT	<u>20,60</u>	33,79	TT
40	<u>27,46</u>	34,45	TT	<u>22,90</u>	28,49	TT	<u>21,26</u>	33,07	TT

41	<u>29,55</u>	36,48	TT	<u>22,57</u>	28,08	TT	<u>20,67</u>	33,27	TT
42	32,59	<u>28,19</u>	GG	39,00	<u>22,87</u>	GG	29,13	<u>21,19</u>	GG
43	<u>26,36</u>	31,00	TT	<u>22,43</u>	28,10	TT	<u>20,15</u>	32,43	TT
44	<u>28,29</u>	<u>27,32</u>	TG	<u>23,88</u>	<u>23,90</u>	TG	<u>21,85</u>	<u>21,82</u>	TG
45	<u>28,11</u>	<u>27,60</u>	TG	<u>24,74</u>	<u>24,74</u>	TG	<u>22,45</u>	<u>22,44</u>	TG
46	<u>27,65</u>	33,25	TT	<u>22,60</u>	28,34	TT	<u>20,79</u>	32,94	TT
47	<u>29,38</u>	35,54	TT	<u>22,73</u>	28,73	TT	<u>20,95</u>	33,71	TT
48	<u>28,28</u>	32,34	TT	<u>22,81</u>	28,74	TT	<u>21,40</u>	33,84	TT
49	<u>28,02</u>	34,58	TT	<u>23,45</u>	29,6	TT	<u>22,00</u>	35,34	TT
50	<u>26,95</u>	32,81	TT	<u>21,95</u>	28,00	TT	<u>20,21</u>	32,97	TT
51	<u>28,85</u>	32,99	TT	<u>22,52</u>	28,32	TT	<u>21,34</u>	33,67	TT
52	<u>28,07</u>	32,76	TT	<u>23,84</u>	30,20	TT	<u>27,89</u>	41,44	TT
53	<u>27,30</u>	32,26	TT	<u>22,61</u>	28,49	TT	<u>20,81</u>	33,89	TT
54	<u>28,88</u>	31,57	TT	<u>22,85</u>	28,81	TT	<u>21,46</u>	33,19	TT

ANEXO I – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de mutações clinicamente relevantes por PCR direta do soro

Pesquisador: Gustavo Barcelos Barra

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 50111515.0.0000.5667

Instituição Proponente: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.375.470

Apresentação do Projeto:

Detecção de mutações clinicamente relevantes por PCR direta do soro

Objetivo da Pesquisa:

Detecção de mutações clinicamente relevantes por PCR direta do soro.
Objetivo claro e bem definido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Satisfatória.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa satisfatório e de acordo com a Resolução 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos satisfatórios.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Satisfatório.

Endereço: Av. L2 Sul Quadra: 807 Módulo: G

Bairro: ASA SUL

CEP: 70.200-670

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3442-4136

E-mail: cephob@hobr.com.br

ANEXO I – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_589932.pdf	15/09/2015 18:41:12		Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_assistente.pdf	15/09/2015 18:40:14	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Pesquisador_principal.pdf	15/09/2015 18:39:37	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração do Patrocinador	Concordancia_soro.pdf	15/09/2015 18:24:35	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade_soro.pdf	15/09/2015 18:23:23	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_soro_v2.docx	15/09/2015 18:22:38	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Soro_v1.pdf	15/09/2015 18:21:23	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_soro_assinada.pdf	15/09/2015 18:17:57	Gustavo Barcelos Barra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 18 de Dezembro de 2015

Assinado por:
DALVANI BATISTA TELES DA SILVA
(Coordenador)

Endereço: Av. L2 Sul Quadra: 307 Módulo: G
Bairro: ASA SUL CEP: 70.200-670
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3442-4136 E-mail: cephob@hobr.com.br