

ISSN (impresso) 1984-235X
ISSN (*on line*) 1984-2368

Boletim do Instituto Adolfo Lutz

Bol Inst Adolfo Lutz. 2017: ano 27, número único



Boletim do
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Bol Inst Adolfo Lutz. 2017: ano 27, número único

Diretor-Geral do Instituto Adolfo Lutz

Dr. Helio Hehl Caiaffa Filho

Coordenadora

Maria Anita Scorsafava

Membros do Corpo Editorial

Cristina Takami Kanamura

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar

Pedro Luiz Silva Pinto

Sergio Dovidauskas

Marcia de Souza Carvalho Melhem

Diagramação

Claudia Cristiane de Araujo

Editoração

Pedro Luiz Silva Pinto

Claudia Cristiane de Araujo

Núcleo de Acervo do IAL

Rocely A. Bueno Moita

ISSN (impresso) 1984-235X

ISSN (*on line*) 1984-2368

Carta ao Editor

Avenida Dr. Arnaldo, 355

Cerqueira César – CEP 01246-000

E-mail:

bial@ial.sp.gov.br

bia@saude.gov.br

São Paulo, SP – Brasil

Telefone: (0XX11) 3068-2869

Núcleo de Acervo

Sumário

- 01** Métodos alternativos para avaliar a concentração de Hemoglobina livre no plasma
- 02** Enzimas em biologia molecular. II. Sequenciamento genômico pelo método de Sanger: T7 DNA polimerase, Sequenase e Termo Sequenase
- 03** Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9
- 04** Programa estadual de monitoramento da água tratada para diálise: capacitação de equipes técnicas

Métodos alternativos para avaliar a concentração de Hemoglobina livre no plasma

Jéssica Abatzoglou MAGNO¹, Karen MIGUITA¹, Marilena OSHIRO¹

¹Centro de Patologia-Núcleo de Hematologia e Bioquímica - Instituto Adolfo Lutz

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular presente nas hemácias cuja principal função é absorver, transportar e liberar oxigênio aos tecidos¹. A concentração de hemoglobina é um dos principais parâmetros para definir se um indivíduo é portador de anemia. Porém, quando esta proteína se encontra livre em amostras de soro ou plasma pode ser um fator interferente nas dosagens bioquímicas.

Avaliar a concentração de Hb presente numa amostra de soro ou plasma através, apenas, da inspeção visual é difícil, principalmente nas concentrações próximas de 0,6g/L, consideradas o limite máximo de aceitabilidade para alguns analitos bioquímicos. Por isso, em alguns casos são necessários dosar a sua concentração para decidir na rejeição ou não da amostra.

A dosagem de hemoglobina pode ser realizada por métodos manuais utilizando espectrofotômetro ou por automação em contadores hematológicos. O método mais comumente utilizado para a dosagem de hemoglobina é o cianometemoglobina, que tem como princípio, a oxidação do íon ferroso da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina pelo ferrocianeto, formando a metemoglobina. Esta Hb oxidada combina-se com o cianeto de potássio e produz a cianometemoglobina que é medida colorimetricamente².

Apesar de fácil execução, este utiliza o cianeto de potássio, altamente tóxico, que por si só, justifica na busca de metodologias menos tóxicas e menos agressivas ao meio ambiente. Desta forma, testamos outros métodos para dosar a hemoglobina como

uma alternativa ao método da cianometemoglobina, porém ajustada para ser utilizada em amostras de plasma contendo hemólise.

Foram avaliadas 22 amostras de plasma com concentrações diferentes de hemoglobina que foram analisadas por 4 diferentes métodos para a dosagem da concentração de hemoglobina: Diluição em NaCl, por cianometemoglobina, Diluição em água bi-destilada e dosagem em contador hematológico. Em todos foram realizados ensaios em triplicata, para aumentar a confiança no resultado.

Diluição em NaCl 0,9 %

Cada amostra foi diluída na solução de NaCl 0,9 % na seguinte proporção: 25 µL da amostra para 1 mL de solução. Foram homogeneizados por inversão. Em seguida, foram obtidos os valores das absorbâncias no comprimento de onda em 540 nm, utilizando NaCl 0,9 % como branco. Os valores obtidos nas leituras foram multiplicados pelo fator 3,9 para obtenção do resultado final.

Diluição em Drabkin (método da cianometemoglobina)

Foram pipetados 50 µL de amostra em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução de Drabkin (ferricanteto de potássio, cianeto de potássio e água destilada). O conteúdo foi homogeneizado com o uso da pipeta. Aguardou-se por 5 minutos antes da leitura das amostras no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm, utilizando Drabkin como branco. Os valores obtidos nas leituras foram multiplicados pelo fator 35 para obtenção do resultado final.

Diluição em água bi-destilada

Cada amostra foi diluída na água na seguinte proporção: 50 µL da amostra para 950 µL de água bi-destilada. Foram homogeneizados por inversão. Em seguida, foram obtidos os valores das absorbâncias nos seguintes comprimentos de onda: 370, 415, 510, 577 e 600 nm, utilizando água como branco.

Cálculo:

Se a Abs em 415 for < 1,5:

$$A = \text{Abs } 510 + (\text{Abs } 370 - \text{Abs } 510) \times 0,68$$

$$B = \text{Abs } 415 - A$$

$$Hb = (B/113,22 \times 16125 \times 20/10000)$$

Se a Abs em 415 for > 1,5 :

$$A = \text{Abs } 600 + (\text{Abs } 510 - \text{Abs } 600) \times 0,26$$

$$B = \text{Abs } 577 - A$$

$$Hb = (B/13,64 \times 16125 \times 20/10000)$$

Dosagem em contador hematológico automático:

A dosagem das amostras foi realizada em triplicata no contador hematológico KX-21N da Sysmex. As médias dos resultados das triplicatas obtidas nos quatro métodos estão dispostas na **Tabela 1** e análise do Teste de Tukey na **Tabela 2**.

Tabela 1. Média dos resultados das 22 amostras nos quatro métodos utilizados para dosagem da concentração de hemoglobina (g/dL) em plasma

Amostras	Analizador Hematológico	Drabkin	NaCl	H2O
1	2,3	2,28	2,34	2,31
2	2,2	2,21	2,22	2,26
3	1,9	1,93	1,99	1,98
4	1,8	1,88	1,88	1,84
5	1,7	1,68	1,59	1,76
6	1,5	1,55	1,52	1,63
7	1,5	1,46	1,44	1,59
8	1,4	1,40	1,34	1,47
9	1,3	1,36	1,29	1,57
10	1,2	1,23	1,28	1,23
11	1,2	1,23	1,16	1,26
12	1,0	1,13	1,13	1,05
13	1,0	1,00	1,04	1,03
14	0,9	0,93	0,93	0,91
15	0,8	0,85	0,91	0,88
16	0,7	0,74	0,79	0,76
17	0,6	0,59	0,63	0,59
18	0,4	0,47	0,49	0,45
19	0,3	0,34	0,32	0,29
20	0,2	0,24	0,25	0,25
21	0,0	0,07	0,09	0,05
22	0,0	0,08	0,09	0,05

Tabela 2. Resumo estatístico do Teste de Tukey

Teste de Tukey (IC 95%)	Centro	Limite Inferior	Limite Superior	P-valor
Contador Hematológico- Drabkin	0,09864	-0,42756	0,62483	0,96082
H2O- Drabkin	0,00273	-0,52346	0,52892	1,00000
NaCl- Drabkin	0,10532	-0,42087	0,63151	0,95291
H2O- Contador Hematológico	-0,09591	-0,62210	0,43028	0,96380
NaCl- Contador Hematológico	0,00668	-0,51951	0,53287	0,99999
NaCl-H ₂ O	0,10259	-0,42360	0,62878	0,95624

Ao considerarmos um nível de confiança de 5%, podemos concluir que não há diferença significativa entre as médias dos quatro métodos, demonstrado tanto pela análise de variância ANOVA ($p= 0,92$) quanto pelo teste de Tukey. Neste último, pode-se ver a comparação par a par de todos os métodos utilizados.

A dosagem da concentração de hemoglobina em contador hematológico é feita por fotometria e os reagentes utilizados são livres de substâncias tóxicas, porém é preciso conhecer o seu limite inferior de quantificação. Pois, nem todos os contadores possuem a capacidade de quantificar concentrações micromolares de hemoglobina. O método de diluição em água, apesar de ser de fácil preparo, foi o mais trabalhoso, pois foram necessárias leituras em 5 comprimentos de onda diferentes. Já, os de diluição em NaCl e da cianometemoglobina foram de execução mais simples com leitura em apenas um comprimento de

onda. O único inconveniente é o uso de substância tóxica no método da cianometemoglobina. Os dados apresentados mostram que os métodos testados neste ensaio funcionam de forma efetiva e confiável para avaliar a concentração de Hb no plasma. Entretanto, pela praticidade e pela utilização de reagentes simples, o método de NaCl seria o escolhido para ser utilizado numa avaliação rápida nas amostra de plasma contendo hemólise, tirando a dúvida da utilização ou não dessas amostras contaminadas nos ensaios bioquímicos.

REFERÊNCIAS

1. Therenzinha F. Lorenzi. Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica. 1992. Ed. Medsi.
2. Raimundo Antônio Gomes Oliveira, Adelino Poli Neto. Anemias e Leucemias – Conceitos Básicos e Diagnóstico por Técnicas Laboratoriais. Ed. Roca, 2004.

Enzimas em biologia molecular. II. Sequenciamento genômico pelo método de Sanger: T7 DNA polimerase, Sequenase e Termo Sequenase

Silvana Beres CASTRIGNANO

Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

As enzimas utilizadas para sequenciamento de DNA pelo método de Sanger são as mesmas utilizadas para amplificação de DNA, por exemplo, na reação em cadeia pela polimerase (PCR)?

Para responder a esta pergunta, neste segundo artigo da série sobre enzimas utilizadas no laboratório de biologia molecular vão ser apresentadas as pesquisas sobre a enzima T7 DNA polimerase e outras delas derivadas, que tiveram papel essencial em impulsionar a técnica de sequenciamento de Sanger.

Quando Sanger et al¹ descreveram o método de terminação da cadeia para sequenciamento genômico, utilizaram como enzima o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* para incorporar os desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) e os didesoxirribonucleotídeos trifosfato (ddNTPs). A diferença entre dNTP e ddNTP reside no grupo 3'-hidroxil que falta a estes últimos. Nesta técnica, a incorporação dos nucleotídeos acontece no sentido 5'→3', na sequência de um *primer* (oligonucleotídeo) que foi anelado à sequência-molde, aquela que se quer sequenciar. Enquanto a incorporação de um dNTP permite a continuação da cadeia, a incorporação de um ddNTP, pela falta de um grupo 3'-hidroxil, leva à interrupção do crescimento da mesma. A seguir, para identificação da sequência, utiliza-se eletroforese em gel, para separação dos fragmentos sequenciados por tamanho¹. O fragmento Klenow tem as mesmas propriedades da DNA polimerase I de *E. coli*, como

a atividade polimerase 5'→3' e a atividade de exonuclease 3'→5', mas não a atividade de exonuclease 5'→3', pois falta a ele o domínio N-terminal em relação à enzima completa^{2,3}.

Para que a reação de sequenciamento pelo método de Sanger ocorra de forma eficiente, é interessante que a enzima utilizada tenha alta processabilidade — termo que descreve o número de nucleotídeos continuamente incorporados por uma DNA polimerase usando o mesmo par *primer*-molde, sem dissociação — e faça pouca distinção entre dNTPs e ddNTPs⁴. A enzima T7 DNA polimerase mostrou-se melhor nesses quesitos do que o fragmento Klenow utilizado por Sanger⁴.

A enzima DNA polimerase do bacteriófago T7 foi descoberta em 1971 e extensivamente estudada pelo grupo de Charles C. Richardson, no Departamento de Química Biológica e Farmacologia Molecular da Faculdade de Medicina de Harvard⁴. O gene da T7 DNA polimerase foi detectado no gene 5 do bacteriófago, mas a atividade polimerase da proteína por ele codificada depende de um fator do hospedeiro do bacteriófago, a proteína tiorredoxina de *E. coli*. O papel desta última é estrutural, estabilizando a ligação da T7 DNA polimerase com o conjunto *primer*-molde. O grupo também demonstrou que a tiorredoxina era responsável por aumentar a processabilidade da polimerase em mais de 100 vezes⁴.

Outro ponto que foi analisado pelo grupo era a atividade de exonuclease. Esta atividade é

positiva e desejável na amplificação de segmentos genômicos pois excisa bases que foram incorporadas erroneamente à cadeia de DNA em formação em relação à fita molde de DNA. A atividade de exonuclease aumenta portanto a fidelidade da enzima⁴. Já no caso de reação de sequenciamento pelo método de Sanger, a atividade de exonuclease é prejudicial, pois: (1) a atividade exonuclease 5'→3' pode degradar *primers* e o DNA produzido³; (2) a atividade exonuclease 3'→5' pode interferir na análise da polimerização pois pode degradar *primers* e o produto de DNA, mas principalmente porque pode hidrolizar tanto o dNTP quanto o ddNTP terminais, prevenindo a acumulação de produtos cuja cadeia foi finalizada pela adição de ddNTP³; (3) quando a concentração de dNTPs diminui, a atividade de exonuclease aumenta, ficando próxima da atividade polimerase, resultando em parada da síntese da nova cadeia⁴; (4) a atividade de exonuclease faz com que a DNA polimerase não seja eficiente em regiões onde a fita-molde tenha estruturas secundárias⁴. No caso da T7 DNA polimerase, apesar de não ter atividade de exonuclease 5'→3', ela apresenta atividade de DNA exonuclease 3'→5' para DNA de fita simples e dupla⁴. Para sua melhor adequação à função de sequenciamento, o grupo de Richardson demonstrou a possibilidade de inativação parcial desta última atividade através de uma reação de oxidação. Esta enzima quimicamente modificada, batizada de Sequenase, foi patenteada e usada em *kits* comerciais de sequenciamento⁴. Posteriormente o grupo gerou mutantes da T7 DNA polimerase e selecionou um que não tinha atividade de exonuclease: a esse mutante, patenteado como Sequenase Versão 2, faltavam 28 aminoácidos da região N-terminal⁴.

Uma forma de aumentar a sensibilidade da reação de sequenciamento seria utilizar enzimas termoestáveis, o que permitiria que fossem feitos diversos ciclos de sequenciamento com a mesma mistura, sem reposição da enzima a cada ciclo, e permitindo assim utilizar amostras com concentração bem menor do DNA a ser sequenciado. A *Thermus aquaticus* DNA polimerase (*Taq* DNA polimerase), que é enzima termoestável, faz bastante distinção entre ddNTPs e dNTPs, durante a incorporação dos

mesmos. Tabor e Richardson², com vistas à utilização de enzimas termoestáveis no sequenciamento e para compreender a base molecular da habilidade de distinguir entre dNTP e ddNTPs, empreenderam a construção de genes híbridos de T7 DNA polimerase, DNA polimerase I de *E. coli* e da *Taq* DNA polimerase. Descobriram que um único grupo hidroxil é crítico para indicar essa seletividade. A troca da tirosina 526 da T7 DNA polimerase por uma fenilalanina aumenta a discriminação contra os ddNTPs em mais de 2.000 vezes, enquanto a troca da fenilalanina na posição homóloga da DNA polimerase I de *E. coli* (posição 762) ou da *Taq* DNA polimerase (posição 667) por tirosina diminui a discriminação contra os diferentes ddNTPs entre 250 e 8.000 vezes².

O conhecimento gerado pelo grupo de Richardson possibilitou a criação da Termo Sequenase a partir da *Taq* DNA polimerase. Esta foi geneticamente manipulada para inibição da atividade exonuclease 5'→3' e também para remoção da discriminação contra ddNTPs com a mutação fenilalanina→tirosina no resíduo 667^{4,5}.

Os descobrimentos acima incentivaram a continuação das pesquisas com DNA polimerases para melhorar a performance no sequenciamento genômico. Isso ocorreu não só com DNA polimerases da família A, como as citadas acima, mas também com membros da família B de DNA polimerases, como phi29, T4, Vent, Deep Vent, 9°N-7, Pfu^{3,6}. Muitas dessas pesquisas têm resultado em enzimas que vêm sendo patenteadas, algumas já disponíveis em *kits* comerciais^{3,6}.

Como pode ser depreendido do que foi citado, as enzimas que usamos para sequenciamento de DNA pela técnica de Sanger não são exatamente as mesmas que usamos para amplificação de DNA, pois algumas características desejáveis para amplificação como a atividade de exonuclease, que aumenta a fidelidade da enzima na amplificação, pode comprometer o sequenciamento. E uma característica muito desejável para sequenciamento pela técnica de Sanger, como a pouca discriminação entre dNTP e ddNTP, não são necessárias para amplificação.

Que tal o leitor descobrir qual é a enzima DNA polimerase existente no *kit* de sequenciamento que utiliza?

REFERÊNCIAS

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-67.
2. Tabor S, Richardson CC. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(14):6339-43.
3. Reha-Krantz LJ. Recent patents of gene sequences relative to DNA polymerases. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2008; 2(3):145-163.
4. Zhu B. Bacteriophage T7 DNA polymerase - sequenase. *Front Microbiol*. 2014;5:181. doi: 10.3389/fmicb.2014.00181.
5. Reeve MA, Fuller CW. A novel thermostable polymerase for DNA sequencing. *Nature*. 1995;376(6543): 796-7.
6. Chen CY. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present. *Front Microbiol*. 2014;5:305.doi: 10.3389/fmicb.2014.00305.

Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9

Silvana Beres CASTRIGNANO

Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

Neste terceiro artigo sobre enzimas utilizadas em laboratório de biologia molecular, será abordada a tecnologia CRISPR-Cas9. Nela, a enzima endonuclease chamada Cas9 cliva DNA guiada por interação RNA-DNA. O grande interesse suscitado pela tecnologia CRISPR-Cas9 é ser facilmente programável para reconhecer e clivar sítios específicos de um gene alvo e, portanto, passível de ser usada para edição de genomas^{1,2}.

Esta clivagem da fita dupla de DNA, quando aplicada em células de eucariotos, tende a ser reparada por um dos dois mecanismos naturais de reparo celular: união terminal não-homóloga ou NHEJ (do inglês, *non-homologous end joining*), ou reparação por recombinação homóloga ou HDR (do inglês, *homology-directed repair*). NHEJ pode levar ou a religação das extremidades resultando na reconstituição perfeita da sequência ou em ligação com erros, por causa de inserções ou deleções no locus genômico, com chances de levar a mudança na fase de leitura, resultando na produção de proteínas não funcionais ou até no impedimento da produção de proteínas. O HDR necessita de um molde de DNA contendo sequência homóloga da região afetada. Esse molde pode ser incorporado ao locus e gerar alterações na sequência genômica^{1,3,4}.

A enzima Cas9 é uma enzima com dois domínios nuclease, e cada um deles cliva uma das duas fitas do DNA detectado pelo sistema CRISPR-Cas (Fig. 1). É possível gerar mutações em um desses domínios para inativá-lo e gerar proteínas que clivem somente uma das fitas do DNA; neste caso a enzima funciona como nicase. E inativação de ambos os domínios resulta em uma proteína de ligação que pode reconhecer um alvo específico em um DNA e sinalizá-lo ou interferir na sua função^{1,5}

A tecnologia CRISPR-Cas9 originou-se do sistema CRISPR-Cas do tipo II que ocorre naturalmente em bactérias e arqueas, nas quais serve como um sistema imune adaptativo que protege esses organismos contra vírus e plasmídeos invasores. No genoma desses procariotos, o locus do sistema CRISPR-Cas do tipo II é composto por (1) um conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (CRISPR, do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) intercaladas com fragmentos pequenos de DNA do invasor — denominados protoespaçadores se localizados no genoma do invasor, e espaçadores se no sistema CRISPR — que foram integrados ao cromossomo do hospedeiro e (2) por um operon de genes codificadores da proteína Cas (do inglês, *CRISPR-associated*). Após transcrito, esse sistema formará um complexo composto por enzima Cas e uma estrutura de RNA duplo formado por CRISPR RNA (crRNA) e *trans-activating* crRNA (tracrRNA) (Fig. 1A). Na fase de interferência, há reconhecimento e clivagem dos alvos (sequências estrangeiras dos vírus ou plasmídeos invasores), respectivamente pelo crRNA (por complementaridade) e pela proteína Cas (Fig. 1A)^{1,5,6}.

Data de 2012 a descoberta da possibilidade de planejar a atuação de Cas9 guiada por molécula-guia simples de RNA — crRNA e tracrRNA sintéticas, ligadas por uma alça artificial — construída para clivar sítios específicos de um genoma (Fig. 1B)^{3,5}. Desde então, a tecnologia tem sido estudada em cultura de células de uma grande variedade de espécies, em vários animais — incluindo seres humanos, parasitas causadores de doença e vetores de transmissão de vírus (p. ex. com objetivo de tornar

o mosquito estéril) —, em plantas, em fungos^{1,4}. A investigação com a tecnologia CRISPR-Cas9 também tem sido feita em vírus com genoma DNA ou naqueles que exibem uma fase de DNA durante seu ciclo de “vida”. Assim, têm sido pesquisadas com sucesso edição nos genomas de alguns vírus como o da hepatite B, papilomavírus, herpesvírus, vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)³.

A ferramenta mostra-se promissora para uso em seres humanos, pois através de seu uso poderão ser introduzidas mudanças no genoma para curar mutações genéticas responsáveis por doenças, como alguns tipos de imunodeficiências, hemoglobinopatias, erros inatos do metabolismo, deficiência de alfa-1-antitripsina, fibrose cística, etc^{1,4}. Outra provável aplicação será no combate à infecção viral causada por vírus que permanecem latentes ou que se integram ao DNA do hospedeiro ou ainda em casos de infecção viral persistente³.

Entre as dificuldades para a utilização dessa ferramenta, a principal é o modo de introdução do sistema dentro das células. Vetores virais como lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associados têm sido utilizados para levar sequências que codifiquem o sistema^{2,4}. Existem preocupações com o uso desses vetores virais, como o fato de nem sempre o vírus infectar a célula que se quer atingir; a falta de segurança desses vetores, já que existe risco de integração de sequências virais no genoma do hospedeiro, mesmo se o vetor não for um lentivírus; dificuldade de empacotar sequências grandes

para expressão em vetores virais; risco de resposta do hospedeiro contra o vetor²⁻⁴. Outros métodos de entrega, seja de sequências do complexo para serem expressas nas células, seja da própria enzima Cas e da molécula-guia de RNA, têm sido avaliadas, como através de plasmídeos, métodos físicos (p.ex. eletroporação), conjugação com peptídeos com capacidade de penetração celular (CPP, do inglês, *cell-penetrating peptide*) e entrega mediada por nanopartículas como polímeros e lipídeos²⁻⁴.

Algumas empresas já comercializam produtos voltados para a utilização da tecnologia CRISPR-Cas9 em laboratório como, p. ex., Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com/crisprs), Genewiz (www.genewiz.com/Public/Services/Gene-Synthesis/CRISPR-Construct-Synthesis), ThermoFisher (www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/genome-editing/genart-crispr.html), TaKaRa/Clontech (www.clontech.com/Products/Genome_Editing), GenScript (www.genscript.com/CRISPR-Cas9-technology-resource.html).

Esta técnica de edição de genomas CRISPR-Cas9 tem suscitado um número enorme de pesquisas, e baseado na sua maior facilidade de uso e eficácia em relação a técnicas anteriormente descritas^{1,2}, e pelas perspectivas de aplicação no futuro, vale a pena difundir suas propriedades e qualidades. A importância do sistema é tal que tem sido aventada a chance de os seus descobridores serem indicados ao prêmio Nobel⁷.

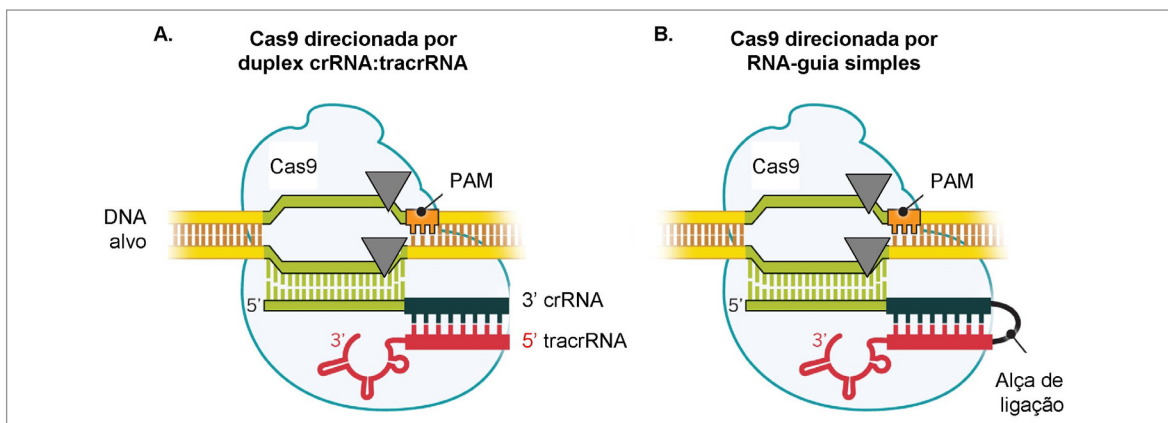


Fig 1. Estrutura esquematizada do complexo CRISPR-Cas9 ligado ao DNA alvo. **A.** CRISPR-Cas9 do *Streptococcus pyogenes*; **B.** Tecnologia CRISPR-Cas9 proposta por Jinek et al⁵. Os triângulos invertidos mostram os sítios de clivagem das fitas de DNA por cada um dos dois domínios da enzima Cas9; PAM: motivo adjacente ao protoespaçador (do inglês, *protospacer adjacent motif*), é uma sequência de poucos nucleotídeos localizada no genoma-alvo do sistema CRISPR-Cas, essencial na funcionalidade do sistema CRISPR-Cas⁶. Figura adaptada a partir da original de Doudna e Charpentier¹

REFERÊNCIAS

1. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096
2. Wang M, Glass ZA, Xu Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther*. 2017; 24(3):144-50.
3. Kennedy EM, Cullen BR. Gene editing: a new tool for viral disease. *Annu Rev Med*. 2017; 68:401-11.
4. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16(6):387-99.
5. Jinek M, Chylinsky K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337(6096): 816-21.
6. Mojica FJM, Díez-Villaseñor, C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009; 155(Pt 3): 733-40.
7. Comfort N. Genome Editing: That's the way the CRISPR crumbles. *Nature*. 2017; 546(7656):30-1.

Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise: Capacitação de Equipe Técnica

Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR¹, Márcia Liane BUZZO¹, Adriana BUGNO¹, Meire Lima Domingues FERREIRA², Regina Lúcia CARDOSO²

¹Instituto Adolfo Lutz

²Equipe Técnica de Hemoterapia, Centro de Vigilância Sanitária

Caracterizada como um importante problema de Saúde Pública devido à sua prevalência na população mundial e seu impacto na mortalidade dos indivíduos acometidos, a doença renal crônica atinge cerca de 10% da população, e tem sido observado que a sua incidência têm aumentado no Brasil.

Para esta população acometida pela perda da função dos rins, a hemodiálise é uma das modalidades de tratamento dialítico utilizada como terapia renal substitutiva, enquanto este paciente renal crônico aguarda um possível transplante de rim¹. Esta terapia substitui parcialmente a função deste órgão acarretando na melhora das condições clínicas e aumentando a sobrevida destes pacientes. Estima-se que no país, em 2017, o número de indivíduos submetidos ao procedimento de hemodiálise ultrapasse 148 mil pacientes².

A hemodiálise consiste na remoção de substâncias tóxicas do organismo através da filtração do sangue por circulação extracorpórea com o uso de um rim artificial (dialisador) e de solução de diálise, composta principalmente por água tratada para este tipo de terapia¹. A garantia da qualidade da água para diálise não depende somente da escolha do sistema de tratamento, mas depende também de manutenção eficiente de seus componentes³.

Considerando que o paciente é exposto a cerca de 360 litros de água por semana, e que a água também é utilizada no reprocessamento de dialisadores, sua qualidade química e microbiológica é essencial para evitar eventos adversos à saúde do

paciente. Para tanto, as diversas características que esta água tratada pode apresentar e influenciar no tratamento dialítico e na sobrevida dos pacientes devem obedecer aos requisitos estabelecidos na Resolução RDC nº 11/2014 do MS, que estabelece os parâmetros mínimos de qualidade da água utilizada nos Serviços de Diálise⁴.

O episódio ocorrido em uma clínica de hemodiálise no município de Caruaru/PE, em 1996, associado à presença de microcistinas na água utilizada no tratamento de pacientes renais, e que ocasionou 52 mortes⁵, foi motivo de preocupação para que as autoridades estabelecessem legislações específicas para funcionamento de Serviços de Diálise no país.

Assim, devido à preocupação com o padrão da água empregada nos Serviços de Diálise do Estado de São Paulo, um programa de monitoramento do padrão de qualidade da água tratada para diálise foi instituído no Estado de São Paulo em 1999, constituindo-se como atores o Centro de Vigilância Sanitária (CVS) como coordenador do programa, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) como o laboratório de Saúde Pública oficial na execução de análises e os Grupos de Vigilância Estadual (GVS) e Vigilância Municipal (VISAM), designados para a efetivação das coletas das amostras e seus respectivos envios ao laboratório. A partir de 2007, o Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise ocorre de forma ininterrupta, abrangendo todos os Serviços de Diálise do Estado de São Paulo na avaliação das amostras coletadas nos pontos definidos pela legislação⁶.

A fase pré-analítica constitui-se como uma das etapas críticas para a garantia da confiabilidade dos resultados das análises laboratoriais, pois pode ser responsável por resultados inadequados, que incluem: procedimento e manipulação de coleta de material de forma inadequada que podem levar à contaminação, problemas e atrasos no transporte, entre outros.

Assim, com o objetivo de minimizar a ocorrência destes problemas, desde 2007 são realizadas capacitações periódicas dos profissionais das Equipes Técnicas da Vigilância Sanitária Estadual e Municipal, responsáveis pela coleta e transporte de amostras de água tratada dos Serviços de Diálise ao IAL.

Em 2017, o CVS promoveu, em parceria com IAL, a capacitação destes profissionais, visando o intercâmbio de informações entre as diferentes áreas técnicas. Os Técnicos da Vigilância Sanitária foram divididos em três grupos, com participação mínima de um representante de Vigilâncias Estadual e Municipal, nas datas: 07/03/2017 (07 GVS, 17 VISAM, total 38 participantes); 05/04/2017 (08 GVS, 16 VISAM, total 30 participantes) e 03/05/2017 (13 GVS, 24 VISAM, total 35 participantes). O Programa de Treinamento contou com palestras temáticas ministradas pela coordenação do Programa no Estado – CVS, especialista em sistema de tratamento de água e pesquisadores do IAL.

Para a realização desta qualificação, o CVS apresentou o histórico dos resultados dos laudos do Programa dos últimos seis anos (2011-2016) e análise dos relatórios de inspeção sanitária do

ano de 2016; um especialista apresentou o sistema de tratamento de água para o serviço de diálise e o IAL elaborou e apresentou o Manual de Orientação de Colheita de Água desenvolvido com exclusividade para o Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise. A finalização deste documento considerou a contribuição dos profissionais envolvidos, resultando no melhor entendimento do processo de coleta e transporte das amostras para a execução do Programa⁷.

Os treinamentos foram avaliados de acordo com questionário aplicado aos participantes, tendo sido abordados os seguintes tópicos: avaliação do conteúdo, qualificação dos palestrantes e avaliação geral do treinamento, conforme descrito na Tabela 1.

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que mais de 96% dos participantes demonstraram satisfação nos quesitos avaliados, considerando como pontos favoráveis, as respostas qualitativas, “Ótimo” e “Bom”. A resposta “Regular” foi considerada como ausência de pontos positivos ou negativos.

Ainda, os participantes registraram em suas avaliações sugestões relacionadas ao tema a serem abordados em treinamentos futuros, tais como: funcionamento da máquina para hemodiálise e novas tecnologias; resultados de novas coletas do programa; discussão sobre relatório de inspeção; promoção de diferentes tipos de treinamento; extensão do período de capacitação; sistema de tratamento de água e debates sobre assuntos da rotina de inspeção.

Tabela 1. Avaliação da capacitação de Equipes Técnicas das Vigilâncias Sanitárias Estadual e Municipal

Item	Avaliação (%)					
	Ótimo			Bom		
	07/03/17	05/04/17	03/05/2017	07/03/17	05/04/17	03/05/17
Conteúdo abordado*	75	54	72	25	46	28
Qualificação dos palestrantes*	79	61	79	21	39	21
Avaliação geral do treinamento**	79	46	62	21	50	38

* Não foram registradas avaliações consideradas Regular ou Ruim

** Referente à avaliação geral do treinamento de 05/04/2017: 4% dos participantes atribuíram nota “Regular”

De um modo geral, os resultados evidenciam que os Técnicos de Vigilância Sanitária conseguiram de forma positiva captar a essência dos conteúdos explorados nos treinamentos, o que implica em melhor e maior entendimento entre os participantes para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em atendimento ao Programa de Monitoramento.

Assim, considera-se adequado que, periodicamente, sejam realizados os treinamentos, com vistas à atualização e intercâmbio de conhecimentos, visando proporcionar segurança aos pacientes com insuficiência renal.

REFERÊNCIAS

1. Programa de Formação de Profissionais de Nível Técnico para a Área da Saúde no Estado de São Paulo – FUNDAP. Curso de Especialização Profissional de Nível Técnico em Enfermagem-Livro do Aluno Terapia Renal Substitutiva. 2012, São Paulo. [acesso 2017 Mai 11]. Disponível em: http://tecsaude.sp.gov.br/pdf/Livro_do_Aluno_TERAPIA_RENAL_SUBSTITUTIVA.pdf.
2. Menezes FG, Barreto DV, Abreu RN, Roveda F, Silva RF, Filho P. Panorema do tratamento hemodialítico financiado pelo Sistema Único de Saúde – Uma perspectiva econômica. *J Bras Nefrol*. 2015;37(3):367-78. [DOI:10.5935/0101-2800.20150057]
3. Buzzo ML, Bugno A, Almodovar AAB, Kira CS, Carvalho MFH, Souza A, et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):1-6.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Disponível em: [<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-154-de-15-de-junho-de-2004>].
5. Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect*. 2001;109(7):663-8.
6. Marcatto MISJ, Grau MAF, Müller NCS. Projeto de reativação e implantação do Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo, Agosto de 2009. *Bepa*. 2010;7(74):6-12.
7. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Manual de Orientação de Colheita de Água. Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2017. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2017_5_30/manual-para-colheita-de-agua-para-dialise/final_manual_para_colheita_de_agua_para_dialise.pdf?attach=true].

Instruções para Publicação

A matéria para publicação deverá apresentar a seguinte estrutura:

- Nome do(s) autor(es) completo por extenso, último sobrenome em caixa alta.
- Filiação científica completa (Instituto Adolfo Lutz – mais complemento).
- O texto deve ser:
 - apresentado de forma única, podendo conter introdução, método, dados experimentais e outros;
 - digitado em fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaço duplo, em formato Word, ocupando no máximo 3 (três) laudas de tamanho A4;
 - redigido em Língua Portuguesa;
 - quando necessário o uso de tabelas e figuras, elas deverão ser autoexplicativas e numeradas;
 - as tabelas serão apresentadas com o título acima e as figuras, com o título abaixo; ambas deverão ser enviadas em arquivo separado, sendo as figuras no formato jpeg ou tif, com resolução mínima de 300 dpi.
- As referências devem ser:
 - numeradas consecutivamente na ordem em que forem mencionadas a primeira vez no texto e identificadas por numerais arábicos sobrescritos e relacionados em ordem crescente;
 - citadas seguindo Vancouver Style, à semelhança da RIAL e conforme disponível em: <<http://revista.ial.sp.gov.br>> (instruções aos autores);
 - no máximo seis.

A matéria deverá ser enviada em uma cópia impressa e em CD-Rom ou pelo endereço eletrônico: bial@saude.sp.gov.br

Toda informação é de total responsabilidade do(s) autor(es).

A publicação de qualquer matéria estará condicionada à aprovação dos membros do corpo editorial do Boletim do Instituto Adolfo Lutz (BIAL).

Fica autorizada a reprodução das matérias publicadas no BIAL, desde que citada a fonte.

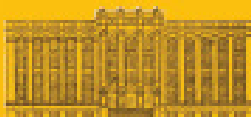
Finalidade

Divulgação de informações técnicas e assuntos de interesse em Saúde Pública originários de atividades desenvolvidas pelo Instituto Adolfo Lutz.

Regulamento

O BIAL publica as matérias de interesse em Saúde Pública enquadradas em um dos itens abaixo:

1. Relatos sucintos de investigação com ênfase a aspectos relativos às ações laboratoriais.
2. Informações sobre dados levantados a partir de registros existentes nos Laboratórios do Instituto.
3. Notas e informações relativas a temas de atualidades.
4. Nótulas de literatura: comentários críticos sobre livros e artigos científicos.



Instituto Adolfo Lutz



Coordenadoria de
Controle de Doenças

