

CAPÍTULO 1

Técnicas e análises de biologia molecular



A biologia molecular é a área da biotecnologia que surgiu a partir da dedução da estrutura tridimensional da molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA) e envolve diversos princípios e técnicas que permitem analisar o material genético dos organismos. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu diversas aplicações, como o diagnóstico de doenças genéticas e patologias, o melhoramento genético animal e vegetal, e a genética forense. Neste capítulo, estão descritas as principais técnicas de biologia molecular utilizadas na obtenção, manipulação e análise de DNA, bem como os principais tipos de análises realizadas no diagnóstico de doenças, na determinação de paternidade e no auxílio à elucidação de crimes.

OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM

- » Conhecer as técnicas de extração, quantificação, amplificação e sequenciamento de DNA.
- » Compreender as análises moleculares no diagnóstico de doenças, determinação de paternidade e auxílio na elucidação de crimes.

>> Técnicas de biologia molecular

As técnicas de biologia molecular são aquelas que utilizam os ácidos nucleicos – ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) – provenientes de amostras biológicas como matéria-prima para a realização dos mais variados procedimentos. O material genético dos organismos está localizado no interior da célula, disperso no citoplasma, no caso dos procariotos, ou no núcleo e em organelas específicas (mitocôndrias e cloroplastos) nos eucariotos. Para a realização das análises moleculares com eficiência é necessária a separação dos ácidos nucleicos do restante dos constituintes das células, utilizando técnicas de extração de DNA ou RNA.

Você encontra mais informações sobre material genético no Capítulo 6 do livro *Biotecnologia I*.



>> Extração de DNA e RNA

Existem vários protocolos de extração de DNA e RNA descritos na literatura, e a escolha do mais adequado deve levar em consideração a molécula desejada (DNA e/ou RNA), o tipo de amostra, o grau de pureza e o rendimento desejado, além da disponibilidade de recursos para a sua realização. O conhecimento a respeito das características dos organismos envolvidos, como suas especificidades e a localização das moléculas de ácidos nucleicos, é importante para o planejamento dos procedimentos a serem utilizados, visando às aplicações específicas posteriores. A seguir, são descritas e ilustradas (Fig. 1.1) as principais etapas das extrações de ácidos nucleicos.

Preparação das amostras

As amostras podem ser obtidas por meio de diferentes procedimentos, como punção de vasos sanguíneos, biópsias, esfregaços, cultivos microbiológicos ou fragmentos de tecidos, de acordo com o organismo envolvido. As amostras também podem ser obtidas a partir de folhas, insetos ou larvas, por exemplo. O acondicionamento adequado das amostras após a coleta é essencial para a sua preservação até o momento da extração. O DNA apresenta estabilidade maior, enquanto o RNA é rapidamente degradado após a coleta. Isso pode ser evitado por meio do congelamento das amostras em nitrogênio líquido ou do uso de reagentes conservantes.

Amostras líquidas, como sangue, urina ou líquido, geralmente são centrifugadas para a separação de células nucleadas, no precipitado, ou de partículas virais, no sobrenadante. Já os tecidos sólidos, como folhas, músculos ou pedaços de outros órgãos, precisam passar por uma etapa de quebra das estruturas rígidas, com o objetivo de aumentar a superfície de contato para a ação dos reagentes nas etapas seguintes. A quebra pode ser realizada por picotagem, utilizando tesouras, ou por maceração, muitas vezes utilizando almofariz e pistilo associados ao congelamento das amostras com nitrogênio líquido. As amostras de pequeno tamanho podem ser maceradas utilizando um bastão de vidro em um tubo de fundo cônico de 1,5 ou 2 mL contendo a solução tampão de extração (também denominada solução tampão de lise).



O acondicionamento adequado das amostras após a coleta é essencial para a sua preservação até o momento da extração. Além disso, todo o material utilizado no procedimento deve ser esterilizado, a fim de evitar a contaminação do DNA ou RNA.

Lise celular

A lise celular envolve o rompimento das células e deve ser realizada em soluções tamponadas, geralmente contendo um detergente e os reagentes tris-hidroximetil aminometano (Tris), cloreto de sódio (NaCl) e ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA).

O detergente atua sobre os lipídeos, promovendo o rompimento das membranas e a liberação do conteúdo celular. Diferentes tipos de detergentes são utilizados, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), tween-20, triton X-100, sarcosil e brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB), sendo que cada um apresenta especificidades e aplicações distintas. O CTAB, por exemplo, também é utilizado para a separação dos polissacarídeos dos ácidos nucleicos, mediante centrifugação.

O reagente Tris mantém o pH da solução tampão de lise estável (próximo a 8,0), evitando que o DNA, ao ser liberado, sofra o ataque das enzimas desoxirribonucleases (DNases) endógenas que o degradam, as quais atuam em pH ótimo de 7,8. A adição do **agente quelante** EDTA também auxilia na inibição da ação das DNases por se ligar aos cofatores Ca^{+2} e Mg^{+2} da enzima DNase. O NaCl contribui rompendo ligações iônicas das cadeias peptídicas, auxiliando na desnaturação das proteínas e adicionalmente promove a aglomeração das moléculas de DNA.



Agentes quelantes são substâncias capazes de formar complexos com íons metálicos. O EDTA é um quelante que possui aplicações em diversas áreas, como nas indústrias alimentícia, química e cosmética, na agricultura e também na saúde, atuando como anticoagulante.

Muitas vezes adiciona-se a enzima proteinase K ao tampão de lise para a digestão de proteínas, o que auxilia na lise das células e na separação dos constituintes celulares (etapa a seguir). Agentes antioxidantes, como β -mercaptoetanol, PVP (polivinilpirrolodona) e BSA (albumina do soro bovino), também podem ser acrescidos à solução de extração. O β -mercaptoetanol evita a oxidação dos ácidos nucleicos pelo contato com compostos fenólicos presentes especialmente em tecidos vegetais.

Separação dos constituintes celulares

Após a lise das membranas, os ácidos nucleicos são liberados na solução aquosa juntamente com outros constituintes celulares dos quais devem ser isolados. Para esse fim, são utilizados solventes orgânicos, como o fenol ou clorofórmio, que desnaturam proteínas. Nessa etapa, após a centrifugação, o DNA permanecerá solúvel na fase aquosa (sobrenadante), a qual é transferida para um novo tubo, separando os ácidos nucleicos de proteínas e demais constituintes celulares presentes na interfase e fase orgânica (Fig. 1.1). A repetição dessa etapa pode elevar a pureza, entretanto pode resultar em perdas de DNA.

Precipitação do DNA

Em condições de baixa temperatura e elevada concentração salina (devido ao NaCl presente no tampão de lise), a adição de etanol absoluto, isopropanol ou soluções acetatos de amônio ou sódio resulta na precipitação do DNA, o que forma em solução um aglomerado de filamentos esbranquiçados que podem ser “pescados” com um bastão de vidro ou concentrados no fundo do tubo por centrifugação.

Alguns *kits* de extração de DNA comerciais utilizam membranas porosas com alta afinidade para os ácidos nucleicos visando a sua separação por meio da filtragem da solução de interesse. Em elevada concentração salina, os ácidos nucleicos ficam retidos na membrana enquanto os contaminantes são descartados no filtrado. O DNA é então liberado da membrana por meio da utilização de uma solução de baixa concentração salina.

Lavagem e ressuspensão do DNA

Geralmente a lavagem do DNA é realizada com etanol 70% para a remoção dos sais, detergentes e de outras impurezas. Após a secagem por evaporação, o DNA é solubilizado preferencialmente em solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA). O DNA também pode ser ressuspendido em água ultrapura, Fig. 1.1.



1. Lise celular (tampão de lise)



2. Purificação
(desnaturante protéico)



3. Precipitação DNA
(etanol absoluto)



4. Lavagem do DNA
(etanol 70%)



5. Ressuspensão (TE)

Figura 1.1 >> Principais etapas da técnica de extração de DNA.

Fonte: Os autores.

No site do Grupo A (loja.grupoa.com.br) estão disponíveis exemplos de protocolos de extração de DNA e a composição das soluções utilizadas nas extrações.

www.o



AGORA É A SUA VEZ

Associe as soluções de 1 a 5 a suas respectivas funções nas extrações de DNA:

- | | |
|---|--|
| 1. Etanol absoluto ou isopropanol gelado ou soluções acetatos | () Ressuspensão de DNA (colocar DNA em solução) |
| 2. Etanol 70% | () Desnaturação/remoção de proteínas |
| 3. Solução clorofórmio-álcool isoamílico (ou fenol-clorofórmio) | () Lavagem de DNA |
| 4. Tampão de lise/extração (Tris, EDTA, CTAB e NaCl) | () Precipitação de DNA |
| 5. Tampão TE (Tris e EDTA) | () Rompimento das membranas celulares e extração de DNA das células |

>> Determinação da concentração e qualidade do DNA

Após a realização da extração do DNA, muitas vezes é importante conhecer qual foi o rendimento do procedimento antes de utilizá-lo nas análises seguintes. A concentração das amostras de DNA geralmente é avaliada por dois métodos: espectrofotometria e eletroforese.

Espectrofotometria

A quantificação de DNA por espectrofotometria é realizada por medição da quantidade de luz absorvida pelo DNA em solução no comprimento de onda de 260 nm (Fig. 1.2). Quanto maior for a absorção de luz nesse comprimento de onda, maior a concentração de DNA na solução. Assim, sabendo que o valor de absorbância (A) de 1,0 corresponde a uma concentração de 50 µg de DNA (fita dupla) por mililitro (mL), é possível calcular a concentração do DNA obtido das amostras. Muitas vezes, em razão do volume das cubetas de espectrofotômetros ser maior que o obtido nas extrações, é necessário diluir as amostras de DNA 100 ou 200 vezes para a realização da medição, o que deve ser levado em consideração no cálculo da concentração. Aparelhos específicos para a medição da concentração de DNA utilizam apenas 1 µL de amostra evitando a necessidade do fator de diluição.



Figura 1.2 >> Leitura da absorvância da amostra no comprimento de luz de 260 nm.

Fonte: Os autores.

O cálculo da concentração do DNA nas amostras é realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração DNA (ng/uL)} = A_{260\text{nm}} \times \text{F.D.} \times 50$$

Sendo:

$A_{260\text{nm}}$ = absorvância da amostra no comprimento de luz de 260 nm

F.D. = fator de diluição

A espectrofotometria também é utilizada para a avaliação da qualidade das amostras de DNA, obtida pela razão entre os valores de absorvâncias medidos nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Valores entre 1,4 e 2,0 indicam pureza adequada das extrações de DNA, enquanto valores abaixo de 1,4 podem significar a presença de proteínas ou outros contaminantes.

$$\text{Pureza DNA} = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$$



AGORA É A SUA VEZ

Calcule a quantidade de DNA extraído e o índice de pureza das amostras 1 e 2 analisadas por espectrofotometria. Qual amostra apresenta maior quantidade e qualidade de DNA?

Amostra 1: DO 260 nm = 0,038

DO 280 nm = 0,034

Amostra 2: DO 260 nm = 0,065

DO 280 nm = 0,035

Eletroforese

A eletroforese consiste em um método de separação de macromoléculas, como DNA, RNA e proteínas, por aplicação de corrente elétrica. As moléculas de DNA apresentam carga elétrica negativa em razão do grupo fosfato dos nucleotídeos e, portanto, quando submetidas a um campo elétrico, direcionam-se para o polo positivo. Quanto menor o tamanho da molécula de DNA, ou seja, a quantidade de nucleotídeos, mais rápido será o seu deslocamento e, portanto, maior será a distância percorrida. Moléculas de mesmo tamanho migram a mesma distância e se concentram em uma determinada região chamada de **banda**, independentemente da sequência de seus nucleotídeos.

A eletroforese pode ser realizada em capilar ou em gel. Ambas separam as moléculas por tamanho molecular, mas, na **eletroforese capilar**, a migração das amostras acontece em um capilar (tubo fino). Nessa técnica, as amostras são marcadas com radicais fluorescentes que, ao passarem por um feixe de *laser*, são registradas sob a forma de picos em um gráfico. A representação gráfica dos picos é denominada eletroferograma (ver Fig.1.8).

A **eletroforese em gel** pode ser realizada de forma horizontal ou vertical. Na forma **horizontal**, normalmente são utilizados géis de agarose e um recipiente (cuba) único, que apresenta os polos positivo e negativo e onde se adiciona solução tampão (Fig. 1.3). Já a eletroforese **vertical** é realizada com géis de poliacrilamida, e cada polo da cuba está em um recipiente com tampão em níveis separados (o negativo acima e o positivo abaixo), conectados pelo gel. Em ambas, a corrente elétrica atravessa o gel e induz a migração das moléculas de DNA (negativas) em direção ao polo positivo.

A eletroforese em gel horizontal ou vertical é empregada para diferentes propósitos, de acordo com o tamanho das moléculas que permite separar. Moléculas de DNA entre 100 e 1.000 nucleotídeos (pares de base = pb), por exemplo, são separadas adequadamente em géis de agarose de 1 a 2%, enquanto moléculas maiores, com tamanhos entre 1 a 30 milhares de bases (1.000 pb = 1 Kb), apresentam melhor distinção em géis de agarose de 0,5 a 0,8%. Os géis de poliacrilamida, por sua vez, permitem a diferenciação de moléculas com variações no tamanho de até 1 pb, apresentando sensibilidade maior em relação aos géis de agarose.

Assim, os fragmentos de DNA provenientes das extrações ou ampliações com diferença grande de comprimento são geralmente visualizados em géis de agarose horizontal, e as análises de microssatélites e sequenciamento de DNA são realizados em géis verticais de poliacrilamida.

Na eletroforese em gel as amostras de DNA são aplicadas com o auxílio de micropipetas em canaletas localizadas em uma das extremidades do gel. O gel fica imerso em uma solução tampão que permite a passagem da corrente elétrica, resultando na migração das moléculas ao longo do gel (Fig. 1.3). As soluções tampão mais utilizadas são a TBE (Tris, ácido **B**órico e **E**DTA) e a TAE (Tris, ácido **A**cético e **E**DTA), mesmas soluções em que é homogeneizada a agarose ou as acrilamidas para o preparo do gel. Após certo período de tempo de migração das amostras, a corrente elétrica é desligada, e o gel é retirado da cuba para avaliação do resultado.



Na eletroforese, o tempo de migração das amostras e a voltagem ou amperagem aplicada são parâmetros importantes. Quanto maior o tempo de migração, maior é a separação dos fragmentos, cuidando-se para que as amostras não migrem para fora do gel. Quanto maior a voltagem ou amperagem, menor é o tempo de migração das amostras no gel. Entretanto, voltagens e amperagens muito altas podem determinar a evaporação das amostras.

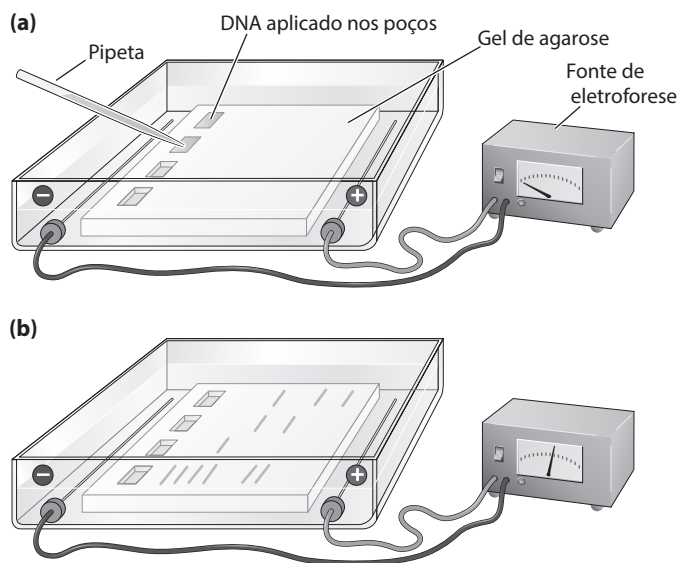


Figura 1.3 >> Eletroforese em gel horizontal: (a) aplicação das amostras no gel, (b) migração e separação dos fragmentos de DNA por tamanho molecular.

Fonte: Watson et al. (2009, p. 78).

O resultado da eletroforese é visualizado pela adição, ao gel ou às amostras, de corantes fluorescentes com alta afinidade pelo DNA. Um exemplo desse tipo de corante é o **brometo de etídeo**, comum em géis de agarose, que se liga ao DNA intercalando-se entre as fitas duplas, e que sob luz ultravioleta (UV), emite fluorescência alaranjada, formando bandas visíveis nas regiões do gel onde está o DNA. Outros corantes com afinidade pelo DNA, como **GelRed**, **GelGreen** e **SybrGreen**, também são utilizados em géis de agarose para visualizar as amostras de DNA, com a vantagem de não apresentarem os níveis de toxicidade do brometo de etídeo. Em géis de poliacrilamida comumente é utilizada uma solução de **nitrato de prata**, o qual se liga ao DNA formando bandas escuras no gel.

Ainda, juntamente com as amostras de DNA, adiciona-se nas canaletas do gel uma solução tampão de migração constituída de um açúcar, como ficol ou glicerol, para dar densidade às amostras, e um corante, como o azul de bromofenol, para visualizar a migração no gel.

A análise das bandas do gel, que correspondem a moléculas de DNA, é realizada aplicando-se também no gel dois tipos de soluções padrão, dependendo do objetivo da análise, que pode ser:

- quantificar e avaliar a integridade do DNA proveniente das técnicas de extração; ou
- estimar o tamanho das moléculas das bandas nos géis por comparação com soluções com fragmentos de DNA de tamanho conhecido, chamados de **marcadores de peso molecular**.

Nas extrações podem-se obter grandes moléculas, que incluem cromossomos inteiros ou cromossomos fragmentados. Amostras de boa qualidade formam bandas integras, enquanto amostras degradadas ou com presença de moléculas de RNA apresentam rastros ao longo do gel. A quantificação é feita pela comparação entre a intensidade da fluorescência das amostras extraídas com uma **solução de DNA de concentração conhecida**, como por exemplo, soluções contendo DNA do fago lambda (Fig. 1.4).

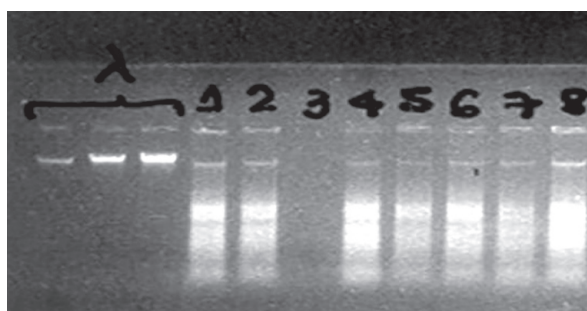


Figura 1.4 >> Quantificação de amostras de DNA (1 a 8) por eletroforese em gel, utilizando-se DNA do fago lambda (λ) em concentrações conhecidas. As bandas na altura das bandas do λ correspondem ao DNA, no rastro abaixo se encontra RNA e DNA degradado.

Fonte: Os autores.

No site do Grupo A (loja.grupoa.com.br) está disponível um protocolo de eletroforese horizontal em gel de agarose.

www.o

Após a obtenção de amostras de DNA e de sua avaliação quantitativa e qualitativa, pode ser realizada a etapa de análise de DNA. Para o entendimento dessas análises, serão detalhados métodos que envolvem o uso de enzimas de restrição e de amplificação e sequenciamento de DNA.

>> Enzimas de restrição

Enzimas de restrição, ou endonucleases do tipo II, são enzimas que apresentam a capacidade de clivar moléculas de DNA por meio da quebra da fita dupla. Cada enzima reconhece uma sequência específica de nucleotídeos, chamada de sítio de corte ou sítio de restrição, e apenas moléculas de DNA que apresentem essa sequência serão cortadas.

As **enzimas de restrição** são encontradas em bactérias e as protegem da infecção por vírus por meio do corte das moléculas de DNA destes, impedindo a sua replicação.



Com o desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, os genes que codificam as enzimas de restrição em diferentes microrganismos foram isolados e clonados em cepas de *E. coli* de fácil cultivo, o que permitiu sua produção comercial. Atualmente, já foram isoladas diversas enzimas de restrição.

A nomenclatura das enzimas de restrição utiliza uma sigla representando as iniciais da espécie da qual foram isoladas. A primeira letra, relativa à inicial do gênero, é maiúscula; as outras duas, relativas às iniciais da espécie, são minúsculas. Há ainda um número romano para diferenciar as diferentes enzimas descobertas na mesma espécie. Exemplos de sítios de corte de diferentes enzimas de restrição são apresentados no Quadro 1.1.

A separação (-) indica a posição em que ocorre a quebra da ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos em cada uma das fitas do DNA. Observe que, em algumas, a posição coincide e produz extremidades retas, mas em outras a diferença na posição do corte cria extremidades desparelhas. Enquanto algumas enzimas de restrição cortam as duas fitas do DNA na mesma posição (retas), produzindo **extremidades cegas**, outras enzimas cortam as duas fitas do DNA de maneira assimétrica (desparelhas), formando pequenas sequências de fita simples nas extremidades dos fragmentos, chamadas de **extremidades coesivas** (Fig. 1.5).

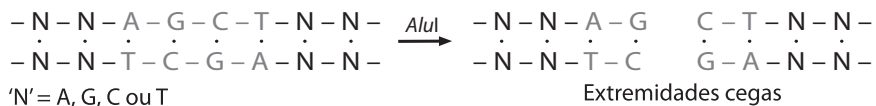
Quadro 1.1 >> Exemplos de enzimas de restrição apresentando a sigla, o organismo do qual cada enzima foi isolada e o sítio de corte

Enzima	Microrganismo	Sítio de clivagem
<i>Afe I</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	5' AGC-GCT 3' 3' TCG-CGA 5'
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5' AG-CT 3' 3' TC-GA 5'
<i>Bfa I</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	5' C-TAG 3' 3' GAT-C 5'

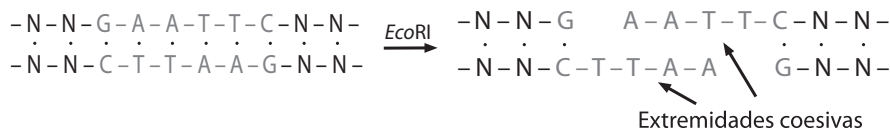
Enzima	Microrganismo	Sítio de clivagem
<i>Dra I</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5' TTT-AAA 3' 3' AAA-TTT 5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> cepaRY13	5' G-AATTC 3' 3' CTTAA-G 5'
<i>Hae III</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5' GG-CC 3' 3' CC-GG 5'
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' A-AGCTT 3' 3' TTCGA-A 5'
<i>Nde I</i>	<i>Neisseria nitroreducens</i>	5' CA-TATG 3' 3' GTAT-AC 5'
<i>Xba I</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5' T-CTAGA 3' 3' AGATC-T 5'

Fonte: Os autores.

(a) Produção de extremidades cegas



(b) Produção de extremidades coesivas



(c) As mesmas extremidades coesivas produzidas por diferentes endonucleases de restrição.

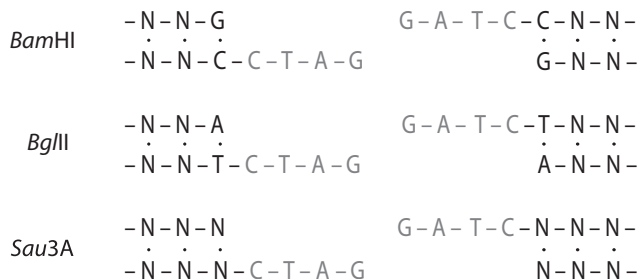


Figura 1.5 >> Tipos de cortes feitos por enzimas de restrição: (a) extremidades cegas promovidas pela *AluI* e (b) extremidades coesivas geradas pela *EcoRI*. (c) Obtenção de extremidades coesivas utilizando as enzimas de restrição *BamHI*, *BglII* e *Sau3A*.

Fonte: Brown (2003, p. 75).

Todas as moléculas de DNA cortadas com a mesma enzima de restrição apresentam a mesma extremidade coesiva, permitindo a união dos fragmentos pela complementaridade dos nucleotídeos das fitas simples. A descoberta das enzimas de restrição foi essencial para o surgimento da **tecnologia do DNA recombinante**, na qual moléculas de DNA de organismos diferentes podem ser cortadas e posteriormente unidas por complementaridade das duas fitas de DNA e ação da enzima DNA ligase, que refaz as ligações fosfodiéster (Fig. 1.6).

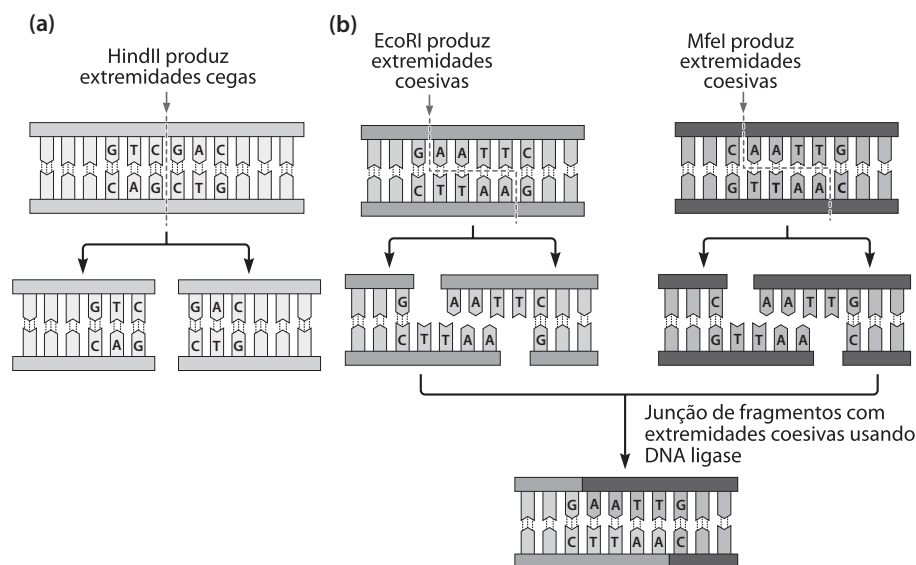


Figura 1.6 >> Formação de moléculas de DNA recombinante a partir de fragmentos de DNA de espécies diferentes clivados por enzima de restrição.

Fonte: Watson et al. (2009, p. 80).

As enzimas de restrição são muito utilizadas na biologia molecular para a manipulação de moléculas de DNA com diferentes objetivos. Na união de fragmentos de organismos de espécies diferentes, o objetivo pode ser a clonagem de moléculas de DNA recombinante (Fig. 1.6), a obtenção de organismos transgênicos ou terapia gênica. Um gene alvo pode ser isolado do genoma de um organismo por meio da clivagem do DNA com uma enzima de restrição e unido a um vetor, como um **plasmídeo**, que foi clivado com a mesma enzima.

Plasmídeos correspondem a moléculas de DNA fita dupla e circular que podem existir em bactérias e leveduras. Os plasmídeos podem apresentar de centenas a alguns milhares de nucleotídeos e replicam-se independentemente do cromossomo celular, podendo atingir um elevado número de cópias dentro da célula. Os plasmídeos geralmente apresentam genes para diferentes características, como genes de resistência a antibióticos, produção de toxinas e enzimas metabólicas e genes de conjugação bacteriana.



As enzimas de restrição também são usadas no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, uma vez que a ocorrência de mutações nas sequências de DNA pode resultar na eliminação ou no ganho de sítios de corte, permitindo a diferenciação entre moléculas de DNA portadoras de mutações, com base no tamanho dos fragmentos formados após a clivagem.

As reações de clivagem do DNA ocorrem em pH e temperaturas específicos e na presença do cofator íon magnésio (Mg^{+2}) em concentrações adequadas. A mistura, contendo a enzima, cofator, DNA alvo e uma solução tampão, é incubada na temperatura de atividade máxima da enzima, que pode ser 37°C, por exemplo, normalmente por uma hora para a digestão do DNA. A verificação do resultado pode ser realizada mediante eletroforese em gel para a visualização dos fragmentos formados.

>> Amplificação de DNA pela reação em cadeia da DNA polimerase

Em 1983, um químico com doutorado em bioquímica chamado Karry Mullis desenvolveu uma técnica de multiplicação de moléculas de DNA em laboratório denominada reação em cadeia da polimerase (PCR), baseando-se no processo celular de duplicação de DNA. O método de PCR é considerado uma das grandes invenções da Ciência, sendo uma das técnicas mais realizadas em laboratórios de biologia molecular.

Para saber mais sobre o processo celular de duplicação do DNA, leia o Capítulo 6 do livro *Biotechnologia I*.

Antes do desenvolvimento da PCR, a multiplicação de sequências de DNA era realizada por meio da cultura de colônias de bactérias e leveduras. Este processo, denominado **clonagem**, se caracteriza pelo isolamento e inserção de fragmentos de DNA em vetores, que podem ser plasmídeos, cosmídeos ou vírus, os quais são introduzidos em células procarióticas por procedimento denominado **transformação genética**. Nesse método, as bactérias e leveduras (transgênicas), ao se reproduzirem, multiplicam os fragmentos de DNA nelas inseridos, clonando assim essas sequências. As grandes dificuldades do processo de clonagem consistem na manutenção e distribuição entre os pesquisadores dos bancos de clones, que foram superadas então com a invenção da PCR.

A PCR é um método de síntese enzimática de fragmentos de DNA que inclui as etapas de desnaturação, anelamento e extensão (ou polimerização), descritas e ilustradas na Fig. 1.7.

Desnaturação: As moléculas de DNA são inicialmente desnaturadas por alta temperatura (acima de 90°C), ou seja, as duas fitas das moléculas são separadas pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas de nucleotídeos complementares.

Anelamento: A seguir, a temperatura é diminuída (usualmente entre 45°C e 65°C) e dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pareiam-se com suas sequências complementares nas fitas molde. Cada *primer* irá se ligar a uma das fitas do DNA alvo. Em razão da característica antiparalela da dupla fita de DNA, é citado que um *primer* se liga na extremidade 3' da região alvo (*primer* direto ou *forward*), enquanto o outro se liga na extremidade 5', na fita oposta (*primer* reverso ou *reverse*).

Polimerização: Posteriormente, pela disponibilidade de extremidade 3'OH dos *primers*, a enzima DNA polimerase realiza a síntese das novas fitas utilizando as originais como molde. A DNA polimerase promove a ligação fosfodiéster entre o último nucleotídeo da nova fita e nucleotídeo trifosfatado a ser adicionado.

Leia sobre a análise das sequências de DNA e o desenvolvimento dos *primers* para a realização de PCR no Capítulo 5 deste livro.



As três etapas da PCR são repetidas, geralmente, de 20 a 30 ciclos. A cada ciclo ocorre a duplicação das moléculas de DNA, determinando, dessa forma sua multiplicação *in vitro*. Assim, na PCR, partindo-se de uma molécula inicial, por exemplo, no primeiro ciclo são formadas duas moléculas e, nos ciclos seguintes, quatro, oito, dezesseis, trinta e duas, sessenta e quatro, e assim sucessivamente (Fig. 1.7).

A PCR é realizada em um equipamento denominado **termociclador**, que permite variações de temperatura de forma rápida. No termociclador são colocados microtubos contendo os reagentes necessários para que ocorra a reação enzimática. As reações incluem água ultrapura, moléculas de DNA a serem duplicadas (DNA molde), desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), *primers*, enzima DNA polimerase, solução de cloreto de magnésio (cofator da enzima DNA polimerase) e solução tampão para a DNA polimerase (Fig. 1.7).

Nas reações de PCR, a enzima DNA polimerase normalmente utilizada é proveniente da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, espécie coletada pela primeira vez em gêiseres e fontes térmicas do Parque Nacional de Yellowstone, nos Estados Unidos. Essas bactérias estão adaptadas à vida em águas que atingem altas temperaturas, aproximadamente 80°C. A enzima é denominada *Taq* DNA polimerase (iniciais do gênero e espécie da bactéria), apresenta temperatura ótima de atividade a 72°C e permanece ativa (não desnatura) nas altas temperaturas que a PCR atinge.



Os **nucleotídeos trifosfatos (dNTPs)** correspondem a uma mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados dATP, dCTP, dGTP e dTTP, respectivamente compostos pelas bases nitrogenadas adenina, citosina, guanina e timina.



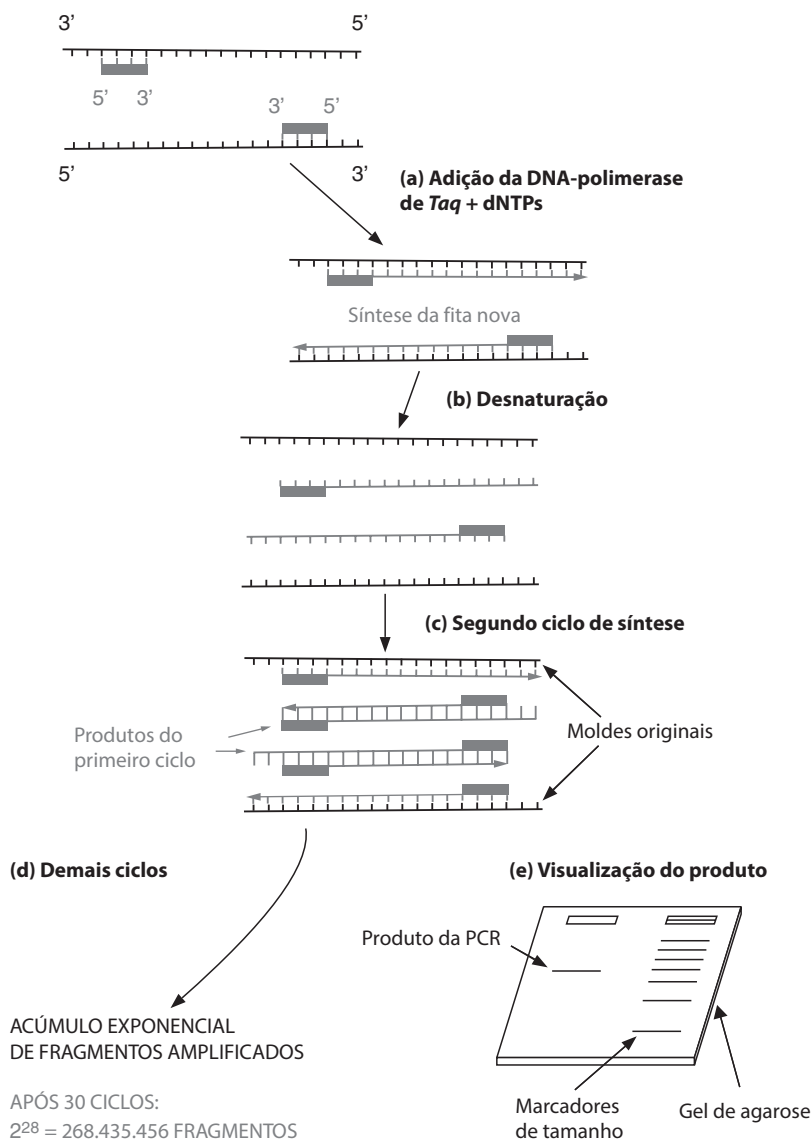


Figura 1.7 >> Esquema do PCR: etapas, amplificação por duplicação a cada ciclo e visualização dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel.

Fonte: Brown (2003, p. 189).

As etapas da PCR são promovidas por aumento e diminuição de temperatura, da seguinte forma:

Desnaturação: 94°C a 99°C (próximo do ponto de ebulição da água)

Anelamento: geralmente entre 45°C a 65°C (determinada pela sequência de nucleotídeos dos *primers*)

Extensão: 72°C (temperatura ótima de funcionamento da *Taq* DNA polimerase)



AGORA É A SUA VEZ

Nos dois alelos (a) e (b) representados abaixo, indique o local de anelamento dos *primers* 5'-GCCTCT-3' e 3'-GGATCC-5' e os tamanhos dos fragmentos amplificados por PCR, em pares de base (pb).

(a)

5'- AGGCCTCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTCCTAGGTTTCGAT -3'

3'- TCCGGAGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGAGGATCCAAGCTA -5'

(b)

5'- AGGCCTCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT
AGCTAGCTAGCTAGCTAGCTCCTAGGTTTCGAT -3'

3'- TCCGGAGATCGATCGATCGATCGATCGATCGA
TCGATCGATCGATCGATCGAGGATCCAAGCTA -5'

Após seu estabelecimento algumas variações de PCR foram desenvolvidas, como:

PCR multiplex: Na PCR multiplex, mais de um par de *primers* são utilizados, promovendo a amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos em um mesmo tubo, ou seja, permitindo a amplificação de diferentes regiões em uma só reação.

RT-PCR: Neste tipo de PCR, utiliza-se inicialmente a enzima transcriptase reversa (RT, enzima de vírus de genomas de RNA) e como molde moléculas de RNA. A ação da enzima determina a síntese de molécula de DNA complementar (cDNA) ao RNA, que é então amplificado por PCR. Esse tipo de PCR permite a análise da expressão de genes por partir de moléculas de RNA mensageiro (RNAm).

Nested PCR: A fim de aumentar a sensibilidade da PCR, desenvolveu-se a estratégia de utilizar dois pares de *primers* complementares à sequência alvo. Inicialmente é realizada a amplificação com o par mais externo e, posteriormente, o produto desta PCR é amplificado com um par interno ao primeiro (aninhado), que utilizará os fragmentos multiplicados na primeira reação como molde.

PCR em tempo real: Na PCR em tempo real, além dos dois *primers* que determinam a amplificação de determinada região do DNA alvo, é adicionada uma sonda complementar à região do DNA localizada entre os dois *primers*, contendo, em uma extremidade, uma molécula fluorescente (fluoróforo) e, na outra extremidade, uma molécula inibidora. Na sonda íntegra, a molécula inibidora impede a emissão de fluorescência. Durante a reação de síntese, a sonda hibridiza-se ao DNA alvo e é degradada pela atividade 5'-3' exonuclease da enzima *Taq* polimerase, resultando na emissão da fluorescência. A emissão de fluorescência é medida a cada ciclo, permitindo acompanhar o seu aumento ao longo da reação, geralmente por um computador acoplado ao termociclador (por isso, a denominação "em tempo real").

A quantidade de fluorescência emitida pela reação irá aumentar exponencialmente conforme as moléculas são sintetizadas, sendo proporcional à quantidade inicial de DNA alvo. A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação precisa de moléculas de DNA e tem sido utilizada para a quantificação de patógenos virais e bacterianos em amostras biológicas, na genotipagem de variantes genéticas, na avaliação dos níveis de expressão gênica e na detecção de produtos transgênicos em alimentos.

>> Sequenciamento de ácidos nucleicos

A informação contida nas sequências de nucleotídeos das moléculas de DNA e RNA é tão rica que possibilita diversas aplicações, como identificar o organismo ao qual pertence uma amostra, diagnosticar uma doença genética e diferenciar cepas de microrganismos patogênicos.

A **determinação da sequência nucleotídica** é possível graças à técnica desenvolvida por Sanger e colaboradores na década de 1970 e se tornou acessível por meio dos avanços recentes na fabricação de equipamentos automáticos. A variação no tamanho dos fragmentos é provocada pela adição à reação de síntese de nucleotídeos modificados, os didesoxirribonucleosídeos trifosfatados (ddNTPs), em baixa concentração, juntamente com os nucleotídeos normais (dNTPs). Os ddNTPs, por não conterem o radical hidroxila no carbono 3' da ribose, ao serem incorporados na fita que está sendo produzida interrompem a sua síntese. A adição aleatória dos ddNTPs irá produzir fragmentos terminando em cada uma das posições dos nucleotídeos da sequência de DNA em análise.

O **método de Sanger** consiste na produção de fragmentos de DNA com tamanhos que diferem em um (1) nucleotídeo, utilizando como molde uma fita simples de DNA. A utilização de um *primer* complementar ao DNA alvo determina qual sequência será produzida.



Atualmente, equipamentos automatizados de sequenciamento utilizam capilares extremamente finos nos quais, por meio da migração por eletroforese capilar, os fragmentos são alinhados com base no seu tamanho, do menor ao maior, e são detectados por um feixe de *laser*. A marcação de cada um dos quatro ddNTPs (A, T, C ou G) com uma molécula fluorescente diferente permite identificar qual foi o nucleotídeo adicionado em cada posição terminal dos fragmentos, construindo-se assim a sequência da molécula de DNA alvo (Fig. 1.8). Essa técnica permite o sequenciamento de moléculas entre 100 e 1000 pb aproximadamente.

A combinação do sequenciamento utilizando equipamentos automatizados com diferentes abordagens de clonagem e mapeamento genético tem permitido a obtenção da informação do genoma inteiro de diferentes organismos, resultando em grandes avanços nos estudos genéticos.

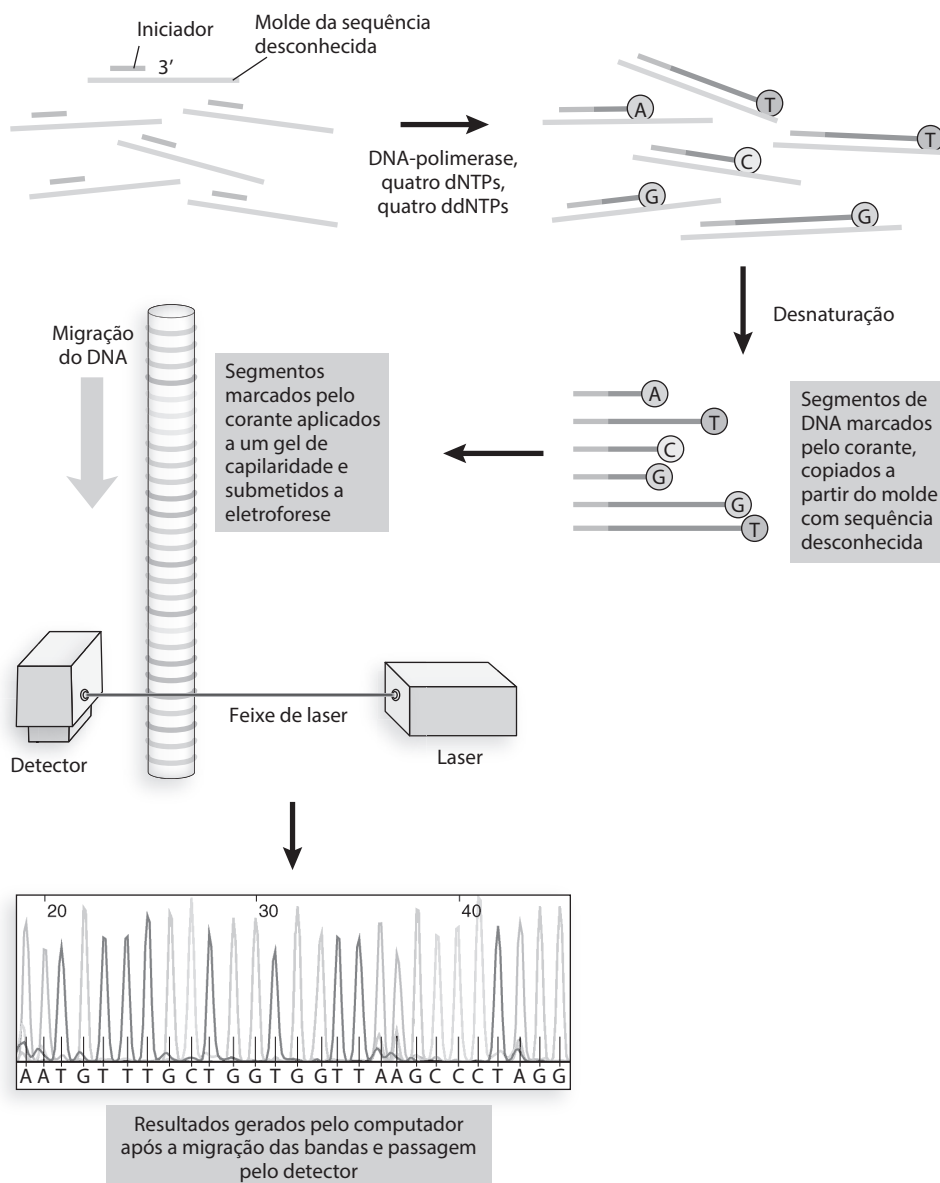


Figura 1.8 >> Sequenciamento automático de DNA pelo método de Sanger.

Fonte: Cox, Doudna e O'Donnell (2012, p. 232).

No site do Grupo A, loja.grupoa.com.br, você encontra mais informações sobre sequenciamento de DNA.

www

O Projeto Genoma Humano (PGH) consistiu em um consórcio internacional organizado no final da década de 1980 com o objetivo de realizar o sequenciamento completo do genoma humano. Considerado uma conquista científica de extrema relevância, o PGH envolvia grande expectativa quanto às suas consequências práticas. Após uma acirrada disputa entre dois grupos de pesquisa (um público e um privado), os primeiros resultados foram publicados em 2001, consistindo em um rascunho dos três bilhões de nucleotídeos do genoma humano. Além da grande quantidade de conhecimento gerada sobre a constituição genética da espécie humana, o PGH resultou em avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA que beneficiaram o estudo de outros organismos e a pesquisa genética como um todo.



No site do Grupo A, loja.grupoa.com.br estão disponíveis dois artigos sobre o projeto Genoma Humano.

www

>> Aplicações da análise do DNA

Agora que as principais técnicas de biologia molecular foram descritas, estudaremos algumas aplicações das análises de DNA.

>> Diagnóstico de doenças genéticas

As doenças genéticas são provocadas por alterações no DNA, afetando diferentes componentes dos organismos, como enzimas, receptores, fatores de crescimento, proteínas estruturais, organelas e hormônios. Essas alterações ocorrem tanto nas regiões dos genes responsáveis pela determinação da sequência de aminoácidos das proteínas (exons) quanto nas regiões intervenientes (introns) e mesmo nas regiões reguladoras, que determinam a expressão do gene.

A identificação das mutações responsáveis pelas doenças torna possível o maior entendimento de sua patogênese, evolução dos tratamentos e disponibilização de testes para o diagnóstico da enfermidade, mesmo antes do desenvolvimento dos sintomas. A sequência do gene candidato de indivíduos portadores da doença pode ser determinada por comparação com a sequência de indivíduos sem a doença, sendo a presença significativamente maior da mutação nos indivíduos doentes um indicativo da sua associação com a moléstia.

Uma vez determinada a(s) mutação(ões) responsável(is) pela doença, testes para a identificação da sua presença em outros indivíduos ou em outras populações podem ser desenvolvidos. Conhecendo a sequência do gene causador da doença, é possível desenvolver *primers* para a amplificação total ou parcial do gene por PCR e também a clivagem por enzimas de restrição ou mesmo o sequenciamento do gene.

Uma das etapas para a descoberta dessas mutações é o **mapeamento genético**, no qual se avalia a frequência de recombinações entre dois genes (ou entre um gene e um marcador molecular neutro), os quais se espera que estejam no mesmo cromossomo. Em razão da ocorrência de *crossing over* durante o pareamento dos cromossomos, genes que estão em um mesmo cromossomo sofrerão recombinação. Quanto maior a distância entre os dois, maior será a frequência de recombinação por *crossing over*; já uma distância muito pequena resulta em uma pequena probabilidade de recombinação, e as características serão herdadas juntas, ou seja, serão ligadas.

Para saber mais sobre herança genética, leia o Capítulo 9 deste livro.



A análise de ligação entre a característica de interesse, por exemplo, uma doença, e genes ou marcadores distribuídos ao longo dos cromossomos permite determinar a região do genoma na qual ocorre a menor frequência de recombinações, indicando a localização do gene responsável. A precisão dessa localização irá depender da densidade dos marcadores utilizados no mapeamento. Por meio dos esforços de muitos grupos de pesquisa estão disponíveis mapas completos do genoma humano e de muitas outras espécies.

Após o mapeamento, utilizam-se técnicas de DNA recombinante para a clonagem e sequenciamento da região do gene. De maneira geral, o DNA é clivado com enzimas de restrição, inserido em vetores de clonagem, plasmídeo ou um cromossomo artificial, e multiplicado dentro de células de microrganismos como *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Esse processo permitirá a produção de cópias do gene para a caracterização de sua sequência, além da avaliação da transcrição do RNA mensageiro ou da tradução da proteína do gene para a confirmação de sua função.

Uma estratégia alternativa ao mapeamento é o estudo de genes candidatos, definidos como genes conhecidos previamente por afetarem a rota metabólica envolvida na doença genética ou mesmo por provocarem uma doença semelhante em outras espécies. Em alguns casos, o gene candidato já foi estudado e sequenciado em outras espécies, fornecendo informações importantes para a análise.



Após a associação de mutação gênica com o desenvolvimento de uma doença, análises bioquímicas, fisiológicas ou de bioinformática posteriores podem avaliar a consequência dessa alteração para a estrutura e a função da proteína, colaborando para a confirmação de seu papel na determinação da moléstia.

No diagnóstico das doenças, os alelos portadores das mutações podem ser detectados por meio da técnica de PCR, no caso de alterações por inserção ou deleção de nucleotídeos, por ser o alelo causador da doença maior ou menor do que o alelo “normal”.

No caso de doenças determinadas por mutações por substituição de nucleotídeos, a amplificação por PCR dos alelos “mutante” e “normal” desse gene produz fragmentos de mesmo tamanho. Assim, após a PCR, uma alternativa é efetuar a digestão desses fragmentos com enzima de restrição que apresente sítio de clivagem na posição que os fragmentos diferem, gerando um polimorfismo de comprimentos de tamanho de restrição (RFLP, *Restriction Fragments Length Polymorphism*), sendo este método denominado PCR/RFLP. O diagnóstico molecular de doenças genéticas pode também ser realizado por sequenciamento ou pela hibridização de sondas específicas complementares a sequência dos diferentes alelos (*Southern blot*).

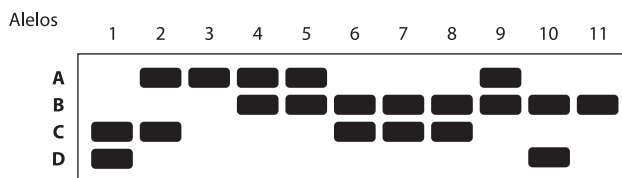


Para saber mais sobre mutações gênicas, leia o Capítulo 6 do livro *Biotecnologia I*.



AGORA É A SUA VEZ

1. A figura abaixo representa uma eletroforese em gel de agarose. Analise o gel e determine o genótipo e o fenótipo dos 11 indivíduos amostrados. Esta análise corresponde ao diagnóstico de uma doença genética autossômica dominante, causada pelo alelo de segundo menor tamanho amplificado por PCR.



Fonte: Os autores.

2. A figura a seguir representa um gel de eletroforese em poliacrilamida que indica o diagnóstico de uma determinada doença monogênica autossômica recessiva. Como a amplificação por PCR dos dois alelos deste gene produz fragmentos de mesmo tamanho, efetua-se a digestão desses fragmentos após a PCR com uma enzima de restrição, que gera um polimorfismo de comprimentos de tamanho de restrição (RFLP). Nesse PCR/RFLP, o alelo mutante (causador da doença) apresenta sítio de restrição, sendo cortado em dois pedaços de tamanhos distintos, enquanto o alelo “normal” não é clivado. A partir dessas informações, indique qual o genótipo e o fenótipo dos indivíduos A, B e C.



Fonte: Os autores.

Pelo estudo dos genes que afetam a saúde dos indivíduos, é possível buscar o diagnóstico precoce de doenças, tratamentos adequados e a melhoria da qualidade de vida da população.

Um exemplo interessante do impacto das variações genéticas está descrito no artigo “O gene da intolerância à lactose”, disponível no site do Grupo A, loja.grupoa.com.br.

www.o

Atualmente, os métodos de sequenciamento em larga escala têm permitido a rápida determinação de milhões de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*) distribuídos ao longo do genoma. Com essa informação, cria-se um perfil genético individual capaz de identificar a presença de alelos associados às doenças genéticas complexas. Alguns laboratórios oferecem o serviço de avaliação do risco pessoal de desenvolvimento de diversas doenças, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios mentais e alguns tipos de câncer. Destaca-se que as doenças genéticas complexas não apresentam herança mendeliana simples, sendo influenciadas por alterações em diversos genes e pelo ambiente. Nesses casos, utilizam-se estudos de associação genética nos quais é feita a comparação da frequência de variações na sequência de DNA entre grupos de indivíduos afetados (casos) e grupos de pessoas sem a doença (controle), buscando-se variações significativas entre estes grupos.

O desenvolvimento de testes de diagnóstico genético-molecular tem tido impacto direto na medicina, possibilitando a identificação dos genótipos dos indivíduos para diversas mutações. Enquanto a detecção de algumas alterações permite o diagnóstico correto de doenças genéticas, outras são caracterizadas apenas como fatores de risco para doenças complexas.

No site do Grupo A, loja.grupoa.com.br está disponível um artigo sobre as consequências dos testes de diagnóstico e uma lista dos principais testes disponibilizados em laboratórios.

www

>> Doenças infecciosas

O diagnóstico molecular de doenças infecciosas envolve a detecção dos patógenos ou agentes infecciosos, a quantificação da sua presença e a tipificação ou genotipagem de variantes presentes. Os microrganismos a serem identificados podem ser bactérias, protozoários, fungos ou vírus, e os hospedeiros beneficiados com as técnicas abrangem desde plantas a animais, incluindo espécies silvestres, domésticas e humanos.

Por amplificar as moléculas de DNA, a PCR propicia alta sensibilidade aos testes moleculares, permitindo a detecção de organismos presentes em baixas quantidades, normalmente sem a necessidade de multiplicação prévia em meios de cultura.



Um requisito importante para a realização dos testes moleculares é o conhecimento total ou parcial da sequência de nucleotídeos do patógeno, a fim de desenhar *primers* que funcionam como sondas complementares específicos ao DNA do patógeno. Assim, coleta-se material do indivíduo e realizam-se os procedimentos de extração de DNA do indivíduo, e juntamente do patógeno, no caso de indivíduos infectados. Neste caso, apenas o DNA do patógeno será amplificado na PCR, em razão da especificidade dos *primers* à sequência de DNA do agente causador da doença, determinando um resultado positivo.

É importante também determinar a variabilidade da sequência dentro da espécie e a similaridade com outras espécies, a fim de atingir a especificidade desejada. Por exemplo, pode-se desejar a detecção das diferentes espécies de bactéria pertencentes a um gênero envolvido com contaminações de alimentos. A utilização de uma região do DNA conservada entre essas espécies resultará na amplificação de todas as presentes nas amostras. Se o objetivo for a detecção de uma determinada espécie ou cepa com uma característica de interesse (p.ex., patogenicidade), deve-se utilizar uma região com polimorfismos em relação às demais para a amplificação exclusiva do alvo. A Figura 1.9 ilustra as diferentes estratégias empregadas no desenho de sondas para a detecção de patógenos utilizando regiões do DNA conservadas ou polimórficas.