



GENÉTICA NO COTIDIANO

Material de apoio para o curso

Organizador: Enéas Ricardo Konzen

G328

Genética no cotidiano. Material de apoio para o curso/
Enéas Ricardo Konzen – Organizador.

Diagramação: Ana Carolina Nardini Cabral e
coordenação de Marlise Bock Santos.

NAPEAD - Núcleo de Apoio Pedagógico à Educação à Distância

Imbé - RS: 2024.

112 p. ; il. color. Recurso eletrônico.

1. Genética. 2. Educação Básica. 3. Konzen, Enéas Ricardo.
I. Cabral, Ana Carolina Nardini. II. Santos, Marlise Bock.
III. Título.

CDU 575(816.5)

Ismael Cabral – CRB10/2484

Módulo 6

Autor:
Enéas Ricardo Konzen

MÓDULO 6

ANALISANDO A PCR ENQUANTO ELA OCORRE

No capítulo anterior trabalhamos com a técnica de PCR como uma ferramenta para investigar desde a variabilidade genética de populações e espécies até mesmo detectar a presença de um gene ou uma mutação específica. No contexto da pandemia de COVID-19, que foi declarada pela OMS no início de 2020, a técnica de PCR passou a fazer parte das reportagens de jornais e revistas eletrônicas como nunca. Lembre que a técnica surgiu nos anos 1980! Mídias sociais tais como Twitter, Instagram, Facebook, LinkedIn e outras frequentemente se referem ao teste de PCR para detecção do coronavírus. Mas como de fato a técnica é utilizada para detectar o vírus? Neste texto vamos esclarecer brevemente a potencialidade da técnica em detectar genes específicos e variantes genéticas. Apesar de tratarmos do exemplo do coronavírus, tenha em mente que a técnica pode ser utilizada para diversas outras aplicações.

Para o caso do coronavírus é importante entender como o material genético do vírus é constituído. O vírus é chamado SARS-CoV-2 e o seu material genético é constituído por RNA de filamento simples, com cerca de 29.000 bases. Para você ter uma ideia, o material genético (ou genoma) humano tem mais de 3 bilhões de bases (unindo os 23 cromossomos que apresentamos de apenas um dos nossos pais, ou seja, a metade de uma célula somática). Então, o vírus é muito pequeno comparado ao nosso genoma. Mesmo assim causou inúmeras mortes e internações.

Ao longo do material genético do vírus há vários genes que são responsáveis pela sua montagem e também pela sua capacidade de infectar humanos. A porta de entrada do vírus nos seres humanos é através de um gene específico, o *Spike* (do inglês que pode ser literalmente traduzido como espinho ou espícula) ou gene *S*. Esse gene codifica a proteína *S* do vírus. Essa proteína se deposita na superfície do vírus e dá o aspecto de coroa do mesmo. Através dessa proteína e de uma proteína receptora humana, ACE2, o vírus consegue entrar nas células humanas e se multiplicar. Se você quiser saber mais sobre isso, assista um vídeo produzido por nossa equipe pelo link: <https://www.youtube.com/watch?v=vH72091ObWM>. Não esqueça que esse vídeo é de agosto de 2020. Conforme o tempo passa, novas evidências surgem. De qualquer modo, é um bom resumo de como os cientistas começaram a compreender a estrutura e a evolução do coronavírus.

Com base nesses conhecimentos, os cientistas passaram a utilizar a PCR para detectar o vírus por meio do gene *S*. Utilizando primers que conseguem se anelar ao

material genético do vírus e produzir cópias de parte desse gene em quantidade suficiente para detecção, passou-se a realizar os procedimentos para confirmar a infecção pelo vírus nos primeiros dias após a infecção. Portanto, para o teste acusar resultado positivo, é necessária uma quantidade mínima de carga viral que, por PCR, será multiplicada e detectada por um aparelho.

Mas então você pode se perguntar: ora, já tratamos disso no módulo anterior, por que repetir então?

Bom, neste módulo estamos introduzindo conceitos e a operacionalização da técnica de **PCR em tempo real**. A chave, portanto, é a expressão '*em tempo real*'. O que isso significa? **A PCR em tempo real permite que você acompanhe ciclo após ciclo de multiplicação ou amplificação do material genético na tela de um computador**. Basicamente, é preparada uma solução de reação que contém: nucleotídeos (com as bases A, G, T e C), primer (pequena sequência de nucleotídeos que se liga à região de interesse), tampão de PCR, cloreto de magnésio (cofator da enzima, sem ele não é possível a enzima fazer o seu trabalho), DNA polimerase (enzima que fará a adição dos nucleotídeos a partir do primer e que precisa do cloreto de magnésio), água, o material genético alvo e um marcador de fluorescência.

O segredo da técnica de PCR em tempo real está no **marcador de fluorescência**, que consiste em uma espécie de 'corante de DNA'. Quimicamente, é uma molécula que funciona como **intercalante**, ficando entre os filamentos de DNA que vão sendo produzidos ao longo dos ciclos da PCR. Quanto maior a quantidade de DNA produzido, mais dessa molécula intercalante estará presente entre as fitas produzidas.

Falando do processo inteiro, podemos basicamente repetir o que já foi falado no módulo anterior, adicionando o fato de que essa molécula intercalante estará presente ao longo de todos os ciclos. Vamos de novo? Ao material genético em filamento simples liga-se o primer, por complementaridade, em temperatura adequada. A partir do primer, a enzima DNA polimerase adiciona os nucleotídeos complementares, formando novas cópias de cada fita.

Esse processo se repete por até 40 a 45 ciclos. O segredo está aqui: **a cada ciclo dentro do termociclador, a intensidade da fluorescência é capturada através de um laser e o sinal é transferido a um computador (Figura 6.1)**. Nos primeiros ciclos, há pouca fluorescência porque há pouco material amplificado. Após cerca de 15 a 20 ciclos (varia com a concentração do gene ou fragmento alvo), a intensidade da fluorescência aumenta se a quantidade de DNA aumenta significativamente. Essa intensidade vai aumentando e é mostrada na forma de uma curva ascendente. Após 35 a 45 ciclos, essa curva atinge um platô, pois os materiais necessários à PCR vão ficando escassos e degradando, ou seja, a PCR chega ao seu final. A figura 6.2 ilustra a curva ascendente de fluorescência, comparada a um controle, que não contém material genético. No controle, a fluorescência usualmente permanece na base do gráfico, sem sinal, portanto.

O que pode acontecer às vezes é o primer se anelar a ele mesmo e gerar algum produto residual, este podendo ser visualizado por uma leve ascendência da curva nos últimos ciclos. Na figura, as linhas roxas indicam três repetições do controle, nenhuma apresentando qualquer sinal de ascendência até o final.

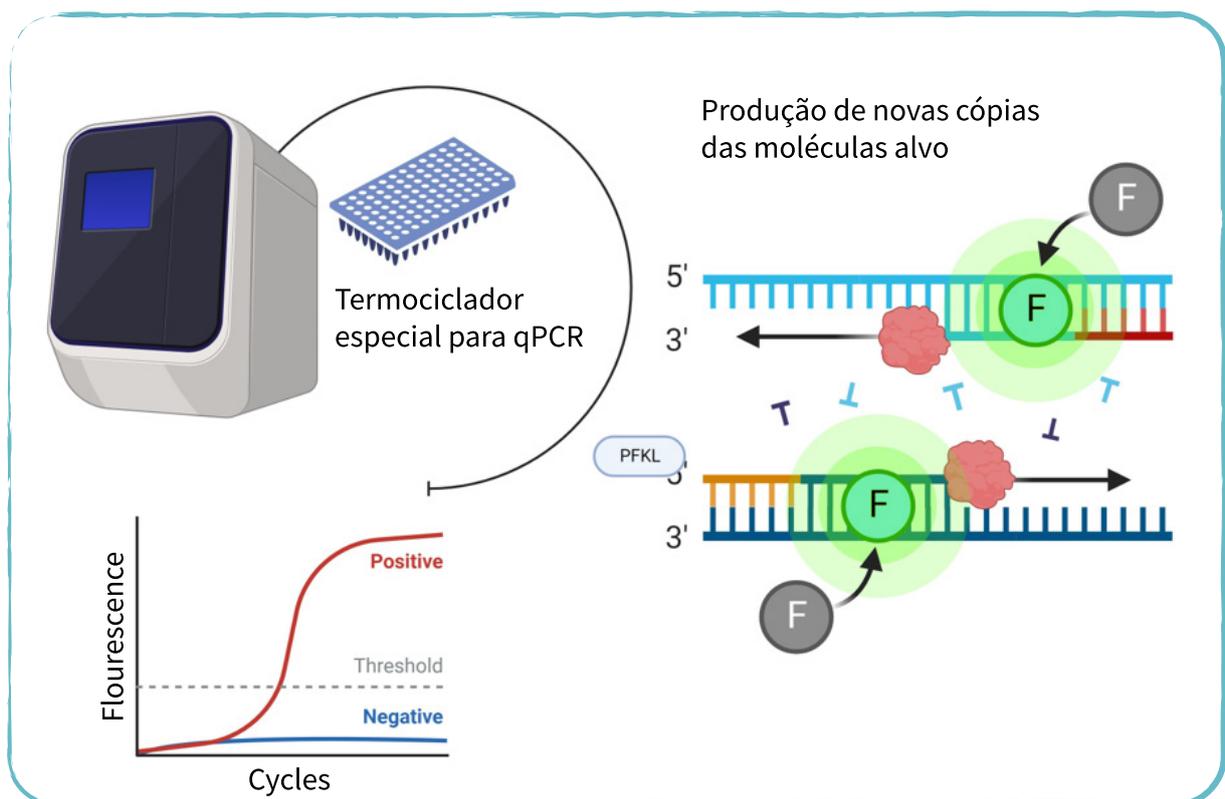


Figura 6.1 - Uma síntese do princípio da PCR em tempo real. Um intercalante de DNA (F na figura à direita) emite fluorescência, esta capturada pelo computador quando raios laser passam pelas moléculas em amplificação. Criada no BioRender.

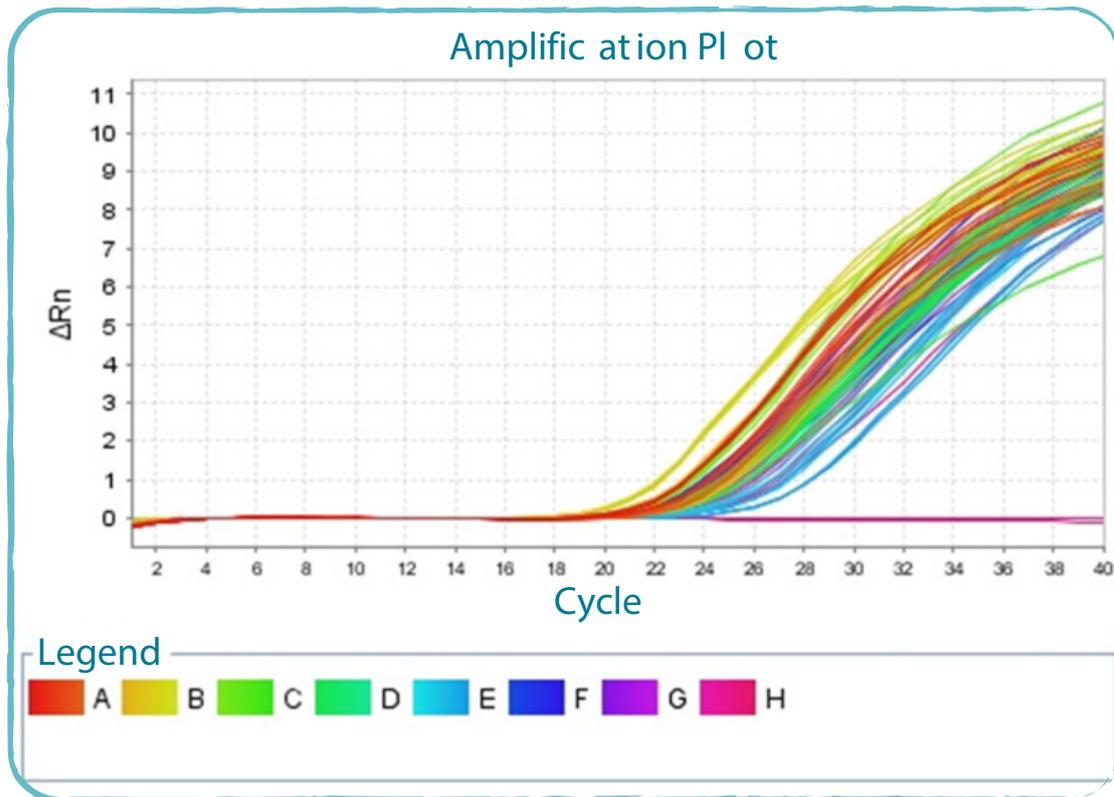


Figura 6.2 - Exemplo de curva de amplificação por PCR.

Para termos um resultado positivo de infecção com o coronavírus, é necessário que a curva de fluorescência seja formada de forma consistente. Importante também é que duas ou três amostras independentes sejam testadas para verificar se o resultado é repetido (Figura 6.3). Se não houver a formação dessa curva, o resultado será negativo. Isso não nos dá 100% de certeza que a pessoa de quem foi coletada a amostra não estava infectada com o coronavírus, por alguns motivos. A carga viral da pessoa infectada pode estar baixa no momento em que a coleta é feita, ou a fase de replicação viral já pode ter encerrado. Ultimamente, é claro, o resultado negativo pode realmente indicar que a pessoa não contraiu a infecção, mas esteja ciente de que os fatores mencionados podem levar a certos falsos negativos. Não nos cabe entrar no mérito desta questão neste material.

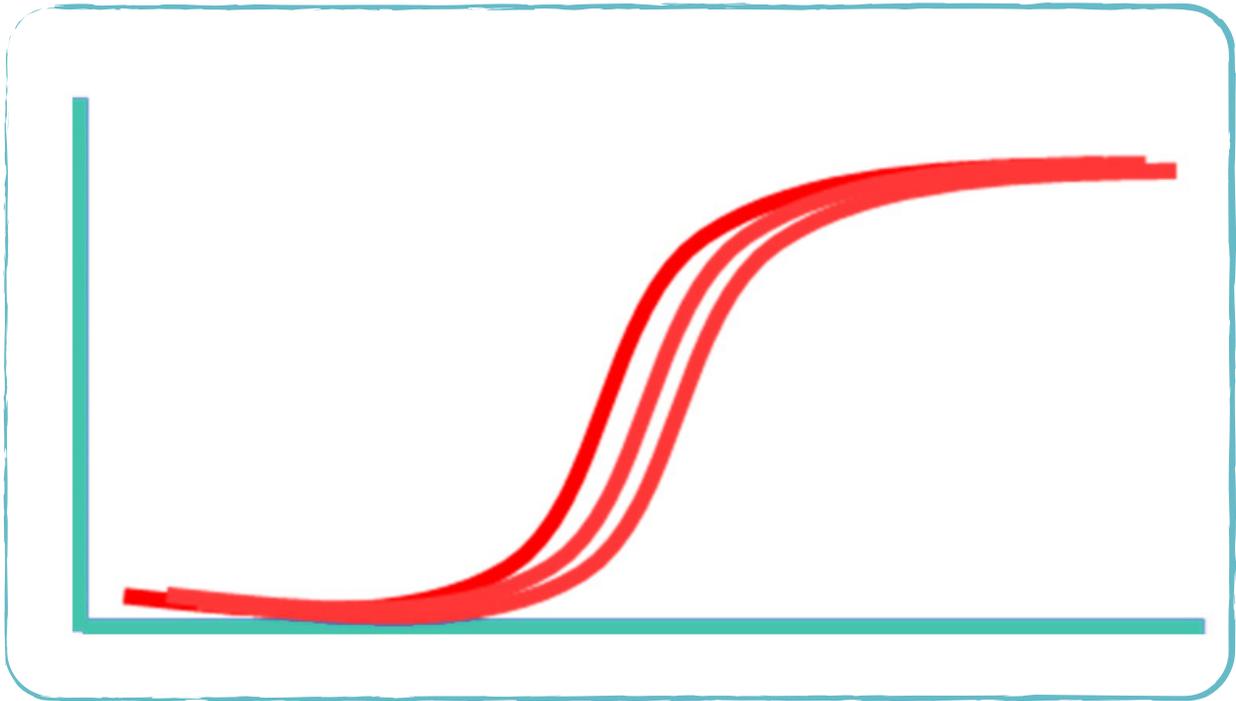
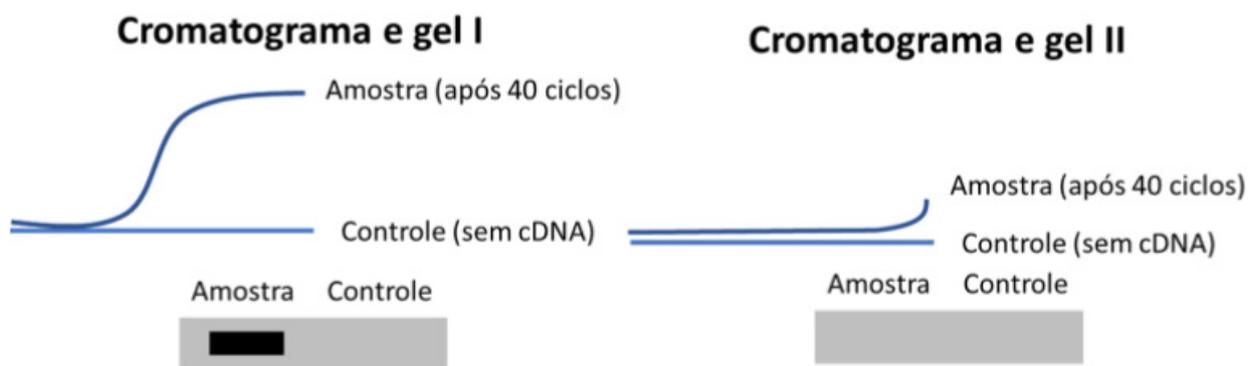


Figura 6.3 - Representação esquemática de curva de amplificação de três repetições de uma amostra.

De forma muito resumida, você obteve uma noção sobre PCR em tempo real. Saiba que a técnica é aplicada há vários anos para identificar variantes, quantificar micro-organismos do solo, quantificar a expressão de genes de procariotos e eucariotos, dentre diversas outras aplicações. Quanto à testagem para infecção com o coronavírus, certamente você conhece alguém que já fez o tal teste de PCR. Bom, o resultado, seja positivo ou negativo, foi obtido após todos esses passos que vimos.

ATIVIDADE DO CAPÍTULO

Considere uma situação hipotética em que duas pessoas estão infectadas com o SARS-CoV2 e possuem carga viral semelhante. No entanto, uma das pessoas está infectada com a variante A do vírus, enquanto a outra foi infectada pela variante B. O primer utilizado para PCR tempo real foi desenvolvido para amplificação de parte do gene S da variante A. Ao realizar o teste de PCR, o resultado foi positivo para a pessoa infectada com a variante A e negativo para a pessoa infectada com a variante B. O que explica o resultado negativo? Qual cromatograma se refere à infecção com a variante A, dentre os abaixo? E qual gel?



Referências consultadas

Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature medicine*, 26(4), 450-452.

Rasmussen, A. L. (2021). On the origins of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 27(1), 9-9.

Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Current biology*, 30(7), 1346-1351.

Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387.

Konzen, E. R., Recchia, G. H., Cassieri, F., Caldas, D. G. G., Berny Mier y Teran, J. C., Gepts, P., & Tsai, S. M. (2019). DREB genes from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) show broad to specific abiotic stress responses and distinct levels of nucleotide diversity. *International Journal of Genomics*, 2019.