

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)



Erna Hêrida Domingues de Oliveira¹, Tiago Campos Pereira^{2,3}


¹ Depto de Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

² Programa de Pós-Graduação em Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

³ Depto de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência - tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Palavras-chave: antígeno, síndrome de Sjogren, tireoidite de Hashimoto, linfócito, mTEC, expressão gênica promíscua



A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite gerar, em um tubo de ensaio, bilhões de cópias de uma determinada sequência de DNA de interesse, de maneira rápida, prática e barata. Baseada no processo natural de duplicação de DNA, essa tecnologia tem ampla aplicabilidade, desde a pesquisa básica no estudo de genes e genomas até aplicações como identificação de pessoas, teste de paternidade, diagnóstico molecular, geração de enzimas de interesse biotecnológico, paleogenética e execução de projetos de sequenciamento de genomas de diferentes organismos. Notavelmente, apesar de ter sido concebida há quase 40 anos, a PCR permanece como uma ferramenta essencial nos laboratórios de genética molecular do mundo inteiro devido ao custo reduzido e também pelos aperfeiçoamentos que ocorreram ao longo dos anos, culminando na versão mais atual e altamente promissora, a PCR digital.

Quando se estudam estruturas muito pequenas, como células, vírus e organelas, o uso do microscópio é essencial, pois ele amplia a imagem milhares ou milhões de vezes. As moléculas de DNA são entidades microscópicas que podem ser visualizadas por microscopia eletrônica. Contudo, quando a intenção é obter a sequência de nucleotídeos ou mesmo *manipular* uma biomolécula como DNA ou RNA, em vez de visualizá-la, precisamos de técnicas que possibilitem *amplificar o número de cópias da sequência de interesse* a tal ponto que possam ser utilizadas em procedimentos técnicos no laboratório e, até mesmo, visualizadas indiretamente, por meio de outras técnicas acessórias.

Em 1983, a **Reação em Cadeia da Polimerase** (PCR, sigla em inglês de *Polymerase Chain Reaction*) foi desenvolvida, atuando como um processo que possibilita gerar bilhões de cópias de um determinado gene, ou de qualquer outra região específica de DNA. Por exemplo, se a sequência do genoma humano fosse impressa de maneira linear em papel, ocuparia aproximadamente 262.000 páginas. Se quiséssemos estudar um gene particular que está descrito na página número 173.295, a PCR seria equivalente a uma máquina de xerox que faria cópias exclusivamente dessa página e de nenhuma outra, facilitando grandemente a vida do leitor (pesquisador). Para o cientista, a produção de bilhões de cópias de apenas uma determinada sequência do genoma viabiliza diversos outros procedimentos laboratoriais e experimentos, desde pesquisas básicas até o diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas.

O princípio dessa amplificação *in vitro* do material genético foi primeiramente descrito em 1971, mas os ensaios experimentais e ajustes necessários para torná-la exequível foram realizados pelo bioquímico estadunidense Kary Banks Mullis e colegas, na década de 1980 (revisto em PEREIRA, 2018). A relevância desse trabalho foi reconhecida em 1993, quando Mullis foi contemplado com o prêmio mais importante da ciência, o Nobel, na área de química.

Desde sua criação, o uso da PCR expandiu-se rapidamente, tendo sido implementada

em laboratórios de pesquisa de todo o mundo. Muitos dos avanços da **Biologia Molecular** aconteceram, em grande parte, graças ao sucesso dessa técnica, assim como a execução de projetos desafiadores como o sequenciamento do genoma humano. Ao longo de sua história, a PCR tem transformado não só a genômica, mas diversas áreas como a ciência forense, **paleobiologia**, o controle da segurança alimentar e o diagnóstico molecular. Ao longo de mais de três décadas de existência, a PCR tem sido constantemente renovada e diversificada, dando origem a variações como a ‘PCR em tempo real’ (qPCR) e a ‘PCR digital’ (dPCR).

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

Dentro da célula, durante a replicação do material genético, o DNA de dupla-fita (dsDNA, *double stranded DNA*, do inglês) é separado em cadeias de DNAs de fita simples (ssDNAs, *single stranded DNA*, do inglês) por meio de uma enzima denominada *helicase* (Figura 1). Essa proteína é capaz de quebrar as ligações de hidrogênio que interconectam as fitas de DNA. Em seguida, uma enzima chamada *primase* sintetiza pequenos fragmentos de RNA, chamados *iniciadores* (ou *primers*, lê-se ‘praimers’, do inglês), sobre as cadeias de fita simples. Esses iniciadores fornecem extremidades 3’OH livres a partir das quais a enzima DNA polimerase sintetiza novas cadeias de DNA, utilizando nucleotídeos livres presentes no nucleoplasma. A DNA polimerase utiliza a cadeia de DNA de fita simples como molde para a síntese de uma cadeia com sequência complementar de bases. O resultado final é a duplicação de todo o material genético da célula.

Em síntese, a PCR reproduz esse processo celular natural em um tubo de ensaio, porém, com algumas diferenças, dentre as quais destacamos duas. Primeira, a amplificação não será de todo o material genético da célula, mas apenas de um único segmento (um gene ou outra região que se queira estudar). Segunda, a duplicação será feita repetidamente (por isso, ‘reação em cadeia’), para que o número de cópias do segmento seja aumentado inúmeras vezes.

Biologia Molecular: área do conhecimento que se dedica a estudar a célula a partir de suas biomoléculas, ao contrário da ‘Biologia Celular’, que vislumbra a célula como um todo.

Paleobiologia: estudo de amostras de organismos do passado remoto.

in vitro: em tubo de ensaio.

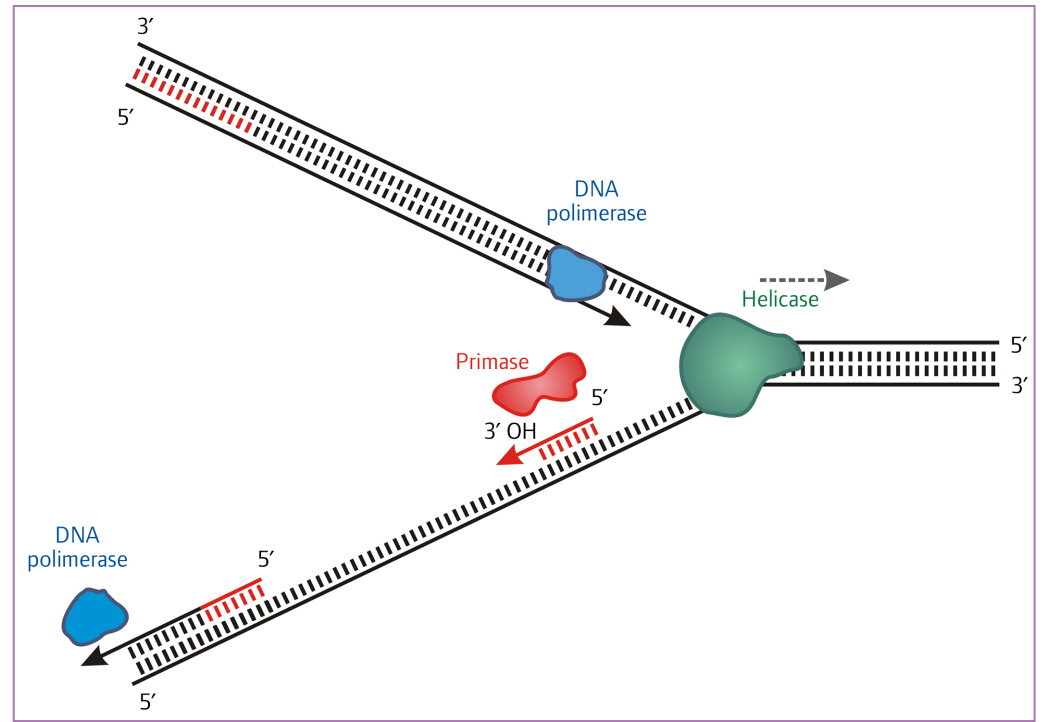


Figura 1. A replicação do DNA. A enzima Primase catalisa a síntese de uma pequena molécula de RNA (nucleotídeos em vermelho), a qual apresenta uma hidroxila na 3'. A enzima DNA polimerase se utiliza desta extremidade 3' OH livre para estender (sintetizar) o DNA complementar (setas pretas) à fita molde.

Termoestável: que apresenta estabilidade em altas temperaturas.

Tampão: solução química que permite a manutenção do pH ao longo de uma certa reação.

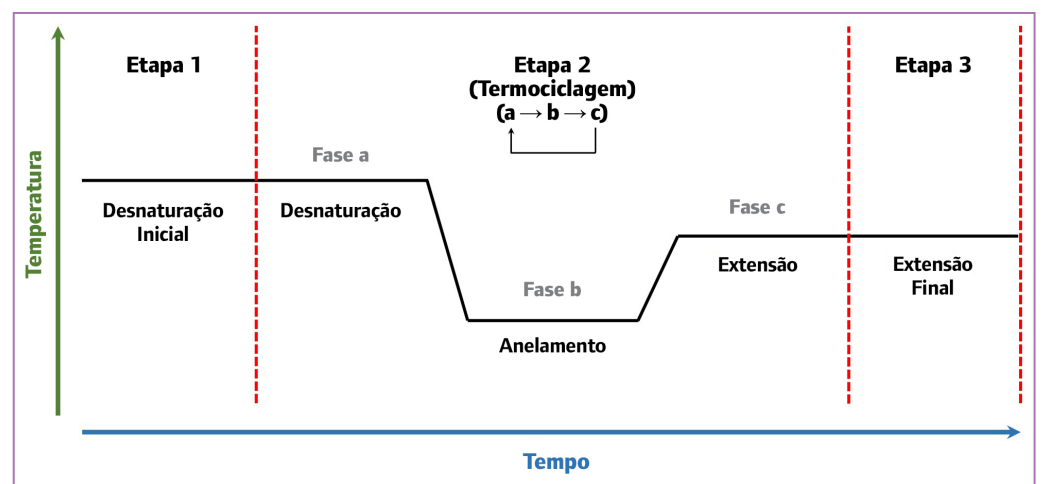
Transcrição reversa: processo de síntese de uma molécula de DNA a partir de uma molécula molde de RNA, por meio da enzima transcriptase reversa.

Desta forma, a PCR é conduzida em um pequeno tubo de plástico contendo sete componentes básicos: (i) a enzima DNA polimerase **termoestável**; (ii) os nucleosídeos trifosfatados, (ATP, TTP, CTP e GTP); (iii) a amostra de DNA a ser amplificada (= DNA-alvo ou DNA-molde); (iv) um par de iniciadores ou *primers* específicos para a sequência que se deseja amplificar; (v) íon magnésio (Mg^{+2}) que atua como cofator da enzima; (vi) **tampão** e (vii) água, que é o meio para a reação.

A origem do DNA a ser amplificado pode ser genômica, mitocondrial, de cloroplasto ou outra. Esse material genético pode ser isolado de células, fluidos corporais ou até substratos inorgânicos (como solo). Alternativamente, pode-se também utilizar moléculas de RNA, que devem ser previamente convertidas em moléculas de DNA, por meio de uma reação de **transcrição reversa**.

Didaticamente, a PCR pode ser separada em três etapas: (i) a desnaturação inicial; (ii) a termociclagem e (iii) a extensão final (revisto em PEREIRA, 2018) (Figura 2).

Figura 2. Aspecto geral da PCR, composta por três etapas principais. A etapa 2 é constituída de três fases ('a-b-c') e é repetida de 30 a 40 vezes (termociclagem), resultando no aumento geométrico da região de interesse.



Primeiramente, durante a **desnaturação inicial**, a temperatura da reação é aumentada para 95 °C, durante 2-5 minutos. O objetivo dessa etapa é mimetizar a atividade da enzima helicase, pois o calor é capaz de quebrar as ligações de hidrogênio entre as cadeias complementares. Assim, ao final dessa etapa, converte-se o dsDNA em ssDNA, apto para o processo de amplificação.

A segunda etapa é a **termociclagem**, que consiste em três fases: (a) *desnaturação*, a 95 °C por 30 segundos, (b) *anelamento* (ou pareamento), a aproximadamente 57 °C por 30 segundos e (c) *extensão* (ou alongamento), a 72 °C por 1 minuto. Durante a desnaturação, a alta temperatura continua separando o

dsDNA em ssDNA. Na fase de anelamento, a redução da temperatura possibilita que os dois *primers* anelem-se, por meio da complementariedade, às suas respectivas cadeias de DNA de fita simples, delimitando precisamente a região que deve ser amplificada.

Em seguida, na **fase de extensão**, o aumento para 72 °C gera a condição ideal para a atividade da enzima DNA polimerase, que sintetizará a nova fita de DNA utilizando os *primers* como o ponto de início, e os nucleosídeos trifosfatados presentes na reação para formar as novas cadeias de DNA (Figura 3). Note que, ao final de cada ciclo 'a-b-c' dessa etapa, é duplicado o número de dsDNA correspondente à sequência-alvo.

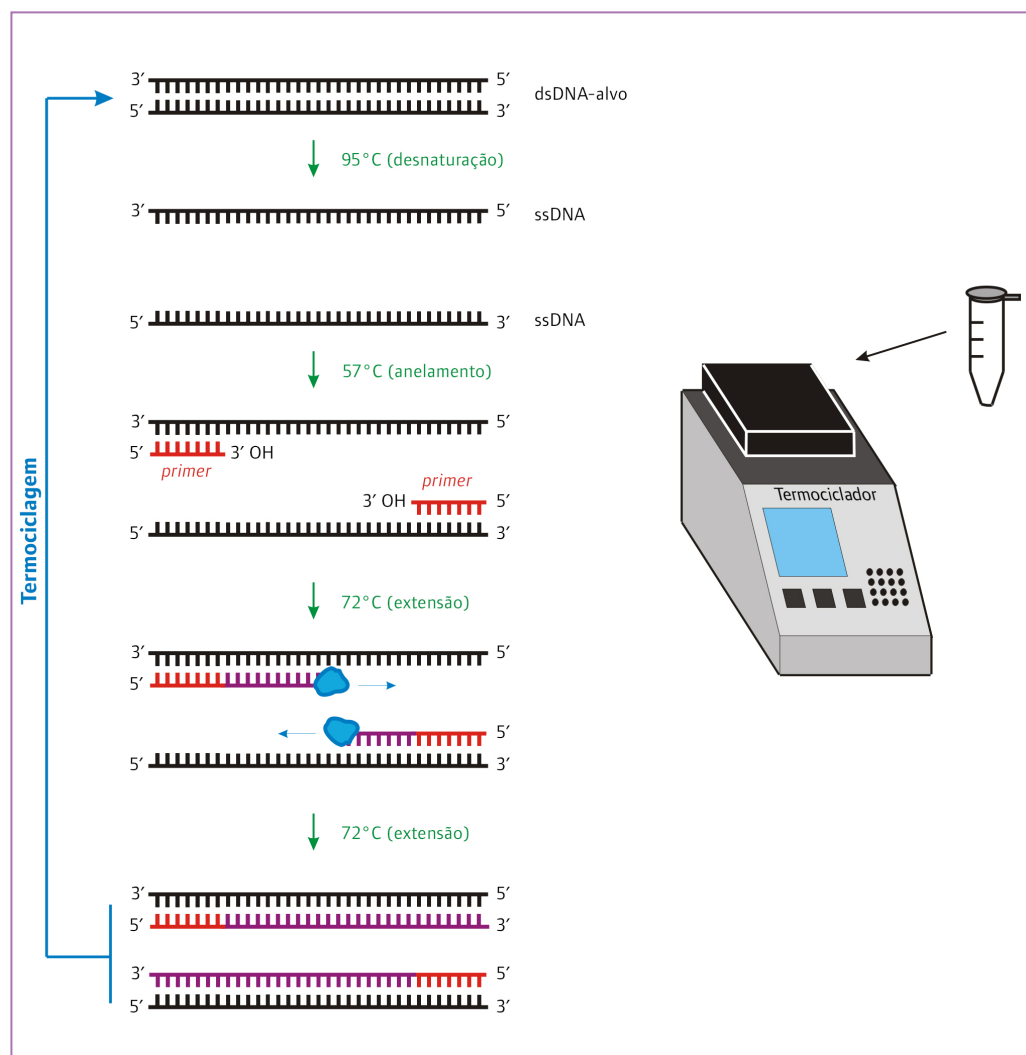


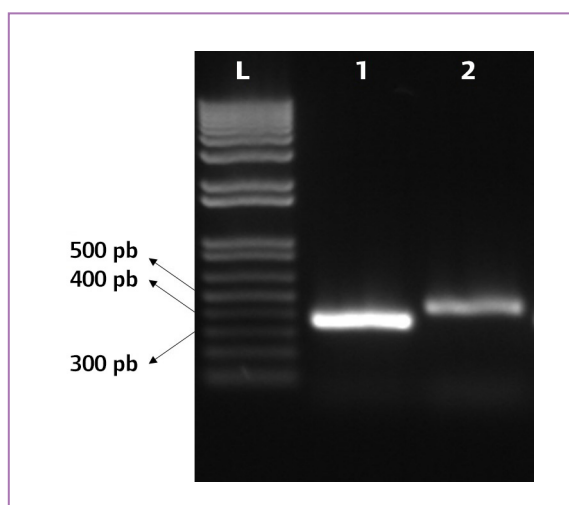
Figura 3. Etapas da amplificação *in vitro* do DNA pela PCR. A reação é composta por ciclos repetitivos que envolvem três passos consecutivos. Na desnaturação, a temperatura de 95 °C ocasiona a quebra das ligações de hidrogênio que unem as bases complementares de dsDNA, transformando-as em ssDNA. No passo de anelamento, a temperatura é reduzida a aproximadamente 57 °C e ocorre a ligação dos *primers* às extremidades das ssDNA-alvo. A extensão é a etapa final e ocorre na temperatura de 72 °C. Nela, a DNA polimerase realiza a síntese das novas fitas de DNA complementares à fita molde. Ao final de 30 a 40 ciclos, são produzidas bilhões de cópias da sequência-alvo de DNA. À direita: tubo de ensaio dentro do qual a reação ocorre, por meio do uso de um aparelho termociclador.

Eletroforese em gel de agarose: técnica que permite que as diversas moléculas de DNA ou RNA de uma amostra sejam separadas por tamanho e, posteriormente, visualizadas.

Assim, a repetição desses três passos (= termociclagem) resulta em duplicações sequenciais da região-alvo. Portanto, se iniciamos a reação com uma única cópia do gene, ao final do primeiro ciclo 'a-b-c' teremos duas cópias, ao final do segundo ciclo teremos quatro cópias, e assim por diante. Tipicamente, a termociclagem compreende de 30 a 40 ciclos 'a-b-c', após os quais a reação chega ao seu limite (fase de platô), pois não há mais reagentes (nucleotídeos, enzima e/ou primers) para manter a amplificação geométrica (i.e., duplicação a cada ciclo).

Ao fim da termociclagem, ocorre a terceira etapa, de extensão final a 72 °C por dez minutos, para término da polimerização do produto da reação, também conhecido como **amplicon**. Toda a PCR é realizada em um aparelho denominado termociclador, capaz de gerar mudanças rápidas e controladas de temperatura, conforme descrito. No final de todo o processo, o amplicon pode ser analisado por meio de **eletroforese em gel de agarose** e visualizado com auxílio de corantes de ácidos nucleicos (Figura 4). Tipicamente, uma PCR dura em torno de duas horas, sendo um procedimento de execução rápida.

Figura 4. Demonstração de resultados obtidos pela PCR, gerados a partir de transcrição reversa de RNA de nematóides. Após o término da PCR, os produtos finais foram corados com SybrSafe e em seguida submetidos a eletroforese em gel de agarose. A primeira coluna apresenta o marcador de peso molecular (1kb plus, Invitrogen). As duas últimas colunas representam amplicons gerados com primers específicos para os genes codificadores da proteína beta actina (377 pares de bases; pb) e da proteína glutathione peroxidase (465 pb). Imagem: Giovana Vieira Guidelli.



APLICAÇÕES

Pesquisa básica

A amplificação de sequências específicas tem apresentado, desde sua origem, vasta aplicabilidade, pois ela é o passo primordial para diversos outros procedimentos experimentais. Por exemplo, o acoplamento da PCR como uma etapa prévia ao sequenciamento genético tem viabilizado a execução de pesquisas desafiadoras e complexas, como os projetos sobre genomas de diferentes organismos. Outros exemplos de aplicação direta/indireta compreendem facilitar a inserção (ou clonagem) de genes em **vetores**, assim como realizar a análise da expressão gênica, ou seja, avaliar a quantidade de moléculas

de RNA derivadas de determinado gene, em determinada célula.

A PCR facilita também construir sequências de DNA com determinadas alterações específicas, úteis para estudos sobre as funções de genes. Esse processo, denominado de 'mutagênese sítio-dirigida', é feito com uso de primers que apresentam modificações em suas sequências nucleotídicas. Essas mutações são incorporadas ao amplicon durante a PCR, fornecendo aos pesquisadores, assim, versões distintas do mesmo gene. Quando inseridas em seres vivos, essas diferentes variações promovem efeitos biológicos distintos, proporcionando informações importantes sobre o papel do gene no organismo.

Vetor: molécula de DNA circular, de replicação autônoma nas células, que pode ser utilizada para armazenar e replicar sequências genéticas de interesse, tais como genes específicos.

Um exemplo mais dramático desse princípio é a ‘PCR propensa ao erro’, conduzida com genes de interesse biotecnológico. Nesse procedimento, a amplificação do gene é feita em condições não adequadas de PCR, resultando em uma grande quantidade de produtos mutados (ou seja, gerando diversidade genética). Esses últimos passam posteriormente por seleção para se identificar variantes funcionalmente mais interessantes (e.g., uma nova variação de uma proteína, que seria agora capaz de executar catálise em pH muito ácido). Adequadamente, o processo é também denominado de evolução *in vitro*.

Diagnóstico de doenças genéticas, infecciosas e câncer

Quando aliada ao sequenciamento de DNA, a PCR possibilita a identificação de mutações que originam doenças genéticas. Uma das primeiras aplicações nessa área foi o diagnóstico pré-natal da anemia falciforme, por meio da observação de uma mutação específica no gene que codifica a cadeia β da hemoglobina. A partir de então, essa técnica tornou-se rotineiramente utilizada na identificação de diversas doenças genéticas, como fenilcetonúria e fibrose cística. Além disso, ela auxilia no diagnóstico molecular do câncer, proporcionando a detecção de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor como, por exemplo, alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, associados ao câncer de mama hereditário.

A PCR também causou um grande impacto no diagnóstico de doenças infecciosas. Isso é possível porque quase todos os patógenos, isto é, agentes causadores de doenças, tais como vírus, bactérias, fungos e outros parasitas, apresentam material genético, seja de DNA ou RNA; a única exceção são os príons (CARLI; PEREIRA, 2018). Assim, por meio de *primers* planejados para genes exclusivos desses patógenos, é possível avaliar se estão presentes em determinada amostra biológica (sangue, fezes, urina, fluido cefaloraquidiano, entre outros). Considerando que a PCR permite detectar quantidades mínimas de material genético por meio da amplificação, o diagnóstico pode ser feito com precisão e alta sensibilidade.

No passado, um método muito comum para o diagnóstico de microrganismos era baseado na coleta de uma amostra de sangue e seu depósito em **placas de cultura**, onde eles pudessem se reproduzir para posterior identificação. Contudo, essa abordagem só é possível para patógenos cultiváveis, porém nem todos são assim. Adicionalmente, esse procedimento pode levar dias, caso o microrganismo seja de multiplicação lenta, atrasando o diagnóstico e o início do tratamento.

Note, porém, que a PCR é uma técnica rápida (2-4 horas) e não requer o cultivo de microrganismos, superando, portanto, a estratégia anterior. Assim, a PCR tem sido regularmente utilizada para a identificação de agentes de doenças infecciosas, tais como a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (causadora da tuberculose), vírus da imunodeficiência humana (AIDS), vírus da herpes simples, a bactéria *Treponema pallidum* (sífilis), vírus *Papilomavírus humano* (HPV), dentre muitos outros.

Evidência forense e perfil genético

Outras áreas muito importantes para as quais a Genética tem contribuído são a ‘identificação de pessoas’ e a ‘determinação de parentesco’. A primeira é exemplificada pelos casos de investigação criminal, em que se deseja identificar a vítima ou o transgressor, com base em resquícios biológicos encontrados na cena do crime (fios de cabelo, saliva, sêmen, sangue, entre outros). A segunda é tipicamente ilustrada pelos casos de disputas de paternidade, em que se deseja confirmar, ou rejeitar, a relação biológica entre indivíduos.

A base de ambos os estudos é caracterização do **perfil genético** dos indivíduos envolvidos (Figura 5) e subsequente comparação com os supostos parentes ou então com o suspeito de um crime. O perfil genético de cada pessoa é gerado estudando-se determinadas regiões do genoma que são hipervariáveis entre os indivíduos. Essa análise permite a identificação de uma ‘impressão digital de DNA’, que é única e exclusiva de cada cidadão, exceto entre gêmeos monozigóticos, pois carregam genomas idênticos.

Placa de cultura: disco de plástico (ou vidro) contendo um meio rico em nutrientes, para cultivo de bactérias e suas posteriores identificações.

Perfil genético: conjunto específico de sequências de DNA de cada pessoa, que permite distinguir os indivíduos, tal como uma impressão digital.

A PCR entra em cena como a técnica capaz de amplificar essas sequências hipervariáveis, tais como minissatélites, microssatélites e sequências contendo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), a partir de amostras, residuais ou não, de material biológico. Ao se reconstruir o perfil genético a partir do sêmen do criminoso pode-se, por exemplo, compará-lo com o banco de dados genéticos da polícia, assim como verificar se o perfil de determinada criança é compatível com o do suposto pai.

Em especial, a PCR é útil também na identificação de vítimas de catástrofes em massa, a partir de corpos e restos humanos encontrados em acidentes e campos de batalha. O maior esforço desse tipo aconteceu após o ataque terrorista ao edifício *The World Trade Center*, em setembro de 2001. Mais de 10.000 amostras de restos mortais das vítimas foram comparadas com amostras de DNA obtidas em itens pessoais (como escova de dente) fornecidas pelos familiares. Por meio dessas análises, cientistas forenses conseguiram identificar quase três mil vítimas.

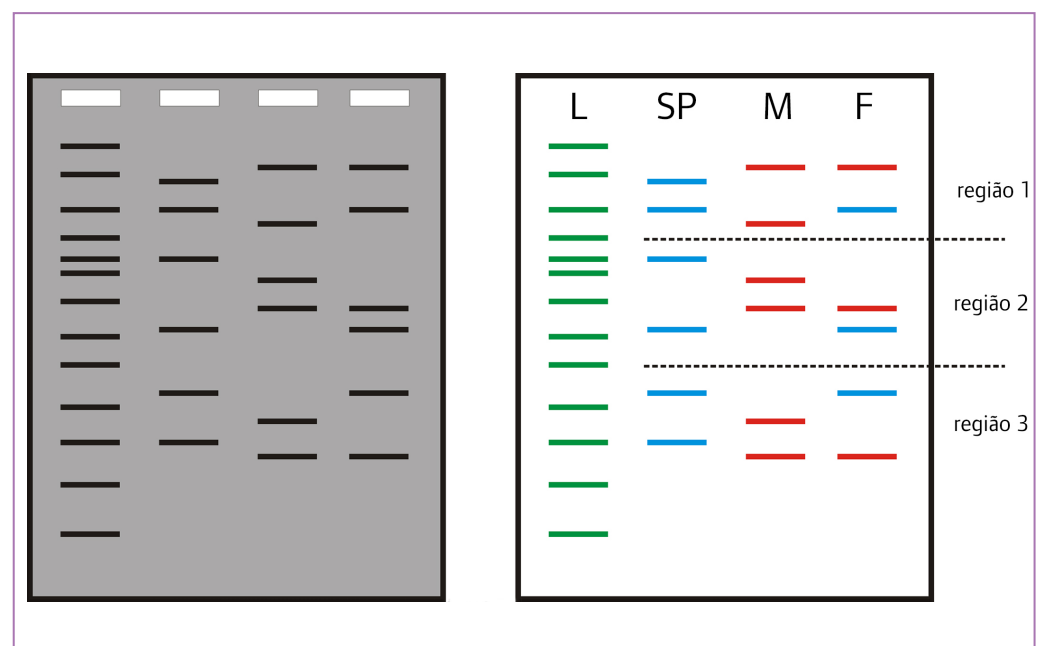


Figura 5. Determinação e comparação de perfis genéticos de diferentes indivíduos. À esquerda, imagem representativa de um gel de agarose contendo amplicons referentes a sequências hipervariáveis. À direita, interpretação esquemática do mesmo gel. Cada uma das quatro colunas verticais refere-se a uma amostra de DNA. L: marcador de peso molecular, para comparação; SP: suposto pai; M: mãe e F: filho. Note que para cada indivíduo, três sequências hipervariáveis foram amplificadas, gerando dois alelos (fragmentos de DNA com comprimentos diferentes) para cada uma delas. Os alelos foram artificialmente coloridos (em azul, os paternos; em vermelho, os maternos) para facilitar a compreensão. Observe que o perfil genético do filho é compatível com o do suposto pai, pois seus alelos de origem paterna (azuis) têm tamanhos equiparáveis aos dos alelos do SP.

Estudo de ‘DNA antigo’

Uma das grandes vantagens da PCR é que uma sequência de DNA-alvo pode ser amplificada até mesmo quando o DNA estiver parcialmente degradado. Essa oportunidade abriu perspectivas para o estudo de DNA de antepassados e de animais extintos, falecidos há décadas ou até milhares de anos.

Um exemplo curioso nessa área foi o estudo de múmias do Egito antigo, datadas entre 1410-1324 a.C. Nessa pesquisa, por meio da PCR de microssatélites, foi possível traçar o perfil genético e identificar membros da família do famoso faraó Tutancâmon. Esse governante egípcio foi coroado ainda quando

criança e morreu em 1327 a.C, aos 19 anos de idade. A causa de sua morte, porém, era desconhecida e por muito tempo permaneceu em mistério. Contudo, os testes revelaram que a amostra biológica proveniente da múmia de Tutancâmon possuía também material genético (genes) específico do parasita *Plasmodium falciparum*, causador da malária. Em conjunto com análises médicas e radiológicas, esses resultados sugerem que a causa mais provável da morte do faraó se deu em decorrência de necrose óssea avascular e malária. Essa hipótese foi reforçada com a descoberta de bengalas e medicamentos na tumba de Tutancâmon.

O advento da PCR tem contribuído também para o avanço da paleobiologia, facilitando a reconstrução da história evolutiva de animais, assim como a determinação da relação evolutiva entre espécies extintas e espécies contemporâneas. Como exemplo, pode ser citado o parentesco próximo entre mamutes e elefantes, confirmado a partir da amplificação e sequenciamento do DNA proveniente de um fóssil de mamute encontrado no nordeste da Sibéria em 1986, datado entre 33.750 e 31.950 anos.

Biotecnologia agrícola

A indústria de biotecnologia agrícola faz uso da PCR em vários procedimentos, desde o desenvolvimento de produtos alimentícios até os testes de qualidade.

Por exemplo, a PCR é empregada na detecção de fitopatógenos de difícil identificação, tais como as bactérias *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* em sementes de tomate e *Xanthomonas axonopodis pv. Phaseoli*

em sementes de feijão. Essa etapa compreende uma das mais importantes no sistema de produção agrícola, pois o certificado de qualidade desses materiais garante o sucesso da produção e a sustentabilidade das atividades relacionadas. Assim, a PCR possibilita informar se determinado lote de sementes está contaminando ou não, propiciando a rápida comercialização de lotes sadios.

Adicionalmente, o uso da PCR permite avaliar a presença de transgenes em grãos e alimentos processados, visando a identificação de organismos geneticamente modificados (OGMs), ou alimentos que contêm em sua composição algum OGM. Por exemplo, o gene 'cry1A(b)', da bactéria *Bacillus thuringiensis*, codifica uma proteína (toxina Bt) que é tóxica para herbívoros. Assim, plantas transgênicas de algodão, milho e batatas contendo 'cry1A(b)' são resistentes a pragas, e podem ser identificadas via PCR, por meio da amplificação desse transgene, *in natura* ou em alimentos derivados dessas plantas.



VARIAÇÕES DA PCR

PCR em tempo real

Embora a PCR convencional represente um importante salto tecnológico, seu principal uso se restringe a análises qualitativas (por exemplo, ‘amplificação ou não’ de DNA de um vírus), sendo sua aplicação muito limitada em estudos que requerem análises quantitativas, tais como a determinação do número de cópias de DNA desse mesmo vírus em uma certa amostra. Essa quantificação é interessante, por exemplo, quando se deseja estimar o número de partículas virais no sangue de um paciente, ou a abundância de material transgênico em determinado produto alimentício.

Diluição limitante: situação em que determinada amostra, após ser submetida a uma série de diluições, apresenta apenas uma molécula por determinado volume de interesse. Por exemplo: apenas uma molécula de DNA por microlitro.

A limitação da PCR para análises quantitativas ocorre porque a mensuração do amplicon ocorre apenas ao final da reação. Esse tipo de medição é problemática porque se a reação já tiver chegado à fase de platô, o valor aferido é incorreto (pois não há mais amplificação geométrica, como esperado).

Motivados por essa dificuldade, os pesquisadores desenvolveram a ‘PCR em tempo real’ (qPCR), que propicia a mensuração da quantidade do amplicon presente ao longo de toda a reação, inclusive durante o período de amplificação geométrica, permitindo, por conseguinte, uma quantificação correta. Isto é possível por meio do uso de: (i) *primers* que emitem fluorescência quando incorporados ao amplicon e (ii) um termociclador capaz de fazer a leitura do sinal fluorescente durante todo o tempo.

Dessa maneira, os resultados obtidos usando a qPCR promovem a ‘quantificação relativa’ de determinado gene em comparação a outro gene da amostra. Por exemplo: o gene *MECP2* é expresso oito vezes mais que o gene *ACTB*, em determinado tecido (revisito em PEREIRA, 2018).

PCR digital

Uma variação mais recente da técnica é a ‘PCR digital’ (dPCR), que apresenta sen-

sibilidade muito superior às PCRs convencional e em tempo real, além de outorgar uma ‘quantificação absoluta’ do produto amplificado. Essa ultrasensibilidade é baseada no princípio da ‘**diluição limitante**’, que assegura à dPCR a capacidade de identificar uma única molécula de DNA mutante entre milhares de outras cópias sem essa alteração. Em termos práticos, um exemplo seria utilizar a dPCR para detectar células tumorais, ou seja, portadoras de mutações, em quantidade muito reduzida, ainda quando o paciente se encontra em estágios iniciais da doença, sem sinais clínicos.

Adicionalmente, a dPCR é capaz de informar o número exato de moléculas de DNA oriundas de um determinado patógeno (mensuração absoluta), garantindo acompanhar, minuciosamente, o avanço ou controle de uma infecção. Em conjunto, essas características conferem à dPCR maior precisão e eficácia em análises de expressão gênica de células individuais, exames pré-natais, detecção de mutações raras e de DNAs de patógenos em baixas concentrações em fluidos corporais (revisito em PEREIRA, 2018).

CONCLUSÕES

O impacto e o sucesso da PCR na ciência e na sociedade vão além da sua função primordial de amplificação do DNA, e se devem também ao reduzido custo da técnica e sua contínua renovação. Trinta e seis anos após a sua invenção, a PCR sustenta-se como uma técnica atual e permanece como um pináculo da biologia molecular devido às suas elevadas especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade.

REFERÊNCIAS

- CARLI, G. J.; PEREIRA, T. C. O gene PRNP codificador da proteína príon e o mal da vaca louca. *Genética na Escola*, v. 13, p. 94-101, 2018.
- PEREIRA, T. C. *Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital*. 1ª. ed. Ribeirão Preto: Editora da Sociedade Brasileira de Genética, 2018. v. 1. 232p.