



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Faculdade de
Ciências da Educação e Saúde

JÉSSICA MÜLLER

**EFEITO DOS ANTICOAGULANTES NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM AMOSTRAS DE EQUINOS.**

Brasília

2022

JÉSSICA MÜLLER

**EFEITO DOS ANTICOAGULANTES NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM AMOSTRAS DE EQUINOS.**

Artigo apresentado a Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção do grau em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. MSc. George Magno Sousa do Rego.

Brasília

2022

JÉSSICA MÜLLER

**EFEITO DOS ANTICOAGULANTES NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM AMOSTRAS DE EQUINOS.**

Artigo apresentado a Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção do grau em Medicina Veterinária.

Brasília, 24 de junho de 2022.

Banca examinadora

Prof. Dr. Ranieri Rodrigues de Oliveira
Membro Titular

Med. Vet. Msc. Izabelle Thayná Soares Carvalho
Membro Titular

Prof. Msc. George Magno Sousa do Rêgo
Orientador

Efeito dos anticoagulantes na reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de equinos.

Effect of anticoagulants on the polymerase chain reaction (PCR) in equine sample.

Resumo

A biologia molecular permitiu muitos progressos na medicina veterinária e a fonte de DNA mais frequentemente usada é o sangue, o qual pode ser coletado com diferentes anticoagulantes, apesar do EDTA ser o mais utilizado. A fim de fornecer dados sobre a viabilidade da amostra caso seja enviado com outros anticoagulantes, o presente estudo tem o objetivo de analisar a influência do tipo de anticoagulante, tempo de armazenamento e tipo de armazenamento na amplificação por PCR de DNA extraído de sangue equino. Amostras de sangue venoso foram colhidas em tubos contendo EDTA, Heparina de Lítio, Citrato de Sódio e Fluoreto de Sódio e foram submetidas a diferentes condições de tempo e armazenamento. As extrações de DNA foram realizadas utilizando kit comercial *DNeasy Blood & Tissue da QIAGEN®* e os produtos foram quantificados pelo espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000 Thermo®* e avaliados em gel agarose 0,8% por eletroforese. Foram realizados ensaios de PCR convencional e os fragmentos foram analisados em gel agarose 2,0%. O DNA extraído das amostras de sangue usando os quatro anticoagulantes expressou qualidade adequada do produto de PCR com o primer ASB 23 e nenhum apresentou inibição na PCR frente às diferentes condições. O tipo de anticoagulante e armazenamento que mais conferiu preservação da amostra foi o EDTA sob congelamento a -20°C.

Palavras-chave: PCR; anticoagulantes; sangue equino.

Abstract

Molecular biology has allowed many advances in veterinary medicine and the most frequently used source of DNA is blood, which can be collected with different anticoagulants, although EDTA is the most used. In order to provide data on the viability of the sample if it is sent with other anticoagulants, the present study aims to analyze the influence of anticoagulant type, storage time and storage type on PCR amplification of DNA extracted from equine blood. Two venous blood collections were performed at different times and on both occasions in tubes containing EDTA, Lithium Heparin, Sodium Citrate and Sodium Fluoride. The samples were submitted to different storage conditions and were tested for the influence of time. DNA extractions were performed using *QIAGEN's DNeasy Blood & Tissue* commercial kit and the products were quantified by the *Nanodrop ND-1000 Thermo* spectrophotometer and evaluated in 0.8% agarose gel by electrophoresis. The samples were submitted to conventional PCR assays and the fragments were analyzed in 2.0% agarose gel. The DNA extracted from blood samples using the four anticoagulants expressed adequate quality of the PCR product with the ASB 23 primer and none showed PCR inhibition under different conditions. The type of anticoagulant and storage that best preserved the sample was EDTA under freezing at -20°C.

Keywords: PCR; anticoagulants; equine blood.

1 Introdução

A equideocultura cresceu significativamente nos últimos anos e apesar dos equinos influenciarem no manejo de bovinos nas fazendas, a utilização deles em práticas de lazer, na equoterapia, e principalmente nos esportes equestres, fez com que a população de equinos avançasse, gerando mais de 3 milhões de empregos e movimentando expressivamente o agronegócio brasileiro (MARCHIORI, 2018). Esse desenvolvimento fortaleceu a demanda da verificação de parentesco através de testes de DNA, com a finalidade de registrar raças equinas e estabelecer paternidade animal (IBIAPINA, 2021).

Graças aos avanços da biotecnologia e genética animal, a disponibilidade de novas técnicas contribuiu para a identificação de possíveis anomalias genéticas e seleção de genes desejáveis ou indesejáveis (COELHO, 2009), colaborando com o melhoramento genético e possibilitando os estudos de variabilidade de genes em nível de DNA. Essas investigações podem ser realizadas com uso de marcadores moleculares, como os microssatélites (MARCHIORI, 2018).

De acordo com a conferência ocorrida na Xi'an (China) em 2014, a International Society of Animal Genetics (ISAG) recomendou para identificação de genes em equinos, o uso do painel de marcadores de microssatélites Short Tandem Repeat (STR), pequenas sequências polimórficas que repetem ao longo do genoma do indivíduo, são eles: AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 e VHL20 (GASTALDO, 2017).

A utilização desses marcadores foi relatada em estudos de investigação de genealogia de raças para melhoramento genético equino (SERENO *et al.*, 2008), pesquisa do distanciamento genético de raças (COSTA *et al.*, 2009), tipagem forense de DNA de equinos (VAN DE GOOR *et al.*, 2010) e verificação de parentesco e identificação individual (LEE; CHO, 2006); (IBIAPINA, 2021).

Por ser uma molécula estável, o DNA é muito utilizado em pesquisas moleculares, e uma ferramenta muito utilizada na rotina laboratorial de estudos genéticos é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HASS; TORRES, 2016). Para sua execução é necessário realizar extração de DNA, a qual é frequentemente realizada a partir de amostras de sangue (KOTIKALAPUDI; PATEL, 2015).

O sangue destinado a testes moleculares pode ser acondicionado em diferentes anticoagulantes de rotina como o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), heparina sódica/lítica, citrato de sódio e fluoreto de sódio, importantes para a preservação da amostra na escolha do exame desejado. O mais utilizado para extração de DNA a partir do sangue é o EDTA, pois possui capacidade de inibir a ação da DNase e não modifica a concentração de DNA (KOTIKALAPUDI; PATEL, 2015). Além disso, é utilizado em outros exames de rotina como os hematológicos e citológicos, exames para detecção de CD4 + /CD8 + e carga viral (SBPC/ML, 2014).

Na literatura há descrições sobre o efeito inibitório da heparina sódica, porém citrato de sódio, EDTA e heparina de lítio demonstraram boa amplificação (DJORDJEVIC *et al.*, 2006), em contrapartida, um outro estudo observou a interferência do citrato, alcançando resultados negativos da PCR (GARCÍA *et al.*, 2002). Ademais, cada um desses aditivos pode afetar a composição da proteína no plasma e, portanto, pode haver a interferência na utilização dessas amostras em análise proteômica e genômica (TUCK *et al.*, 2009).

A heparina, apesar de muito utilizada na rotina hematológica de répteis, análises citogenéticas e bioquímicos do plasma (SBPC/ML, 2014), pode ligar-se à molécula de DNA no processo de purificação e inibir a atividade da Taq polimerase

na PCR, não sendo indicada para estes testes (KOTIKALAPUDI; PATEL, 2015). Estudos prévios que buscaram entender o efeito do anticoagulante heparina, observaram que há a inibição da amplificação pela heparina (YACOTA *et al.*, 1999), tanto em testes de identificação de genes infecciosos (WANG *et al.*, 1992); (PARDOE; MICHALAK, 1995); (GARCÍA *et al.*, 2002), quanto em estudos genéticos (DJORDJEVIC *et al.*, 2006).

Por outro lado, já foi observado que na amplificação do gene utilizado em diagnósticos de doenças genéticas em bovinos, a heparina não interferiu na reação (KOTIKALAPUDI; PATEL, 2015). Ou seja, além de todos os critérios supracitados que afetam a reação, o gene de interesse utilizado e a espécie do animal também pode influenciar no efeito da heparina.

Além dos anticoagulantes, outros fatores também podem afetar a estabilidade das amostras biológicas como agentes estabilizantes, ácido ascórbico, glutatona, ácido metafosfórico, temperatura durante o armazenamento, seja a curto ou longo prazo, coleta e processamento da amostra, podendo degradar o DNA (HOLLAND *et al.*, 2003). O tempo antes do processamento inicial também pode influenciar dependendo do objetivo do estudo e da estabilidade do componente, assim como a esterilidade das amostras, sendo essa uma condição que pode resultar em falsos resultados, caso haja contaminação (HOLLAND *et al.*, 2003).

Apesar do EDTA ser o anticoagulante mais utilizado em análises genéticas, não se pode descartar a possibilidade de envio de amostras acondicionadas em outros tipos de anticoagulantes. Visando isso, esse trabalho torna-se importante no intuito de fornecer dados para que os laboratórios de biologia molecular tenham informações sobre a utilização da amostra em PCR. O objetivo deste trabalho é verificar a viabilidade do DNA extraído a partir de amostras de sangue coletadas em diferentes anticoagulantes, bem como, apurar o efeito do tempo e condições de armazenamento na realização da PCR.

2 Metodologia

A pesquisa foi elaborada no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por meio de experimentos na área de biologia molecular.

2.1 Coleta de sangue e armazenamento de amostras

Foram realizadas duas coletas de sangue venoso em momentos distintos (22 de fevereiro de 2022 e 15 de março de 2022), doravante denominadas grupos C1 e C2 respectivamente, de uma mesma égua na Fazenda Sucupira da Embrapa por meio da venopunção da jugular. As amostras foram colhidas em ambas as ocasiões em tubos contendo os seguintes anticoagulantes e suas respectivas capacidades (volume): EDTA K2 - 4 ml (FirstLab®), Heparina de Lítio - 6 ml (FirstLab®), Citrato de Sódio - 3,6 ml (VacuPlast®) e Fluoreto de Sódio + EDTA K3 - 2 ml (Vaccum®). Após a colheita, os tubos foram transportados até o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob refrigeração (4°C) em até duas horas após a colheita.

As amostras de sangue venoso colhidas nos diversos anticoagulantes foram submetidas a diferentes condições de armazenamento - refrigeração (4°C) e

congelamento (-20°C) e foi testada a influência do tempo de armazenamento na qualidade do DNA extraído.

As amostras de C1 foram acondicionadas sob refrigeração e submetidas à extração nos seguintes momentos: M0 (3 dias após a colheita); M1 (1 mês após colheita); M2 (2 meses após colheita) e M3 (3 meses após colheita). Já as amostras de C2, foram submetidas a uma extração inicial com a amostra ainda sob refrigeração três dias após a colheita (M0), considerando um ponto inicial de extração com a amostra ainda fresca e em seguida foi congelada (-20°C) passando por extrações nos seguintes momentos: M1 (1 mês congelado); M2 (2 meses congelado) e M3 (3 meses congelado).

2.2 Extração, quantificação e amplificação do DNA por PCR

As extrações de DNA foram realizadas de maneira igual para ambos a grupos utilizando kit comercial *DNeasy Blood & Tissue da QIAGEN®* de acordo com protocolo do fabricante. Após a etapa de extração, os produtos foram quantificados e sua qualidade foi avaliada quanto a pureza por meio da razão de absorvância 260/280 de densidade óptica (DO) no espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000 Thermo*. Além disso, a integridade do DNA das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% de forma qualitativa utilizando 2uL do produto da extração por amostra.

O DNA extraído foi submetido a ensaios de PCR convencional realizados em alíquotas com volume final de 20uL e com as seguintes concentrações dos reagentes: 2uL de DNA genômico (100 - 140 ng), 1x de Tampão 10x (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTP, 0,15 uM de cada primer, 1U de Taq polimerase (Platinum Invitrogen®) e água Mili-Q para completar o volume final.

Os primers utilizados foram sintetizados com base no painel de marcadores microssatélites (STR) recomendado pela International Society of Animal Genetics (ISAG) Equine Core Panel 2014: Locus ASB 23 localizado no cromossomo 3 do genoma equino, a sequência FWD (GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG) e sequência REV (ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC), podendo gerar fragmentos de 175 a 211 pares de base (pb).

As reações no termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler®) foram realizadas nas condições de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos (desnaturação 94°C por 20 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 40 segundos) e extensão final a 72°C por 3 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 2,0% corado com Brometo de Etídio, com carga de 100 volts por 1 hora para que houvesse migração dos fragmentos de DNA, os quais foram visualizados utilizando transiluminador de luz Ultravioleta e o marcador 1kb DNA Plus Ladder Invitrogen®.

3 Resultados e discussão

A concentração de DNA (ng/uL) e a qualidade de todas as amostras obtidas por espectrofotometria foram registradas e avaliadas quanto a pureza através da relação 260/280 da Densidade Óptica e estão dispostas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Densidade Óptica (DO 260/280) do DNA extraído a partir de amostra de sangue total equino acondicionada em diferentes anticoagulantes do grupo C1 (resfriado) e C2 (congelado).

Amostras	EDTA		Heparina		Citrato de Na+		Fluoreto de Na+	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
M0	1,87	1,95	1,87	1,81	1,97	1,81	1,82	1,83
M1	1,99	1,83	1,98	1,86	1,91	1,88	1,74	1,91
M2	1,87	1,85	1,8	1,8	1,76	1,85	1,75	1,94
M3	1,91	1,83	1,84	1,8	2,04	1,85	1,73	1,88
Média	1,91	1,87	1,87	1,82	1,92	1,85	1,76	1,89
Desvio Padrão	±0,057	±0,057	±0,077	±0,029	±0,119	±0,029	±0,041	±0,047

Fonte: De autoria própria.

Os dados da Tabela 1, mostram que as amostras do grupo C1 colhidas em EDTA e Heparina mantiveram a DO 260/280 próximo ao valor ideal 1,8 - 2,0 (GUHA *et al.*, 2017) durante M0, M1, M2 e M3. Já o Citrato, apresentou valores fora da referência desejável a partir de M2 e o Fluoreto a partir de M1. Além disso, é possível observar que todas as amostras do grupo C2 se mantiveram dentro do valor da DO considerado ideal, indicando que o congelamento permite obter extrações com qualidade desejável. Este parâmetro é utilizado para indicar contaminação por proteína, fenol ou outros contaminantes que absorvem em 280 nm ou próximo disso (LUCENA-AGUILAR *et al.*, 2016).

No presente estudo, o anticoagulante e tempo de armazenamento não interferiram na pureza da amostra obtida para aquelas extrações realizadas a partir de sangue total refrigerado colhidas em EDTA e Heparina Lítica, ao contrário do observado nas amostras colhidas em Citrato e Fluoreto de Sódio, onde a partir do M2 (Citrato) e M1 (Fluoreto) apresentaram dados de pureza fora do desejado.

Na literatura há uma carência de estudos que comparam qualidade e quantidade de DNA extraído de sangue tratado com os diversos anticoagulantes. Os valores da DO 260/280 obtidos em amostras refrigeradas colhidas em fluoreto, podem ser justificados pela associação dos dois sais, já que por ser um anticoagulante fraco e estar associado ao EDTA (BARRETO, 2021), ele possivelmente interferiu qualidade da amostra, uma vez que as amostras tratadas somente com o EDTA apresentaram bons resultados quanto a pureza.

Tabela 2 – Concentração (ng/uL) do DNA extraído a partir de amostra de sangue total equino acondicionada em diferentes anticoagulantes do grupo C1 (resfriado) e C2 (congelado).

Amostras	EDTA		Heparina		Citrato de Na+		Fluoreto de Na+	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
M0	43	55	61	59	46	39	58	40
M1	73	77	39	62	44	53	40	50
M2	66	74	30	49	34	55	31	54
M3	57	59	42	25	29	39	26	53
Média	59,75	66,25	43	48,75	38,25	46,5	38,75	49,25
Desvio Padrão	±12,95	±10,87	±13,04	±16,78	±8,098	±8,699	±14,08	±6,397

Fonte: De autoria própria.

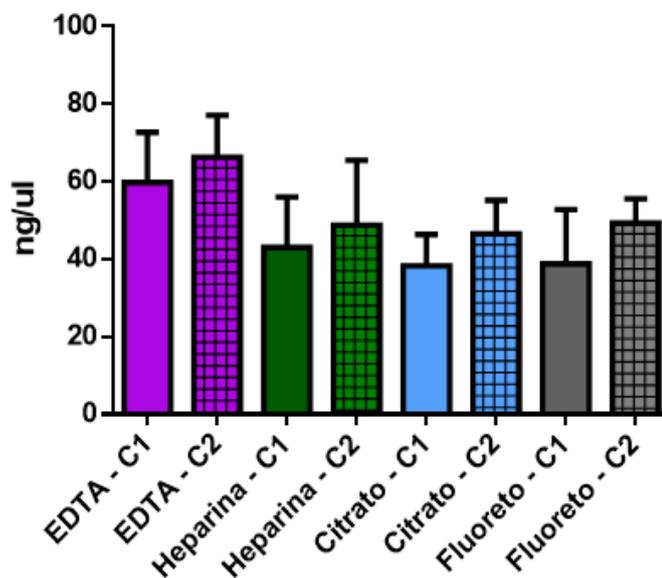
Quanto à quantidade de DNA extraído, ao passar do tempo, observa-se que as amostras apresentaram diminuição da concentração, sugerindo a não preservação e diminuição de DNA nas amostras acondicionadas sob refrigeração. Apesar das amostras sob congelamento também resultarem em menos DNA nos diferentes momentos de extração, essa diminuição foi mais sutil, indicando que esse método tende a conservar melhor a quantidade de DNA na amostra.

Na Tabela 2, observa-se que após congelamento, as extrações resultaram em produtos com melhores concentrações. Isso pode ser justificado pela maior recuperação de DNA genômico nas amostras congeladas, uma vez que, a baixa temperatura causa o rompimento dos leucócitos resultando em maior quantidade de DNA livre (GUHA *et al.*, 2017).

Em relação aos anticoagulantes, os dados obtidos mostram que as médias das amostras acondicionadas em EDTA tanto refrigerada ($59,75 \pm 12,95$) quanto congelada ($66,25 \pm 10,87$) foram superiores às obtidas nos demais anticoagulantes, esse achado corrobora com a literatura, a qual informa que o EDTA não modifica consideravelmente a concentração de DNA (KOTIKALAPUDI; PATEL, 2015).

Quando consideramos o método de armazenamento das amostras, observamos que as congeladas apresentam médias superiores às das amostras resfriadas (Figura 1). Essa condição é relatada como o melhor método para preservação de amostras (HOLLAND *et al.*, 2003), como também, na descrição de maiores concentrações de DNA, em comparação com amostras resfriadas (MOLER *et al.*, 2021).

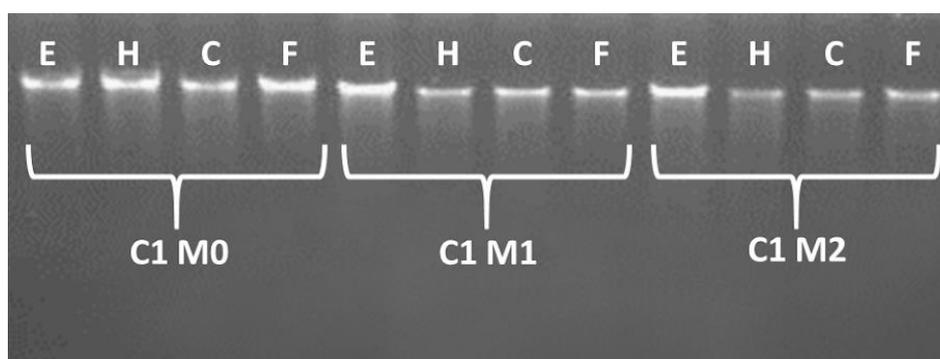
Figura 1 – Quantificação média das amostras resfriadas (C1) e congeladas (C2) em ng/uL, para avaliar a concentração do DNA com os diferentes anticoagulantes nas duas condições de armazenamento.



Fonte: De autoria própria.

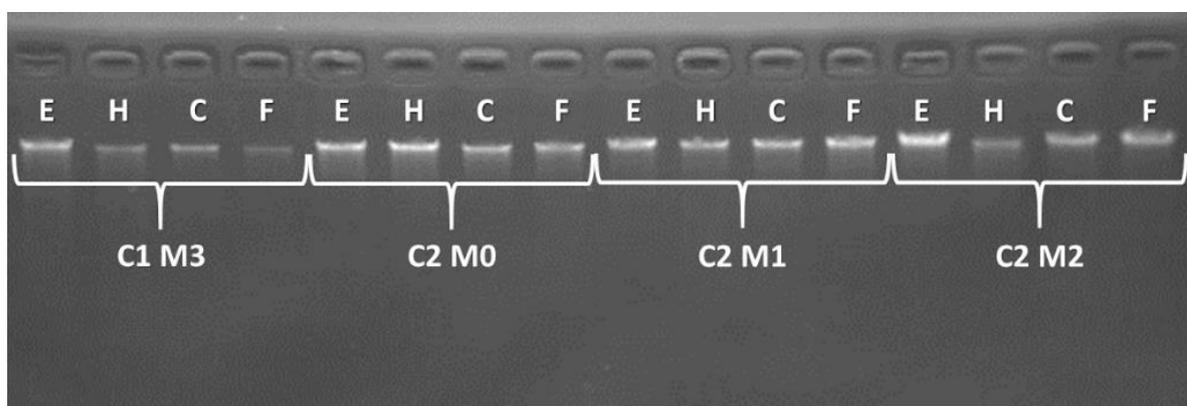
Para conferir a integridade do DNA, as extrações foram analisadas por meio do gel agarose 0,8% (Figura 3, Figura 4 e Figura 5) e todas as amostras resultaram em bandas de intensidade variável, límpidas, sem degradação, contaminação por RNA e geração de microfragmentos condições que formariam “bandas de arraste” ou linhas inferiores às bandas esperadas. Estes achados demonstram a pureza e qualidade do DNA extraído (COSTA; MOURA, 2001).

Figura 2 - Gel agarose 0,8% dos DNAs extraídos para a análise de qualidade das amostras C1 M0, C1 M1 e C1 M2. E: EDTA; H: Heparina; C: Citrato; F: Fluoreto.



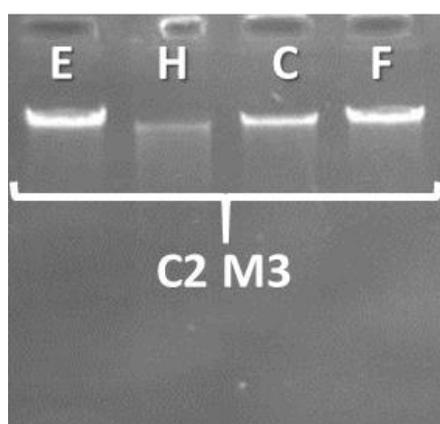
Fonte: De autoria própria.

Figura 3 - Gel agarose 0,8% dos DNAs extraídos para a análise de qualidade das amostras C1 M3, C2 M0, C2 M1 e C2 M2. E: EDTA; H: Heparina; C: Citrato; F: Fluoreto.



Fonte: De autoria própria.

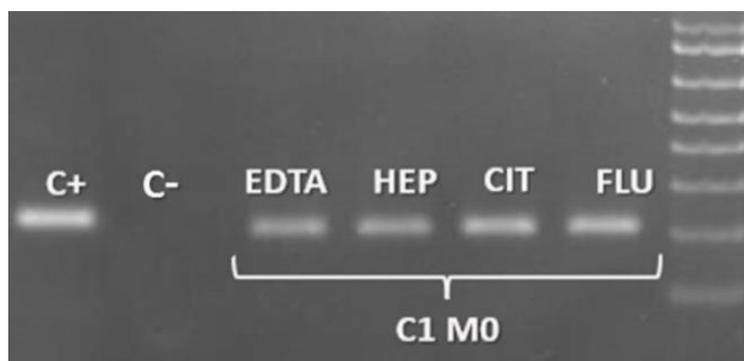
Figura 4 - Gel agarose 0,8% dos DNAs extraídos para a análise de qualidade das amostras C2 M3. E: EDTA; H: Heparina; C: Citrato; F: Fluoreto.



Fonte: De autoria própria.

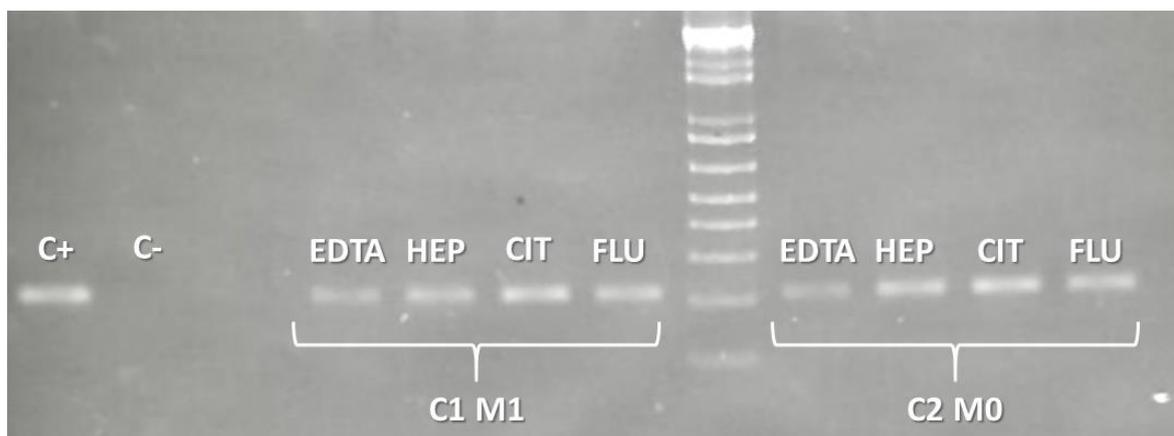
As amostras extraídas foram submetidas a reação de PCR usando os primers ASB 23, para a verificação do efeito inibitório dos anticoagulantes EDTA, Heparina de Lítio, Citrato de Sódio e Fluoreto de Sódio, e da possibilidade da interferência da degradação gradual do DNA nas amostras refrigeradas. Nenhuma das variáveis (anticoagulante, tempo e armazenamento) foram capazes de inibir a PCR como observado nas Figuras 5, 6, 7, 8 e 9, tanto para o grupo C1 quanto para o C2.

Figura 5 - Fragmentos de PCR das extrações C1 M0 (3 dias refrigerado) com primer ASB 23 (175 - 211 pb). HEP: Heparina; CIT: Citrato; FLU: Fluoreto.



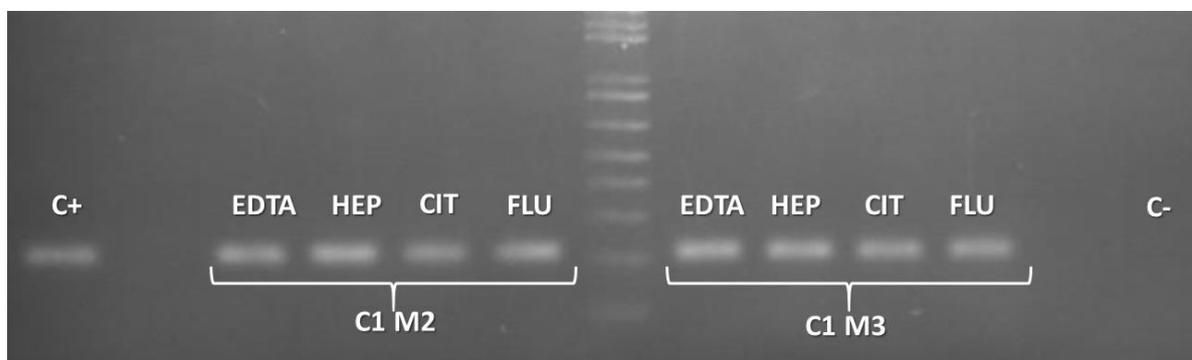
Fonte: De autoria própria.

Figura 6 - Fragmentos de PCR das extrações C1 M1 (1 mês refrigerado) e C2 M0 (3 dias refrigerado - Controle + das amostras C2) com primer ASB 23 (175 - 211 pb). HEP: Heparina; CIT: Citrato; FLU: Fluoreto.



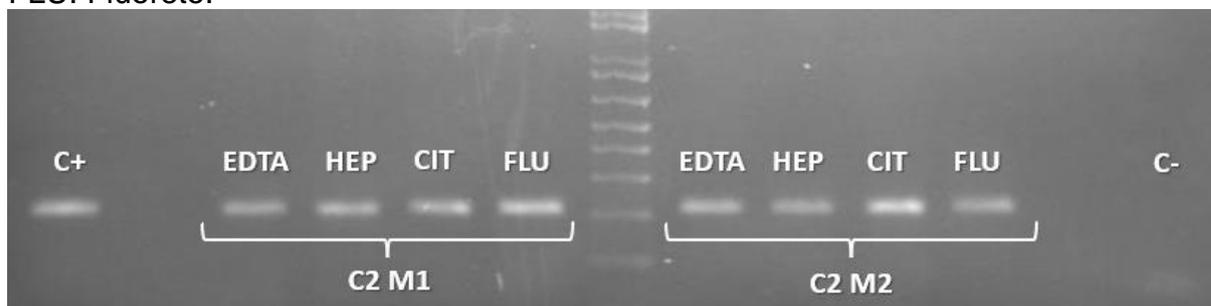
Fonte: De autoria própria.

Figura 7 - Fragmentos de PCR das extrações C1 M2 (2 meses refrigerado) e C1 M3 (3 meses refrigerado) com primer ASB 23 (175 - 211 pb). HEP: Heparina; CIT: Citrato; FLU: Fluoreto.



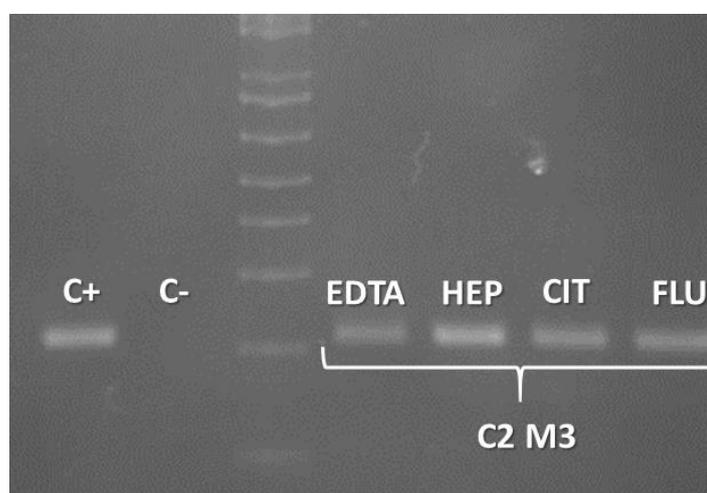
Fonte: De autoria própria.

Figura 8 - Fragmentos de PCR das extrações C2 M1 (1 mês congelado) e C2 M2 (2 meses congelado) com primer ASB 23 (175 - 211 pb). HEP: Heparina; CIT: Citrato; FLU: Fluoreto.



Fonte: De autoria própria.

Figura 9 - Fragmentos de PCR das extrações C2 M3 (3 meses congelado) com primer ASB 23 (175 - 211 pb). HEP: Heparina; CIT: Citrato; FLU: Fluoreto.



Fonte: De autoria própria.

Apesar do n amostral ter sido pequeno, pode-se inferir que a concentração de DNA nos diferentes anticoagulantes apresentou uma tendência de diminuição ao passar do tempo nas amostras no C1, condição que não afetou na reação da PCR, da mesma forma que a redução do grau de pureza nas amostras tratadas com Citrato e Fluoreto também não inibiram a amplificação, visto que todos os fragmentos resultaram em bandas com intensidade semelhante, sem bandas inespecíficas e/ou de arraste.

Na literatura, alguns estudos relatam o efeito inibitório na PCR dos Heparina e Citrato de sódio, dados que diferem dos achados do presente estudo (YACOTA *et al.*, 1999); (PARDOE; MICHALAK, 1995); (WANG *et al.*, 1992); (GARCÍA *et al.*, 2002). Por outro lado, Kotikalapudi & Patel (2015), obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde a heparina não inibiu a PCR.

4 Conclusão

O DNA extraído das amostras de sangue usando os quatro anticoagulantes expressou qualidade adequada do produto de PCR com o primer ASB 23 e nenhum

apresentou inibição na PCR frente às diferentes condições. O tipo de anticoagulante e armazenamento que mais conferiu preservação da amostra foi o EDTA sob congelamento a -20°C .

Esses achados são importantes para viabilizar a realização de testes genéticos por meio da PCR utilizando o marcador ASB 23, com amostras acondicionadas em diferentes anticoagulantes como Heparina de lítio, Citrato de Na^+ e Fluoreto de Na^+ , dado que, a fase da extração é um ponto crítico dentro de ensaios moleculares.

Dado a importância do tema, estudos futuros se fazem necessários para elucidar o efeito dos anticoagulantes, método e tempo de armazenamento na realização de estudos genéticos utilizando outros marcadores.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus, pela minha vida e pelas oportunidades que Ele me concedeu durante os meus anos de estudos.

Aos meus pais e ao meu namorado, por me incentivarem, comemorarem minhas conquistas, acreditarem no meu potencial e sempre fazerem questão de estar fielmente ao meu lado me apoiando e me proporcionando todas as condições possíveis para o meu processo de formação profissional.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, por todo apoio manifestado e pela torcida constante para que eu conseguisse superar as dificuldades, encontradas ao longo desses anos, e alcançar meus objetivos.

Aos meus professores, por toda dedicação e paciência ao lecionar, pelos aprendizados, conselhos, experiências e oportunidades na vida acadêmica.

Ao meu professor e orientador George Magno Sousa do Rego, pela confiança no meu trabalho, pelos conselhos e por prontamente me auxiliar sempre que o procurei.

Ao professor Andrei Fidelis, por me apresentar o mundo da pesquisa, por acreditar na minha capacidade e abrir as portas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Ao pesquisador Doutor Eduardo de Oliveira Melo e à doutoranda Melissa Yamashita, por tantos ensinamentos, constantes incentivos, pelas valiosas orientações durante meu estágio e por ter me dado a chance de conhecer e crescer na área da pesquisa.

Aos meus supervisores e amigos de estágio, com quem convivi intensamente durante os últimos meses, por me ensinarem, por depositarem confiança em mim, pela troca de experiências, por compartilharem comigo momentos de descobertas e entusiasmo.

A todos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho.

Referências

- BARRETO, M. E. do N. **Influência do tipo de tubo de coleta de sangue na determinação da glicose: possível interferência da glicólise “in vitro”**. 2021. 26f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.
- COELHO, E. G. A.; OLIVEIRA, D. A. A. de. **Testes genéticos na equideocultura**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 37, p. 202-205, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300023>. Acesso em: 12 abr. 2022.
- COSTA, M. R.; MARQUES, J. R. F.; SILVA, C. S.; DA CUNHA SAMPAIO, M. I.; BERMEJO, J. V. D.; DA SILVA, F. K. S.; PLA, J. L. V. **Distâncias genéticas em equinos (*Equus caballus*) por meio de marcadores Microssatélites**. Revista Biociências, v. 15, n.1, 2009.
- COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental Documentos, p. 13-15, 2001. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63491/1/Oriental-Doc89.pdf>
- DJORDJEVIC, V.; STANKOVIC, M.; NIKOLIC, A.; ANTONIJEVIC, N.; RAKICEVIC, L. J.; DIVAC, A.; RADOJKOVIC, M. **PCR Amplification on Whole Blood Samples Treated with Different Commonly Used Anticoagulants**. Pediatric Hematology and Oncology, v. 23, n. 6, p. 517-521, 2006. DOI: 10.1080/08880010600751900
- GARCIA, M. E.; BLANCO, J. L.; CABALLERO, J.; GARGALLO-VIOLA, D. **Anticoagulants Interfere with PCR Used To Diagnose Invasive Aspergillosis**. Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 4, p. 1567-1568, 2002. DOI:<https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1567-1568.2002>
- GASTALDO, A. Z. **Identificação genética e estudos populacionais utilizando microssatélites (STR) em equinos, bovinos e caninos domésticos provenientes do Uruguai, Paraguai e Brasil**. 2017. Dissertação (Doutorado) Faculdade de Biociências Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2017.
- GUHA, P.; DAS, A.; DUTTA, S.; CHAUDHURI, T. K. **A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples**. Journal of Clinical Laboratory Analysis, v. 32, n. 1, p 1 – 7, 2018. <https://doi.org/10.1002/jcla.22181>
- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. **Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais**. Revista Científica de Medicina Veterinária, ano XIV, n. 26, 26 jan. 2016.
- HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. **Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies**. Mutation Research, v. 543, n. 3, p. 217–234, 2003.

IBIAPINA, B T. **Desenvolvimento e validação de kit multiplex para identificação genética e teste de parentesco por análise de microssatélites em equinos.** 2021. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

KOTIKALAPUDI, R.; PATEL, R. K. **Comparative study of the influence of EDTA and sodium heparin on long term storage of cattle DNA.** Cell journal, v. 17, n. 1, p. 181–186, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.526>. Acesso em: 12 de abr. 2022.

LEE, S. Y.; CHO, G. J. **Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing.** Journal of veterinary science, v. 7, n. 1, p. 63-67, 2006.

LUCENA-AGUILAR, G.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.M.; BARBERÁN-ACEITUNO, C.; CARRILLO-ÁVILA, J. A.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A.; AGUILAR-QUESADA, R. **DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis.** Biopreservation and biobanking, v. 14, n. 4, p. 264-270, 2016. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

MARCHIORI, C. M. **Caracterização genômica de equinos das linhagens de trabalho e de corrida da raça Quarto de Milha.** 2018. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2018.

MØLLER, P.; BANKOGLU, E. E.; STOPPER, H.; GIOVANNELLI, L.; LADEIRA, C.; KOPPEN, G.; GAJSKI, G.; COLLINS, A.; VALDIGLESIAS, V.; LAFFON, B.; BOUTET-ROBINET, E.; PERDRY, H.; BO, C. D.; LANGIE, S.A. S.; DUSINSKA, M.; AZQUETA, A. **Collection and storage of human white blood cells for analysis of DNA damage and repair activity using the comet assay in molecular epidemiology studies,** Mutagenesis, v. 36, n. 3, p. 193-212, 2021. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab012>

PARDOE, N. U.; MICHALAK, T. I. **Detection of hepatitis B and woodchuck hepatitis viral DNA in plasma and mononuclear cells from heparinized blood by the polymerase chain reaction.** Journal of Virological Methods. v. 51, n. 2-3, p. 277-288, 1995.

SBPC/ML. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Coleta e Preparo da Amostra Biológica,** Barueri, SP. Manole: Minha Editora, 2014. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br>. Acesso em: 12 de abr. 2022.

SERENO, F. T. P. D. S.; SERENO, J. R. B.; VEGA-PLA, J. L.; DELGADO, J. V. **DNA testing for parentage verification in a conservation nucleus of Pantaneiro horse.** Genetics and Molecular Biology, v. 31, p. 64-67, 2008.

TUCK, M.; CHAN, D.; CHIA, D.; GODWIN, A.; GRIZZLE, W.; KRUEGER, K.; ROM, W.; SANDA, M.; SORBARA, L.; STASS, S.; WANG, W.; BRENNER, D. **Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection: Early Detection**

Research Network Consensus Statement Standard Operating Procedure Integration Working Group. Journal of proteome research. v. 8, p. 113-117, 2009.

VAN DE GOOR, L. H. P.; PANNEMAN, H.; VAN HAERINGEN, W. A. **A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci.** Animal genetics, v. 41, n. 2, p. 122-127, 2010.

WANG, J. T.; WANG, T. H.; SHEU, J. C.; LIN, S. M.; CHEN, D. S. **Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus.** Journal of Clinical Microbiology. v. 30, n. 3, p. 750-753, 1992. DOI:<https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.750-753.1992>

YOKOTA, M; TATSUMI, N.; NATHALANG, O.; YAMADA, T.; TSUDA, I. **Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells.** Journal of Clinical Laboratory Analysis. v. 13, n. 3, p. 133-140, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2825\(1999\)13:3<133::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:3<133::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0)