



VIVÊNCIAS PRÁTICAS EM LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Palavras-Chave: INICIAÇÃO CIENTÍFICA, PRÁTICA LABORATORIAL, BIOLOGIA MOLECULAR

Autores:

CLARA BATISTA DA SILVA, FCA – UNICAMP

GABRIEL BOMBO PIERROTI, FCA – UNICAMP

SARAH DOMINGUES, FCA – UNICAMP

Prof. Dr. EDUARDO ROCHETE ROPELLE (orientador), FCA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

É indiscutível que a busca pelo ensino superior se amplificou, sendo essa a escolha predominante entre os que concluem o ensino médio, compreendendo no ensino superior a oportunidade de melhora na qualidade de vida e perfil profissional. Entretanto, aparenta que o abismo entre o ensino superior e os discentes do ensino médio (em especial os de escolas públicas) se torna cada vez maior.^{1,2}

Nesse contexto, compreende-se que durante o período do ensino básico, se torna indispensável o contato com pesquisas científicas. O Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica para o Ensino Médio (PIBIC-EM) atua na intermediação desses dois ambientes no processo de aprendizagem, quebrando o protótipo tradicional da educação e explorando o raciocínio e método científico, além de tornar a metodologia científica uma ferramenta de tomada de decisões, aprendizagem, resoluções de questões, com um aprendizado mais prazeroso, desenvolvendo a facilidade de processar informações novas, como também armazená-las.^{3,4}

Ademais, ele impacta positivamente no aspecto emocional, protagonismo, autoconhecimento e independência através do trabalho cooperativo, visto que a iniciação científica proporciona o relacionamento entre IC, orientadores e pesquisadores, atingindo propostas educacionais geradas em conjunto com os mesmos, de mesmo modo que eles entram em contato com variedade de culturas e línguas.^{3,4}

Além disso, o contato prévio com a pesquisa científica estimula a ampliação da visão de futuro daquele jovem, incentivando a ampliação das carreiras profissionais de formação superior, como também ajuda de certa forma na redução da evasão escolar, já que possibilita ao estudante a opção de continuar com os estudos ao invés de entrar prontamente no mercado de trabalho. Consequentemente,

proporciona a consolidação de bagagem necessária para a futura admissão nas universidades, dando-lhes ferramentas necessárias para a solução de futuros problemas, ainda que em situações divergentes, possibilitando o total aproveitamento desse momento de sua vida.⁵

OBJETIVO:

O objetivo desta pesquisa foi adquirir conhecimento sobre práticas laboratoriais na área de Biologia Molecular, aplicando os conhecimentos obtidos em laboratório no desenvolvimento de estudos científicos, assim favorecendo a capacitação técnica de estudantes do Ensino Médio.

METODOLOGIA:

O presente estudo quali-quantitativo permitiu que a rotina em laboratório de biologia molecular fosse vivenciada por três discentes do Ensino Médio de escolas públicas, durante o período de setembro de 2023 a agosto de 2024. As atividades práticas desenvolvidas no laboratório foram supervisionadas pelos professores e pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício (LaBMEx).

As atividades desenvolvidas vão desde noções de boas práticas de laboratório, incluindo a instrumentação e o uso de equipamentos de proteção individuais (EPIs), a técnicas utilizadas para análises em biologia molecular, como a análise de lactato sanguíneo, o acompanhamento do treinamento de animais sob diversas condições e o *western blotting*. A seguir, estão descritos os procedimentos dessas análises.

Análise de lactato sanguíneo

Participaram da análise os três estudantes do Ensino Médio e a monitora da graduação em Ciências do Esporte. Para a avaliação do lactato sanguíneo produzido após a atividade física, foi realizada a análise antes e depois da execução de exercícios. O exercício escolhido para a análise foi o agachamento com salto, já que, por envolver grandes grupos musculares, o impacto sobre valores hemodinâmicos e bioquímicos hematológicos são mais severos.⁶

A monitora responsável realizou a coleta de sangue em um dos jovens para ensiná-los o protocolo da técnica e, posteriormente, os estudantes realizaram a coleta entre si, seguindo as orientações recebidas. As amostras de sangue foram coletadas do lobo da orelha de cada indivíduo. Para isso, a superfície da orelha foi higienizada com álcool 70%, e puncionada com um golpe rápido, através de uma lanceta. O sangue foi coletado nas tiras teste do lactímetro Accutrend Plus (Roche), que analisou a concentração do lactato na amostra.

Acompanhamento do monitoramento dos animais

A partir das diversas pesquisas em andamento no LaBMEx, foi possível acompanhar o monitoramento e treinamento dos camundongos utilizados para a avaliação das diferentes condições metabólicas em estudo. Antes do manuseio dos animais, foi também ressaltada a importância da avaliação do comitê de ética da UNICAMP para o seu uso nos projetos.

Durante o acompanhamento do monitoramento, foi salientada a relevância do controle das condições físicas para o ciclo de vida do animal, incluindo a temperatura ambiente e iluminação. O controle das condições dos camundongos também foi avaliada, a partir da medição de suas massas periodicamente.

Para a avaliação das hipóteses de cada pesquisa, os camundongos foram submetidos a situações particulares de alimentação e treinamento. Eles se dividiam em grupos de dieta normolipídica, com teor padrão de lipídios para o estado nutricional, e hiperlipídica, com teor elevado de lipídios, para avaliação metabólica sob condições de má alimentação. Também foram divididos em grupos sedentários, que não passavam por nenhum treinamento, e grupos com variados treinamentos, incluindo de resistência, força e até mesmo overtraining.

Western blotting

A partir da técnica de western blotting, foram analisadas as expressões proteicas de HSP60 e LONP1, relacionadas à UPR^{mt}, no tecido adiposo marrom (BAT, do inglês, *brown adipose tissue*) de três grupos de camundongos (controle, obeso e em jejum intermitente).

As amostras de BAT já extraídas foram homogeneizadas em tampão de extração com o TissueLyser II (Qiagen), em velocidade máxima por 3 minutos. O homogeneizado foi então centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Com os sobrenadantes dos homogenatos, foi realizada a quantificação de proteínas, utilizando o método colorimétrico do ácido bicinonínico (BCA, do inglês, *bicinchoninic acid*), como previamente descrito.⁷ Foram utilizadas onze soluções de albumina de soro bovino (BSA, do inglês, *bovine serum albumine*) como soluções padrão, com concentrações variando de 0 a 2,5 µg/µL. A partir das concentrações obtidas, as proteínas foram desnaturadas em tampão de Laemmli, contendo 100 mM de DTT, e armazenadas a -80 °C.

Em seguida, foram preparados dois géis de poliacrilamida 10%, onde foi feita a eletroforese das proteínas, que, após serem corridas, foram transferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da transferência foi verificada pela pigmentação das membranas com corante Ponceau, e a ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi minimizada pelo bloqueio com solução de leite em pó, por 1 hora a 4°C.

As membranas foram incubadas com os anticorpos específicos anti-HSP60 e anti-LONP1 *overnight* a 4 °C. Após lavagem com TBST (solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20), as membranas foram incubadas novamente com anticorpos secundários anti-rabbit, por 1 hora a 4 °C. As bandas específicas foram detectadas por quimioluminescência, utilizando o substrato ECL, e suas imagens foram registradas pelo ChemiDoc Imaging System (BioRad).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Análise de lactato sanguíneo

O exercício de alta intensidade ocasionou o aumento do lactato sanguíneo, por conta da falta de oxigênio no organismo, que faz com que o metabolismo produza lactato para continuar gerando energia de forma anaeróbia, pois a respiração celular não é suficiente. Com a análise, foi observado que, antes da prática de atividade física, o nível de lactato no sangue de um dos integrantes do grupo era de 1,5 mM, enquanto após a realização do exercício, o nível subiu para 2,1 mM.

Acompanhamento do monitoramento dos animais

A pesquisa e experimentação animal, utilizando modelos de roedores obesos induzidos por dieta, foram de fundamental importância para a reprodução controlada de condições específicas. Dessa forma, possibilitando a observação detalhada dos efeitos de determinados tratamentos, dietas ou intervenções aos quais os animais foram submetidos, fornecendo dados para o desenvolvimento de terapias contra a obesidade com eficácia. Os resultados obtidos contribuem para o avanço do conhecimento científico, disponibilizando dados cruciais para a elaboração de estratégias novas e mais eficazes na promoção da saúde.

Western blotting

A quantificação pelo método BCA e a preparação das amostras foram realizadas com sucesso. As técnicas laboratoriais aplicadas se mostram de grande relevância para o estudo da obesidade, assim proporcionando uma compreensão mais detalhada dos mecanismos que envolvem essa condição. A quantificação proteica, feita pelo método do BCA, possibilitou calcular a concentração de proteínas em cada amostra baseado nos valores de referência da curva de 11 pontos, com um valor da equação de $R^2 > 0.99$, identificando sucesso na realização da curva como um parâmetro comparativo para os valores das amostras em concentração desconhecida.

Além disso, a pigmentação das membranas de nitrocelulose com o corante Ponceau permitiu a visualização das bandas de proteínas. A eficácia da técnica de western blotting na identificação e análise de proteínas específicas permitiu observar modulações no conteúdo proteico em diferentes condições fisiológicas, como obesidade e jejum intermitente.

CONCLUSÕES:

A partir das técnicas realizadas, foi possível entender a importância da pesquisa científica para o desenvolvimento social e tecnológico. A área da biologia molecular apresenta grande relevância no estudo de questões relacionadas à saúde, como a obesidade e o exercício físico, e a pesquisa nessa área permite a detecção de distúrbios e doenças, possibilitando o seu tratamento. As próximas etapas da pesquisa incluem a quantificação das proteínas detectadas pelo western blotting e a realização de

outras técnicas de estudo na biologia molecular, de modo que, ao final da iniciação científica, seja possível elaborar o relatório final.

Com base nas experiências conduzidas no LaBMEx, pode-se afirmar que o atual projeto foi capaz de proporcionar uma oportunidade de familiarização e aplicação de técnicas relacionadas à biologia molecular, além de possibilitar uma compreensão aprofundada do método e do processo de produção de conhecimento científico. O aprendizado adquirido ultrapassou a esfera prática em laboratório, estendendo-se à análise crítica de artigos científicos e ao entendimento do caminho necessário para sua produção. Dessa forma, essa experiência desempenhará um papel relevante no desenvolvimento profissional futuro, sendo de grande contribuição para futuros pesquisadores dentro desta área de pesquisa.

BIBLIOGRAFIA

- 1 BIANCHETTI, L. *et al.* A iniciação à pesquisa no Brasil: políticas de formação de jovens pesquisadores. **Educação**. Santa Maria, p. 585-597, 2012.
- 2 VOLINSKI, V. S. *et al.* O PIBIC-EM como política e estratégia de aproximação da universidade com a rede de educação no ensino médio: Um relato de experiência. **Seminário de Políticas Públicas e Sociais**, v. 1, n. 1, p. 19-20, 2018.
- 3 DA COSTA, W. L.; ZOMPERO, A. F. A Iniciação Científica no Brasil e sua propagação no Ensino Médio. **Revista de Ensino de Ciências e Matemática**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 14–25, 2017. DOI: 10.26843/rencima.v8i1.988. Disponível em: <https://revistapos.cruzeirosul.edu.br/rencima/article/view/988>. Acesso em: 22 jul. 2024.
- 4 GOMES HECK, T. *et al.* Iniciação científica no ensino médio: um modelo de aproximação da escola com a universidade por meio do método científico. **Revista Brasileira de Pós-Graduação**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2012. DOI: 10.21713/2358-2332.2012.v8.245. Disponível em: <https://rbpg.capes.gov.br/rbpg/article/view/245>. Acesso em: 20 jul. 2024.
- 5 NEVES, R. M.; LEITE, S. B. Iniciação Científica: vocação de genialidade ou prática cultural? *In*: CALAZANS, J. (Org.). **Iniciação científica: construindo o pensamento crítico**. São Paulo: Cortez, 2002.
- 6 CASTINHEIRAS-NETO, A. G.; COSTA-FILHO, I. R.; FARINATTI, P. T. V. Respostas cardiovasculares ao exercício resistido são afetadas pela carga e intervalos entre séries. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 4, p. 493-501, 2010. DOI: 10.1590/S0066-782X2010005000119. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/KjwyzdkDwLFp7sZkLXmGmgN/?lang=en>. Acesso em: 13 jul. 2024.
- 7 SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, out. 1985. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269785904427?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2024.