

Módulo DNA, Diversidade e Hereditariedade



Apresentação

Este módulo faz parte do projeto Imagine, da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo um projeto de solidariedade internacional que visa a inclusão científica e o intercâmbio cultural entre os povos. Com ele, procura-se discutir sobre diversidade e variabilidade biológicas entre os seres vivos, sobre suas semelhanças e diferenças, assim como entre os seres humanos, que naturalmente variam tanto “dentro” como “entre” os diferentes povos e etnias.

A compreensão desta temática, de tamanha complexidade, demanda um conjunto de atividades e discussões, que vão de debates com os participantes de grupos envolvidos a apresentação de vídeos, aulas explicativas, práticas e vivências diversificadas, que culminam com o estudo molecular do DNA e suas implicações na diversidade e na hereditariedade.

Para alcançar, no entanto, este universo microscópico e molecular, foi estabelecida uma estratégia que vai da observação macroscópica até uma interpretação do universo molecular.

Os conceitos de diversidade e variabilidade podem ser trabalhados por meio de coletas e classificação de materiais, como partes de plantas, animais etc. Da observação atenta do material coletado, práticas são propostas, como as que envolvem identificação de suas semelhanças e diferenças, considerando o estabelecimento de critérios de agrupamento. Derivando-se dessa abordagem, é possível avançar na discussão sobre a observação e interpretação dos tipos humanos, por meio de critérios que nos permitem reuni-los em variados e flexíveis subgrupos.

Importante ressaltar que os critérios a serem estabelecidos, muitas vezes, dependem da mensuração de exemplares, por isso, medições com instrumentos variados são importantes ferramentas a serem exploradas. O conjunto destas atividades pretende levar os participantes a perceber que qualquer tipo de classificação é subjetiva.

Módulo DNA, Diversidade e Hereditariedade



Contudo, nem todas as características possíveis de serem usadas como critérios de agrupamento estão disponíveis para observação a olho nu, uma vez que nosso universo vai do macro ao microscópico. Práticas experimentalmente mais elaboradas podem auxiliar no reconhecimento destas características, como a cromatografia em papel ou, mesmo, a extração de DNA de diferentes espécies (visível a olho nu como um aglomerado de moléculas).

Vale lembrar que, mesmo observando aglomerados de moléculas de DNA, não é possível compreendermos prontamente os processos que regem a produção de moléculas que, por meio de múltiplas interações, participam da constituição das características dos seres vivos. Práticas simples, usando peças de montagem, podem nos auxiliar no entendimento de como dão-se estes mecanismos. Além disso, estas práticas estimulam discussões acerca do código genético, quanto à sua organização e o modo como é decifrado pelas células.

Finalmente, o trabalho com técnicas mais complexas, que demandam um suporte tecnológico específico, permite a identificação do material genético com grau maior de detalhamento, inclusive com a possibilidade de compará-lo inter e intraespecificamente.

Coleta e Classificação de Materiais



Objetivo Geral

Compreender sistemas de classificação.

Objetivos Específicos

- 1) Discutir o conceito de critério.
- 2) Estabelecer critérios de classificação e aplicá-los em material obtido em coletas.
- 3) Concluir que critérios de classificação são subjetivos.

1

Coletando o Material

- Estabelecer dois a três locais, em diferentes ambientes nos arredores da própria comunidade onde vivem, trabalham ou estudam os participantes, para serem usados como pontos de coleta de itens de material biológico e/ou não biológico (por exemplo, folhas, flores, frutos, pedra, lixo etc.).
- Dividir os participantes em 3 a 4 grupos.
- Cada grupo deverá coletar de 5 a 10 unidades diferentes de cada um dos itens previamente determinados. O número de itens dependerá da quantidade de grupos formados, por exemplo, para 4 grupos coletar: 1) pedras, 2) folhas, 3) flores e 4) lixo.
- Solicitar que cada grupo dirija-se a um dos locais determinados para realizar as coletas.
- Sugere-se um tempo de coleta de 15 a 30 minutos.

Ampliando a Discussão!

Neste momento, você poderá solicitar aos participantes que descrevam o ambiente das coletas com intuito de discutir sobre espécies nativas, exóticas, ação antrópica, condições climáticas, relevo etc.

2 Classificando o Material Coletado

- Reunir, em um ambiente propício (ex: mesa ou bancada), os materiais coletados, agrupando-os por item. Por exemplo, juntar todas as folhas coletadas pelos diferentes grupos em um único conjunto, conforme a figura:



Os itens não estão separados por critério de classificação

- Discutir o conceito de critério e solicitar aos participantes que deem exemplos (considerando a existência de uma atividade específica com agrupamentos humanos, sugere-se a não utilização de exemplos envolvendo suas características neste momento).
- Definir apenas um item (ex: folhas para o grupo 1 e flores para o grupo 2 etc) para ser trabalhado inicialmente em cada grupo.
- Solicitar aos grupos que organizem os seus itens de acordo com diferentes critérios por eles definidos e descritos (ver exemplos na figura a seguir). Anotar os critérios utilizados.



Itens separados por critério de classificação

Sugestão: Para um encaminhamento mais interessante, é importante que os participantes não recebam dicas de possíveis critérios, mas que sejam estimulados a estabelecê-los em maior número possível.

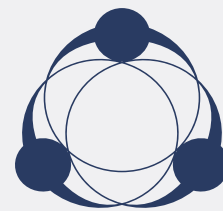
- Se possível, fotografar os agrupamentos construídos pelos participantes para posterior apresentação em equipamento multimídia.
- Solicitar aos grupos que escolham um dos padrões produzidos para desafiar outro grupo a descobrir o critério que foi utilizado.
- Trocar os grupos, em forma de rodízio, para redefinir classificações de acordo com novos critérios. Cada grupo passará por todos os itens coletados, devendo anotar seus critérios. Se possível, fotografar o resultado.

3

Discutindo a Importância da Classificação

- Discutir os resultados sobre os diferentes arranjos feitos pelos grupos, se possível, projetando fotografias.
- Destacar o número ilimitado de combinações possíveis em função de diferentes critérios.
- Discutir a importância de classificar, especialmente no contexto biológico.
- Concluir a discussão, ressaltando a subjetividade dos critérios de classificação, uma vez que diferentes olhares sobre um mesmo conjunto de itens poderá levar a agrupamentos diversos.

Os tipos humanos: cultura e geografia



Objetivo Geral

Discutir criticamente o conceito de raças humanas.

Objetivos Específicos

- Discutir o conceito de critério (Caso a atividade sobre “Coleta e classificação de materiais” já tenha sido aplicada, recupere os conceitos gerados naquela atividade)
- Identificar tipos humanos, correlacionando suas características físicas e sua indumentária com suas supostas origens geográficas;
- Perceber como a cultura do observador pode influir na distribuição dos tipos humanos;
- Concluir que critérios de classificação de tipos humanos são flexíveis e subjetivos.

Material Necessário

- Mapa Mundi ([Acesse aqui](#));

Sugere-se a projeção através de multimídia, fixando as cartelas com os diferentes tipos diretamente na tela de projeção ou parede.

- Doze cartelas de tipos humanos (com indicação da origem de cada uma). ([Acesse aqui](#)).

Imprima o número de cópias coloridas que achar conveniente, em função do número de grupos que serão constituídos. Para uma melhor conservação do material, sugere-se que o mesmo seja plastificado.

- Um gabarito para aplicadores. ([Acesse aqui](#));

Classificando o grupo de participantes

- Solicitar que o grupo estabeleça critérios de classificação entre os participantes (por exemplo: sexo; tipos de vestimenta; altura, entre outras características observáveis externamente ou, mesmo, aquelas que não estão explícitas, mas que permitam fazer grupos distintos, como: descendência, estado ou cidade de nascimento, faixa etária etc.). É importante que os participantes escolham os critérios.

- Solicitar que os participantes proponham a reorganização dos grupos de acordo com outros critérios.
- Observar e comentar que, pessoas podem estar juntas de acordo com um critério, mas separadas em função de outro, quando mudado o parâmetro de semelhança. Discutir, ainda, que os critérios dependem de consensos entre os participantes, uma vez que características como, por exemplo, a idade ou a altura, estão sujeitas à definição dos limites entre uma faixa e outra.

Ampliando a Discussão!

Importante perceber que esta discussão poderá avançar com a solicitação de que os subgrupos sejam reorganizados por meio da introdução de mais um critério. Por exemplo, se o critério tinha sido tom da cor da vestimenta (escuro e claro), que os de roupas claras ou escuras sejam separados por cores mais específicas, gerando novas subdivisões.

2 Localizando os tipos humanos geograficamente

- Compor dois ou mais grupos de participantes.
- Entregar as imagens dos tipos. Selecione, conforme a disponibilidade de tempo para execução da atividade, o número de tipos que achar conveniente (por exemplo, cinco, seis, dez, etc.)
- Entregar um conjunto idêntico das cartelas selecionadas para cada grupo, juntamente com a cópia em papel A4 do mapa para que sirva de gabarito da distribuição.
- A partir da análise das características possíveis de serem observadas nas imagens, os grupos deverão determinar e marcar no mapa do papel a região que supõem ser a origem de cada uma delas.

Ampliando a Discussão!

Neste momento, você poderá estimular os grupos a buscarem (em um atlas, ou globo, ou um site da internet) a localização real dos países escolhidos, aproveitando a atividade para trabalhar a Geografia como tema transversal.

- Solicitar que cada um dos grupos entregue seus gabaritos e apresente, colando no mapa mundi projetado, a sua ideia sobre a origem dos tipos humanos escolhidos.
- Discutir as semelhanças e diferenças entre as distribuições, solicitando que os grupos detalhem qual(is) o(s) critério(s) determinou(aram) as escolhas. Refletir sobre como qualquer tentativa de agrupamento de tipos humanos não é simples, pois os critérios não são rígidos nem absolutos.
- Caso julgue pertinente, informe aos grupos a real origem dos tipos que eles trabalharam.

ATENÇÃO

Neste caso, o objetivo não deve ser o de estabelecer o certo e o errado, mas mostrar que, cada vez mais, os povos ocupam distintas regiões do mundo, motivados por diversos interesses de fluxos migratórios.

Ampliando a Discussão!

Neste momento, você poderá estimular os grupos a discutir aspectos históricos, culturais, econômicos, políticos que levam a estes fluxos migratórios

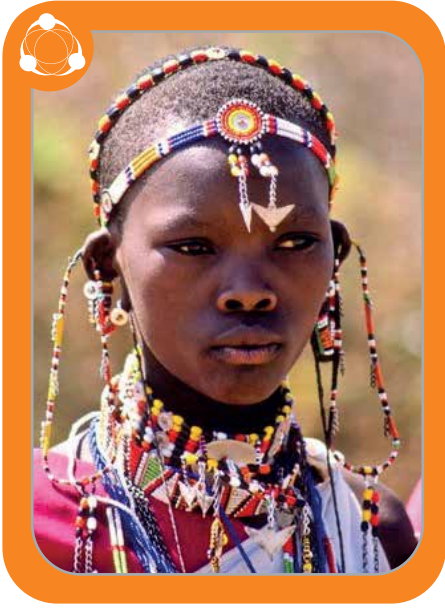
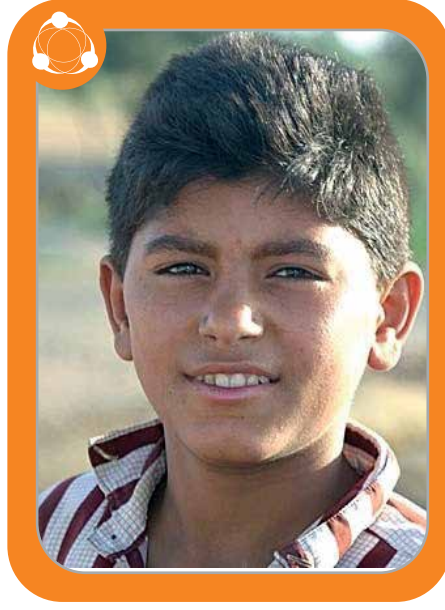
Mapa Mundi

Para download em tamanho completo, clique aqui.

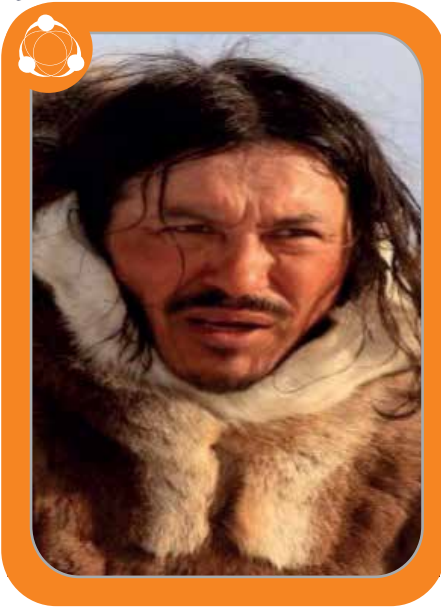


IMAGINE: O MUNDO

Este é o Mundo em que vivemos. Você sabe de onde são os diferentes povos?



Pessoas do Mundo
Plastifique os cartões, e localize-os no globo.



Pessoas do Mundo
Plastifique os cartões, e localize-os no globo.

Gabarito

(Somente para os aplicadores)



África
• Maasai - Quênia



África
• Egito



América do Norte
• México



Oceania
• Aborígene Australiano



América do Sul
• Bolívia



Ásia
• Bangladesh



Ásia
• Índia



América do Sul
• Santa Catarina - Brasil



América do Norte
• Inuit do Canadá



Europa
• Bavária, Alemanha



América do Sul
• Mata Atlântica - São Paulo - Brasil



América do Norte
• Indígena Chippewa

Material produzido pelo Projeto Imagine. UFSC, Fevereiro de 2015

Medições com Instrumentos



Objetivo Geral

Mensurar materiais biológicos, utilizando instrumentos diversos, permitindo a percepção da utilidade da precisão nas medidas.

Objetivos Específicos

- 1) Reconhecer e valorizar modos de medição cotidianos, regionais e/ou oficiais;
- 2) Aprender a utilizar instrumentos diversos de medidas: lineares, de área e de peso;
- 3) Comparar medições feitas com e sem instrumentos;
- 4) Estabelecer relações entre os níveis macro e microscópicos;

Material Necessário

- | | | |
|---|---|--------------------------|
| Quatro folhas de plantas, de tamanho e forma semelhantes por subgrupo. | 2 | Papel milimetrado |
| 1 Régua de 10 ou 15 cm (uma por subgrupo) (se possível utilizar régua com escala também em polegadas) | 3 | Paquímetro (se possível) |
| | 4 | Balança (se possível) |
| | 5 | Lupa (se possível) |



Sugere-se a utilização de folhas para esta prática devido à facilidade de obtenção deste material biológico na maioria das zonas rurais. Em regiões desérticas pode-se utilizar sementes, ossos ou mesmo pedras.

1 Observando o Material Biológico

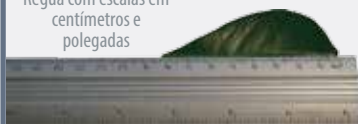
- Formar subgrupos de quatro a cinco participantes.
- Disponibilizar instrumentos de medida (papel milimetrado, régua, paquímetro e/ou balança) e pedir que meçam as quatro folhas para ao final responderem a seguinte pergunta: qual a medida da folha?
- Estabelecer um critério inicial de medida (comprimento, área, peso, etc.) para cada subgrupo e solicitar que os participantes meçam as quatro folhas. Se houver tempo, o subgrupo poderá fazer a mensuração de mais variáveis.

Neste momento surgirão dúvidas sobre qual medida tomar, comprimento ou largura, área total, peso, se o subgrupo deve medir uma ou as quatro folhas. A necessidade de estabelecer um critério possivelmente será natural entre os participantes.

2

Atividade Introdutória Opcional

Régua com escalas em centímetros e polegadas



Com papel milimetrado, desenhe o contorno de uma folha, usando lápis, caneta, etc.

Com o desenho obtido, é possível calcular a área dessa folha

- Projetar uma figura com quatro folhas, para todo o grupo, e solicitar que, individualmente, descrevam o material.
- Em seguida, oferecer uma lupa a cada subgrupo e pedir que anotem as novas observações. A ideia é que percebam que, refinando o instrumento de análise, eles podem ver coisas que não viam antes, como por exemplo, poros, pelos, detalhes das nervuras ou serrilhado das bordas (ou até mesmo ver que o que havia sido classificado como borda lisa, pode apresentar um padrão serrilhado nesta forma de observação).
- Discutir que cada descrição é subjetiva, ou seja, tem o olhar de quem a descreve e depende do instrumento utilizado.

3

Discutindo a Importância das Medidas Precisas

- Discutir os resultados com cada subgrupo, percebendo que cada uma das quatro folhas tem sua medida, mas que precisamos informar um valor único e representativo (média) ao grande grupo.
- Solicitar ao subgrupo que calcule as médias dos valores obtidos das quatro folhas.
- Discutir quais as razões que podem ter levado aos valores diferentes (levantamento de hipóteses) entre os resultados dos subgrupos.

Medição com o paquímetro



Exemplo de pesagem da folha, utilizando uma balança.



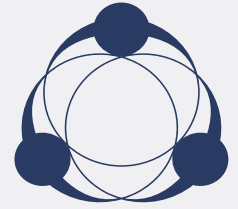
Ampliando a Discussão!

Se possível, fazer uma foto com o conjunto das folhas que serão dadas a cada subgrupo. Cada subgrupo deverá receber um conjunto de quatro folhas, de tamanho, cor, "idade", semelhante (por exemplo, um subgrupo com folhas novas, outro com maiores e mais velhas, outro com folhas recém caídas da planta e outro com folhas secas). A atividade realizada desta maneira poderá estimular o levantamento e a discussão sobre hipóteses.

É interessante o uso de uma lupa, para percebermos detalhes do objeto estudado.



Desvendando Características Escondidas



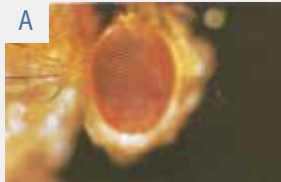
Objetivo Geral

Utilizar técnicas que permitam observar que as características visíveis dos seres vivos são produto de interações físicas, químicas e biológicas

Objetivos Específicos

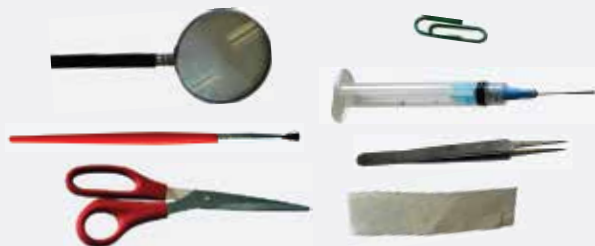
- 1) Familiarizar os participantes com a técnica de cromatografia em papel.
- 2) Comparar observações feitas a olho nu com aquelas resultantes da técnica cromatográfica.
- 3) Estabelecer relações entre os níveis macro e microscópicos.
- 4) Extrapolar os resultados obtidos com o olho de drosófila, para características de outros organismos.

Linhagens de mosca da fruta
Drosophila melanogaster
com diferentes cores de olhos:
A - selvagem, B- sépia, C- white, D- brown



Material Necessário

Lupa
estereoscópica ou de mão
Pinceis nº 0
Tesoura
Clipes grandes



Agulhas histológicas ou
pinças de relojoeiro
Papel Filtro
Luz UV
Transiluminador de mesa ou de mão

Vidros com tampa
de polietileno
ou equivalente, com
aproximadamente
250 mL, para colocar o solvente



Eterizador

Eterizador
Aberto



Eterizador
Fechado

Proveta



1

Preparando a solução

Para um volume final de 30 mL de solução usa-se:

Solução 1

- 16 mL de n-propanol
- 3 mL de hidróxido de amônio
- 11 mL de água destilada

OU

Solução 2

- 20 mL de álcool etílico;
- 3 mL de ácido acético;
- 7 mL de água destilada;

Observação: Ambas as soluções produzem o mesmo resultado.

2

Observando o material biológico



- Observe, na lupa estereoscópica ou de mão, **exemplares de moscas** com as diferentes cores de olhos que serão utilizados na atividade.
- Corte uma tira de papel filtro (2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento) e trace uma linha com lápis (a 1,5 cm de uma das bases), para marcar onde será o ponto de aplicação das amostras.
- Perfure a tampa de polietileno com o clip:



- Separe e eterize até a morte cinco indivíduos de cada uma das linhagens de cores de olhos.
- Coloque cinco moscas mortas de uma mesma cor de olho sobre uma placa de cartolina branca e, com auxílio de agulhas histológicas e/ou pinças de relojoeiro, remova as cabeças.

- Coloque e esmague (com a ponta do pincel) uma a uma, as cinco cabeças da mesma cor sobre o mesmo ponto de aplicação na tira de papel.

extração do pigmento das cabeças de drosófilas



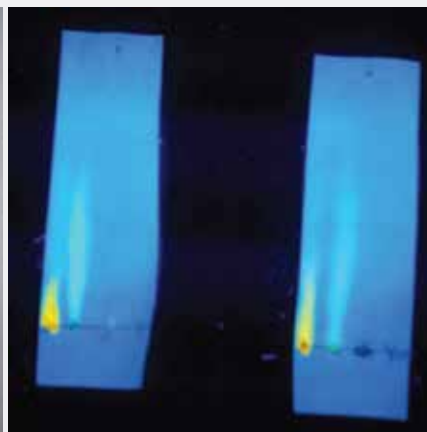
- Proceda da mesma forma com as demais cores de olhos, tomando o cuidado de não aproximar do ponto anterior de aplicação, para evitar contaminação entre amostras. Registre a ordem de aplicação das cores de olhos para posterior interpretação da migração das amostras.
- Prepare uma das soluções para migração, conforme as proporções citadas. Coloque-a em um vidro com tampa de polietileno ou equivalente. Mantenha o vidro contendo a solução fechado para evitar evaporação e alteração na proporção dos reagentes.
- Prenda o papel filtro contendo as amostras já esmagadas no clipe preso à tampa e tampe o frasco de modo que a solução esteja em contato com o papel, sem, no entanto, cobrir os pontos de aplicação.
- Deixe o papel filtro absorver a solução por 2 horas ou até que a marca da umidade no papel chegue à borda superior. Retire o papel e deixe-o secar (em temperatura ambiente).
- Uma vez seco, observe o resultado a olho nu e, posteriormente, exponha o papel filtro à luz UV . Compare os resultados destas duas observações.



Pigmentos no papel filtro, expostos à luz comum



Pigmentos no papel filtro, expostos à luz ultravioleta



3

Discutindo os resultados cromatográficos

- Enquanto as amostras estão migrando, questione os participantes sobre suas expectativas com relação ao resultado do experimento.
- Após a visualização dos resultados, solicite que os participantes descrevam e sugiram interpretações para os resultados encontrados, a olho nu e na luz UV, e comparem com sua expectativa inicial.
- Saliente que a técnica utilizada revela padrões cromatográficos diferentes para cada linhagem, devido às reações entre os diferentes pigmentos presentes no olho de cada uma delas com os reagentes das soluções reveladoras. Destaque que os pigmentos existentes na linhagem *brown* não reagem com os componentes da solução reveladora utilizada e por este motivo não são revelados no resultado final.
- Extrapole os resultados encontrados para outras características em outros seres vivos.

Escalas da vida



Objetivo Geral

Compreender diferentes escalas de tamanho, desde metros até nanômetros.

Objetivos Específicos

- Relacionar diferentes unidades de medida, partindo de objetos de nosso cotidiano que são visíveis a olho nú até o nível intracelular.
- Através de uma ferramenta visual e interativa, demonstrar o quão pequenas são nossas células e nosso material genético.

[Acesse aqui.](#)



O DNA a Olho Nu



Objetivo Geral

Obter e visualizar DNA vegetal através de um protocolo simples.

Objetivos Específicos

- 1) Fazer a transição entre coisas visíveis e invisíveis a olho nu.
- 2) Introduzir os participantes na biologia molecular.
- 3) Demonstrar que podemos extrair o material genético dos seres vivos.

Material Necessário

1 saco plástico de preferência com sistema de fechamento (ex: ziplock)

3 morangos com as devidas adaptações, pode-se realizar com outra planta (ex: banana, kiwi, cebola, tomate, etc)

1 peneira de cozinha

15 mL de álcool etílico comum gelado

1 copo de 200 mL

Detergente de cozinha incolor

Sal comum

1 bastão de vidro

1 proveta de 25 mL

1 becker de 500 mL

1 par de luvas de látex por pessoa

1 colher de sopa

1 colher de chá

De preferência, os participantes usarão jalecos, que podem ser descartáveis.

1 Discutindo o DNA

Discutir com os participantes o conceito de herança de características em plantas, animais e seres humanos. Pedir que eles descrevam como a hereditariedade é vista e interpretada em sua cultura e o que eles sabem sobre o material genético. Caso eles não mencionem o termo DNA, conduzir a discussão para que se chegue até ele.

Ampliando a Discussão!

Neste momento, você pode pedir que os participantes citem exemplos de herança biológica na agricultura praticada em sua região e que expliquem como os agricultores locais interpretam e aproveitam esta hereditariedade.

2

Preparando o Tecido Vegetal Para a Extração

- Formar grupos de quatro ou cinco participantes.
- Duas ou três pessoas do grupo serão encarregadas de preparar a solução de extração: Em um copo misturar 150 mL de água, uma colher (sopa) de detergente, e uma colher (chá) de sal, mexer com bastão de vidro tentando não fazer espuma.
- Selecionar os morangos e retirar as folhas. Colocar os morangos em um saco e pedir para os outros membros do grupo macerarem com as mãos, esmagando até formar uma pasta.



3

Extraindo o DNA

- Adicionar aproximadamente 1/3 da solução de extração (50 mL) no saco que contém a pasta e deixar atuar por 30 minutos. Inverter o saco de vez em quando tentando não formar espuma.



Sugestão de Atividade:

Neste momento, enquanto aguarda, você pode pedir que os participantes tentem adivinhar de que cor será o DNA do morango. Registradas as opiniões, perguntar de que cor seria o DNA de outros organismos. Será que todos os organismos têm mesmo DNA?

- Com ajuda de uma peneira, filtrar o conteúdo do saco em um Becker, desprezando a polpa.
- Transferir para uma proveta de 25 mL cerca de 10 mL do líquido filtrado.

Peneirando a pasta obtida em um Becker



Transferindo o líquido para uma proveta



Sugestão de Atividade:

Neste momento, avisar que eles estão a ponto de ver o DNA dentro da proveta. Eles devem, portanto ficar muito atentos para observar o que vai acontecer no próximo passo, pois a aparência do que se vê muda muito rapidamente.

- Adicionar álcool gelado até completar 20-25 mL. Sem mexer, esperar alguns minutos até o DNA gradualmente aparecer em forma de nuvem e se condensar na forma de um material viscoso.
- Tentar “pescar” o DNA com ajuda do bastão de vidro.

DNA aparecendo no álcool



“Pescando” o DNA de dentro da proveta



- Discutir os resultados em função das expectativas. Conversar sobre o que representa aquele agregado de DNA. Pergunte se poderíamos comer aquele material e o que aconteceria se fizéssemos isso.

Comentário para o aplicador: o método usado também extrai outras moléculas semelhantes, como diferentes tipos de RNA.

O Universo dos Microlitros



Objetivo Geral

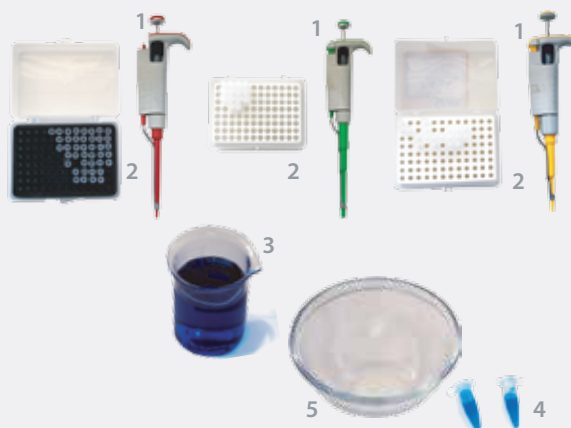
Compreender e manipular volumes líquidos muito pequenos em situações de laboratório.

Objetivos Específicos

- 1) Discutir as diversas unidades de medida do sistema métrico.
- 2) Introduzir o universo dos microlitros.
- 3) Aprender a utilizar micropipetas automáticas de forma precisa e segura.

Material Necessário

- 1 Micropipetas automáticas de vários tamanhos e capacidades (exemplo: P10, P100 e P1000).
- 2 Ponteiras descartáveis de tamanhos compatíveis com as pipetas.
- 3 Becker com água ou outro líquido colorido.
- 4 Tubos plásticos (exemplo: microtubos de 1,5 mL).
- 5 Recipiente para descartes.



Apresentamos, neste roteiro, uma sugestão de materiais, que podem ser substituídos ou adaptados. Micropipetas, ponteiras e tubos velhos ou usados podem ser emprestados por laboratórios de análises clínicas ou universidades parceiras.

1

Discutindo unidades de medida

Discutir as principais grandezas físicas e suas unidades, como comprimento, massa e volume, perguntando aos participantes como eles medem estas coisas e que nomes e símbolos costumam usar. Pedir exemplos de medidas de volume usadas no contexto da comunidade local (exemplo: litros de leite, combustível ou água).

2

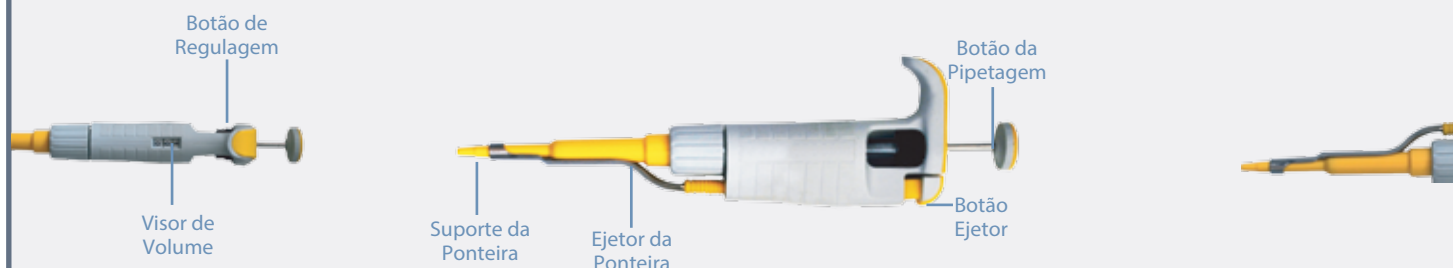
Transpondo a discussão para volumes muito pequenos

Pedir aos participantes que sugiram formas de coletar, medir e transferir volumes cada vez menores, até chegar nos microlitros.

3

Apresentando a micropipeta e suas ponteiras

- Escolher uma pipeta com faixa de volumes de 200 a 1000 μL (dependendo das pipetas disponíveis) e apresentar as partes dela.
- Mostrar o visor e o botão de regulagem com a escala de medição, explicando o significado dos dígitos.



- Demonstrar que a pipeta apresenta dois estágios de resistência: 1º estágio será utilizado para sugar o líquido para a ponteira; 2º estágio será utilizado para expulsar o líquido que está na ponteira;
- Demonstrar como se coloca uma ponteira na pipeta. Pipetar puxando o líquido a partir da 1º posição e dispensando-o em outro recipiente pressionando o botão até a 2º posição.
- Depois de terminada a pipetagem, descartar a ponteira apertando o botão correspondente.



- 1 Ejetor
- 2 1º posição
- 3 2º posição
- 4 utilizando a pipeta

- Enfatizar a forma correta de manuseio:

1) Nunca se deve segurar a pipeta na posição horizontal a fim de evitar contaminação.



2) Nunca ultrapassar os volumes máximos e mínimos da pipeta.

3) Apertar e soltar o botão de pipetagem gentilmente.

- Trocar a ponteira para cada amostra diferente, a fim de evitar a contaminação da parte fixa da pipeta e dos líquidos utilizados.

4

Praticando com os Participantes



Colocar em um quadro diferentes volumes a serem pipetados por cada participante, de preferência usando todas as pipetas disponíveis na forma de rodízio.



Pedir aos participantes que pipetem o líquido (água) com o volume correspondente a partir do Becker e que o dispensem em um tubo plástico.



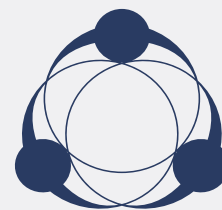
Se tiver uma pipeta P10, pedir para um participante pipetar o volume próximo ao mínimo e dispensá-lo na palma da mão, a fim de mostrar que essa quantidade é muito pequena.



Explicar que quando se trabalha com líquidos que não podem ser contaminados ou que apresentam qualquer tipo de risco a quem os manipula (exemplo: amostras de DNA, reagentes, produtos diversos), é preciso se trabalhar com luvas descartáveis, jaleco e, em alguns casos especiais, óculos e máscaras.



O DNA Humano



Objetivo Geral

Realizar, de forma simplificada, um processo de extração de DNA humano.

Objetivos Específicos

- 1) Demonstrar que seres humanos, assim como as plantas, também possuem DNA e que este também pode ser extraído.
- 2) Perceber que existem formas diferentes de se extrair DNA, bem como outros componentes das células.
- 3) Compreender que nem sempre poderemos ver a olho nu as moléculas que purificamos

Material Necessário

- 1- Espátulas de madeira (uma para cada voluntário)
 - Centrífuga
 - Copos descartáveis
- 2- 10 mL de etanol absoluto gelado
 - 1 jaleco descartável por participante
 - 1 par de luvas de látex/pessoa

- 3- 1 micropipeta de 1000 μ L e ponteiros
- 4- Reagente para extração de DNA animal ou humano*
- 5- Solução de sacarose (1 colher de chá de açúcar em 100 mL de água)
- 6- Tubos de 1,5 mL (2 tubos por amostra)

* O presente protocolo foi otimizado para o reagente DNAzol da marca Invitrogen®, que utiliza 500 μ L por amostra. Outros reagentes podem ser usados, fazendo-se as necessárias adaptações, de acordo com as instruções do fabricante.



1

Dividindo Tarefas e Materiais

- Separar os participantes em dois grupos. Cada grupo terá um voluntário, que doará sua amostra de saliva, e um outro participante, que realizará o processo de extração de DNA do voluntário.
- Fornecer para cada grupo uma pipeta P1000, ponteiros, uma espátula de madeira, um copo descartável com 15 mL de solução de sacarose e 2 tubos de 1,5 mL.

2 Obtendo a Amostra

- Utilizando a espátula de madeira, o participante raspará, delicadamente, a mucosa bucal do voluntário, durante 10 segundos, em cada lado de dentro das bochechas. O participante conservará a espátula na mão, enquanto o voluntário realiza um bochecho.
- O voluntário deverá bochechar vigorosamente os 15 mL da solução de sacarose durante 30 segundos.

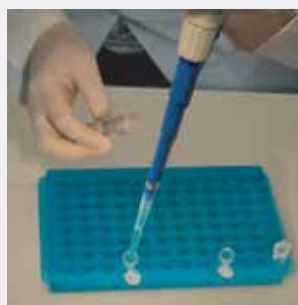


- O voluntário despejará o volume obtido no bochecho em um copo descartável, podendo coloca-lo no mesmo copo que já continha a solução.
- O participante mergulhará a espátula usada na raspagem dentro do líquido obtido no bochecho e deixará ali durante 2 minutos.

3 Separando o Material de Extração

- O participante transferirá 1 mL do volume obtido no passo anterior para um tubo de 1,5 mL e o centrifugará durante 5 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 500 g (ver especificações do fabricante).
- Com o auxílio de uma micropipeta, após a centrifugação desprezar o sobrenadante, deixando no tubo apenas o precipitado.

Adicionando o DNAzol.



4 Extraindo o DNA

- Adicionar 500 μ L de DNAzol (ou o volume necessário de reagente de outra marca, se for o caso) a cada tubo.
- Homogeneizar bem invertendo várias vezes o tubo.
- Centrifugar por 10 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 12.400 g (ver especificações do fabricante).

Utilizando uma centrífuga



Ampliando a Discussão!

Neste momento, enquanto se aguarda a centrifugação, você pode perguntar aos participantes o que eles acham que foi retirado da bochecha do voluntário. Seriam células? Onde está o DNA dentro dessas células? Qual poderia ser a função do reagente DNAzol no processo de extração do DNA?

- Pipetar o maior volume possível de sobrenadante e transferi-lo para um novo tubo de 1,5 ml.
- Sugestão: avisar que, no próximo passo, ao se colocar o álcool gelado no tubo, a nuvem de DNA aparecerá. Os participantes devem ficar bem atentos, pois às vezes a nuvem não é facilmente visível.
- Adicionar 500 μ L de etanol absoluto (100%) gelado, ao mesmo tempo em que se observa atentamente a formação da nuvem de DNA.



Ampliando a Discussão!

É possível propor aos participantes uma comparação entre a nuvem obtida nesta atividade e a nuvem observada anteriormente na extração de DNA do morango. Pode-se discutir a respeito das diferenças de tamanho e de natureza das amostras, bem como dos procedimentos adotados, lembrando que, embora tenha sido utilizado um reagente comercial para a extração de DNA humano, este deve apresentar a mesma função que o detergente e o sal utilizados para extrair DNA de morango.

A demonstração do protocolo de extração com todos os participantes finaliza aqui, mas ainda é possível fornecer uma explicação sobre os passos seguintes a serem realizados pelo aplicador do módulo (ver Anexo 1), em particular as lavagens com álcool 75% e a posterior conservação do DNA.

Anexo 1: Gerando material de discussão



Este processo será realizado por um dos aplicadores, sem a presença do público participante, já no primeiro dia de atividades, para gerar material de qualidade suficiente para garantir a discussão do último dia do módulo. O processo é composto por quatro etapas:

Etapa 1 - Extração de DNA de oito participantes voluntários.

Etapa 2 - Técnica de PCR para amplificação de dois marcadores moleculares a partir do DNA coletado.

Etapa 3 - Confeção de um gel de agarose a 1%, aplicação das amostras e corrida de eletroforese.

Etapa 4 - Observação e registro fotográfico do gel resultante da Etapa 3.

Etapa 1 - Extração de DNA

Objetivo Geral

Obter, através deste protocolo, amostras de DNA de voluntários para gerar material de qualidade para a discussão final com base em genótipos.

Material utilizado

O material será coletado de oito participantes voluntários pelo método de raspagem de tecido interno da bochecha. É imprescindível que se obtenha um termo de consentimento livre e esclarecido enfatizando que o material biológico obtido será utilizado somente para os fins de aprendizado no âmbito desta atividade educativa específica, sem finalidade de pesquisa presente ou futura.

Material Necessário

- 1 espátula de madeira para cada voluntário
- 2 copos descartáveis
- Centrífuga
- Etanol 75% gelado
- Etanol absoluto gelado
- Água miliQ (100 µL por amostra)
- Freezer
- Luvas e jaleco para o aplicador
- Microcentrífuga de baixa rotação do tipo spin (opcional)
- 1 micropipeta de 1000 µL e ponteiras
- Reagente para extração de DNA animal ou humano*
- Sacarose 3% (1 colher de chá de açúcar em 100 mL de água)
- Tubos de 1,5 mL do tipo eppendorf (2 tubos por amostra)
- Agitador tipo vórtex (opcional)

* O presente protocolo foi otimizado para o reagente DNAzol da marca Invitrogen®, que utiliza 500 µL por amostra. Outros reagentes podem ser usados, fazendo-se as necessárias adaptações, de acordo com as instruções do fabricante

Procedimentos

1) Obtendo a amostra

- Higienizar a boca dos oito voluntários fazendo bochechos com água ou, se possível, escovando os dentes.
- Delicadamente, raspar a mucosa bucal com uma espátula durante 10 segundos de cada lado. Conservar a espátula na mão enquanto o voluntário realiza o bochecho.
- Cada voluntário realizará um bochecho vigoroso com aproximadamente 15 mL da solução de sacarose 3% por 30 segundos.
- Cada voluntário despejará o volume obtido do bochecho no mesmo copo descartável que continha a solução de sacarose.
- Deixar a espátula usada na raspagem imersa na solução obtida do bochecho, mantendo-a mergulhada no copo durante 2 minutos.

2) Separando o material

- Transferir aproximadamente 1 mL do volume obtido no passo anterior para um tubo de 1,5 mL e centrifugar durante 5 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 500 g (ver especificações do fabricante).
- Retirar cuidadosamente o sobrenadante com a micropipeta e desprezÁ-lo.

3) Extraíndo o DNA

- Adicionar 500 µL de DNAzol (ou o volume necessário de reagente de outra marca, se for o caso). Homogeneizar invertendo o tubo.
- Centrifugar os tubos por 10 minutos a uma velocidade de rotação correspondente a 12.400 g (ver especificações do fabricante).
- Coletar o sobrenadante (aproximadamente 600 a 700 µL) e transferir para um novo tubo.
- Adicionar 500 µL de etanol 100% gelado. Observar a formação da nuvem de DNA.
- Homogeneizar invertendo várias vezes os tubos.
- Centrifugar por mais 3 minutos a 7.000 g. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 800 µL de etanol 75 % gelado. (Primeira lavagem).
- Centrifugar por mais 3 minutos a 7.000 g. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 800 µL de etanol 75 % gelado. (Segunda lavagem).
- Centrifugar por mais 3 minutos a 7.000 g. Descartar o sobrenadante.

*Velocidade e tempo de centrifugação podem ser ajustados.

4) Secando e conservando as amostras

- Virar os tubos e deixÁ-los abertos por aproximadamente 30 segundos.
- Suspender o precipitado em 100 µL de água MiliQ.
- Conservar as amostras em um freezer.

Etapa 2: Amplificação de DNA humano por PCR

Objetivo Geral

Através de PCR de marcadores moleculares específicos, gerar material para avaliar e comparar os genótipos dos voluntários ao final do módulo.

Material utilizado

Amostras de DNA extraídas de oito voluntários pelo protocolo anterior (Etapa 1).

Material Necessário

- Luvas e jaleco para o aplicador
- Micropipetas P10 e P200 com suas ponteiras.
- Reagentes necessários:
 - Água MiliQ
 - DNA genômico na mesma concentração resultante da Etapa 1
 - dNTP (desoxirribonucleotídios trifosfatados) a 10 mM
 - Enzima Taq Polimerase
 - 2 pares de primers* (AT3 e PV92) a 20 µM
 - Tampão PCR (fornecido com a enzima Taq Polimerase)
- Termociclador
- Tubos de 1,5 mL
- Tubos de 200 µL para PCR.
- 1 estante para os tubos
- Agitador tipo vórtex (opcional)

* Primers para o marcador AT3

F: 5' CCACAGGTGTAACATTGTGT 3'

R: 5' GAGATAGTGTGATCTGAGGC 3'

* Primers para o marcador PV92

F: 5' AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAAGT 3'

R: 5' TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG 3'

Procedimento

Tabela 1: Ingredientes para a Reação de PCR

	1X (volume em µL)	9X* (volume em µL)
H2O MiliQ	14,37	129,33
Tampão**	5,0	45
dNTP	0,5	4,5
Primer F	1,0	9
Primer R	1,0	9
Taq Polimerase	0,13	1,17
DNA	3,0	3,0 x 9
Vol. Final	25	225

* O cálculo para os volumes dos reagentes consideram n+1, onde n é o número de amostras. Isto porque se leva em conta o erro na pipetagem. Portanto, para 8 amostras, o cálculo é para 8+1=9 amostras.

** Se o tampão não contém MgCl₂, este deve ser adicionado. O volume de MgCl₂ adicionado será diminuído do volume de H₂O MiliQ, para que o volume final de 25 µL não se modifique.

- Preparar 16 tubos de 200 µL (2 tubos por voluntário, correspondendo aos marcadores AT3 e PV92). Cada tubo deverá estar identificado, com o nome do voluntário e nome do marcador correspondente.
- Em um tubo de 1,5 mL preparar o Mix 1 para 9 reações com o marcador AT3 segundo a Tabela 1, colocando por último a Taq polimerase. Não incluir ainda o DNA genômico. Homogeneizar no vórtex.
- Em um tubo de 1,5 mL preparar o Mix 2 para 9 reações com o marcador PV92 segundo a Tabela 1, colocando por último a Taq polimerase. Não incluir ainda o DNA genômico. Homogeneizar no vórtex.
- Colocar 22 µL do mix correspondente em cada tubo de 200 µL. (Ex.: No tubo identificado como "Maria AT3", se colocará 22 µL do Mix 1 e 3 µL do DNA extraído de Maria, e assim por diante).
- Adicionar 3 µL de DNA de cada voluntário no tubo correspondente, totalizando 25 µL de volume total de reação.
- Colocar os tubos no termociclador.

Tabela 2: Condições d\ PCR para os Marcadores AT3 E PV92

	TEMPERATURA	TEMPO	REPETIÇÕES	ESTÁGIO
	94°C	5 minutos	1	1
Passo 1	94°C	1 minuto		
Passo 2	58°C	2 minutos	30	2
Passo 3	72°C	2 minutos		
	72°C	5 minutos	1	3
FINAL	4°C			

- Ao finalizar a PCR, as amostras deverão ser conservadas em freezer.

Etapa 3: Confecção de gel de agarose 1%, aplicação das amostras e eletroforese.

Objetivo Geral

Permitir a visualização dos genótipos dos membros voluntários da comunidade, para posterior interpretação e discussão dos resultados.

Material Necessário

- Agarose
- Amostras de PCR
- Balança
- Cuba de eletroforese*
- Erlenmeyer de 500 mL
- Fonte de eletroforese
- Corante para visualização de DNA**
- Corante de rastreamento (loading buffer ou loading dye)***
- Luvas e jaleco para o aplicador
- Micro-ondas****
- Luva para micro-ondas.
- Micropipeta P10 e ponteiros
- Parafilm
- Proveta de 250 ml
- TBE 0,5X*****

* As quantidades aqui mostradas estão calculadas para um gel de 200 mL.

**O aplicador deve atentar para o fato de que há diferentes opções de corantes de DNA, o mais conhecido sendo o Brometo de Etídio (BE), que não é o mais recomendado atualmente por ser tóxico. Opções não tóxicas, como das marcas GelRed ou Diamond, são bons substitutos, que devem ser usados conforme orientação do fabricante. O presente protocolo usou o corante Safer Kasvi, que vem pronto para uso e dispensa adição de corante de rastreamento.

***A ser usado com certos tipos de corantes de DNA, como BE, GelRed ou Diamond.

**** Pode-se também usar banho-maria.

***** TBE: Solução tampão composta de Tris, Borato e EDTA.

Procedimento

Montar a bandeja completa (fora da cuba) em uma superfície reta e lisa.

Pesar 2 g de agarose.

Colocar a agarose em um Erlenmeyer de 500 mL e adicionar 200 mL de TBE 0,5X

Esquentar a mistura no micro-ondas até a completa dissolução da agarose. No processo, interromper o aquecimento para mexer a solução. Cuidar para não transbordar.

Uma vez que a agarose esteja pronta, deixar esfriar um pouco e despejar na bandeja montada no início, deixando solidificar (até ter uma aparência opaca e esbranquiçada). O tempo de solidificação depende da agarose utilizada e das condições do ambiente local.

Aplicação das amostras e corrida de Eletroforese

- Uma vez que o gel esteja solidificado, retirar os pentes, colocar o gel na cuba e adicionar TBE 0,5X até cobrir totalmente a superfície do gel.
- Em um pedaço de parafilm, colocar uma gota de 1 µL do corante Safer para cada amostra (neste caso, 16 gotas em linha, separadas e enfileiradas, sobre o parafilm).
- Pipetar 10 µL de cada amostra de produto de PCR e misturar com 1 µL do corante Safer no parafilm. Uma vez misturada, colocar a amostra no primeiro poço do gel.
- Realizar este procedimento com todas as amostras. A ordem das amostras deve ser anotada cuidadosamente. Utilizando o exemplo anterior, poderia ser aplicada a amostra de "Maria/AT3" seguida por "Maria/PV92".
- Uma vez aplicadas todas as amostras, colocar a tampa da cuba, os cabos correspondentes e ligar a fonte.

As condições de corrida dependerão do tamanho da cuba eletroforética utilizada.

Tabela 3: Condições de corrida de um gel 1% em uma cuba eletroforética com gel de 200 mL.

Volts	mA	Watts	Tempo	Concentração
95	300	100	40 minutos	1%

Etapa 4 – Observando o gel de agarose 1%

Objetivo Geral

Permitir a visualização dos genótipos dos membros voluntários da comunidade, para posterior interpretação e discussão dos resultados.

Material Necessário

- Transiluminador com luz UV (é necessário usar óculos protetores ou tampa de acrílico para se observar).
- Gel pronto.
- Caixa de papelão forrada com material preto ou pintada de preto, onde caiba o transiluminador, com um orifício na parte superior para se olhar dentro dela.

Procedimento

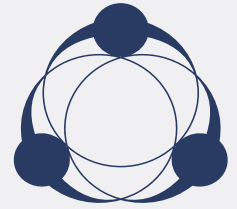
- Colocar o gel sobre a placa de luz UV e colocar os óculos ou a tampa de acrílico, dependendo do caso.
- Colocar a caixa preta sobre o aparato*.
- Ligar a luz UV para se observar o resultado.
- Fotografar e anotar os resultados obtidos.

*Segundo a disponibilidade, pode-se usar uma câmara escura fechada acoplada a um sistema de fotodocumentação, ao invés de uma caixa de papelão.

Discussão

Os resultados devidamente fotografados e identificados serão utilizados na atividade final deste módulo, que é a discussão coletiva, com base nas fotos do gel de agarose, da variabilidade genética humana, ou seja, das diferenças e semelhanças entre os seres humanos, de uma mesma comunidade ou de diferentes povos e etnias.

Decifrando Códigos



Objetivo Geral

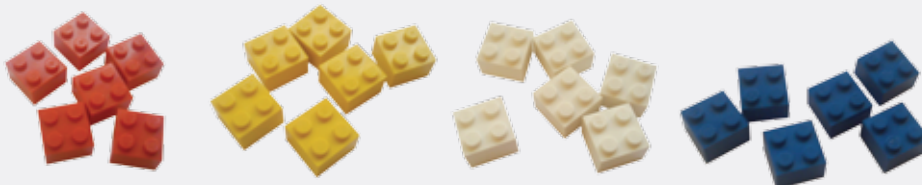
Compreender a forma como códigos, de uma forma geral, são decifrados.

Objetivos Específicos

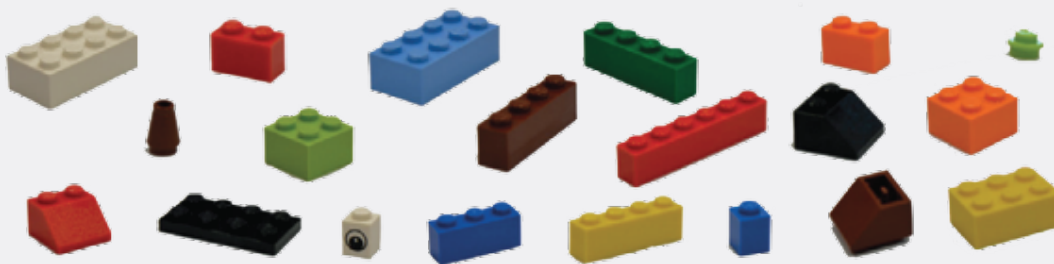
- 1) Trabalhar com diferentes combinações que representam códigos a partir de unidades isoladas.
- 2) Estabelecer relações entre sequências construídas e um dado código.
- 3) Trabalhar os conceitos de variantes e redundância de códigos.

Material Necessário

- Peças quadradas de Lego®, nas cores vermelho, amarelo, branco e azul. Sugere-se 30 a 40 unidades de cada cor.



- Quadro com as diferentes combinações de três cores e as peças que determinam.
- 20 peças de Lego® de formas e/ou cores diferentes, em quantidades ideais de 10 unidades para os tipos menos frequentes e de 20 a 30 dos tipos mais frequentes, em função das combinações apresentadas no quadro.

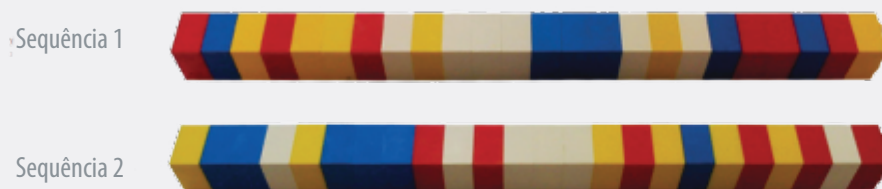


Apresentamos, neste roteiro, uma sugestão de tipos e cores de peças Lego®. Observe que, diante da disponibilidade de peças que você possua, será necessário efetuar mudanças. Tenha cuidado em, ao efetuar trocas entre peças de cores e/ou formas diferentes das sugeridas, manter as relações em correspondência com as apresentadas na tabela em anexo .

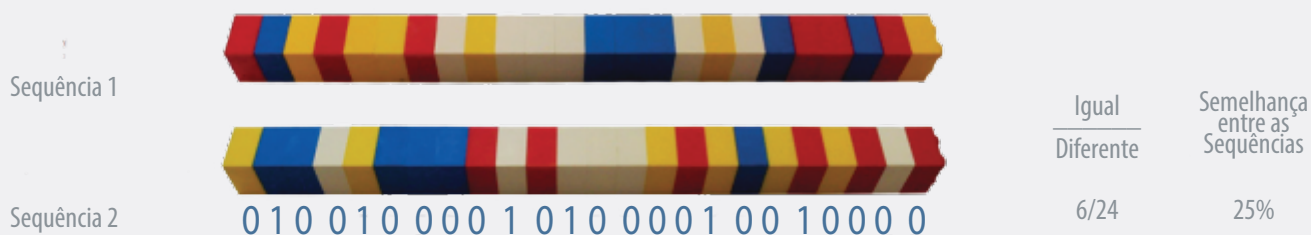
1

Discutindo diferentes códigos

- Aborde com os participantes o conceito de códigos, solicitando que eles citem diferentes exemplos (números associados a datas e códigos telefônicos; letras associadas a palavras em diferentes idiomas que usem o mesmo alfabeto; outros alfabetos; LIBRAS; etc.).
- Monte grupos de 8 a 10 participantes (este número poderá ser menor ou maior em função do tamanho da turma e da quantidade de peças de Lego disponíveis).
- Distribua seis peças quadradas de Lego de cada cor.
- Solicite que cada grupo monte uma sequência, encadeando as 24 peças, de forma aleatória.



- Solicite aos grupos que coloquem suas sequências, duas a duas, de forma paralela e as compare em função da quantidade de peças iguais (1) ou diferentes (0) na mesma posição, calculando, posteriormente, o percentual de semelhança entre ambas.

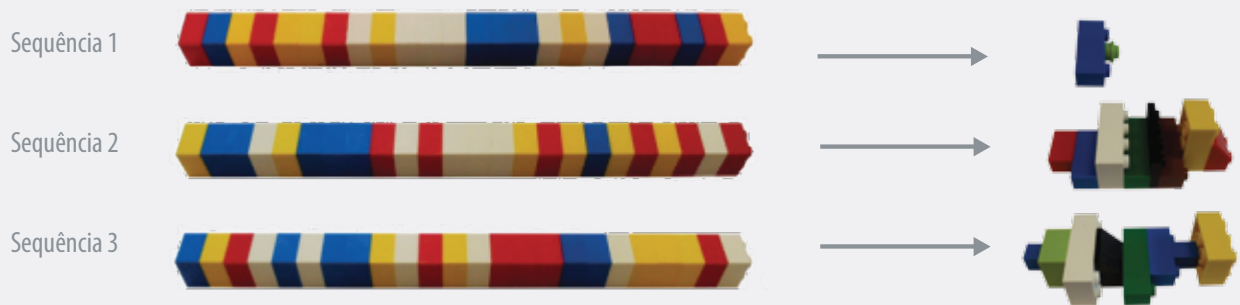


Ampliando a Discussão!

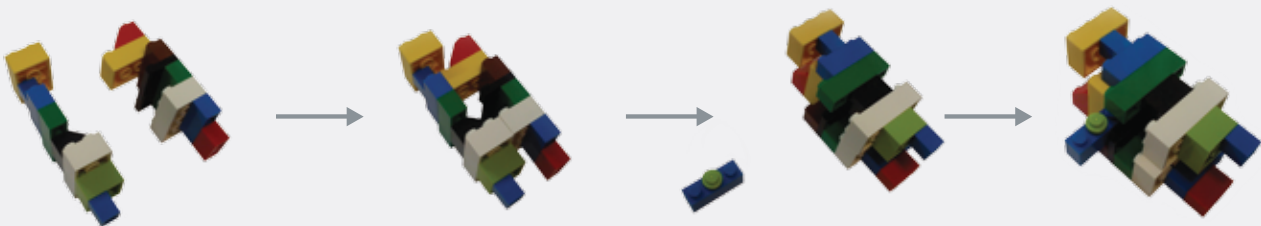
Neste momento, é possível trabalhar as semelhanças entre as sequências dos diferentes grupos.



- Apresente o painel com o código para que os participantes observem suas características como, por exemplo: a partir da combinação de quatro peças unidas três a três, é possível obter 64 combinações. No entanto, estas trincas se associam a apenas 20 novas peças (veja a tabela em anexo). Em decorrência disso, algumas peças estão associadas a apenas uma trinca enquanto outras estão associadas a duas, três, quatro ou seis trincas. É importante destacar que há trincas que não estão associadas a nenhuma peça (Fim).
- Peça aos grupos que montem, a partir de suas sequências de 24 peças, o produto resultante da leitura do código fornecido no quadro de combinações.
- Solicite aos grupos que comparem os produtos formados e tirem suas conclusões.



- Sugira que os participantes liguem os produtos, formados a partir de suas sequências, de diversas maneiras.



Ampliando a Discussão!

Observe que, em função de algumas trincas não estarem associadas a quaisquer peças, enquanto algumas sequências poderão ser interrompidas, outras sequer serão iniciadas. Solicite aos grupos que se dividam em dois subgrupos e montem, a partir de suas sequências de 24 peças, os produtos resultantes, sendo que um dos subgrupos fará a leitura da esquerda para direita e o outro fará a leitura no sentido inverso.



Questione os participantes da possibilidade ou não de, a partir de um produto formado, descobrir qual a sequência que lhe deu origem. Destaque que, dada a redundância do código, apesar de ser possível identificar uma sequência, não haverá garantias desta ser a original.

Decifrando o código

Para download em tamanho completo, clique aqui.

Um gel para ver DNA



Objetivo Geral

Aprender a preparar um gel de agarose para, posteriormente, realizar a separação de amostras de DNA de diferentes tamanhos.

Objetivos Específicos

- 1) Familiarizar os participantes com uma das ferramentas mais simples e universais da biologia molecular: o gel de agarose.
- 2) Demonstrar que algumas das técnicas usadas pelos cientistas podem ser simples como uma receita de cozinha.

Material Necessário

- 1 200 mL de tampão TBE** 0,5X
- 2 7 g de agarose
- 3 1 cuba de eletroforese horizontal com bandeja e pentes
- 4 Forno micro-ondas***
- 5 1 erlenmeyer de 500 mL
- 6 1 proveta de 250 mL
- 7 1 jaleco descartável por participante
- 8 1 par de luvas de látex/pessoa
- 9 1 luva para forno micro-ondas
- 10 1 pedaço pequeno (~10 x 10 cm) de papel pardo

Atenção

* O presente protocolo corresponde à preparação de um gel de agarose 3% com 200 mL de volume.

** TBE: Solução tampão composta de Tris, Borato e EDTA

*** Pode ser utilizado o banho-maria como substituto.



1 Procedimento

- Em caso de se contar com duas cubas de eletroforese, os materiais deverão ser duplicados e os participantes serão divididos em dois grupos, sendo cada grupo acompanhado por um mediador treinado.
- Um participante de cada grupo montará a bandeja do gel, com bandas isolantes nas extremidades, em uma superfície reta e lisa.
- Um outro participante colocará 6 g de agarose no erlenmeyer e adicionará 200 mL de TBE 0,5X
- Cobrir a boca do erlenmeyer com papel pardo, perfurando dois ou três buracos com uma ponteira para permitir a saída do vapor.



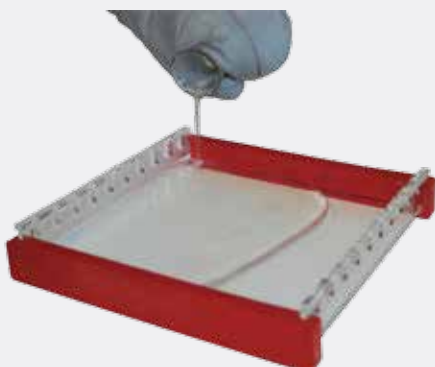
Sugestão

Se houver disponibilidade de uma balança no local, sugere-se que o participante pese os 6 g de agarose a serem adicionados ao erlenmeyer. Se possível, é interessante fornecer aos grupos o tampão TBE a uma concentração maior, de 5X, para que os participantes possam, eles mesmos, preparar o volume necessário de TBE 0,5X. Neste caso, eles misturariam em uma proveta 20 mL de tampão 5X com 180 mL de água destilada.

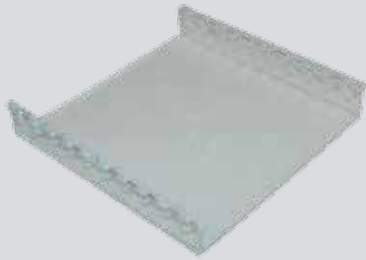


- Colocar o erlenmeyer no micro-ondas. Esquentar por um minuto. Retirar o erlenmeyer com ajuda de uma luva de cozinha, agitar suavemente a solução e colocar de novo no micro-ondas. Esquentar por mais 30 segundos. Retirar e mexer a solução, cuidando sempre para não transbordar devido ao aquecimento. Repetir os passos anteriores até conseguir uma solução transparente e sem grumos.

- Deixar esfriar um pouco, mexendo o erlenmeyer.
- Quando atingir uma temperatura suportável à mão do participante, verter o gel sobre uma das bordas da bandeja, bem devagar para não gerar bolhas.
- Encaixar cuidadosamente os pentes nos espaços apropriados da bandeja.



- Deixar solidificar por aproximadamente 20 minutos (até o gel ficar com uma aparência opaca e esbranquiçada).
- Uma vez solidificado, retirar os pentes do gel, com cuidado, e retirar as bandas de borracha das extremidades da bandeja.
- Colocar a bandeja com o gel dentro da cuba eletroforética



Ampliando a Discussão!

Sugere-se complementar esta atividade com uma explicação prática (utilizando-se uma peneira ou um filtro, por exemplo) a respeito da separação de coisas de diferentes tamanhos. No exemplo da peneira, diferentes tamanhos de partículas (de areia, terra ou semente) são separados em função do tamanho dos orifícios. Da mesma forma, o gel de agarose se assemelha a uma peneira ou a um filtro, com poros microscópicos por onde passam os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Pode-se usar aqui uma animação que mostre que fragmentos menores viajam mais rapidamente e, portanto, chegam mais longe durante uma corrida de eletroforese, em comparação com fragmentos maiores.

Diferenciando Espécies pelo seu DNA



Objetivo Geral

Demonstrar que, apesar de todos os seres vivos terem DNA, há diferenças entre o DNA das diversas espécies.

Objetivos Específicos

- 1) Aprender uma das formas mais comuns de se separar moléculas de tamanhos e formas diferentes.
- 2) Ilustrar experimentalmente que os organismos das mais variadas espécies, animais e vegetais, possuem DNA.
- 3) Demonstrar que estes organismos podem ser diferenciados por seu DNA.

Material Necessário

Atenção

Serão utilizados produtos previamente preparados de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir de DNA de diferentes espécies animais e vegetais. Para fins didáticos, as amostras devem gerar bandas de tamanhos diferentes para cada uma das espécies. Por tal motivo, foram escolhidos marcadores específicos que geram bandas de tamanho conhecidos e diferentes entre si.

Câmera fotográfica para documentar os resultados

- 1 Cuba e fonte para eletroforese
- 2 Transiluminador com luz UV
- 3 Corante para visualização de DNA*
Corante de rastreamento (loading buffer ou loading dye)**
- 4 Micropipeta P10 e ponteiros
- 5 1 pedaço de 10 cm de comprimento de Parafilm
Produtos de PCR de diferentes espécies***
Tampão TBE 0,5X em quantidade suficiente para encher a cuba****

Atenção

*O aplicador deve atentar para o fato de que há diferentes opções de corantes de DNA, o mais conhecido sendo o Brometo de Etídio (BE), que não é o mais recomendado atualmente por ser tóxico. Opções não tóxicas, como das marcas GelRed ou Diamond, são bons substitutos, que devem ser usados conforme orientação do fabricante. O presente protocolo usou o corante Safer Kasvi, que vem pronto para uso e dispensa adição de corante de rastreamento.

**A ser usado com certos tipos de corantes de DNA, como BE, GelRed ou Diamond.

***No Anexo 2, há detalhes dos marcadores moleculares de todas as espécies utilizadas nesta atividade. Tais marcadores podem ser modificados, desde que se garanta a presença de uma banda de tamanho diferente para cada espécie.

****TBE: Solução tampão composta de Tris, Borato e EDTA.



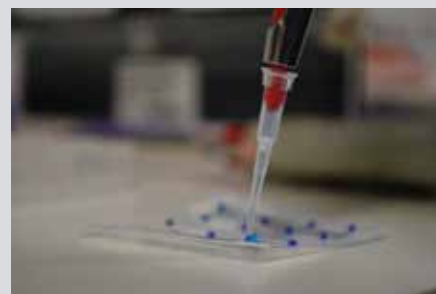
1 Procedimento

- Após os participantes terem realizado a atividade do REA anterior (ver “Como fazer um gel de agarose”) colocar o gel na cuba e cobri-lo com TBE 0,5X.
- Colocar sobre um pequeno quadrado de parafilme 1 μ l do corante Safer por amostra (Ex.: se são 10 participantes e cada participante irá aplicar 2 amostras, coloca-se 20 gotas separadas e enfileiradas de 1 μ l do corante Safer sobre o parafilme)

2 Sugestão

Dependendo do número de espécies disponíveis, podem ser definidas as repetições das amostras de cada espécie. (Ex.: se houver quatro espécies, pode-se montar um gel de 20 poços com cinco repetições de cada espécie).

- Com ajuda de uma micropipeta P10, o participante pegará 8 μ L da amostra de DNA produto da PCR e a misturará com a gota de 1 μ L do corante Safer sobre o parafilm.
- Uma vez misturada a solução, o participante identificará, com ajuda do mediador, o poço onde será colocada a amostra. A seguir, o participante aplicará a amostra no poço correspondente do gel.
- Uma vez que cada participante tenha aplicado pelo menos duas amostras no gel, um dos participantes será encarregado de colocar a tampa da cuba e inserir os cabos da fonte nos polos positivo e negativo.



Atenção

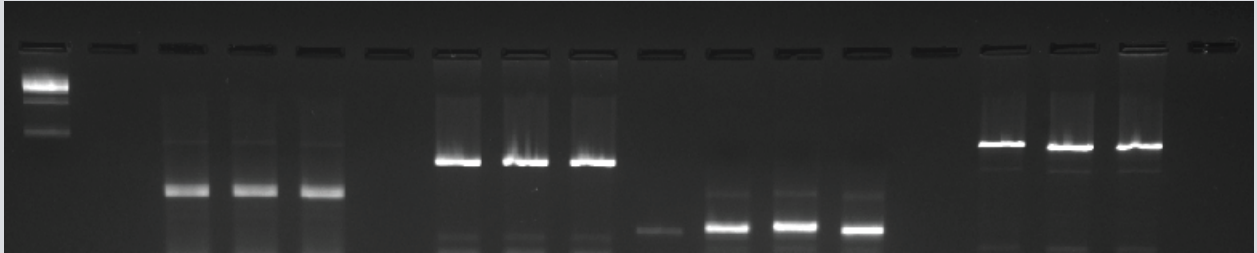
Prestar muita atenção, pois o DNA possui carga negativa e migrará para o polo positivo, que deve estar no lado oposto ao da posição das amostras

- Ligar a fonte e regula-la com os valores de corrida correspondentes (ver condições de eletroforese para gel 3%*)
- Uma vez transcorrido o tempo de corrida, os participantes observarão o gel na luz UV, protegidos por jaleco, luvas e óculos ou pela tampa de acrílico transparente do transiluminador. Para escurecer o campo de visão, recomenda-se utilizar uma caixa de papelão de cor preta com um orifício apenas suficiente para permitir a visualização.



3 Sugestão

Tirar foto do gel e utilizá-la posteriormente para discussão. É muito importante que, durante toda a manipulação na presença de luz UV, nenhuma parte do corpo desprotegida (mãos, rosto, etc) seja exposta à esta luz.



*O tempo de corrida e os valores utilizados na fonte dependem do tamanho e da concentração do gel. Neste exemplo, o gel a 3% é de 20 x 20 cm e as condições de corrida são: 300 volts, 100 mA, 200 Watts durante 30 min.

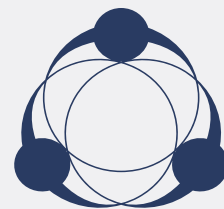
Ampliando a Discussão!

A discussão final se dá com base na imagem das diferentes bandas obtidas no gel de agarose contendo as amostras de DNA das diferentes espécies. Sugere-se perguntar aos participantes se eles conseguem, a partir das posições conhecidas dos poços onde eles próprios aplicaram suas amostras, diferenciar as espécies com base na posição de suas bandas. Perguntar o que estas diferentes espécies têm em comum.

4 Conclusão Final

Concluir que todas as espécies, incluindo a nossa, possuem DNA, que pode ser extraído, manipulado, visualizado em um gel e analisado. Isto ocorre porque todas as espécies têm um certo grau de “parentesco” entre si. Enfatizar, no entanto, que cada espécie tem sua particularidade, tanto em termos de características aparentes como em termos de seu DNA.

Anexo 2: Marcadores moleculares utilizados na atividade “Diferenciando Espécies pelo seu DNA”



Para realizar a diferenciação das espécies estudadas no gel de agarose, ao se encomendar os primers, ou no caso dos mesmos serem desenhados especificamente para o projeto, deve-se prestar atenção aos tamanhos das bandas resultantes que serão observadas em agarose 3%. O gel das espécies conta geralmente com uma ou duas espécies de plantas, o ser humano e uma ou duas espécies animais. Abaixo, descrevemos as sequências dos pares de primers referentes aos marcadores utilizados no Projeto Imagine.

Goiabeira serrana (*Acca sellowiana*)

Marcador ASE59 – fragmento esperado 178–190 pb

Sequência F: 5'-ACTATTGCATGCTTGTCTC-3'

OU

Sequência R: 5'-AGGTATCTTCAGTTCTTGTG-3'

Marcador ASE31 – fragmento esperado 300–340 pb

Sequência F: 5'-TCTTCAAACAATCCACTCTC-3'

Sequência R: 5'-TCTTCATCAGGCGACCATA-3'

Araucária (*Araucaria angustifolia*)

Marcador Ag45 – fragmento esperado 161-191 pb

Sequência F: 5'-CCATCCTCCATCATTATCC-3'

OU

Sequência R: 5'-TCCCTCCCTATGTCCCAAAG-3'

Marcador Ag94 – fragmento esperado 173-187 pb

Sequência F: 5'-CCCCACAATAACCCAAGATG-3'

Sequência R: 5'-AGTAAAATCCGCTAACAAATGC-3'

Milho (*Zea mays*)

Marcador Zeina – fragmento esperado 329 pb

Sequência F: 5'-TGCTTGCATTGTTGCTCTCCTAG-3'

Sequência R: 5'-GTCGCAGTGACATTGTGGCAT-3'

Galinha (*Gallus gallus domesticus*)

Marcadores de sexagem* – fragmento esperado aproximadamente 344 pb

Sequência primer F: 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3' (R=A ou G; Y=T ou C)

Sequência primer R: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'

*A sexagem em aves se determina pelo número de bandas. Duas bandas indicam fêmeas enquanto que uma banda indica machos.

Rato (*Rattus norvegicus*)

Marcador D4Mgh22 – fragmento esperado 92-114 pb

Sequência F: 5'-CCTGTCATGTTATTGATGATG-3'

Sequência R: 5'-GGTCACATGAAATTTGACCTCA-3'

Humano (*Homo sapiens*)

Marcador PTPN - fragmento esperado 215 pb

Sequência F: 5'-TGCCCATCCCACACTTTAT-3'

Sequência R: 5'-ACCTCCTGGGTTTGTACCTTA-3'

A diversidade biológica



Objetivo Geral

Realizar uma discussão final ampla sobre a diversidade biológica, com base nas diversas práticas realizadas durante o módulo “DNA, diversidade e hereditariedade”.

Objetivos Específicos

- 1) Perceber e discutir as diferenças existentes entre as espécies, em seus mais variados níveis.
- 2) Perceber e discutir as diferenças e semelhanças existentes entre os seres humanos, que variam tanto “dentro” como “entre” grupos, povos e etnias.
- 3) Demonstrar a utilidade da abordagem científica e das técnicas moleculares para se compreender a diversidade biológica, humana ou não humana.
- 4) Estabelecer uma relação natural entre o ser humano e as demais espécies.
- 5) Compreender que a humanidade é, do ponto de vista genético, como uma “grande família”, dentro de uma família maior ainda que é a natureza.

Material necessário

Nesta atividade, os únicos materiais necessários serão as fotografias geradas em duas atividades precedentes: “O DNA Humano – Anexo 1” e “Diferenciando Espécies pelo seu DNA”. Caso haja disponibilidade de um projetor multimídia, o ideal é fazer a discussão em torno de uma grande tela, onde serão projetadas as fotos e suas identificações. Caso contrário, pode-se fazer a atividade com as fotos impressas ou ainda utilizando a tela de um computador portátil.

Sugestão

No Projeto Imagine, a equipe sempre procura realizar esta etapa no último dia de atividades, momento em que todos os participantes se reúnem. Neste momento, outros membros da comunidade podem ser convidados a participar. O intuito principal é dar um fechamento e um sentido maior ao conjunto das práticas realizadas, possibilitando uma discussão horizontal e criativa. Antes disso, ou seja, até a noite do dia anterior, a equipe prepara as fotos na forma de uma apresentação de slides, onde se podem inserir explicações e resultados de experimentos reais, tanto da comunidade em questão quanto de comunidades de outros países ou regiões participantes do projeto.

Exemplos de duas fotos das espécies

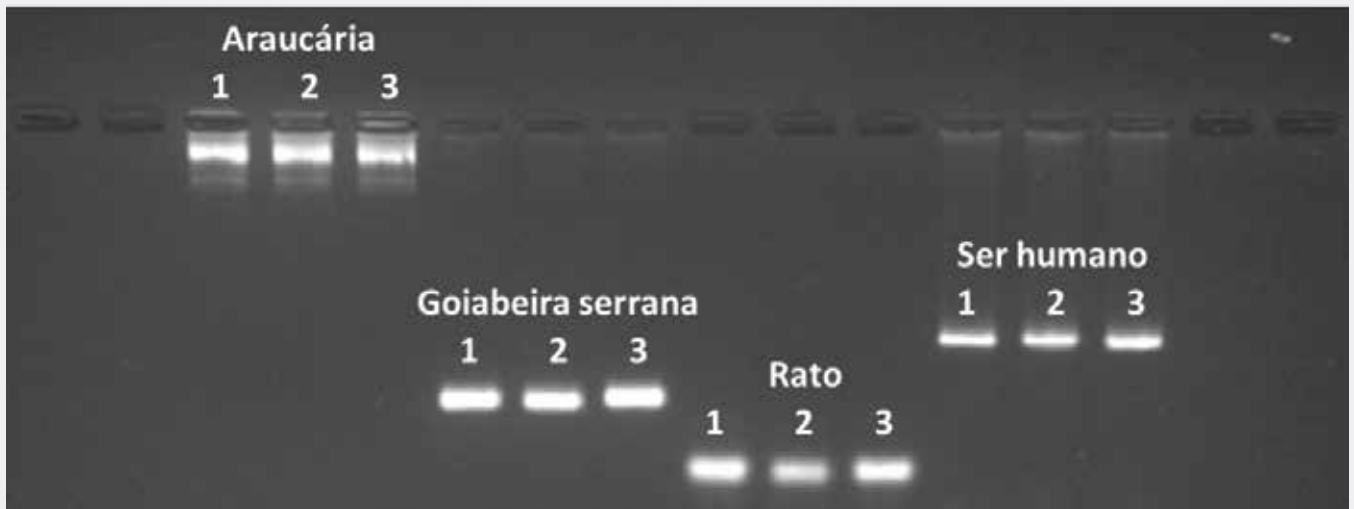


Foto 1: tirada no laboratório da UFSC com as mesmas condições dos projetos de pesquisa locais.



Foto 2: tirada em condições de campo, a partir do trabalho realizado pelas crianças das comunidades rurais de Calca no Peru. A maior parte do equipamento utilizado era pertencente à Universidad Andina del Cusco (agosto de 2014).

Com base nas fotos 1 e 2, inicia-se uma discussão envolvendo todos os participantes, na busca de uma interpretação dos resultados obtidos. É necessário explicar que os números em tela (1 a 3) correspondem às três amostras de DNA representando cada uma das espécies, que foram aplicadas pelos próprios participantes na prática "Diferenciando Espécies pelo seu DNA".

Ampliando a Discussão!

Neste momento, pode-se fazer uma recapitulação de alguns conceitos já trabalhados nas etapas anteriores, como a separação de objetos ou partículas de tamanhos diferentes através do uso de peneiras, filtros ou da própria cromatografia em papel usados nas atividades "Desvendando Características Escondidas" e "Um Gel para Ver DNA". Relembrar as características e a função do gel de agarose na separação de fragmentos de DNA.

Partindo-se do princípio que as bandas ou listras brilhantes representam as amostras de DNA de um determinado tamanho (quanto maior, mais alta a sua posição no gel), pode-se deduzir que a molécula de DNA está presente em todas as espécies trabalhadas, representando, portanto, um ponto de convergência ou de semelhança entre elas. Deve-se observar com os participantes que a posição das bandas, no entanto, permite diferenciar uma espécie da outra, representando assim um ponto de divergência entre elas. Deve-se observar que, nesta atividade, a espécie humana também apresenta semelhanças e diferenças em relação às demais espécies.

Ampliando a Discussão!

Pode-se salientar, neste momento, dependendo do grau de compreensão dos participantes, que as bandas observadas representam apenas um minúsculo fragmento (ou um "marcador") do DNA destas espécies e não seu DNA total.

Concluir que todas as espécies, incluindo a nossa, possuem DNA. Enfatizar, no entanto, que cada espécie tem sua particularidade, tanto em termos de características aparentes como em termos de seu DNA.

Exemplos de duas fotos da diversidade humana

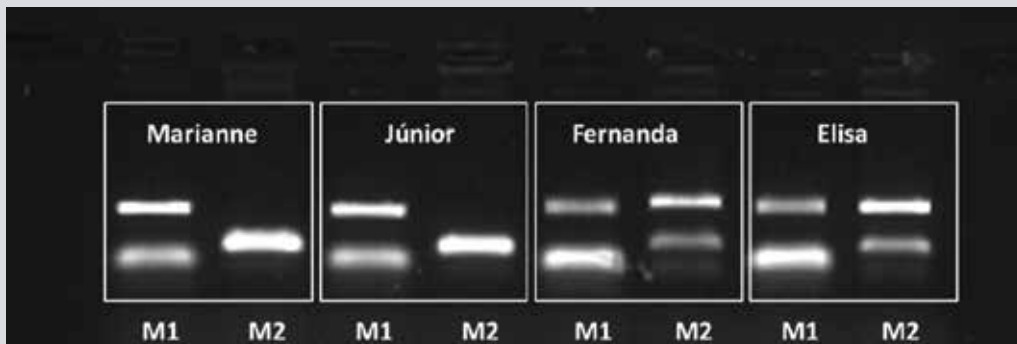


Foto 3: tirada no laboratório da UFSC com as mesmas condições dos projetos de pesquisa locais.



Foto 4: tirada em condições de campo, a partir do trabalho realizado pelas crianças das comunidades rurais de Calca no Peru. A maior parte do equipamento utilizado era pertencente à Universidad Andina del Cusco (agosto de 2014).

Com base nas fotos 3 e 4, deve-se conduzir uma discussão sobre a diversidade entre as pessoas, tanto dentro de uma mesma comunidade, como entre comunidades, etnias ou mesmo países diferentes. Os nomes representam as pessoas voluntárias e as legendas M1 e M2 representam os dois fragmentos ou “marcadores” de DNA analisados (AT3 e PV92, respectivamente), conforme descrito em “O DNA Humano – Anexo 1”.

Atenção

Nesta etapa, é muito importante que os participantes tenham espaço e liberdade para observar, analisar e interpretar os resultados de acordo com suas próprias visões e valores. Os mediadores devem simplesmente balizar a discussão, oferecendo as interpretações próprias do método científico, enfatizando que estes resultados se referem a uma porção ínfima do DNA de algumas poucas pessoas analisadas e que, portanto, não podem ser generalizados para todo o material genético de cada indivíduo, nem mesmo para todos os membros de uma determinada comunidade ou etnia.

- Perguntar aos participantes quantas bandas podem ser observadas para cada pessoa analisada, se considerarmos conjuntamente os dois marcadores, M1 e M2. Este número é variável?
- Perguntar se as pessoas podem ser diferenciadas com base no número e na posição de suas bandas. Neste caso, as pessoas voluntárias da comunidade local são todas iguais entre si ou também se diferenciam umas das outras?
- Neste momento, os mediadores podem informar de onde foram coletadas as outras amostras analisadas, por exemplo, de membros da equipe Imagine ou das comunidades X e Y que podem, inclusive, ser de países diferentes.
- Perguntar aos participantes se é possível, com base apenas nestes resultados específicos, identificar com certeza a origem das pessoas.

Ampliando a Discussão!

Pode-se sugerir aos participantes que verifiquem se os marcadores M1 ou M2 podem formar grupos diferentes de indivíduos dentro da mesma comunidade. Caso formem, pode-se iniciar uma discussão sobre quais os critérios utilizados, dando a ideia de que, ao introduzir mais marcadores, poderão se formar grupos diferentes e mais numerosos de “tipos genéticos”.

Sugestão

Com base nos dois marcadores aqui utilizados, é bastante provável que haja alguma variação entre as pessoas de uma mesma comunidade, principalmente se for evitada a seleção de voluntários com alto grau de parentesco. Além disso, também é provável que se observem semelhanças entre algumas pessoas daquela comunidade e pessoas externas à comunidade. Caso isso não aconteça num primeiro momento, pode-se ampliar o número de voluntários, incluir outras pessoas da equipe de mediadores ou mesmo selecionar os produtos de PCR armazenados de pessoas externas à comunidade. Para isso, recomenda-se que estas análises sejam feitas pelo mediador responsável já nos primeiros dois dias do módulo (ver “O DNA Humano – Anexo 1”), para que haja tempo de se ampliar as amostras e preparar o material fotográfico para a discussão final.

Conclusões finais

O que se busca ao final deste módulo é concluir, através de uma reflexão coletiva baseada em dados gerados pela própria comunidade e orientada pelos mediadores do projeto, que a diversidade é própria da natureza humana, em qualquer povo e em qualquer região do mundo. Esta diversidade faz com que não existam duas pessoas exatamente iguais e que também não existam dois povos ou etnias totalmente diferentes, pois todos compartilham, em algum grau, o seu material genético. A sugestão é que se abra a discussão para que todos manifestem suas impressões, conclusões e críticas e que reflitam sobre como as atividades realizadas poderiam dialogar com a cultura e as tradições locais.