

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e CCP  
Programa de Pós-Graduação Morfofisiologia de Estruturas Faciais

Dissertação de Mestrado

**Comparação de genomas e genes expressos entre tecidos de pólipos nasal e de epitélio nasal normal por “representation differential analysis” (RDA) em paciente com rinosinusite crônica com pólipos nasais.**

Tamara Honorato Saturno da Silva

Ribeirão Preto-SP

2016

Tamara Honorato Saturno da Silva

**Comparação de genomas e genes expressos entre tecidos  
de pólipos nasais e de epitélio nasal normal por  
“representation differential analysis” (RDA) em paciente  
com rinossinusite crônica com pólipos nasais.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Morfofisiologia de Estruturas Faciais na Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr Edwin Tamashiro

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### Ficha catalográfica

Silva, Tamara Honorato Saturno da  
Comparação de genomas e genes expressos entre tecidos de pólipo nasal e de epitélio nasal normal por “representation differential analysis” (RDA) em paciente com rinosinusite crônica com pólipo nasal. Ribeirão Preto, 2016.  
43 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Morfofisiologia de estruturas faciais.  
Orientador: Tamashiro, Edwin.

1. Hibridação . 2.Pólipo Nasal. 3. Rinosinusite Crônica . 4. Sequenciamento

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SATRUNO, TAMARA HONORATO Título: Comparação de genomas e genes expressos entre tecidos de pólipos nasais e de epitélio nasal normal por “representation differential analysis” (RDA) em paciente com rinossinusite crônica com pólipos nasais.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Orientador: Prof. Dr. Edwin Tamashiro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto e Prof. Dr. Edwin Tamashiro, pelo exemplo de seriedade e amor a pesquisa. Obrigada por toda paciência, ensinamentos, atenção e confiança.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Wilma Terezinha Anselmo-Lima e Dr<sup>a</sup> Fabiana Valera, que me acolheram no departamento e pelas amostras cedidas a esse estudo.

À Maria Lúcia Silva, técnica do nosso laboratório, pelo imenso coração de mãe, amizade e carinho.

À secretária do departamento Maria Cecília Onofre, por toda paciência e ajuda.

Aos meus grandes amigos e colaboradores Dr<sup>a</sup> Talita Bianca Gagliardi e Dr Marcus Vinícius Gomes da Silva. Foi um imenso prazer trabalhar com vocês.

Ao bioinformata Dr Leandro Costa pela colaboração com as análises.

Aos colegas do Laboratório de Patogênese Viral, principalmente aos grandes amigos: Miriã, Talita, Marcus Vinícius, José Luiz (Zezinho), Flávia, Anibal, e Ronaldo.

À todos do Centro em Pesquisa em Virologia, especialmente Sueli, Leila e Soraya que me acolheram como filha ao longo desses anos e não pouparem ombros e abraços diante das adversidades.

Ao meu marido David, que é meu porto seguro e desde a minha seleção esteve ao meu lado, me incentivando a ser o melhor de mim nesse projeto. Obrigada meu amor.

À minha mãe que sempre viveu minhas lutas. Obrigada por todo amor e carinho.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

## ABSTRACT

SATURNO, T.H. **Genome Comparison and expressed genes between nasal polyp tissue and epithelium by " analysis of differential representation " nasal normal ( RDA) in patient with chronic rhinosinusitis with nasal polyp.** 2016. 45f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2016.

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a set of inflammatory diseases of the nasal mucosa and paranasal sinuses, clinically characterized by persistent signs and inflammatory sinonasal symptoms for more than 12 weeks, including changes to the nasal endoscopy and CT findings. It is one of the most common chronic diseases in the community, with an estimated prevalence of about 5-15% of the adult population. Phenotypically, the CRS patients may present themselves in two ways: with or without the presence of nasal polyps in the nasal cavity. Nasal polyps are benign tumors originating from the very sinonasal mucosa with significant edematous and inflammatory infiltrate rich component. Distinguishing between patients with CRS with nasal polyp (RSCcPN) and CRS without nasal polyps (RSCsPN) has been of great clinical and surgical value, as these conditions have different responses to pharmacological and surgical treatments accordingly due to different pathophysiological mechanisms.

Recent advances have shown that the pathogenesis of RSCcPN is complex and probably multifactorial. In this study, we investigate genomic differences (expressed genes and genomes) by analysis of representational differences (representational difference analyzes, RDA) between an apparently normal tissue of the nasal cavity (mucosa of the nasal septum) and a nasal polyp of the same individual with RSCcPN.

To date, the study revealed a causative agent or gene RSCcPN, but the number of sequences generated through the Next Generation Sequencing indicate interesting genes still be screened polyp tissue once been generated a large number of unknown sequence, present in polyps but find no similarity to any sequence deposited in databases.

## RESUMO

SATURNO, T.H. **Comparação de genomas e genes expressos entre tecidos de pólipos nasal e de epitélio nasal normal por “representation differential analysis” (RDA) em paciente com rinosinusite crônica com pólipos nasal.** 2016. 45f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2016.

A rinosinusite crônica (RSC) é um conjunto de doenças inflamatórias da mucosa nasal e dos seios paranasais, caracterizado clinicamente pela persistência de sinais e sintomas inflamatórios nasossinusais por mais de 12 semanas, incluindo alterações à endoscopia nasal ou alterações tomográficas. É uma das doenças crônicas mais comuns na comunidade, com prevalência estimada em cerca de 5-15% da população adulta. Fenotipicamente, os pacientes com RSC podem se apresentar sob duas maneiras: com ou sem a presença de pólipos nasal na cavidade nasal. Pólipos nasais são tumorações benignas originadas da própria mucosa nasossinusal, com significativo componente edematoso e rico infiltrado inflamatório. A distinção entre pacientes com RSC com pólipos nasal (RSCcPN) e RSC sem pólipos nasal (RSCsPN) tem sido de grande valia clínica e cirúrgica, pois tais condições apresentam respostas distintas a tratamentos medicamentosos e cirúrgicos, consequentemente devido a diferentes mecanismos fisiopatogênicos.

Os recentes avanços têm demonstrado que a fisiopatogenia da RSCcPN é complexa e provavelmente multifatorial. Neste estudo, investigamos diferenças genômicas (genomas e genes expressos) por análise de diferenças representacional (*representational difference analyses*, RDA) entre um tecido aparentemente normal da cavidade nasal (mucosa do septo nasal) e um pólipos nasal de um mesmo indivíduo com RSCcPN.

Até o momento, o estudo não revelou um agente ou gene causador de RSCcPN, mas a quantidade de sequências geradas através do Sequenciamento de Nova Geração indicam interessantes genes ainda ser rastreados em tecidos de pólipos, uma vez foram gerados um número elevado de sequências desconhecidas, presentes nos pólipos mas que não encontram similaridade com nenhuma sequência depositada em bancos de dados.

## Lista de figuras

Figura 1: Diagrama esquemático da técnica de “Representational Difference Analyses” (RDA) até a primeira hibridação .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 2: Produtos diferenciais 1 e 2 .....	17
Figura 3: Produtos diferenciais 3 das bibliotecas de cDNA.....	17
Figura 4: Produto diferencial 1 da biblioteca de DNA.....	18
Figura 5: Produtos diferenciais 2 e 3 da biblioteca de DNA. ....	18



## Lista de tabelas

Tabela 1 - Número de <i>reads</i> por amostra .....	19
Tabela 2 - Resultados da anotação automática .....	19
Tabela 3 - Identificação dos <i>contigs</i> obtidos com SNG -DNA .....	21
Tabela 4 - Identificação dos <i>contigs</i> obtidos com SNG -cDNA.....	26
Tabela 5 – Sequência de pares de base utilizada nos <i>primers</i> de bactérias.....	29

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1 Rinossinusite Crônica.....	2
1.2 Análise de diferença representacional ( <i>representational difference analysis</i> , RDA). ....	3
<b>2. OBJETIVO</b> .....	6
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	7
<b>3.1 Amostras de tecidos</b> .....	7
3.4 Quantificação do ácido nucleico.....	8
3.5 Síntese da primeira fita de cDNA .....	8
3.6 Síntese da segunda fita de cDNA .....	8
3.7 Digestão do ácido nucleico com Mbol.....	8
3.8 Purificação do ácido nucleico digerido .....	9
3.9 Ligação dos adaptadores R .....	9
3.10 Preparação das representações .....	10
3.10.1- Padronização da PCR .....	10
3.10.2 Geração das representações em larga escala.....	11
3.11 Geração do DNA <i>driver</i> e <i>tester</i> .....	11
3.11.1 Geração do cDNA <i>driver</i> .....	11
3.11.2 Geração do DNA <i>tester</i> .....	11
3.12 Primeira hibridização subtrativa .....	12
3.13 Geração do primeiro produto diferencial (PD1).....	12
3.14 Troca de adaptadores do primeiro produto diferencial (PD1).....	13
3.15 Segunda hibridização subtrativa e geração do segundo produto diferencial (PD2).....	14
3.16 Terceira hibridização subtrativa e geração do terceiro produto diferencial (PD3).....	14
3.17 Sequenciamento de Nova Geração (SNG) .....	15

3.18 Bioinformática .....	15
3.19 Confirmação por PCR .....	16
4. Resultados.....	16
4.1 Controle das reações.....	16
4.2 Produtos diferenciais.....	16
4.3 Análise do sequenciamento .....	18
4.3.1 Montagens .....	18
4.3.2 Anotação.....	19
4.4 Análise das Sequências .....	19
4.5 PCR em tempo real.....	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES: .....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Rinossinusite Crônica

As patologias crônicas do trato respiratório superior são muito comuns e têm grande impacto em saúde pública. Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 50 milhões de pessoas sofrem anualmente de rinossinusite crônica (RSC), estimada em cerca de 5-15% de prevalência na população adulta mundial (1, 2). Na cidade de São Paulo, a prevalência estimada de pacientes com RSC é de 5,5%, semelhante a dados internacionais (3). Ainda, gastos relacionados ao tratamento de pacientes com RSC atingem cifras de bilhões de dólares anuais, tornando-a uma das doenças crônicas de significativo impacto socioeconômico (1).

A RSC é uma doença inflamatória crônica da mucosa nasossinusal, definida clinicamente pela presença de sintomas e sinais persistentes por mais de 12 semanas, tais como: obstrução nasal, congestão nasal, secreção nasal anterior ou posterior, dor ou pressão facial e alterações do olfato. Para diagnóstico de RSC, é necessária a confirmação de tais alterações inflamatórias por meio de endoscopia nasal e/ou alterações tomográficas compatíveis com o quadro (2).

A RSC pode estar associada a outras doenças de base, tais como alergia, discinesia ciliar primária, imunodeficiências ou doenças granulomatosas. Anormalidades anatômicas do septo nasal ou da parede lateral, lesões tumorais ou a presença de corpos estranhos também podem predispor à RSC, devido à retenção de secreções e dificuldade de drenagem de seios paranasais (4). Acredita-se que a etiopatogenia da RSC seja multifatorial, envolvendo determinantes tanto do hospedeiro quanto de fatores ambientais (2).

Uma parcela variável de pacientes com RSC pode desenvolver pólipos na cavidade nasal, especialmente no complexo ostiomeatal. Pólipos nasais são tumorações benignas, formadas por tecido conjuntivo frouxo, edema, células inflamatórias, glândulas e vasos, com cobertura de diferentes tipos de epitélio, principalmente do tipo pseudoestratificado com células ciliadas e caliciformes (epitélio respiratório). Os eosinófilos são as células inflamatórias mais comumente encontradas em pólipos nasais; neutrófilos, mastócitos, plasmócitos, linfócitos e monócitos também estão presentes, bem como fibroblastos. A presença marcante da interleucina 5 (IL-5) e de outros biomarcadores de resposta T helper 2 (Th2) são

características típicas moleculares das formas de RSC com pólipos nasais (RSCcPN), e que estão intimamente relacionadas ao recrutamento, ativação e perpetuação da eosinofilia. Pacientes com RSC com pólipos nasais (RSCcPN) têm maior tendência de recidiva da doença após remoção cirúrgica em relação aos casos sem pólipos nasais (RSCsPN). Além disso, apresentam respostas distintas a diversos tipos de tratamentos medicamentosos, o que pode ter sua justificativa baseada em diferentes processos fisiopatogênicos (2, 3).

Apesar dos recentes avanços na elucidação molecular da fisiopatogenia das RSC, ainda há uma carência de evidências em relação a fatores etiológicos dessa doença.

### **1.2 Análise de diferença representacional (*representational difference analysis*, RDA).**

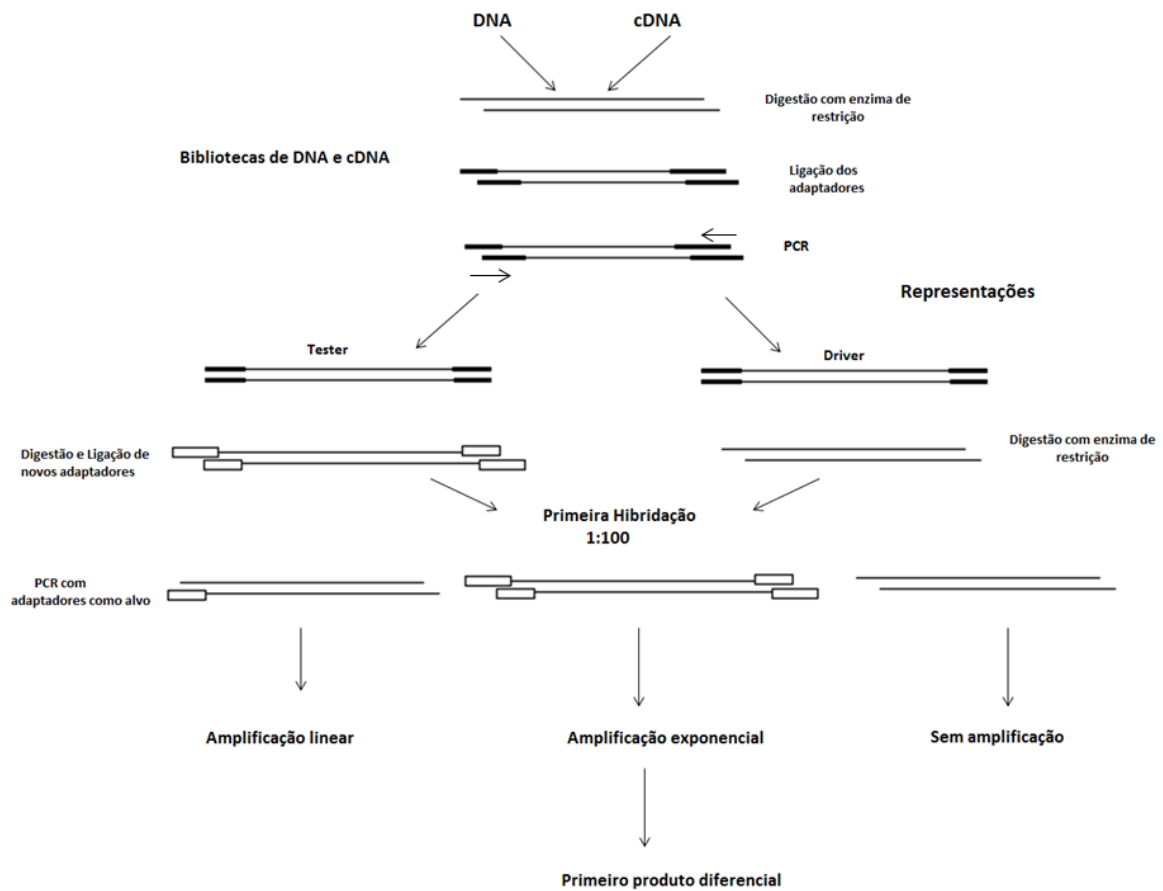
A RDA, descrita pela primeira vez em 1993 (5), é uma estratégia que permite a seleção positiva de diferenças genômicas presentes em um processo patológico em relação ao tecido normal do mesmo hospedeiro. A RDA envolve subtração entre 'representações' de dois tecidos mediante hibridação diferencial, de modo que o que é comum entre os tecidos é seletivamente eliminado, em favor de produtos 'diferenciais' que são amplificados. A vantagem da RDA é que não há necessidade de um conhecimento prévio das sequências a serem analisadas, desde que seja seguido um protocolo estritamente cuidadoso. O conjunto de sequências obtidas na RDA precisa ser analisado por ferramentas de bioinformática e, em seguida, ser confirmado por métodos complementares.

Sumariamente, RDA se baseia em hibridações subtrativas sequenciais entre genomas/transcritos do tecido doente e do tecido normal. Representações de fragmentos de genoma ou de cDNA são preparadas a partir de tecidos doente (*tester*) e normal (*driver*) do mesmo indivíduo. A seguir, essas coleções de DNA ou cDNA são separadamente tratadas com enzima de restrição para gerar bibliotecas de fragmentos de diferentes tamanhos.

A técnica é realizada a partir da extração de ácidos nucleicos de fragmentos de tecidos sadio e lesado de um mesmo órgão. Por meio de uma reação de transcriptase reversa, o RNA é transformado em cDNA. O cDNA e o DNA de ambos os fragmentos são clivados por uma enzima de restrição formando fragmentos com

extremidades coesivas que permitam sua ligação a um par de adaptadores por T4 ligase. Com a finalidade de produzir bibliotecas com grandes quantidades de produtos ligados a adaptadores, é feita uma reação de polimerase em cadeia (PCR) usando primers dirigidos a esses adaptadores. Após obtenção das bibliotecas, os primeiros adaptadores são clivados, passando-se a denominar de *driver* o tecido sadio e de *tester* o tecido lesado. Novos adaptadores são ligados ao *tester* para que aconteça a primeira hibridação subtrativa.

Uma mistura de *driver* e *tester* é preparada, garantindo que haja proporção maior de do primeiro do que do último, e submetida a aquecimento para separação de fitas duplas de DNA genômico ou cDNA, seguido de resfriamento para uma temperatura que permita a formação de híbridos, com incubação por 20 horas. Após esse tempo, os produtos totais são submetidos a amplificação por PCR, usando primers cujos alvos são os adaptadores ligado ao *tester*. Dessa forma, haverá amplificação exponencial apenas de híbridos presentes somente no *tester*, já que contêm adaptadores em ambas as extremidades. Enquanto isso, híbridos de *driver* com *driver* não serão amplificados, e hbridos de *tester* com *driver* sofrerão apenas amplificação linear, gerando acumulação insignificante. O resultado é confirmado em gel de agarose (Figura 1).



**Figura 1 Diagrama esquemático da técnica de RDA até a primeira hibridação**

Subsequentemente, novas trocas de adaptadores são feitas com novas rodadas de hibridização, objetivando o progressivo surgimento de bandas definidas, que são os produtos das diferenças presentes somente no *tester*, e que serão posteriormente sequenciadas. Várias descobertas importantes já foram feitas com base em RDA, com destaque para a identificação do herpesvirus humano 8 (HHV8) como causa do sarcoma de Kaposi associado à AIDS (8).

No presente estudo, buscamos aplicar a estratégia de RDA a uma amostra tecidual de um pólipso nasal, na tentativa de se encontrar algum agente candidato (genoma ou gene expresso) a ser usado para rastreamento em uma série de casos de RSCcPN. Para a RDA de cDNA, foi utilizado o protocolo de Hubank, et.al (7), com modificações.

## 2. OBJETIVO

Este projeto teve como objetivo identificar possíveis diferenças no conteúdo genômico e na expressão gênica tecidual entre tecidos de pólipos nasal e de mucosa normal do septo nasal de um mesmo paciente com RSCcPN, por meio de hibridação subtrativa de bibliotecas de DNA genômico ou de cDNA, mediante a estratégia de RDA.



### **3. PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras de tecidos**

As amostras de tecidos foram colhidas de onze pacientes diagnosticados com RSC com polipose, submetidos a cirurgia endoscópica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O pólipó nasal e um fragmento da mucosa do septo contralateral foram retirados e colocados imediatamente em meio essencial mínimo de Eagle (MEM), com 10% de soro fetal bovino e 15% de antibióticos (penicilina-estreptomicina 20.000 U/ml) e antimicóticos (anfotericina B 200µg/mL) e enviados imediatamente ao laboratório de Patogênese Viral, no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os tecidos foram lavados duas vezes com MEM para remover o excesso de debris e sangue e a seguir macerados em 1 mL de Trizol (Invitrogen) e armazenado em freezer a -70°C para posterior extração de ácidos nucleicos. As amostras foram colhidas como parte de um estudo previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, com número de processo 10466/08. Os pacientes ou responsáveis assinaram termos de consentimento livre e esclarecido. Tecidos de pólipó e controle de um dos pacientes, escolhido ao acaso, foram usados para a RDA, e os tecidos restantes foram guardados para testagem posterior, na busca de validar os resultados da RDA.

#### **3.2. Extração dos ácidos nucleicos**

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada de acordo com recomendações do fabricante de Trizol (Invitrogen), seguindo-se ressuspensão do produto em 50 µL de água ultrapura destilada autoclavada livre de RNase e DNase (Gibco).

#### **3.3 Tratamento com DNase**

A fim de evitar contaminação com DNA genômico, que seria crítica nos passos posteriores da construção das bibliotecas subtrativas, o RNA total foi tratado com 1 unidade

de DNase Amp Grade (Invitrogen), a 37°C por uma hora, seguindo-se inativação a 70°C por 15 minutos. Esse RNA foi utilizado para a reação de transcrição reversa.

### **3.4 Quantificação do ácido nucleico**

O RNA total foi quantificado utilizando espectrofotometria em equipamento Qbit (Thermo Scientific) com leitura no comprimento de onda de 260 nm. A pureza da amostra é avaliada pela razão da leitura 260/280 nm, que deve ser maior que 2,0.

### **3.5 Síntese da primeira fita de cDNA**

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando uma reação de transcrição reversa (Qiagen) com primers randômicos, seguindo o protocolo do fabricante.

### **3.6 Síntese da segunda fita de cDNA**

A segunda fita de cDNA foi feita na PCR randômica, utilizando a enzima Taq DNA Polimerase high Fidelity Phusion . A reação foi realizada como se segue:

DNA e cDNA ligado aos adaptadores: 1 µl

Tampão Taq DNA polimerase 10X (EasyGen): 10 µl

dNTP mix (10 mM): 2 µl

Primer randômico (500 µM): 2µl

DMSO: 2 µl

1 µl de Taq DNA polimerase Phusion (EasyGen)

Água ultrapura autoclavada para completar volume final de 100 µl.

Os parâmetros de ciclagem foram: 98°C por 30 segundos; 24 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos; seguindo-se extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para obtenção de extremidades abruptas foram utilizadas 50 u da enzima Klenow DNA polimerase.

### **3.7 Digestão do ácido nucleico com Mbol**

Todo ácido nucleico foi quantificado utilizando-se o Qbite (Thermo Scientific) para avaliar a quantidade de dupla fita necessária para os próximos passos. Utilizou-se 1,5 µg de ácido nucleico para digestão com a enzima Mbol (Thermo Scientific- Fermentas) como segue:

Ácido nucleico: 1,5 µg

Tampão R 10X: 20 µl

Mbol (5U/µl): 1 µl

Completo-se o volume final para 40 µl com água ultrapura autoclavada.

A reação foi mantida em banho-maria a 37°C por 16 horas e a enzima foi inativada por incubação a 65°C por 20 minutos.

### **3.8 Purificação do ácido nucleico digerido**

Posteriormente, as amostras foram purificadas utilizando-se o seguinte protocolo:

1. Foram adicionados 100 µL de fenolclorofórmio, seguido de agitação breve em vortex, centrifugação por 5 minutos a 12.000 x g e transferência do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL.
2. Foram adicionados 100 µL de clorofórmio, misturado em vortex, centrifugado por 5 minutos a 12.000x g e transferido o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL.
3. Foram adicionados 25 µL de NH<sub>4</sub>Ac 10 M, mais 250 µL de Etanol 100%
4. Ácido nucleico foi precipitado a -20°C durante 2 horas ou overnight, quando conveniente, seguindo-se centrifugação por 20 minutos a 12.000 x g.
5. Foram adicionados 1000 µL de etanol 70%, seguindo-se centrifugação por 5 minutos a 12.000x g, descarte do sobrenadante e secagem da *pellet* em papel absorvente.
7. O material foi ressuspenso em 20 µL de água ultrapura.

### **3.9 Ligação dos adaptadores R**

Na reação de ligação dos adaptadores, há uma etapa inicial de pareamento dos oligonucleotídeos (12 e 24 pares de bases), para em seguida ocorrer a ligação dos mesmos à dupla fita de DNA. As amostras foram aquecidas a 50°C por 1 minuto e resfriadas até

10°C com decréscimo de 1°C por minuto, permitindo o pareamento dos oligos R12 e R24. A reação foi montada como segue:

Ácido nucleico: 1 µg

Tampão T4 DNA ligase 10X: 10 µl

R12 (500 µM): 2 µl

R24 (500 µM): 2 µl

Água ultrapura autoclavada para um volume final de 100 µl.

Após o resfriamento a 10°C, foram adicionados 2 µl da enzima T4 DNA Ligase (5U/µl, Thermo Scientific-Fermentas), a reação foi agitada gentilmente, e incubada a 16°C por 14 horas. A enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos.

Sequências dos adaptadores R12 e R24 utilizados:

R12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R24: 5'-AGCACTCTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

### **3.10 Preparação das representações**

#### **3.10.1- Padronização da PCR**

Após a ligação dos adaptadores R foi realizada uma amplificação do ácido nucleico a ser utilizado na hibridização subtrativa. A reação de amplificação é padronizada a fim de se evitar o efeito de “*overcycling*”. Inicialmente foi realizada uma reação piloto e o produto da amplificação em diferentes ciclos analisado em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red. Após a padronização, o ciclo a ser utilizado para a geração das representações em larga escala foi escolhido considerando-se a saturação de síntese do DNA e a fase exponencial de amplificação. Nessa reação, o adaptador R24 na concentração de 500 µM foi utilizado como primer.

A reação piloto foi realizada como segue:

DNA e cDNA ligado aos adaptadores: 1 µl

Tampão Taq DNA polimerase 10X (EasyGen): 10 µl

dNTP mix (10 mM): 2 µl

R24 (500 µM): 2µl

DMSO: 2 µl

1 µl de Taq DNA polimerase Phusion (EasyGen)

Água ultrapura autoclavada para completar volume final de 50 µl.

Os parâmetros de ciclagem foram: 98°C por 30 segundos, mais 24 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; seguindo-se extensão final a 72°C por 10 minutos.

Alíquotas de 8 µl foram coletadas nos últimos 5 segundos da fase de extensão nos ciclos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24, e foram analisadas em gel de agarose a 1,5%. Assim foi determinado o número de 18 ciclos como ideal para DNA e cDNA de pólipo, e 16 para DNA e cDNA de septo nasal.

### **3.10.2 Geração das representações em larga escala**

Após a padronização da PCR foram realizadas novas reações para amplificação do produto para obtenção de um mínimo de 21 µg de DNA. O mesmo protocolo padronizado na etapa anterior foi utilizado para essa produção. Para as bibliotecas de pólipo e septo nasal foram realizadas 25 e 30 reações respectivamente, com obtenção de 21 µg de DNA. Esse produto foi digerido com *Mbol*.

## **3.11 Geração do DNA *driver* e *tester***

### **3.11.1 Geração do cDNA *driver***

Para o preparo do DNA *driver* as amostras de ambas as bibliotecas foram digeridas com a enzima *Mbol* para remoção do adaptador R, seguindo o protocolo: DNA: 21 µg, tampão R 10X (Fermentas): 70 µl, *Mbol* (5U/µl, Fermentas): 5 µl, completando-se a reação com água ultrapura autoclavada para volume final de 700µl.

A reação foi incubada por 16 horas a 37°C em banho-maria e interrompida a 65°C por 20 minutos. Os produtos da digestão foram purificados com o protocolo do item 3.8, quantificados como descrito anteriormente e armazenados a -20°C.

### **3.11.2 Geração do DNA *tester***

O DNA *tester* foi produzido ligando-se novos adaptadores, J12 e J24, a uma alíquota do material digerido. Os passos da ligação são os mesmos utilizados para o adaptador R, seguindo o protocolo: DNA *driver*: 1 µg, tampão T4 DNA ligase 10X: 10 µl; J12 (500 µM): 2 µl, J24 (500 µM): 2 µl, T4 DNA ligase : 1 µl, e água ultrapura autoclavada para volume final de 30 µl.

A eficiência da ligação foi testada por PCR, assim constituída: tampão Taq DNA polimerase 10X (EasyGen): 10 µl, dNTP mix (10 mM): 2 µl, J24 (500 µM): 2µl, MgCl<sub>2</sub> (25 µM): 6 µl, Taq DNA polimerase (EasyGen): 1 µl, mais 10 ng de cDNA ligado (1 µl da reação de ligação), e água ultrapura autoclavada completando volume final de 25 µl.

As reações foram realizadas em termociclador com os seguintes parâmetros: 72°C por 8 minutos, 95°C por 1 minuto, 17 ciclos: 95°C por 1 minuto, 70°C por 3 minutos, mais extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto final foi a seguir analisado em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Re.

Sequência dos adaptadores utilizados:

J12: 5'-GATCTGTTTCATG-3'

J24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

Na análise do gel de agarose deve ser observado um rastro de amplificação dos fragmentos, indicando que a ligação do J24 foi satisfatória para o procedimento dos passos posteriores do método RDA.

### 3.12 Primeira hibridização subtrativa

Para a primeira hibridização subtrativa 10 µg do *driver* foi adicionado a 0,1 µg de *tester* J, na razão driver/tester de 100:1.

A mistura de *driver* e *tester* foi concentrada (por centrifugação a vácuo) para volume final de 1,0 µl. Adicionou-se 10µl de tampão Ee3x (60 µl de EPPS 0,5 M, 6 µl de EDTA 0,5 M, 934 µl de água) e a reação foi incubada a 37°C por 5 min. As amostras foram desnaturadas a 98°C por 5 min e colocadas a 67°C, quando se adicionou 1 µl de NaCl 5 M (para evitar a formação de precipitados). A hibridização seguiu por 20 horas a 67°C. Ao final da hibridização, o material foi diluído em 200 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

### 3.13 Geração do primeiro produto diferencial (PD1)

A geração do PD1 ocorreu em etapas. Em um primeiro momento foi realizada PCR para o preenchimento das extremidades e criação dos sítios de ligação para o J24, permitindo que apenas os híbridos *tester/tester* fossem exponencialmente amplificados. As reações da primeira PCR constituíram de 5 µl do produto da primeira hibridização, tampão Taq DNA polimerase 10X :10 µl, dNTP mix (10 mM): 2 µl, J24 (500 µM): 2µl, DMSO: 2 µl, 1

µl de Taq DNA polimerase Phusion (EasyGen), água ultrapura autoclavada para completar volume final de 50 µl. Os parâmetros utilizados foram 98°C por 30 segundos, 11 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos; seguindo-se extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto dessa primeira reação foi diluído 5 vezes seriadamente e 20 µl foram utilizados como molde para uma segunda reação de amplificação, com volume final de 200 µl, seguindo o mesmo protocolo da primeira. Os produtos foram diluídos para que DNA de fita simples, incluindo híbridos *driver/driver* não fossem amplificados e produtos de amplificação linear de híbridos *driver/tester* tivessem sua concentração reduzida. Na segunda PCR os híbridos *tester/tester* são amplificados. O programa utilizado foi o mesmo utilizado na primeira PCR com variação do número de ciclos utilizados (30 ciclos). Os produtos dessas reações foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), quantificados como descrito anteriormente e analisados em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red.

### **3.14 Troca de adaptadores do primeiro produto diferencial (PD1)**

Para a remoção do adaptador J24, 2 µg do PD1 foram digeridos com a enzima *Mbol*. Na reação foram utilizados 10 µl de tampão R 10X, 5 µl de *Mbol* (5 U/µl), 2 µg do PD1, e água ultrapura autoclavada completando o volume para 100 µl.

A reação foi incubada a 37°C por 16 horas e inativada a 65°C por 20 minutos. Em seguida, foi realizada purificação dos produtos como o protocolo do item 3.8 e quantificação como descrito anteriormente.

Novos adaptadores, N12 e N24, foram utilizados na reação de ligação de 200 ng do PD1. O protocolo foi o mesmo utilizado nas ligações anteriores: tampão T4 DNA ligase 10X: 10 µl, N12 (500 µM): 2 µl, N24 (500 µM): 2 µl, 200 ng de PD1, 1 µl de T4 DNA ligase (Fermentas), mais água ultrapura autoclavada completando o volume final para 30µl.

A eficiência da ligação aos adaptadores N foi testada por PCR: 10n g do produto de ligação ao adaptador N24, tampão Taq DNA polimerase 10X (EasyGen): 10 µl, dNTP mix (10 mM): 2 µl, N24 (500 µM): 2µl, DMSO: 2 µl, 1 µl de Taq DNA polimerase Phusion (EasyGen), mais água ultrapura autoclavada completando volume final de 50 µl.

Os parâmetros utilizados foram: 98°C por 30 segundos, mais 24 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 72°C por 10 minutos, mais água autoclavada para completar volume final de 50 µl. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1,5%.

As sequências dos adaptadores N12 e N24 utilizados foram:

N12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

### **3.15 Segunda hibridização subtrativa e geração do segundo produto diferencial (PD2)**

Na segunda hibridização subtrativa, o DNA *driver* foi adicionado ao DNA *tester* ligado ao adaptador N, em uma razão driver/tester de 800:1. As reações seguiram o mesmo protocolo da primeira hibridização subtrativa. Após a subtração foram feitos os experimentos para a geração de PD2. Na primeira PCR foram adicionados 5 µl da solução de hibridização diluída, tampão Taq DNA polimerase 10X (EasyGen): 10 µl, dNTP mix (10 mM): 2 µl, N24 (500 µM): 2µl, DMSO: 2 µl, 1 µl de Taq DNA polimerase Phusion (EasyGen), mais água ultrapura autoclavada completando volume final de 50 µl.

Os parâmetros utilizados foram: 98°C por 30 segundos, mais 11 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguindo-se extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto da primeira PCR foi diluído 10 vezes em água autoclavada e da solução resultante 10 µl foram utilizados como molde para a segunda amplificação, com volume final de 100 µl (mantendo a proporção de 1:10). Os parâmetros utilizados foram os mesmos da primeira reação, porém com 30 ciclos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%. Seguiu-se a purificação dos produtos diferenciais (PDII) recortados diretamente do gel com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

### **3.16 Terceira hibridização subtrativa e geração do terceiro produto diferencial (PD3)**



Na terceira hibridização subtrativa o DNA *driver* foi adicionado ao DNA *tester* ligado ao adaptador R, em uma razão *driver/tester* de 1600:1. As reações seguiram o mesmo protocolo da primeira hibridização subtrativa. Após a subtração, foram feitos os experimentos para a geração de PD3.

Na primeira reação de PCR foram adicionados aos 5  $\mu$ l da solução de hibridização diluída: Tampão Taq DNA polimerase 10X (EasyGen): 10  $\mu$ l, dNTP mix (10 mM): 2  $\mu$ l, R24 (500  $\mu$ M): 2 $\mu$ l, DMSO: 2  $\mu$ l, 1  $\mu$ l de Taq DNA polimerase Phusion (EasyGen), mais água ultrapura autoclavada para completar volume final de 50  $\mu$ l.

Os parâmetros utilizados foram: 98°C por 30 segundos, 11 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguindo-se extensão a 72°C por 10 minutos.

O produto da PCR foi diluído 10 vezes em água autoclavada, e da solução resultante 10  $\mu$ l foram utilizados como molde para a segunda amplificação com volume final de 100  $\mu$ l (mantendo a proporção de 1:10). O programa utilizado foi o mesmo da primeira reação, porém com 30 ciclos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%. Seguiu-se a purificação dos produtos diferenciais (PDII) recortados diretamente do gel com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

### 3.17 Sequenciamento de Nova Geração (SNG)

O sequenciamento de nova geração (SNG) baseia-se no conceito de “sequenciamento por síntese”, o qual requer que os alvos a serem sequenciados sejam convertidos numa biblioteca de fragmentos, permitindo a sua imobilização e amplificação. Enquanto um sequenciador de eletroforese processa no máximo 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo (12).

As bandas purificadas foram quantificadas e 0,5 pM de cada uma foi utilizado para o sequenciamento no equipamento MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) utilizando o kit MiSeq Reagent kit v2 (300 ciclos), que é capaz de gerar 15 Gb de dados em um total de 25 milhões de *reads* de aproximadamente 300 pares de bases.

### 3.18 Bioinformática

Para a anotação das sequências obtidas (*contigs* e *single reads*), elas foram submetidas a diferentes análises de similaridade de sequência (algoritmos BLAST N e BLAST X), utilizando dois bancos de dados distintos: banco completo de sequências de nucleotídeos (nt) NCBI e banco completo de sequências de proteínas não redundantes Swiss-Prot.

Além desses bancos de dados, uma segunda análise das sequências foi feita, utilizando o banco de dados Mega Blast e BlastX.

### **3.19 Confirmação por PCR**

Das sequências analisadas, as que mais se destacaram foram selecionadas para que fossem sintetizados primers e, por meio de PCR em tempo real pela estratégia de Syber (Kappa), amostras de mais 10 pacientes colhidas de pólipos nasal e septo nasal, foram testadas.

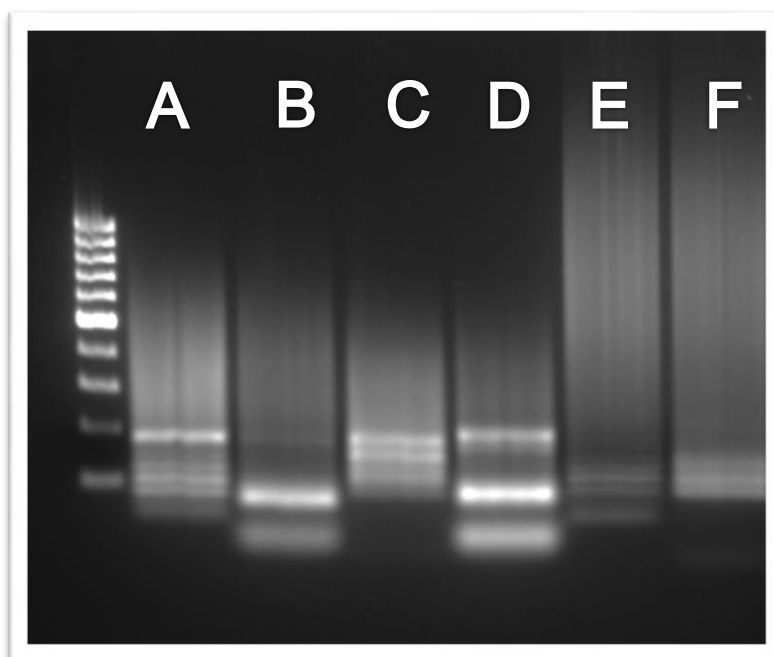
## **4. Resultados**

### **4.1 Controle das reações**

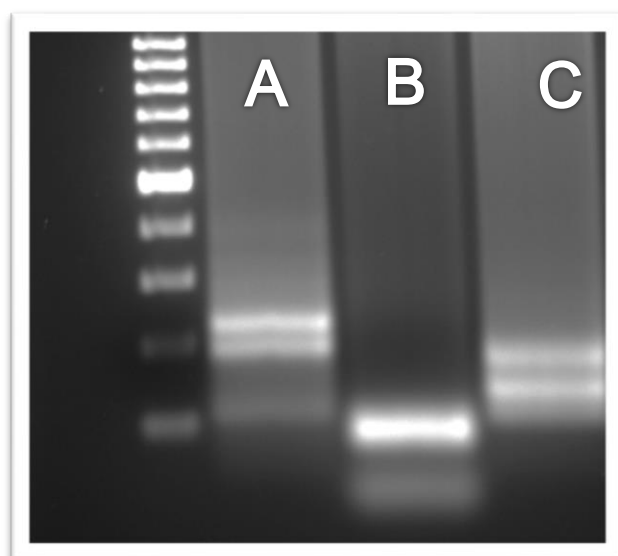
Paralelamente a RDA realizada foi feita RDA controle utilizando as amostras do mesmo paciente, para que se pudesse confirmar a eficácia da estratégia. Assim, 10ng de um produto de PCR de vírus de Leishmania LRV1-4 foi propositalmente adicionado ao *tester* submetido à RDA, para servir de alvo controle positivo.

### **4.2 Produtos diferenciais**

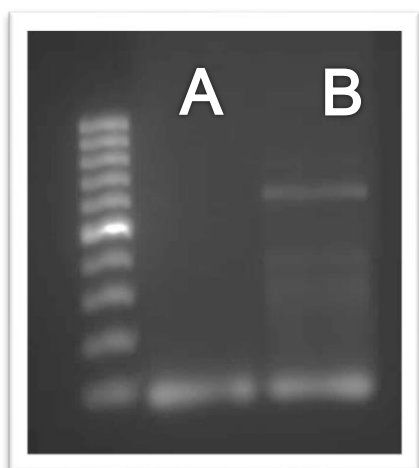
Foram realizadas três hibridações subtrativas, que geraram 'arrasto' com duas bandas na RDA de cDNA e duas bandas na RDA de DNA (Figura 2, 3, 4, 5)



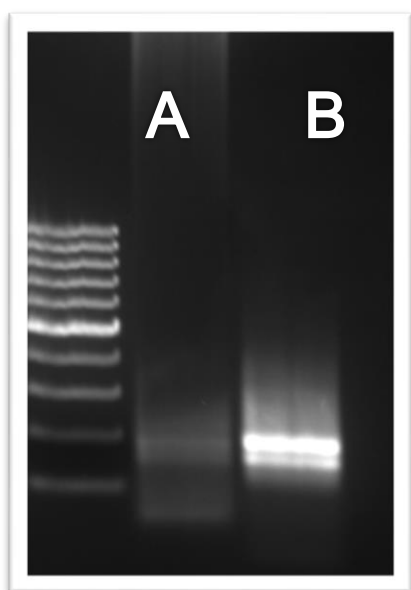
**Figura 2:** Produtos diferenciais 1 e 2 das bibliotecas de cDNA. **A:** PD1 de cDNA com sequência controle de LRV 1-4. **B:** PCR para LRV 1-4 do material em A. **C:** PD2 de cDNA com sequência controle de LRV1-4. **D:** PCR para LRV 1-4 do material em C. **E:** PD1 de cDNA. **F:** PD2 cDNA.



**Figura 3:** Produtos diferenciais das bibliotecas de cDNA. **A:** PD3 de cDNA com sequência controle de LRV 1-4. **B:** PCR para LRV 1-4 do produto em A. **C:** PD3 da biblioteca de cDNA.



**Figura 4:** Produto diferencial 1 da biblioteca de DNA. **A:** Primeira tentativa de hibridação para biblioteca de cDNA. **B:** Primeiro produto diferencial da biblioteca de DNA.



**Figura 5:** Produtos diferenciais 2 e 3 da biblioteca de DNA. **A:** Produto diferencial 2. **B:** Produto diferencial 3.

### 4.3 Análise do sequenciamento

#### 4.3.1 Montagens

Para analisar os resultados provenientes do sequenciamento de nova geração, foi necessário montar as sequências obtidas em *contigs*, por meio de um software específico. O número de pares de *reads* e o tamanho dos *reads* para cada amostra é apresentado na tabela 1.

**Tabela 1 - Número de *reads* por amostra**

	Read pairs	Read size
Banda 1 DNA	551,204	301
Banda 2 DNA	422,300	301
Banda 1 cDNA	211	301
Banda 2 cDNA	499,573	301

A montagem dos reads foi feita utilizando o software SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), configurado para utilizar valores de *k-mer* entre 31 e 121.. A montagem da amostra “Banda 1 cDNA” não produziu resultados.

#### 4.3.2 Anotação

Os *scaffolds* foram anotados automaticamente usando o BLASTx (Altschul *et al.*, 1997) com e-value de corte 1e-5 contra os bancos do NCBI e Swiss-Prot (Bairoch *et al.*, 1996). A tabela 3 abaixo apresenta os resultados da anotação automática.

**Tabela 2- Resultados da anotação automática**

	Scaffolds	Anotados (NCBI)	Anotados (Swiss-Prot)
Banda 1 DNA	704	373	306
Banda 2 DNA	401	202	41
Banda 1 cDNA	-	-	-
Banda 2 cDNA	2,515	1,820	1,208

#### 4.4 Análise das Sequências

Dentre os resultados obtidos com os bancos de dados NCBI e Swiss-Prot, os *contigs* que despertaram maior interesse considerando possíveis patogenias para pólipos nasais, foram jogados contra o banco de dados do Gene Bank utilizando a

ferramenta BlastX e MegaBlast (Tabelas 4 e 5). Foram consideradas viáveis aquelas sequências em que a identidade era maior que 95% e o e-value menor que 0,05.

Além das sequências listadas, outras 597 sequências não encontraram nenhuma similaridade nos bancos de dados citados.

Tabela 3: Identificação dos contigs obtidos com SNG-DNA

Contigs	Análise Primária (NGS)	Análise Secundária (Blast)	Organismo
NODE_137_length_481_cov_1.53611_ID_38155	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria
NODE_262_length_460_cov_1.06195_ID_41353	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	Bactéria
NODE_380_length_434_cov_1.15016_ID_44317	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Bactéria
NODE_381_length_433_cov_1.15385_ID_44343	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
NODE_175_length_474_cov_1.01983_ID_39117	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	Bactéria
NODE_137_length_481_cov_1.53611_ID_38155	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria
NODE_350_length_441_cov_1.125_ID_43563	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria
NODE_205_length_469_cov_1.38793_ID_39897	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria
NODE_165_length_476_cov_1.01408_ID_38857	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria
NODE_148_length_479_cov_1.00559_ID_38415	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria
NODE_71_length_501_cov_0.947368_ID_36439	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
NODE_293_length_454_cov_117.886_ID_47257	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria

<b>NODE_20_length_569_cov_2.29911_ID_35113</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_248_length_462_cov_1.05572_ID_40989</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéria
<b>NODE_230_length_464_cov_1.04956_ID_40547</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_57_length_512_cov_1.03325_ID_36075</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_16_length_578_cov_1.10066_ID_35009</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_212_length_467_cov_1.04046_ID_40079</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_233_length_464_cov_0.985423_ID_40625</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_18_length_560_cov_1.38041_ID_8177</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_88_length_478_cov_1.0084_ID_9971</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéria
<b>NODE_62_length_506_cov_0.935065_ID_36205</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bactéria
<b>NODE_30_length_557_cov_1.52982_ID_35373</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Nenhuma Similaridade</i>	Bactéria
<b>NODE_35_length_551_cov_0.988372_ID_35503</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_18_length_560_cov_1.38041_ID_8177</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria



<b>NODE_88_length_478_cov_1.0084_ID_9971</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_164_length_476_cov_1.01408_ID_38831</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bactéria
<b>NODE_309_length_451_cov_1.09091_ID_42497</b>	<i>Neisseria subflava</i>	<i>Neisseria subflava</i>	Bactéria
<b>NODE_623_length_162_cov_102.976_ID_61091</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_58_length_511_cov_0.953846_ID_36101</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Nenhuma Similaridade</i>	Bactéria
<b>NODE_635_length_157_cov_62.5278_ID_66061</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_111_length_487_cov_0.983607_ID_37479</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria
<b>NODE_111_length_471_cov_1.02857_ID_10569</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria
<b>NODE_79_length_499_cov_1.12698_ID_36647</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria
<b>NODE_385_length_432_cov_1.10932_ID_44447</b>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria
<b>NODE_393_length_123_cov_14498_ID_22479</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_225_length_341_cov_535.273_ID_17997</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_249_length_304_cov_12.2568_ID_21395</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_27_length_547_cov_1.11268_ID_8411</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria

NODE_306_length_198_cov_4948.36_ID_22525	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_399_length_122_cov_7463_ID_22491	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_52_length_501_cov_0.947368_ID_9035	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_397_length_122_cov_8616_ID_22487	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_260_length_260_cov_1.41007_ID_14159	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_369_length_139_cov_4591.17_ID_22331	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_398_length_122_cov_9763_ID_22489	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_394_length_122_cov_6120_ID_22481	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_392_length_123_cov_5834_ID_22477	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_391_length_123_cov_3657.5_ID_22475	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_396_length_122_cov_10658_ID_22485	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_19_length_556_cov_1.09195_ID_8203	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_81_length_481_cov_1_ID_9789	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_146_length_451_cov_1.09091_ID_11453	<i>Hydrogenophaga intermedia</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactéria
NODE_78_length_482_cov_0.99723_ID_9711	<i>Corynebacterium sp</i>	<i>Corynebacterium sp</i>	Bactéria

<b>NODE_174_length_426_cov_751.643_ID_19329</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_179_length_423_cov_0.937086_ID_12181</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_224_length_342_cov_233.344_ID_15021</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_149_length_450_cov_866.793_ID_15747</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_173_length_427_cov_1.15686_ID_12051</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_295_length_223_cov_909.284_ID_17995</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_232_length_332_cov_1741.48_ID_17311</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_300_length_209_cov_1375.34_ID_19711</b>	<i>Human herpesvirus 6A</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Bactéria
<b>NODE_400_length_427_cov_1.17647_ID_44837</b>	NAV2_HUMAN Neuron navigator 2	NAV2_HUMAN Neuron navigator 3	Gene Humano
<b>NODE_282_length_456_cov_1.07463_ID_41847</b>	HUMAN LINE-1 retrotransposable element ORF2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bactéria
<b>NODE_376_length_435_cov_1.1465_ID_44213</b>	HUMAN LINE-1 retrotransposable element ORF3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria
<b>NODE_369_length_437_cov_1.13924_ID_44031</b>	Homo sapiens BAC clone RP11-425P5 from 7	Homo sapiens BAC clone RP11-425P5 from 8	Gene Humano
<b>NODE_352_length_440_cov_1.12853_ID_43615</b>	HUMAN Putative uncharacterized protein PRO2829	Homo sapiens autism susceptibility candidate 2 (AUTS2)	Gene Humano

<b>NODE_213_length_467_cov_1.02312_ID_40105</b>	Neuroblastoma breakpoint family member 9	Neuroblastoma breakpoint family member 10	Gene Humano
<b>NODE_138_length_457_cov_1.05952_ID_11245</b>	HUMAN Zinc finger protein 283	Homo sapiens TNF receptor-associated protein 1 (TRAP1)	Gene Humano
<b>NODE_148_length_451_cov_1.09091_ID_11505</b>	HUMAN UPF0764 protein C16orf89	Human DNA sequence from clone RP11-563J2 on chromosome 10	Gene Humano

**Tabela 4: Identificação dos contigs obtidos com SNG-cDNA**

<b>Contig</b>	<b>Análise Primária (NGS)</b>	<b>Análise Secundária (Blast)</b>	<b>Organismo</b>
<b>NODE_1020_length_474_cov_1.01983_ID_124827</b>	Vaccinia virus	Vaccinia virus	Vírus
<b>NODE_1718_length_428_cov_1.17264_ID_142069</b>	Monkeypox virus	Vaccinia virus	Vírus
<b>NODE_643_length_490_cov_0.97561_ID_115337</b>	Yoka poxvirus	Vaccinia virus	Vírus
<b>NODE_644_length_490_cov_0.97561_ID_115363</b>	Human Rhinovirus 14	Human Rhinovirus 15	Vírus
<b>NODE_1181_length_467_cov_1161.26_ID_189529</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_37_length_661_cov_1.82037_ID_101191</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_2003_length_292_cov_96.3743_ID_145265</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria

<b>NODE_2452_length_127_cov_23.3333_ID_251132</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1838_length_381_cov_1525.72_ID_175519</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1842_length_378_cov_1555.25_ID_178957</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1936_length_321_cov_35.105_ID_174261</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_2171_length_233_cov_96.1429_ID_158571</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1388_length_453_cov_1_ID_133931</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1154_length_468_cov_1168.6_ID_145581</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_123_length_568_cov_10.9754_ID_236135</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1668_length_433_cov_1336.12_ID_206085</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1650_length_434_cov_1314.23_ID_187367</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1668_length_433_cov_1336.12_ID_206085</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1558_length_443_cov_1323.78_ID_241609</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1755_length_425_cov_1317.64_ID_186347</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1788_length_416_cov_945.464_ID_161001</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1798_length_410_cov_1425.98_ID_248313</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1803_length_404_cov_61.3357_ID_238457</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1795_length_411_cov_1359.62_ID_17928</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1805_length_404_cov_106.604_ID_244739</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1834_length_383_cov_1058.54_ID_15260</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria
<b>NODE_1815_length_395_cov_1421.86_ID_187903</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	Bactéria

<b>NODE_107_length_581_cov_1.58043_ID_102725</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_132_length_564_cov_1.18284_ID_103219</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_1340_length_456_cov_1.07463_ID_132787</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_1340_length_456_cov_1.07463_ID_132787</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_2474_length_125_cov_103.5_ID_242803</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_2476_length_125_cov_202.5_ID_242805</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_2490_length_123_cov_110_ID_247573</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_617_length_491_cov_0.972973_ID_114661</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_690_length_488_cov_0.980926_ID_116559</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria
<b>NODE_2474_length_125_cov_103.5_ID_242803</b>	<i>Leuconostoc</i> <i>Mesenteroides</i>	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Bactéria

#### 4.5 PCR em tempo real

Diante dos resultados, algumas bactérias foram selecionadas para serem testadas nas demais amostras colhidas no projeto: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria sp*, *Corynebacterium sp*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Serratia sp*. Foram sintetizados primers de sequências conservadas (tabela 6), já usados em estudos prévios, uma vez que nas análises pode-se verificar uma variedade de genes relacionados à mesma espécie de bactérias.

**Tabela 5: Tabela de Primers de Bactérias**

Bactéria	Primer	Sequências 5' -3'	Referência
<i>Neisseria sp</i>	Neisseria F	CGCCATTTCTTCCGCCAACAC CA	14
<i>Neisseria sp</i>	Neisseria R	CCAGCCCGAAAGTAGCCGATG C	14
<i>Serratia sp</i>	Serratia F	GGGAGCTTGCTCACTGGGTG	15
<i>Serratia sp</i>	Serratia R	GCGAGTAACGTCCAGTTGATG AGCGTAT	15
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S.matophilia F	GCTGGATTGGTTCTACGAAAA CG	16
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S.matophilia R	ACGCAGTCACTCCTTGCG	16
<i>Corynebacterium sp.</i>	Coryne. F	GAAGTCGTCAACAAGG	17
<i>Corynebacterium sp.</i>	Coryne R	CAAGGCATCCACTGC	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	S. aureus F	GTTATTAGGGAAGAACATATGT G	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	S. aureus R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA CC	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P. aeruginosa F	AGGGCAGTAAGTAAGTTAATA CCTTGCT	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P. aeruginosa R	CCACCTCTACCGTACTCTAGCT CAAG	15

Foi feita PCR para essas bactéria nas amostras de tecidos de 10 pacientes, e os resultados foram negativos para todas.

Apesar de nosso interesse em infecções bacterianas na região dos seios paranasais, não há nenhum indício de que a causa da formação de pólipos nasal seja bacteriana, portanto, para os ensaios a seguir *primers* das sequências obtidas para

genes humanos e para o vírus vaccinia foram desenhados, de acordo com as sequencias obtidas.



## 5. DISCUSSÃO

Foram colhidas amostras de tecidos de pólipo nasal e de mucosa normal de 10 pacientes, e dentre as amostras colhidas, um par de pólipo e tecido normal foi selecionado ao acaso para ser usado na RDA. Os outros 9 serviram para validar resultados, confirmando a presença nos pólipos das sequências indicadas pela RDA. Caso alguma sequência candidata fosse detectada em algumas dessas 9, isso serviria como base para alargar o estudo a um número mais abrangente de amostras de pólipos nasais.

Toda cautela foi exercitada na coleta de amostras de tecido normal, que teve como alvo o septo nasal do lado oposto àquele que apresentava o pólipo, minimizando chances de que algum tecido lesado ser incluído no *driver*, prejudicando a RDA.

A utilização da estratégia de RDA foi escolhida para que, em *rounds* sucessivos de amplificação e subtração, pudéssemos enriquecer as bibliotecas de sequenciamento de última geração para sequências de genes predominantes nos pólipos. Essa técnica já permitiu descobertas importantes como HHV-8 em sarcoma de Kaposi associado AIDS (8), e genes relacionados à endometriose (12).

Diferentemente de outros estudos publicados com a mesma técnica, neste trabalho utilizamos um produto de PCR do vírus de *Leishmania* 6 que foi artificialmente adicionado na extração de ácidos nucleicos do pólipo (*tester*). Foi possível encontrá-lo em cada uma das hibridações sucessivas, mostrando que a técnica de enriquecimento para sequências presentes no *tester* funcionou. Devido à baixa quantidade desse controle que foi adicionada à reação, é possível afirmar que a RDA não somente consegue selecionar produtos presentes apenas no *tester*, como também é capaz de, a cada rodada, ampliar a quantidade de sequências que talvez passariam despercebidas em outras metodologias.

Foram usados no presente estudo os mesmo passos propostos por Hubank em 1994 para obtenção do produto diferencial. Entretanto, nos estudos iniciais empregando RDA, o procedimento de sequenciamento foi feito pelo método de Sanger (8).

Como a sequência do produto era desconhecida, utilizava-se a estratégia de clonagem, inserindo o produto de PCR da RDA em um vetor plasmidial, usando a

seguir primers do vetor para o sequenciamento. O presente estudo é o primeiro de que temo notícia que combinou RDA com o sequenciamento de nova geração, permitindo que fossem descobertas sequências úteis para rastreamento, que não seriam vistas numa clonagem mais sequenciamento por método de Sanger.

O método de SNG faz levantamento minucioso de cada sequência presente na amostra. Por ser altamente sensível, a RDA resultou num amplo elenco de sequências, incluindo muitas cuja correlação com polipose nasal se torna difícil. Cumpre salientar que as sequências obtidas pelos *contigs* foram usadas para minerar dois bancos de dados, o Swiss-Prot e Blast X, e em seguida confirmadas por Mega Blast e Blast N. Foram consideradas somente sequências com e-values seguros, e com identidade maior que 95%, permitindo excluir alguns patógenos que apareceram nos reads iniciais.

Para as sequências de maior interesse, foram sintetizado primers a fim de confirmar a presença desses genes e patógenos nas amostras, utilizando qPCR pela metodologia de Syber. Apesar de ser uma técnica sensível capaz de detectar pequenos fragmentos, o SNG mostrou em estudos anteriores (13) ser mais eficaz em termos de sensibilidade, sendo possível detectar sequências que a PCR talvez não detecte. Entretanto, como o objetivo de nosso estudo é encontrar uma possível causa da polipose nasal em pacientes com rinosinusite crônica, as sequências que não foram amplificadas no qPCR foram consideradas insignificantes, já que possivelmente o pólipos nasal deveria provavelmente conter abundantes cópias do gene em causa.

Até o momento, o estudo não revelou um agente ou gene causador de RSCcPN, mas os resultados apresentados indicam interessantes genes ainda ser rastreados em tecidos de pólipos. Destaca-se o elevado número de sequências desconhecidas, presentes nos pólipos mas que não encontram similaridade com nenhuma sequência depositada em bancos de dados. Estamos atualmente testando os pólipos nasais para genes humanos e poxvirus.

## 6. CONCLUSÕES:

- 1- A estratégia de RDA permitiu sequenciar genes cuja presença é enriquecida em pólipos, em relação à mucosa nasal normal de um paciente com RSCcPN.
- 2- Com base no rastreamento por PCR de 9 pacientes com RSCcPN, as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria sp*, *Corynebacterium sp*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Serratia sp* não devem estar relacionados com a causa de pólipos nasais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brook I. Acute and chronic bacterial sinusitis. **Infect Dis Clin North Am.** 2007 Jun;21(2):427-48, vii.
2. FOKKENS, W J et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012: A summary for otorhinolaryngologists. **Rhinology**, Amsterdam, v. 1, n. 50, p.1-12, mar. 2012.
3. Pilan, R.R. *et al.* Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. **Rhinology**, São Paulo, v. 2, n. 50, p.129-138, jun. 2012.
4. Jones NS. CT of the paranasal sinuses: a review of the correlation with clinical, surgical and histopathological findings. **Clin Otolaryngol.** 2002;27(1):11-7.
5. Wounter Huvenne, M.D. *et al* Chronic Rhinosiusitis with and without nasal polyps: what is the difference? **Current Allergy and Asthma Reports**, 9:213–220,2009.
6. Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., Wigler, M. Cloning the difference between two complex genomes. **Science**, v. 259, p. 946-951, 1993.
7. Hubank,M., Schatz,D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 25, 1994.
8. Chang, Y., *et al* Identification of Herpesvirus-Like DNA sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. **Science**, v. 266, p. 1865 -1869, 1994.
9. Altschul *et al.*, 1997. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.**
10. Bankevich *et al.*, 2012. **SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.**
11. Bairoch *et al.*, 1996. **The SWISS-PROT Protein Sequence Data Bank and Its New Supplement TREMBL.**
12. CHEN, Qi *et al.* Identification of endometriosis-related genes by representational difference analysis of cDNA. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, [s.l.], v. 52, n. 2, p.140-145, 25 jan. 2012
13. GIT, A. *et al.* Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. **Rna**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.991-1006, 1 abr. 2010

14. ZHU, Hongfei et al. Development of a Multiplex PCR Assay for Detection and Genogrouping of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.46-51, 16 nov. 2011. American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/jcm.00918-11.
15. Wilson VL, Tatford BC, Yin X, Rajki SC, Walsh MM, LaRock P. Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria. *J Microbiol Methods*. 1999 Dec;39(1):59-78
16. GALLO, Stephanie Wagner et al. A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 108, n. 3, p.390-391, maio 2013
17. AUBEL, D. et al. Genomic Diversity of Several *Corynebacterium* Species Identified by Amplification of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Regions. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.767-772, 1 jul. 1997. Microbiology Society. DOI: 10.1099/00207713-47-3-767
18. Jaffe RI, Lane JD, Albury SV, Niemeyer DM. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol*. 2000 Sep;38(9):3407-12.