

## REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

### AUTORES

**Andressa Fernanda SILVA  
Ana Carolina PIOVESAN  
Larissa Mayara ROSSALU**

Discentes da União das Faculdades dos Grandes Lagos - UNILAGO

**Amanda Priscila de OLIVEIRA  
Ana Iara Costa FERREIRA  
Natalia MARTIN  
Paula Curi de Freitas FAVARO  
Silvia Messias BUENO  
Fabiana NAKASHIMA**

Docentes da União das Faculdades dos Grandes Lagos - UNILAGO

### RESUMO

Após a descoberta da molécula de DNA, vários métodos de análises foram desenvolvidos para facilitar os estudos da mesma. Considerando a relevância desta molécula para a sobrevivência do ser humano, o conhecimento sobre os métodos disponíveis para análise é de grande importância para os profissionais da área da saúde. Por isso, este trabalho buscou elaborar uma revisão narrativa sobre a PCR. A PCR consiste em uma reação de amplificação *in vitro* de regiões específicas de ácidos nucleicos. Sua realização depende, principalmente de alguns reagentes (*primer*, Taqpolímerase, tampão e  $MgCl_2$ ) e de um aparelho conhecido como termociclador, o qual é responsável pelas alterações da temperatura, a fim de contemplar as etapas de desnaturação, anelamento e extensão. O resultado pode ser analisado por meio da eletroforese ou em tempo real (PCR em tempo real). Esta metodologia é considerada um grande avanço da área de biologia molecular, pois permite explorar o conhecimento sobre os processos envolvidos no desenvolvimento e expressão das características, que são de interesse tanto da área de pesquisa básica como clínica.

### PALAVRAS - CHAVE

PCR, biologia molecular, eletroforese

## 1. INTRODUÇÃO

Dados históricos mostram que o interesse pelo material genético iniciou-se por volta de 1865 com Gregor Mendel, que por meio de seus experimentos descobriu que as características são herdadas com base em leis específicas, hoje conhecidas como leis de Mendel. No ano de 1866, Ernst Haeckel conseguiu identificar o núcleo como sendo o responsável pela transmissão das características hereditárias. Em 1869, Johann Friedrich Miescher foi primeiro pesquisador a isolar o DNA (ácido desoxirribonucleico) e por meio dos experimentos de Watson e Crick (1953), foi elucidada a estrutura tridimensional desta molécula (DAHM, 2005; RAJENDRAN MAHEASWARI, JAISHREE TUKARAM KSHIRSAGAR, 2016). Após estas descobertas, vários meios de estudos foram desenvolvidos com intuito de conhecer e compreender a molécula de DNA, dentre eles estão: o *Southern blot* (Edwin Southern, 1975), o Sequenciamento (Frederick Sanger e Walter Gilbert, 1977) e a Reação em Cadeia da Polimerase-PCR (Kary Mullis, 1985) (DAHM, 2005; DEMAR et al., 2011; RAJENDRAN MAHEASWARI, JAISHREE TUKARAM KSHIRSAGAR, 2016)

Diante da importância da molécula de DNA para a sobrevivência do ser humano e a conservação de suas características ao longo das gerações, o conhecimento sobre os métodos de estudos e suas aplicações torna-se de extrema importância para os profissionais da área da saúde. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão narrativa sobre produções teóricas que abordam a PCR. Foi realizada uma pesquisa de produções teóricas nas bases de dados PubMed, Scielo e Lilacs. Foram selecionados trabalhos que abordavam os princípios da PCR utilizando as seguintes palavras-chave: PCR; Técnicas de Laboratório Clínico; Biologia Molecular; avaliação diagnóstica, eletroforese, qPCR.

## 2. HISTÓRICO

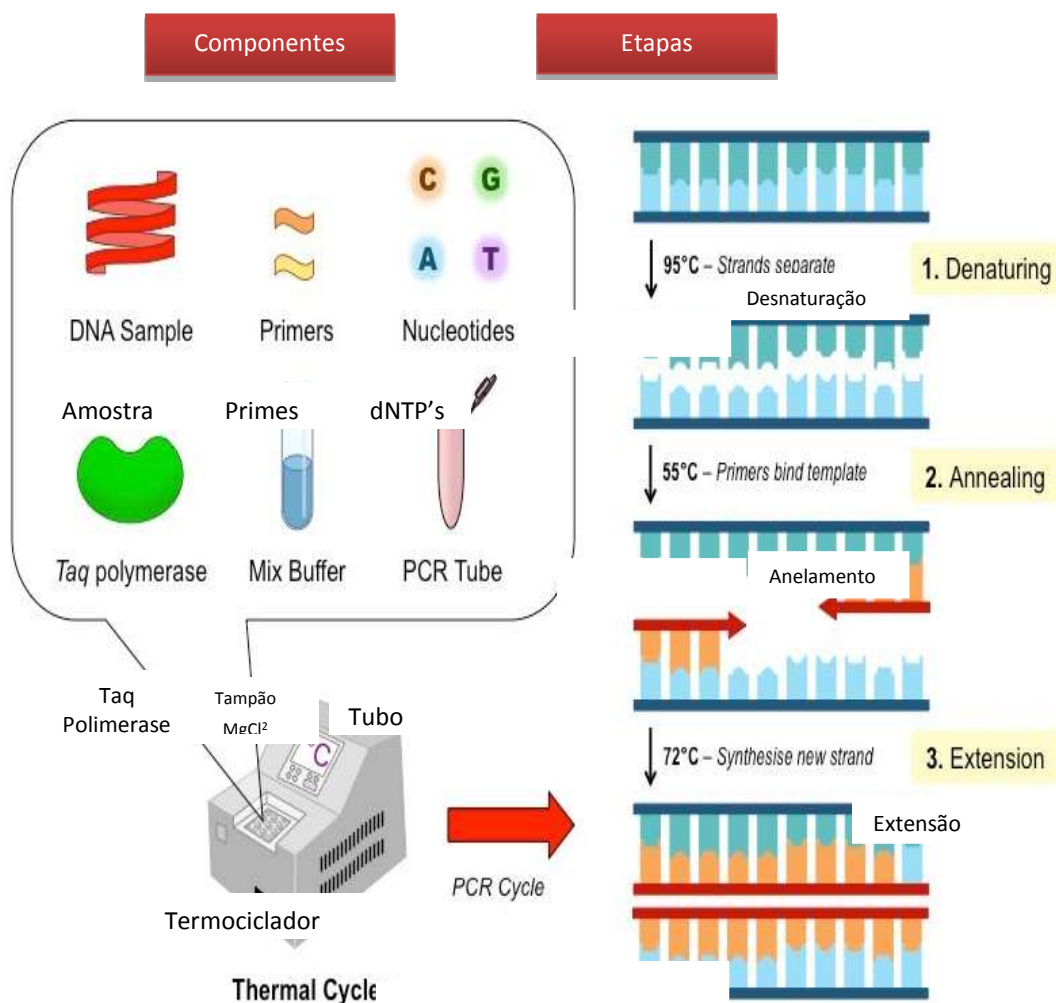
A PCR, nos dias atuais, é considerada uma das técnicas de biologia molecular de grande importância revolucionária (LORENZ, 2012; RAJENDRAN MAHEASWARI, JAISHREE TUKARAM KSHIRSAGAR, 2016; TYRRELL, 1997). Seu criador, Mullis (1983), em 1993 recebeu o prêmio Nobel em química pela descoberta (MULLIS, 1990; MLA style: "Kary B. Mullis - Facts". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 30 Jun 2016. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html)>), e desde então, esta metodologia vem sendo amplamente aplicada em diversas áreas; são exemplos: identificação de polimorfismo, genotipagem, detecção de microrganismos, doenças genéticas, entre outras (AGNE et al., 2009; CARNEIRO et al., 2013; MILLER, 2007; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; TIBAYRENC et al., 2002).

## 3. PCR

A PCR consiste na detecção e a amplificação *invitro* de regiões específicas de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) (TYRRELL, 1997). O desenvolvimento desta técnica é dependente dos seguintes reagentes e aparelho: amostra, primers, *dNTP's*, *Taq* polimerase,  $MgCl_2$ , tampão da PCR e de um termociclador (AGNE et al., 2009; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; SANTOS et al., 2014)

A amostra está relacionada a fonte do material que deseja-se amplificar, podendo ser sangue, biópsia de qualquer tecido, cabelo, unha, líquidos corpóreos, entre outros. Os *primers* (pelo menos um par) são responsáveis pela identificação do local correto (exemplo gene) do material a ser amplificado; os dNTP's (desoxirribonucleotídeos fosfatados) são responsáveis pela síntese de novas cópias do material a ser amplificado; a *Taq* polimerase sintetiza as novas cadeias de DNA ou cDNA; o  $MgCl_2$  e o tampão da PCR colaboram com a atividade da polimerase; e o termociclador é responsável pelas alterações das temperaturas que levam a desnaturação da molécula de DNA ou cDNA, ao anelamento dos *primers*, e ao alongamento/extensão das novas cadeias de DNA (SANTOS et al., 2014), conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1. Componentes e etapas envolvidas durante a PCR que ocorrem no termociclador

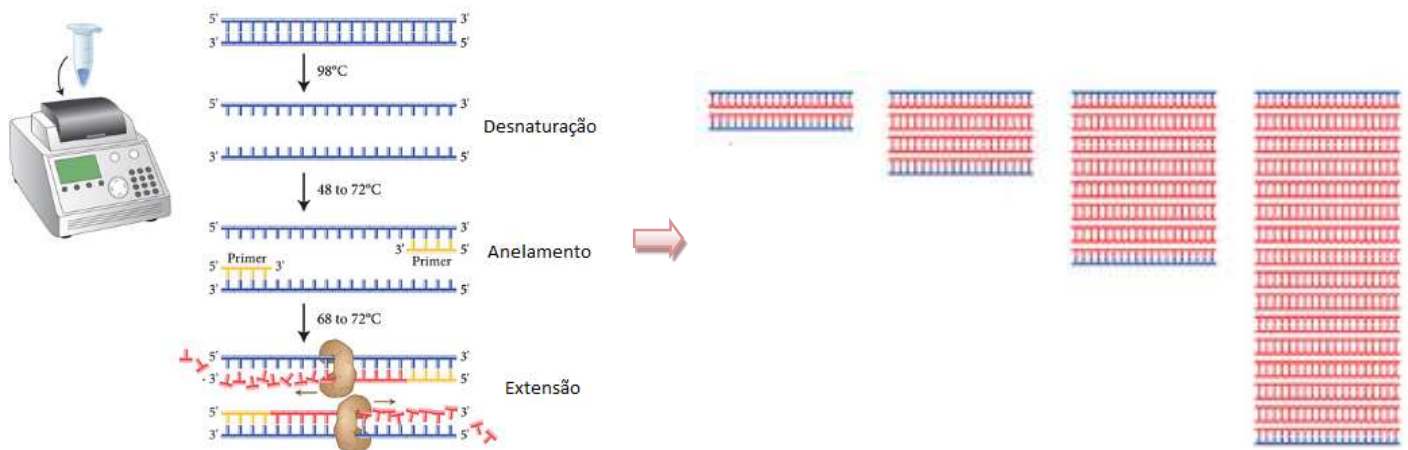


Fonte: Adaptador de <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>. Acessado em 29/06/2016.

O tubo com todos os reagentes e a amostra é encaminhado a um aparelho conhecido como termociclador. Este aparelho é composto por um bloco capaz de aquecer e resfriar de acordo com o sentido da corrente elétrica aplicada. O termociclador divide a reação de PCR em três etapas, que são: desnaturação, anelamento e extensão (SANTOS et al., 2014). A desnaturação é caracterizada pelo aumento da temperatura (91 a 95°C) com a finalidade de romper as pontes de hidrogênio e, assim permitir a abertura da dupla fita. O anelamento está relacionado com a ligação dos *primers* na região específica que se deseja

amplificar e é caracterizada pelo abaixamento da temperatura (55 a 62°C). Esta temperatura esta diretamente relacionada com a composição dos *primers*. A terceira etapa, a extensão, envolve a ativação da *Taq* Polimerase (72°C) e subseqüentemente a síntese das novas cadeias (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010), conforme ilustrado na figura 2. Estas alterações de temperatura ocorrem em torno de 30 a 40 vezes e são chamadas de ciclo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Figura 2. Etapas da PCR



Fonte: Adaptado de <https://monitoriadegenetica.files.wordpress.com/2014/09/pcr.jpg>. Acessado em 01/07/2016.

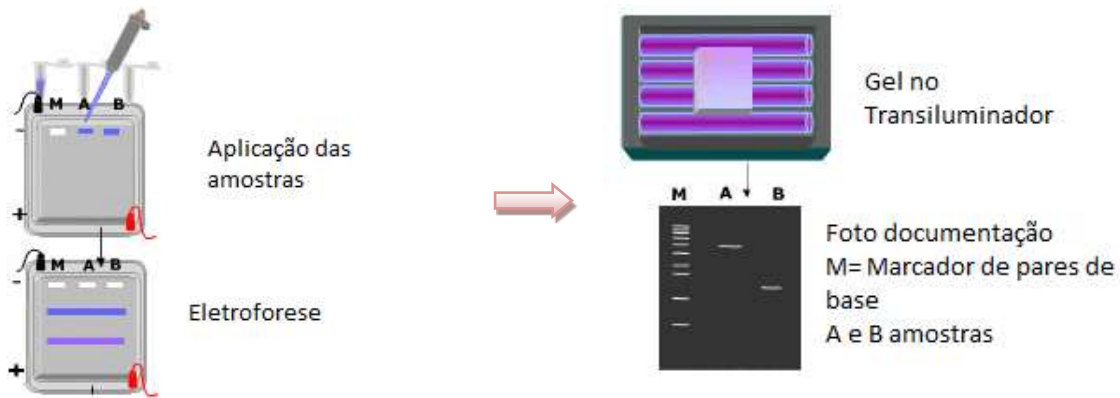
## 4. FORMAS DE REVELAÇÃO DO RESULTADO DA AMPLIFICAÇÃO

### 4.1 Eletroforese

A eletroforese trata-se de um processo de migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico. Por apresentarem grupos funcionais ionizáveis, várias moléculas adquirem carga positiva ou negativa em um determinado pH. Portanto, quando são submetidas a um campo elétrico, essas moléculas carregadas migram para o cátodo ou ânodo, dependendo de sua carga (WILSON; WALKER, 2010).

Para a realização desta metodologia é necessário uma fonte de tensão e uma unidade de eletroforese que estão disponíveis na forma vertical e horizontal. Além destes itens, também é necessário de um gel, que pode ser de poliacrilamida ou de agarose (WILSON; WALKER, 2010). O gel de agarose é o tipo de matriz mais rotineiramente utilizado no laboratório de Biologia Molecular, que por sua constituição química e o tamanho dos poros pode mudar a velocidade de migração dos ácidos nucléicos (PETECOF et al., 2015). Na figura 3 está esquematizado o processo envolvido na eletroforese.

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose



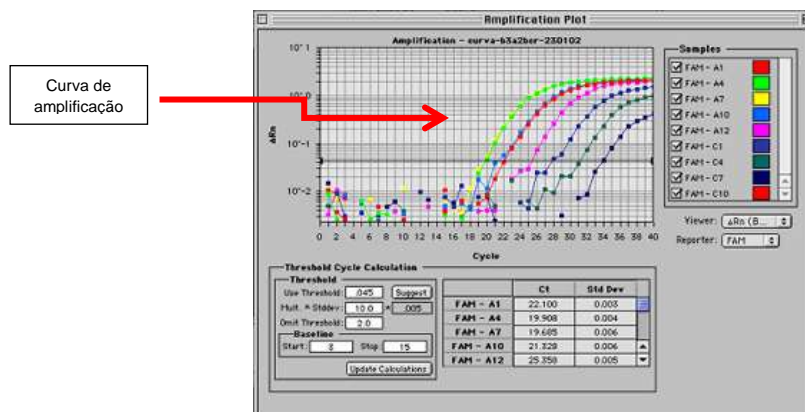
Fonte: Adaptado de <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/eletroforese.php>. Acessado em 01/07/2016.

#### 4.2 PRC em Tempo real

O PCR em tempo real possibilita monitorar, em tempo real, o processo de amplificação e permite a quantificação dos ácidos nucleicos por meio da emissão e captação de fluorescência que ocorre durante todo o processo. A emissão da fluorescência gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. O PCR em tempo real requer um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e captação da emissão, além de um computador com um *software* para aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Existem dois tipos de sistemas principais de fluorescências, o SYBR Green e o Taq Man. O SYBR Green se liga a qualquer molécula de dupla fita e TaqMan consiste em uma sonda ligada a um fluoróforo em uma das extremidades, e na outra uma molécula *quencher*. Durante a amplificação as moléculas de fluorescência são excitadas e a luz é captada pelo aparelho. Conforme ocorre a reação é gerado uma curva de amplificação (AGNE et al., 2009; ARYA et al., 2005), conforme mostra a figura 4.

Figura 4. Análise em tempo real da amplificação



Fonte: Adaptado de <http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/manuais/manual-hematologia/Pages/pcr.aspx>. Acessado em 01/07/2016.

## 5. CONCLUSÃO

A criação da PCR é considerada um grande avanço na área de biologia molecular, pois esta metodologia permite explorar o conhecido sobre o genoma e sua expressão. Esta técnica consiste em uma reação de amplificação *in vitro* de regiões específicas de ácidos nucleicos. A sua realização é considerada simples, entretanto necessita de vários reagentes e do aparelho termociclador, o qual permite variações na temperatura, caracterizando três etapas (desnaturação, anelamento e extensão). A revelação dos resultados pode ser feita por eletroforese ou em tempo real (PCR em tempo real).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNE, M. et al. PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN MEDICAL DIAGNOSTIC FIELDS : A REVIEW. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 1–11, 2009.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Rev. Mol.Diagn**, p. 209–219, 2005.

CARNEIRO, A. C. A. V. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901–7, mar. 2013.

DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental Biology**, v. 278, p. 274–288, 2005.

DEMAR, M. et al. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 10.1111/j.1469-0691.2011.03648.x, p. 221–231, 2011.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction : Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. May, p. 1–15, 2012.

MILLER, M. B. Molecular diagnosis of infectious diseases. **NC MED J**, v. 68, n. 2, p. 115–118, 2007.

MULLIS, B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, n. April, p. 56–65, 1990.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. DA S. Tecnologia de PCR e RT em tempo real e suas aplicações na área médica. **RBM**, v. 10, p. 7–19, 2010.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.

PETECOF, R. et al. Análise da eficiência do gel de agar-agar na eletroforese de DNA. **Acis Atas de Ciências da Saúde**, v. 3, n. 3, 2015.

RAJENDRAN MAHEASWARI, JAISHREE TUKARAM KSHIRSAGAR, AND N. L. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. **J Indian Soc Periodontol**, v. 20, n. 2, p. 128–135, 2016.

SANTOS, E. A. et al. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, p. 1522–1525, 2014.

TIBAYRENC, M. et al. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. v. 32, p. 27–38, 2002.

TYRRELL, D. A. J. Polymerase chain Reaction. **BMJ**, v. 324, n. 4, p. 4–9, 1997.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. New York: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2010.