

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

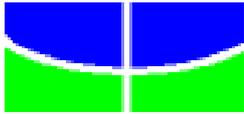
IGOR DE OLIVEIRA POTY

REVISÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DO DNA PARA COMPREENSÃO DAS
TÉCNICAS DE PCR E PCR EM TEMPO REAL E SUA APLICABILIDADE NA
PESQUISA DE MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Monografia apresentada para a conclusão
do Curso de Medicina Veterinária da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília.

Brasília / DF

2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

IGOR DE OLIVEIRA POTY

REVISÃO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DO DNA PARA COMPREENSÃO DAS
TÉCNICAS DE PCR E REAL TIME PCR E SUA APLICABILIDADE NA PESQUISA
DE MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Monografia apresentada para a conclusão do
Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade
de Brasília.

Orientadora
Prof^a. Dr. Ângela Patrícia Santana

Brasília / DF

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

POTY, Igor de Oliveira

Revisão da estrutura e função do DNA para compreensão das técnicas de PCR e PCR em tempo real e sua aplicabilidade na pesquisa de microrganismos em alimentos de origem animal / Igor de Oliveira Poty; orientação de Ângela Patrícia Santana – Brasília, 2011.

46p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

Palavras-chave: PCR em tempo real, TaqMan, SYBR Green I, estrutura do DNA, replicação, transcrição.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Igor de Oliveira Poty

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Revisão da estrutura e função do DNA para compreensão das técnicas de PCR e PCR em tempo real e sua aplicabilidade na pesquisa de microrganismos em alimentos de origem animal

Ano: 2011

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)

Igor de Oliveira Poty

CPF: 026.438.171-84

Endereço: SHIN CA 2 Bloco F apto 517. Ed. Millenium. Lago Norte

CEP: 71503-502 Brasília/DF- Brasil

Telefone: 9674-1817

E-mail: poty.igor@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: POTY, Igor de Oliveira

Título: Revisão da estrutura e função do DNA para compreensão das técnicas de PCR e PCR em tempo real e sua aplicabilidade na pesquisa de microrganismos em alimentos de origem animal.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª. Dra. Ângela Patrícia Santana Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Dra. Margareti Medeiros Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Bióloga Nara Rúbia Souza Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha família, que me ama e apóia em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me acompanhar em tudo o que faço e pelas oportunidades que me foram dadas.

Também agradeço a meu pai, minha mãe e minha irmã, pelo apoio incondicional não importa qual seja minha decisão.

Agradeço a toda a equipe do Lamal por sempre ser paciente comigo, apesar das minhas tentativas de incendiar o laboratório. Agradeço a Nara por nunca hesitar em responder minhas perguntas e por me acompanhar durante praticamente todos os dias do meu estágio e do meu Pibex. Não posso deixar de mencionar outros membros do Lamal, como a Pâmela, Patricia Helena, Patricia Renault e Anderson. A todos os mestrandos e doutorandos por me deixarem acompanhar seus experimentos. Também gostaria de agradecer a todos os colegas de Pibex e estágio por deixarem o meu estágio muito mais agradável.

Um agradecimento especial para meus colegas de curso Aryana, Suelen, Júlia, Rafaella, Thamiris, Maia, Wanessa, Gustavo, Stela, Michelle e Wlad, que me trouxeram tanta alegria em todos os momentos. Especialmente naqueles que eu mais precisei.

Meus amigos do Grupo Natal, que me reaproximaram de Igreja, depois de muito tempo afastado. Amo vocês!

É claro que tenho que agradecer a minha orientadora, Ângela Patrícia, por me dar a oportunidade de estagiar no Lamal e conhecer todas essas pessoas maravilhosas que já citei. Por ter me mostrado a extensão universitária e me incitado a escrever. Por me tranquilizar nos momentos em que estive mais estressado. Por sempre ter sido gentil e delicada na sua maneira de corrigir. Por ter me mostrado uma área da veterinária que poucos se interessam, mas que se tornou minha paixão. Mais uma vez, muito obrigado, professora.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de nucleotídeos e nucleosídeos	14
Figura 2. Açúcares que compõem nucleotídeos em ácidos nucleicos	14
Figura 3. Gráfico representando a amplificação de dois genes	34

SUMÁRIO

Introdução	10
Revisão bibliográfica	13
1. Ácidos nucleicos	13
1.1. Estrutura dos ácidos nucleicos	13
1.1.1. A dupla hélice	15
1.2. Estrutura e pareamento de bases nitrogenadas	16
1.3. Estabilidade da dupla hélice	17
1.4. Diferentes tipos de dupla hélice	17
1.5. Formas e enrolamento da dupla hélice	18
2. Organização do genoma de procariotos	19
2.1. Plasmídeos	20
3. Replicação em procariotos	20
3.1. Origem da replicação	21
3.2. Enzimas envolvidas na replicação	22
3.2.1. As DNA polimerases	22
3.2.2. Outras enzimas envolvidas na replicação	23
3.3. Síntese da fita contínua e descontínua	24
3.4. Término da replicação	24
4. Transcrição em procariotos	25
4.1. A RNA polimerase	26
4.2. Início da transcrição	26
4.3. Alongamento da cadeia	27
4.4. Término da transcrição	28
5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	28
6. RT-PCR	31
6.1. Transcriptase reversa	31

6.2. Escolha dos <i>primers</i>	32
6.2.1. Tipos de <i>primers</i>	32
6.3. Tipos de RT-PCR	33
6.4. Detecção de produtos da RT-PCR	33
7. PCR em tempo real	33
7.1. O princípio	34
7.2. Método SYBR® Green	35
7.3. Método TaqMan®	35
8. Aplicações na pesquisa de alimentos	36
Considerações finais	39
Referencias	40

Introdução

Desde a descoberta do DNA em 1869 por muito tempo se passou até que suas funções primordiais fossem sugeridas por Avery, MacLeod e McCarty, em 1944, e comprovadas em 1953 por Hershey. Já a estrutura em dupla-hélice foi proposta em 1953 por Watson e Crick e lançou as bases de como essa molécula poderia ser duplicada (SCHRANK, 2001).

A amplificação e detecção de ácidos nucléicos estão substituindo ensaios tradicionais baseados mais em fenótipos que em genótipos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido descrita como o padrão ouro para a detecção de microrganismos (MACKAY, 2004). O PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando dois *primers* que hibridizam com fitas opostas em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado (PASSAGLIA & ZAHA, 2001).

Os primeiros experimentos de PCR foram realizados com o fragmento de Klenow da DNA-polimerase I. A cada passo de desnaturação a enzima era inativada e mais enzima precisava ser adicionada. Então passou-se a se utilizar a DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimerase), e, como esta enzima é termoestável, não há necessidade de adição de mais enzima após cada ciclo de desnaturação (PASSAGLIA & ZAHA, 2001).

A PCR tem sido usada para caracterização de cepas de *Campylobacter jejuni* provenientes de amostras humanas, animais e de produtos de origem animal (GRIPP et al., 2011). Também foi usada para a caracterização de *Salmonella enterica* sorotipo enteritidis em animais portadores assintomáticos (MACIEL et al., 2011). Outros microrganismos patógenos alimentares também foram identificados utilizando-se a PCR, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*

e *Listeria monocytogenes*, dentre outros (PELISSER et al., 2009; LOPEZ & ALIPPI, 2010; SALEHI et al. 2008).

A possibilidade de que, ao contrario dos ensaios tradicionais com PCR, a amplificação fosse possível de ser detectada durante a reação, foi bem-vinda. Essa abordagem proporcionou uma grande perspectiva sobre a cinética da reação e se tornou a base do PCR em tempo real (MACKAY et al., 2002). A técnica da PCR em tempo real usa marcadores fluorescentes para monitorar a produção de produtos da amplificação durante cada ciclo da reação (BUDIN, 2005).

Nas ultimas duas décadas, os avanços tecnológicos aumentaram a possibilidade de diagnósticos rápidos para várias doenças. Porém, para agentes bacterianos patogênicos capazes de causar surtos de doenças transmitidas por alimentos, os métodos tradicionais de cultura, que podem levar até uma semana, são os únicos métodos usados por diversos laboratórios de microbiologia. O PCR em tempo real é uma das principais tecnologias emergentes para o diagnóstico rápido de patógenos alimentares (FUKUSHIMA et al., 2010).

Os benefícios para a saúde publica provenientes de um ensaio com PCR em tempo real são os mais notáveis após a detecção rápida e compreensiva de bactérias. Os resultados podem informar rapidamente à administração de saúde publica sobre os agentes causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos, permitindo uma resposta mais acurada, eficiente e veloz (FUKUSHIMA et al., 2009).

Além de economizar tempo, o PCR em tempo real é sensível, altamente específico e oferece a possibilidade de quantificação. O risco de contaminação cruzada é reduzido, possui performance de alto rendimento e não é necessária nenhuma manipulação pós-PCR (FUKUSHIMA et al., 2009).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi promover uma revisão de literatura abordando os principais aspectos da estrutura dos ácidos nucléicos, dos mecanismos de replicação e transcrição em procariotos, visando melhor entendimento dos mecanismos usados nas técnicas da PCR, RT-PCR e PCR em tempo real, bem como sua aplicabilidade como ferramenta na inspeção de produtos de origem animal.

Revisão bibliográfica

1. Ácidos nucleicos

A hereditariedade de todo organismo vivo é definida por seu genoma, que consiste em uma longa sequência de ácidos nucleicos que fornece a informação necessária para construir o organismo (LEWIN, 2009). O termo genoma designa o conjunto completo de sequências do material genético de um organismo. Ele inclui a sequência de todos os cromossomos e ainda qualquer DNA contido em organelas (MARTINEZ et al. 2006). Através de uma complexa série de interações, essa sequência é utilizada para produzir todas as proteínas do organismo no momento e local apropriados (LEWIN, 2009).

Pode-se dizer que um gene é uma sequência de DNA necessária para a síntese de um ácido ribonucleico (RNA), que levará a síntese de uma proteína. Esse é o dogma central da biologia molecular (MARTINEZ et al., 2006).

1.1. Estrutura dos ácidos nucleicos

O bloco constituinte básico dos ácidos nucleicos é o nucleotídeo, que possui três componentes: uma base nitrogenada, um açúcar e um fosfato (Figura 1). Eles são denominados de acordo com o tipo de açúcar. O DNA possui uma 2'-desoxirribose, já o RNA possui uma ribose (LEWIN, 2009).

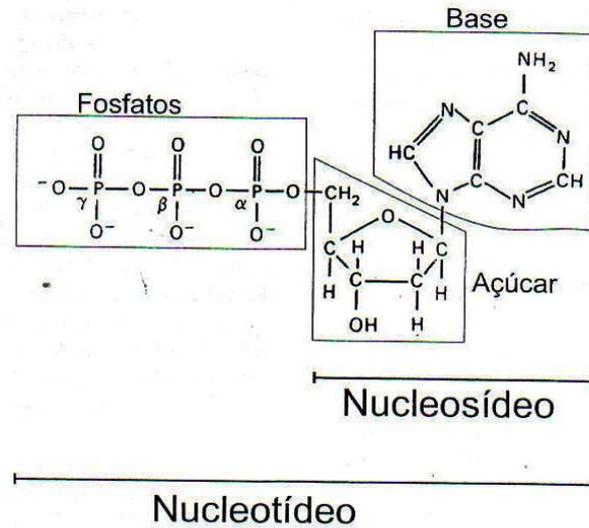


Figura 1. Estrutura de nucleotídeos e nucleosídeos.

Fonte: SCHRANK, 2001

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é um polímero de desoxirribonucleotídeos. Os desoxirribonucleotídeos são formados por um açúcar, a desoxirribose; uma base nitrogenada ligada ao carbono 1' da pentose; e um ou até três grupos fosfato ligados ao carbono 5' da pentose através de uma ligação glicosídica β. No RNA a desoxirribose é substituída por uma ribose (Figura 2). (SCHRANK, 2001).

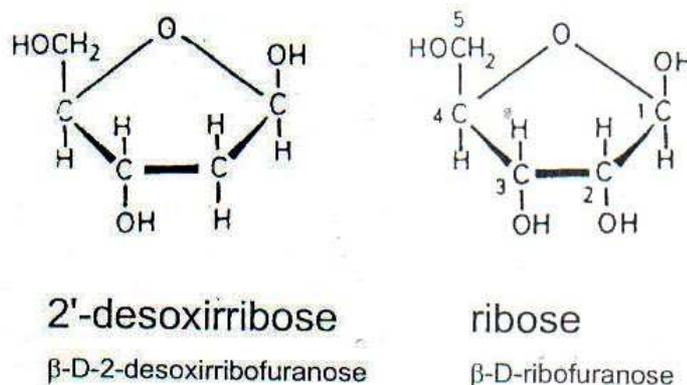


Figura 2. Açúcares que compõem nucleotídeos em ácidos nucléicos

Fonte: SCHRANK, 2001

Cada ácido nucléico contém quatro tipos de bases nitrogenadas. As purinas, adenina e guanina, estão presentes tanto no DNA quanto no RNA. Contudo, no DNA as pirimidinas são citosina e timina; no RNA, a uracila é encontrada no lugar da timina (LEWIN, 2009).

Todos os nucleotídeos do DNA possuem a mesma orientação relativa. Ou seja, o carbono 5' da pentose de todos os nucleotídeos é voltado para cima, isso confere direcionalidade às cadeias polinucleotídicas. Na extremidade 5' da cadeia, está presente um grupo fosfato, enquanto que na extremidade 3' está presente um grupo OH. Na molécula de DNA, os desoxirribonucleotídeos formam cadeias entre si, ligados por pontes fosfodiéster estabelecidas entre o grupo fosfato do carbono 5' e o grupo OH do carbono 3'. Por convenção, as cadeias polinucleotídicas são representadas na orientação 5'→3' (SCHRANK, 2001).

1.1.1. A dupla hélice

O modelo de dupla hélice do DNA foi proposto inicialmente por Watson e Crick em 1953, levando em conta 3 conceitos: dados de difração de raios X revelaram que o DNA possuía a forma de uma hélice regular, apresentando uma volta completa a cada 34 Å e com diâmetro de aproximadamente 20 Å; A densidade do DNA sugere que a hélice deve conter duas cadeias polinucleotídicas. O diâmetro constante da hélice pode ser explicado se as bases em cada cadeia estiverem voltadas para o interior e restrinjam-se de tal forma que uma purina esteja sempre em oposição a uma pirimidina, evitando dessa maneira o pareamento de purina-purina (muito largo) e pirimidina-pirimidina (muito estreito); independente das quantidades absolutas de cada base, a proporção de G é sempre igual à de C, enquanto a de A é sempre igual à de T (LEWIN, 2009). Devido a essa propriedade,

as fitas de DNA são ditas complementares. Essa propriedade também garante a propriedade de replicação de cadeias longas de DNA e a transmissão de informação genética às proteínas, via transcrição (SCHRANK, 2001).

Esse modelo demonstrou que as desoxirriboses ficam externas em relação às bases nitrogenadas, como se fossem corrimãos em uma escada circular, expostas ao meio aquoso (SCHRANK, 2001).

Cada par de bases é rotacionado em aproximadamente 36° ao redor do eixo da hélice, em relação ao próximo par, com isso, é possível afirmar que a cada 10 pares de bases se forma uma volta completa de 360° (LEWIN, 2009). Já SCHRANK (2001) diz que a rotação entre dois nucleotídeos adjacentes é de $34,6^\circ$, desta forma, a dupla hélice conclui uma volta completa a cada 10,4 pares de bases.

A torção das duas fitas forma a dupla hélice, que contém um sulco menor ($\sim 1,2 \text{ \AA}$ de largura) e um sulco maior ($\sim 22 \text{ \AA}$ de largura) (LEWIN, 2009). Nessas cavidades, especialmente na maior, as bases estão expostas ao meio solvente e são quimicamente distinguíveis, deste modo, moléculas que interagem com sequências específicas de bases podem identificar essas sequências sem romper a hélice (SCHRANK, 2001).

1.2. Estrutura e pareamento de bases nitrogenadas

O pareamento de bases nitrogenadas é fundamental para a manutenção da dupla hélice. Duas características principais se destacam: sua estrutura química e seu tamanho. A presença de grupos ceto ($\text{C}=\text{O}$) e amino ($\text{C}-\text{NH}_2$) favorece a formação de pontes de hidrogênio. Dessa maneira, T e U, que apresentam grupos ceto, podem fazer uma ponte de hidrogênio com A, que contém grupo amino. Enquanto que C e G, que possuem tanto grupos amino quanto grupos ceto, podem

formar duas pontes de hidrogênio. Em adição a essas pontes, todas as bases podem formar mais uma ponte de hidrogênio entre os anéis aromáticos. Deste modo, T ou U e A formam duas pontes de hidrogênio, enquanto C e G formam três pontes de hidrogênio (SCHRANK, 2001).

1.3. Estabilidade da dupla hélice

Existem várias forças agindo para estabilizar a estrutura da dupla hélice do DNA. Essas forças são fundamentais para manter sua integridade, no entanto não podem deixar de permitir sua flexibilidade essencial para suas atividades (SCHRANK, 2001).

Efeitos hidrofóbicos estabilizam o pareamento, tendo em vista que os anéis purínicos e pirimidínicos são forçados para o interior da hélice, enquanto os sítios hidrofílicos são expostos ao solvente nos sulcos maior e menor. Além dessas forças, o empilhamento das bases favorece o estabelecimento de forças de Van der Waals entre os anéis aromáticos (SCHRANK, 2001).

Já as cadeias de açúcar-fosfato, que são carregadas negativamente, interagem com cátions, em especial Mg^{2+} em solução, neutralizando a repulsão entre as duas cadeias (SCHRANK, 2001). Já quando o DNA está em solução *in vitro*, as cargas tipicamente são neutralizadas por íons Na^+ (LEWIN, 2009)

1.4. Diferentes tipos da dupla hélice

A estrutura do DNA pode variar de acordo com o meio em que se encontra, levando-se em conta as interações com a própria água ao seu redor e a influencia de outros solutos ou solventes (DALE & PARK, 2004)

As formas encontradas em condições fisiológicas são: tipo B, tipo A e tipo Z. Nessas formas, as regras de pareamento ainda se aplicam e a informação contida na sequência das se mantém. Contudo, a mudança na conformação pode dificultar a interação do DNA com proteínas (SCHRANK, 2001).

1.5. Formas e superenrolamento da dupla hélice.

O DNA nem sempre está em sua forma linear, um bastão em dupla hélice. Ele também pode ter suas extremidades ligadas covalentemente, formando estruturas circulares. Bactérias possuem seus cromossomos em forma circular, bem como estruturas extracromossomais, como os plasmídeos. As mitocôndrias, os cloroplastos e alguns vírus e bacteriófagos também possuem DNA circular (SCHRANK, 2001).

Existem dois tipos de superenrolamentos: o positivo (+), no sentido horário, e o negativo (-), no sentido anti-horário (LIMA, 2008). Quando o superenrolamento é gerado pelo desenrolamento da dupla hélice, é chamado de negativo. É normalmente encontrado na natureza. Pode assumir dois tipos: plectotemico e toroidal: o primeiro é encontrado em DNA em solução, enquanto o segundo, em DNA enrolado em proteínas, como as histonas, para formar os nucleossomos. Caso antes que se selem o final das duas fitas, elas forem adicionadas de giros no mesmo sentido da dupla hélice, essa assumirá um superenrolamento positivo. As arqueobactérias apresentam seu DNA com superenrolamento positivo (SCHRANK, 2001).

Uma molécula fechada de DNA pode ser caracterizada pelo seu número de ligação, ou seja, o número de vezes que uma fita cruza a outra no mesmo espaço. O número de ligação (L) é definido pelo número de superenovelamentos (W – writhing number) e pelo número de torções (T – twisting number) (LEWIN, 2009).

O número de torções (T) representa o número de voltas da fita, enquanto que o número de superenovelamentos (W) representa o número de vezes que uma fita passa sobre si mesma. A soma desses dois parâmetros é o número de ligação ($L=W+T$) (DALE & PARK, 2004).

O número de ligação é uma propriedade topológica da molécula dupla circular e permanece inalterado independente do que ocorre com o DNA, desde que as cadeias de açúcar fosfato não sejam rompidas e novamente seladas. As enzimas que realizam essa atividade são as topoisomerases (SCHRANK, 2001).

2. Organização do genoma de procariotos

A molécula de DNA é um meio notavelmente simples e elegante de armazenar informações genéticas. Entretanto, uma codificação linear desse tipo demanda uma molécula extremamente longa, logo, cromossomos bacterianos são muito maiores que as células em que eles residem (TORO & SHAPIRO, 2010).

Todo genoma tem a mesma função básica, que é servir como repositório replicativo da informação codificada pelo DNA que o constitui. Genomas de procariotos, contudo, são mais simples que os de eucariotos, possuindo algumas características marcantes, tais como: ausência de um complemento diplóide de genes; uso de quase todo o genoma na codificação e na regulação, praticamente não há presença de sequências de DNA redundantes; colinearidade dos genes com seus produtos protéicos; tendência de apresentar genes codificando funções relacionadas agrupados em unidades transcricionais policistronicas; ocorrência praticamente igual de sequências codificantes em ambas as fitas de DNA; existência de unidades genéticas acessórias (FERREIRA, 2001).

Embora as bactérias não apresentem estruturas com as características morfológicas distintas dos cromossomos eucariotos, ainda assim seus genomas são organizados em corpos definidos. O material genético pode ser observado na forma de uma massa bastante compacta, que ocupa aproximadamente um terço do volume celular (LEWIN, 2009).

Genomas procarióticos têm estrutura bastante compacta e dedicada, quase que exclusivamente, a codificação de proteínas. Praticamente todo o DNA desses organismos tem função codificante, podendo haver superposição de sequências (FERREIRA, 2001).

2.1. Plasmídeos

Um plasmídeo é constituído por duas cadeias lineares de desoxirribonucleotídeos ligados entre si por pontes de hidrogênio entre purinas e pirimidinas. No caso do pDNA, as duas moléculas encontram-se ligadas covalentemente, isto é, os dois esqueletos fosfodiéster encontram-se intactos, formando, assim, um *loop* fechado (LIMA, 2008).

São moléculas de DNA de conformação compacta devido ao superenovelamento do DNA. Em muitos casos, são moléculas pequenas, com apenas alguns kilobases de comprimento, mas em alguns organismos, notavelmente membros do gênero *Pseudomonas*, é comum serem encontrados plasmídeos com centenas de kilobases (DALE & PARK, 2004).

3. Replicação em procariotos

A replicação é um processo no qual uma fita de DNA age como template (molde) para a síntese de um novo ácido nucléico, no qual cada base forma uma ponte de hidrogênio com outra da fita template (DALE & PARK, 2004).

A replicação é semiconservativa, durante o processo as duas fitas do DNA parental são copiadas, originando moléculas filhas com somente uma das fitas novas sintetizadas (SCHRANK & SILVA, 2001).

A adição dos nucleotídeos para o crescimento da cadeia é sempre no sentido 5'→3'(SCHRANK & SILVA, 2001). Reiji Okazaki observou que as duas fitas de DNA não se replicam de forma contínua. A DNA polimerase sintetiza uma fita contínua – leading strand- e uma fita descontínua – lagging strand (WEAVER, 2008). A fita contínua, necessita apenas de um *primer* inicial, enquanto a fita descontínua utiliza vários *primers*. (SCHRANK & SILVA, 2001).

A replicação de DNA de fita dupla é uma tarefa complexa que envolve um conglomerado de atividades enzimáticas. Diferentes atividades estão envolvidas nos estágios de iniciação, alongação e de terminação (LEWIN, 2009).

3.1. Origem de replicação

A replicação do DNA ocorre ao longo da molécula, a partir de um ponto inicial denominado origem. O DNA de células procarióticas, plasmídeos e vírus possuem apenas uma origem de replicação, enquanto que várias origens são encontradas em organismos eucarióticos (SCHRANK & SILVA, 2001).

O cromossomo bacteriano é replicado bidirecionalmente, sendo o processo iniciado num sitio definido – *oriC* – situado na posição 83,5 do mapa genético circular da bactéria (FERREIRA, 2001).

3.2. Enzimas envolvidas na replicação

3.2.1. As DNA-polimerases

A DNA polimerase é a enzima responsável pela síntese de uma nova fita de DNA. Essas enzimas têm a capacidade de adicionar nucleotídeos na extremidade 3'OH de uma região pareada do DNA (SCHRANK & SILVA, 2001).

As DNA-polimerases são incapazes de iniciar uma nova fita de DNA, apenas estender uma molécula já existente (DALE & PARK, 2004). Elas catalisam as ligações fosfodiéster que se produzem entre o OH do C3' da desoxirribose de um nucleotídeo e o fosfato ligado ao C5' do nucleotídeo recém-chegado. (DE ROBERTIS & RIB, 2006)

A DNA polimerase I de *E.coli* foi a primeira polimerase caracterizada por Arthur Kornberg, em 1956. É um polipeptídeo de 928 aminoácidos, contendo 3 domínios de atividade. Na região carboxi-terminal está localizada a atividade de polimerização e, logo em seguida, a atividade de exonuclease 3'→5'. A região amino-terminal contém a atividade de exonuclease 5'→3' (SCHRANK & SILVA, 2001).

Essa cadeia polipeptídica pode ser clivada por proteases, originando um fragmento pequeno da região N-terminal, contendo atividade exonucleásica 5'→3' e um fragmento grande ou fragmento de Klenow, com as duas outras atividades. O fragmento de Klenow pode ser utilizado *in vitro* para a síntese de DNA e remoção de nucleotídeos pela atividade de exonuclease 3'→5' (SCHRANK & SILVA, 2001).

A DNA polimerase III holoenzima é a responsável pela alongação dos *primers* tanto da fita contínua quanto da descontínua. O termo holoenzima indica que é uma enzima com múltiplas subunidades. Cada uma das suas subunidades tem a capacidade de polimerizar DNA individualmente, porém muito devagar. Isso sugere

que falta alguma coisa às subunidades, tendo em vista que a replicação *in vivo* é extremamente rápida (WEAVER, 2008).

DNA-polimerases tem sido isoladas de uma variedade de microrganismos, como *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus*, entre outros. Essas enzimas apresentam características básicas bastante similares àquelas encontradas em polimerases de *E. coli*. Entretanto, a enzima isolada de *Thermus aquaticus*, a Taq-polimerase, apresenta-se estável a 95°C e não possui atividade exonuclease 3'→5' (SCHRANK & SILVA, 2001).

As DNA-polimerases não possuem a capacidade de iniciar uma cadeia de nucleotídeos, necessitando de uma região pareada, denominada *primer*. Os *primers* são pequenas sequências de RNA sintetizados pela RNA-polimerase ou por uma primase (SCHRANK & SILVA, 2001).

Uma característica das DNAs polimerases é a sua tendência de se desprender do DNA da cadeia modelo. Porém, enquanto estão fazendo isso, permanecem unidas a ele uma vez que são sustentadas por uma braçadeira deslizante. A braçadeira se une à polimerase e rodeia o DNA, o que impede o desprendimento da enzima, porém não seu deslizamento (DE ROBERTIS & RIB, 2006).

3.2.2. Outras proteínas envolvidas na replicação.

As helicases são enzimas que tem como função a quebra de pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, separando as duas fitas de DNA (SCHRANK & SILVA, 2001). As helicases se ligam a fita molde e se movem sobre ela, separando as duas fitas (DALE & PARK, 2004).

As fitas separadas são impedidas de se associarem novamente pela ação da proteína SSB – single-stranded DNA binding protein (DALE & PARK, 2004). Isso induz uma conformação ideal do DNA para replicação e pareamento de bases, além de proteger as fitas simples da degradação por exonucleases (SCHRANK & SILVA, 2001). As SSB protegem o DNA fita simples da degradação por nucleases e modificações químicas durante a replicação, recombinação e outros processos que requerem que o DNA se desenrole (BERRY & BELL, 2006).

3.3. Síntese das fitas contínua e descontínua

Cada nova fita de DNA é sintetizada por uma unidade catalítica individual com comportamentos diferente, por que as novas fitas de DNA crescem em direção oposta. Uma unidade enzimática está se deslocando com o ponto de desenrolamento, sintetizando a fita contínua ininterruptamente. A outra unidade se desloca para trás em relação ao DNA. Dessa maneira pequenos segmentos do molde são expostos a cada momento. (LEWIN, 2009).

A síntese do DNA ocorre pela ação da DNA polimerase e pela provisão de desoxirribonucleotídeos, que se encontram no núcleo como desoxirribonucleosídeos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e são agregados sequencialmente na extremidade 3' da cadeia de crescimento seguindo a ordem marcada pelos nucleotídeos da fita molde (DE ROBERTIS & RIB, 2006).

3.4. Término da replicação

Na replicação do cromossomo circular de *E.coli*, as forquilhas de replicação encontram-se na região terminal denominada *Ter* localizada a 180° de *OriC*

(SCHRANK & SILVA, 2001). Os sítios de terminação vão de TerA a TerF. Os sítios Ter se ligam a proteínas chamadas Tus (WEAVER, 2008).

O término da replicação em genomas circulares, em geral não apresentam problemas, pois as forquilhas de replicação devem se encontrar em algum ponto do DNA, caso a replicação seja bidirecional, ou, se unidirecional, retornar a origem de replicação (SCHRANK & SILVA, 2001). Entretanto, por causa de sua natureza circular, as duas dupla hélices permanecem ligadas como anéis entrelaçados. Esses anéis devem ser separados para que a replicação termine. A separação ocorre com o auxílio de topoisomerases (WEAVER, 2008).

4. Transcrição em procariotos

Recebe o nome de transcrição a síntese de moléculas de RNA a partir de moléculas de DNA que servem como modelo. A síntese ocorre pela união entre si dos nucleotídeos A, U, C e G, que se alinham seguindo a ordem dos nucleotídeos complementares de DNA (DE ROBERTIS & RIB, 2004). O processo segue as mesmas regras de pareamento que a replicação, exceto pelo pareamento de uracil (U) com adenina (A). Portanto a molécula de RNA sintetizada é complementar a fita que lhe deu origem e idêntica a outra fita de DNA, sendo as timinas substituídas por uracilas (SCHRANK & SILVA, 2001).

Assim como na síntese de DNA, a fita de RNA é feita no sentido 5'→3'. Entretanto há grandes diferenças entre a replicação e a transcrição. Primeiro, apenas uma molécula comparativamente pequena é produzida. Segundo, apenas uma fita de DNA é transcrita (alguns genes usam uma fita, outros usam outra fita). A produção de uma molécula de RNA fita única de tamanho relativamente menor gera menos problemas topológicos. A enzima e o produto de RNA podem se movimentar

pela hélice sem a necessidade de topoisomerasas e helicases essenciais para a replicação. Além disso, a RNA polimerase pode começar a transcrição do zero, sem a necessidade de *primers* (DALE & PARK, 2004).

A função biológica de cada um desses processos é diferente. Enquanto a síntese de DNA deve ser precisa e uniforme, a transcrição expressa o estado fisiológico da célula e é extremamente variável para atender suas necessidades (SCHRANK & SILVA, 2001).

4.1. A RNA polimerase

As RNA polimerases mais bem caracterizadas são aquelas de eubactérias, das quais *Escherichia coli* é o caso típico. Em uma eubactéria, um único tipo de RNA polimerase parece ser responsável por quase toda a síntese de mRNA, e de todo rRNA e tRNA (LEWIN, 2009).

A reação catalisada pelas RNA polimerases é mecanicamente idêntica à reação catalisada pelas DNA polimerases. A reação ocorre entre o grupo 3'OH de um ribonucleotídeo e o grupo fosfato do carbono 5' do ribonucleosídeo trifosfato a ser incorporado. A reação processa-se então no sentido 5'→3' e a fita de DNA copiada é a de sentido 3'→5' (SCHRANK & SILVA, 2001).

4.2. Início da transcrição

A holoenzima RNA polimerase desliza pela dupla-hélice do DNA e reconhece sequências específicas. Essas sequências, denominadas promotores, sinalizam onde a transcrição deve começar. O primeiro nucleotídeo que é copiado no RNA é denominada sitio de início e demarcado como +1 na molécula de DNA. Os desoxirribonucleotídeos que se localizam em direção a extremidade 5' (ou upstream

do DNA tem a partir dessa posição, sinal negativo. Já os desoxirribonucleotídeos, após o sítio +1 em direção a extremidade 3' (ou downstream) recebem números crescentes positivos (SCHRANK & SILVA, 2001).

4.3. Alongamento da cadeia.

Após o desligamento da subunidade sigma, ocorre uma alteração conformacional, e a RNA polimerase deixa de cobrir 70 pb e passa a cobrir 30 pb, mantendo uma forma esférica (SCHRANK & SILVA, 2001).

A RNA polimerase, além de catalisar as ligações fosfodiéster, desliza sobre o DNA na direção 5'→3' e faz avançar a bolha. Isto é obtido pela separação dos nucleotídeos no lado frontal da bolha, enquanto os da retaguarda voltam a se unir (DE ROBERTIS & RIB, 2006).

As RNA polimerases procariótica e eucariótica podem iniciar a transcrição mais facilmente *in vitro* quando o molde está superenovelado, provavelmente por que a estrutura superenovelada requer menos energia livre para a desnaturação inicial do DNA no complexo de iniciação (LEWIN, 2009).

A velocidade da transcrição não é a mesma ao longo do alongamento, ela depende da sequência de nucleotídeos da região do DNA sendo transcrita. Em geral, sequências ricas em GC reduzem a velocidade, provavelmente por que esses pareamentos são mais resistentes a desnaturação e o passo de abertura das fitas é mais resistente que em outras regiões. Há regiões em que a transcrição para rapidamente e depois é retomada, sem desfazer o complexo. Essas paradas são chamadas de pausas. Um dos fatores que propicia as pausas é o acoplamento dos processos de transcrição e tradução. A proteína NusA, que se liga ao complexo após o desligamento do fator sigma, amplifica os sítios de pausa, especialmente

quando sequências repetidas invertidas ou palíndromos estão presentes. Essas pausas de 10 a 30 minutos são utilizadas como mecanismo de controle de expressão (SCHRANK & SILVA, 2001).

O alongamento da cadeia de RNA segue até o momento que a RNA polimerase encontra sequências específicas no DNA que determinam seu término (SCHRANK & SILVA, 2001).

4.4. Término da transcrição

Após o início da transcrição, a RNA polimerase sintetiza RNA até encontrar uma sequência terminadora. Ao encontrá-la, a enzima deixa de adicionar nucleotídeos a cadeia crescente de RNA, libera o produto da transcrição e dissocia-se do DNA (LEWIN, 2009).

Existem algumas semelhanças entre as etapas de início e terminação da transcrição: ambos requerem quebra de pontes de hidrogênio e ambos requerem proteínas adicionais para interagir com a enzima (LEWIN, 2009).

5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Métodos tradicionais para detecção e identificação de bactérias se baseiam em cultivar o organismo em uma colônia pura e identificá-los por uma combinação de testes de coloração, provas bioquímicas e outros testes. Esses métodos são lentos e requerem pelo menos 24 horas ou mesmo semanas para organismos de crescimento lento, como *Mycobacterium tuberculosis* (DALE & PARK, 2004).

A técnica da reação em cadeia da polimerase é um sistema de amplificação *in vitro* de DNA, através do qual é possível se obter em poucas horas grandes

quantidades de um determinado gene, ou parte dele, a partir de uma quantidade muito pequena de DNA (DE ROBERTIS & RIB, 2006).

A técnica consiste em três passos: a fita dupla de DNA é desnaturada pelo calor; em seguida, cada *primer* anela com uma das fitas de DNA; os *primers* anelados são então estendidos pela ação de uma DNA polimerase (ERLICH, 1995). Nesse processo o DNA é desnaturado a 95-97°C, os *primers* são hibridizados a 30-60°C e, posteriormente, a síntese de DNA é feita com DNA-polimerase e desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs) a 72°C. A repetição dessas etapas, por cerca de 20 a 30 ciclos, permite a amplificação de um segmento de DNA (PASSAGLIA & ZAHA, 2001).

Estudos iniciais com PCR para amplificar sequências específicas do DNA humano, utilizavam o fragmento de Klenow proveniente da DNA polimerase I de *Escherichia coli*. Essa enzima não é termoestável, dessa maneira é necessário que seja adicionada depois da fase de desnaturação de cada ciclo. Isso foi eliminado com a introdução da polimerase termoestável isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*. O uso da Taq DNA polimerase transformou o PCR, permitindo o desenvolvimento de um ciclo térmico automático para que a amplificação fosse feita em um único tubo, contendo todos os reagentes necessários (ERLICH, 1995).

Não existe um protocolo único que seja apropriado para todas as situações. Conseqüentemente, para cada nova aplicação do PCR, é necessário que seja feita uma otimização (INNIS & GELFAND, 1990).

A concentração recomendada de Taq DNA polimerase varia de 1 a 2,5 unidades para cada 100µl de reação (LAWYER et al. 1989 *apud* INNIS & GELFAND, 1990). Entretanto, a quantidade de enzima pode variar de acordo com os requerimentos da fita template e do *primer*. Quando se otimiza um PCR, se

recomenda utilizar concentrações variando de 0,5 a 5 unidades para cada 100 µl de reação e testar os resultados com eletroforese em gel de agarose. Caso a concentração da enzima seja muito alta, produtos não específicos podem se acumular, caso seja muito baixa, uma quantidade insuficiente do produto desejado pode ser formada (INNIS & GELFAND, 1990). Atualmente devido a ampla utilização desta técnica, os volumes têm sido consideravelmente menores, variando entre 25 a 50 µl.

Estoques de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP) devem ser neutralizados em pH 7,0 e sua concentração deve ser estimada espectrofotometricamente. A estabilidade dos dNTPs durante ciclos repetidos de PCR é tamanha que aproximadamente 50% permanecem com dNTPs após 50 ciclos (INNIS & GELFAND, 1990).

A concentração de magnésio pode afetar o anelamento dos *primers*, temperatura de dissociação das fitas, especificidade do *primers* e a fidelidade e atividade da enzima (INNIS & GELFAND, 1990).

Teoricamente, a quantidade de produto dobra a cada ciclo do PCR, porém, depois de um determinado número de ciclos, a eficiência da amplificação cai com o aumento da quantidade de ciclos, resultando do efeito platô. Diversos fatores podem causar o efeito platô, entre eles a degradação de nucleotídeos ou *primers*; inativação da DNA polimerase (Taq possui meia vida de 40 minutos a 95°C); reassociação de fitas simples antes dos *primers* poderem se anelar ou ser estendidos; excesso de substrato; competição com produtos não específicos da amplificação; acúmulo de inibidores não específicos da amplificação; acúmulo de inibidores da polimerase, como pirofosfatos (GAUSE & ADAMOVICZ, 1994).

Dada a capacidade do PCR de gerar trilhões de cópias de DNA a partir de uma sequência template, a contaminação da amostra com o produto de um PCR anterior, DNA ou material celular exógeno pode criar problemas tanto para pesquisa, quanto para diagnóstico. As precauções para diminuir o risco de contaminação incluem atenção aos procedimentos realizados no laboratório, separação física do local onde ocorre a preparação da reação do local onde ocorre a análise do produto do PCR, uso de pipetas precisas, organização das pipetas e uso de ponteiros protegidas (ERLICH, 1995).

6. RT-PCR

Diversas técnicas estão disponíveis atualmente para se medir mudanças na expressão gênica. Eles incluem o Northern blot, ensaios com RNase, hibridização in situ e transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Porém, se a quantidade da amostra é muito pequena ou a mensagem é tão rara que o uso de outras técnicas não é prático, o RT-PCR quantitativo pode ser usado. No RT-PCR, o RNA é reversamente transcrito em cDNA e a sequência desejada é amplificada com *primers* específicos. Menos de 10 cópias de RNA são necessárias para esse processo (GAUSE & ADAMOVICZ, 1994)

6.1. Transcriptase reversa

A quantificação do RNA começa com a criação de cDNA pela transcriptase reversa. Existem dois tipos de enzimas RT disponíveis no mercado, AMV e MMLV. A AMV é derivada do vírus da mieloblastose aviária. A MMLV é derivada do vírus da leucemia de Moroney de murinos. Ambas as enzimas possuem atividade de RNase H, que é a habilidade de degradar RNA em um híbrido RNA-DNA. Contudo, a AMV tem uma atividade RNase H maior que a da MMLV. Além disso, a AMV possui processividade maior que a MMLV, isto é, elas podem incorporar mais nucleotídeos

por unidade enzimática por molécula template. A temperatura ótima para a AMV é mais alta que a para MMLV (42°C e 37°C, respectivamente) (SHIPLEY, 2006).

6.2. Escolha dos *primers*

Outro passo essencial para a RT-PCR é a escolha dos *primers* que darão início à síntese do cDNA. Esses *primers* têm como função hibridizar com o RNA molde, para que a transcriptase reversa possa sintetizar o cDNA por sua atividade de DNA polimerase RNA dependente (ALVARES, 2001).

6.2.1. Tipos de *primers*

Existem três tipos de *primers* que podem ser usados. Os *primers* oligo d(T) são o tipo de *primer* mais usados nos experimentos de RT-PCR e permitem a análise da expressão de vários genes a partir de uma única preparação de cDNA. Os *primers* oligo d(T) polimerizam com a cauda poli-A presente na extremidade 3' dos mRNA e produzem uma população de cDNAs que corresponde a população de mRNA daquele tecido ou célula. Os *primers* hexanucleicos randômicos se ligam a todo tipo de DNA presente na amostra, gerando populações de cDNA mais complexas que quando são utilizados *primers* oligo d(T). Os *primers* randômicos são preferíveis quando o mRNA específico é longo e por isso a transcriptase reversa tem dificuldade em copiá-lo. Já os *primers* específicos são desenhados para hibridizar especificamente moléculas de mRNA do gene de interesse, aumentando a especificidade da RT-PCR (ALVARES, 2001).

O maior problema do uso de *primers* oligo d(T) é que ele limita a transcriptase reversa à região próxima a cauda poli-A do mRNA, além disso, nem todos os mRNAs possuem cauda poli-A e alguns possuem sequências poli-A no meio do RNA. O uso de *primers* randômicos favorece a transcrição reversa de RNA ribossomal e transportador, além do mensageiro, aumentando o risco de anelamentos errôneos durante o PCR (SHIPLEY, 2006). Os *primers* específicos tem a desvantagem de não permitir a análise da expressão de genes diferentes a partir da mesma preparação de cDNA (ALVARES, 2001).

6.3. Tipos de RT-PCR

A segunda etapa da RT-PCR é a reação em cadeia da polimerase, na qual as moléculas de cDNA produzidas pela RT são amplificadas exponencialmente, permitindo que sejam facilmente detectadas (ALVARES, 2001).

A RT-PCR pode ser feita usando a técnica one-step RT-PCR ou two-step RT-PCR. Na técnica two-step RT-PCR, são feitas duas reações separadas: primeiro, o RNA é transcrito reversamente em cDNA, então é amplificado utilizando-se PCR. Esse método é útil para detectar múltiplos transcritos de um único molde de cDNA, ou para estocar alíquotas de DNA para uso futuro. Já no one-step RT-PCR, a reação ocorre em um único tubo para a RT e para o PCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

6.4. Detecção dos produtos da RT-PCR

A última etapa da RT-PCR é a detecção dos seus produtos, que pode ser feita com através da visualização em gel de agarose ou poliacrilamida, seguida de coloração com brometo de etídio. A coloração com prata também é bastante sensível e pode ser usada para a detecção de produtos da RT-PCR (KEVIN et al., 1993 *apud* ALVARES, 2001).

7.0. PCR em tempo real

Muitos métodos de análises quantitativas de ácidos nucléicos têm sido descritos (SOUTHERN, 1975; SHARP et al., 1980; THOMAS, 1980 *apud* HEID et al., 1996). Tanto o PCR quanto o RT-PCR tem se mostrado poderosas ferramentas para análises quantitativas de ácidos nucléicos. Isso tornou possível a realização de diversos experimentos que não seriam possíveis de ser realizados por métodos tradicionais tais como cultivo celular, isolamento em meio de cultura e provas bioquímicas. (RAYEYMAEKERS, 1995 *apud* HEID et al., 1996).

A principal dificuldade em se obter resultados quantitativos pela PCR se deve ao fato de a quantificação ser feita após o término da reação, depois da fase

exponencial da PCR. Conforme a PCR progride, os componentes da reação tornam-se limitantes, até que se atinja o platô (figura 3) (ALVARES, 2001).

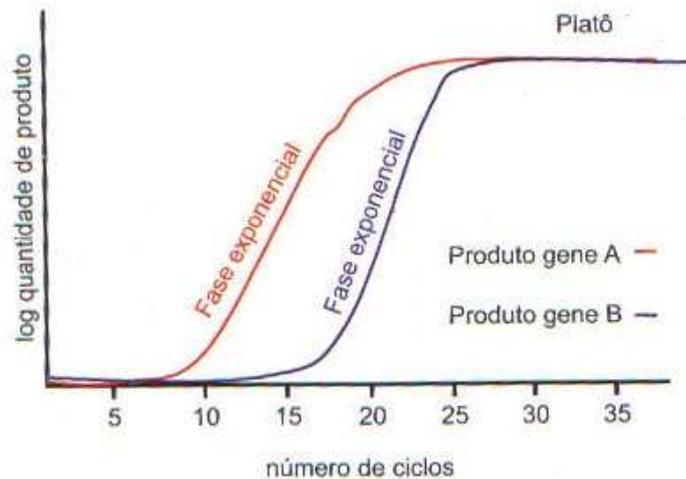


Figura 3. Gráfico representando a amplificação de dois genes

Fonte: ALVARES, 2001

A PCR em tempo real é capaz de determinar o ciclo exato em que a amplificação é detectada. Esse ciclo é denominado threshold cycle (C_t), ou ciclo limiar. O C_t é determinado na fase exponencial da PCR e é inversamente proporcional ao número de cópias da sequência alvo. Portanto, quanto maior é a quantidade de ácido nucléico inicial, mais cedo será observado um aumento na fluorescência e menor será o C_t (BUSTIN, 2005)

Infortunadamente o PCR "real time" e o "Reverse transcriptase" são ambos abreviados como RT-PCR. É necessário conhecer o contexto para saber de que tipo de PCR está se falando. Ainda é possível combinar as duas técnicas. Fazendo primeiro um reverse transcriptase PCR seguido de um real time PCR (WEAVER, 2008).

7.1. O princípio

A detecção em tempo real é feita monitorando-se cada amostra, ciclo a ciclo, até que uma determinada quantidade de produto seja acumulada, permitindo a detecção pelo equipamento (FREEMAN et al., 1999 *apud* ALVARES, 2001).

As análises quantitativas são feitas com o uso de corantes fluorescentes na PCR, como o SYBR Green I. Desta forma, na medida em que a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA que se ligam ao corante, resultando em aumento da fluorescência (HIGUCHI et al., 1992, 1993 apud ALVARES, 2001).

7.2. Método SYBR® Green

As análises quantitativas são feitas com o uso de corantes fluorescentes na PCR, como o SYBR Green I. Desta forma, na medida em que a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA que se ligam ao corante, resultando em aumento da fluorescência (HIGUCHI et al., 1992, 1993 apud ALVARES, 2001). O SYBR® Green I é um corante fluorescente que se liga à cavidade menor da dupla hélice e fluoresce quando excitado por luz (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

A fluorescência é medida com o auxílio de um aparelho especial que é capaz de excitar as moléculas e detectar a fluorescência resultante, produzindo gráficos de amplificação. Esse método tem como principal desvantagem o fato de que qualquer molécula de dupla fita será detectada. Assim, produtos inespecíficos também geram sinal (ALVARES, 2001).

Contudo, o SYBR® Green I pode ser usado como ferramenta para se obter rapidamente informações sobre níveis de expressão de uma variedade de genes em uma variedade de amostras. Após obter esse dado preliminar, recomenda-se utilizar o método TaqMan® para resultados quantitativos mais precisos (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

7.3. Método TaqMan®

O método TaqMan® foi desenvolvido por David Gelfand e Pam Holland e colaboradores que descreveram a atividade de nuclease 5'→3' da DNA polimerase e o método que eles usaram para controlar essa atividade de maneira a degradar a sonda colocada no PCR. Sua descoberta foi posteriormente chamada de TaqMan®

em homenagem a um dos primeiros videogames existentes, o PacMan (WILLIAMS, 2009).

O método de TaqMan[®] utiliza uma sonda marcada com uma molécula fluorescente (fluoróforo) e outra de silenciamento intramolecular (*quencher*) além do par *primers* que se utilizam na PCR comum. A sonda é constituída de uma sequência-alvo que está entre os dois *primers*. O fluoróforo e o *quencher* que ficam nas extremidades da sonda só emitem sinal quando são separados por meio da clivagem da sonda pela enzima Taq DNA polimerase durante a reação (MARTINHAGO et al. 2006) .

A PCR em tempo real pelo método TaqMan[®] tem uma série de vantagens sobre a PCR convencional, incluindo a possibilidade de quantificar a replicação com alta especificidade, através da inserção de uma sonda com um marcador repórter e um marcador silenciador (FUJIKAWA et al., 2008).

Nesse método, a hibridização específica é imprescindível para que seja gerada a fluorescência, então pareamentos inespecíficos não geram sinal (LEE et al., 1993 *apud* ALVARES, 2001).

8.0. Aplicações na pesquisa em alimentos

O diagnóstico rápido de organismos patogênicos que causam doenças transmitidas por alimentos é necessário para garantir alimentos seguros. Os métodos tradicionais de cultura, isolamento e identificação de patógenos alimentares em surtos são demorados e trabalhosos. Então, esforços têm sido feitos para reduzir o tempo de identificação desses patógenos (FUKUSHIMA et al., 2007).

O PCR em tempo real vem sendo cada vez mais usado para a detecção e quantificação de patógenos em alimentos (NORTON, 2002 *apud* RUDI et al., 2005). Existem dois grandes problemas com o uso de PCR para diagnóstico quantitativo. O limite de detecção é determinado pela quantidade de material que pode ser amplificado em uma única reação. Outro problema é a detecção de DNA de células mortas (HERMAN, 1997; MCKILLIP et al., 1999; NOGVA et al., 2003 *apud* RUDI et al., 2005).

BLEVE et al. (2003) utilizaram o RT-PCR em tempo real e foram capazes de quantificar a presença de bolores e leveduras em iogurtes, leites e sucos contaminados naturalmente e intencionalmente.

DAUM et al. (2002), durante um surto de gastroenterite, em Kerr County, Texas, suspeito de ter sido causado por alimentos, conseguiu isolar *Salmonella enterica* tanto pelos métodos de cultivo tradicionais quanto utilizando a PCR em tempo real em uma amostra de frango.

FRICKER et al. (2007), investigaram dois surtos de doenças transmitidas por alimentos com episódios de vômito, que ocorreram no sul da Alemanha. Um deles envolvia 23 crianças que vomitaram após comer uma refeição a base de arroz em uma creche. O outro surto envolvia uma pessoa apenas, que havia consumido um couve-flor. Através da técnica de PCR em tempo real, eles conseguiram constatar que o agente etiológico de ambos os casos era uma cepa emética de *Bacillus cereus*.

MACIEL et al. (2011) fizeram um estudo comparativo entre métodos tradicionais de cultura e isolamento de *Salmonella enterica* sorotipo enteritidis com PCR em tempo real. Nesse estudo, constataram que 45 das 243 amostras provenientes de animais assintomáticos, apresentaram resultado positivo no PCR em tempo real, enquanto que nos métodos tradicionais de cultura e isolamento apresentaram resultado negativo.

Tendo isso em vista, é necessário esclarecer que células mortas também podem ser detectadas pelo PCR em tempo real. Desta maneira, é obtido um resultado positivo na PCR em tempo real, enquanto que em métodos tradicionais de cultura e isolamento se observa um resultado negativo.

NAKAJIMA et al. (2009) utilizou a PCR em tempo real para quantificar a presença dos genes de resistência a neomicina e puromicina, comumente usados como marcadores em animais geneticamente modificados, com o objetivo de estabelecer um método de identificação de produtos derivados destes animais.

LEBLANC-MARIDOR et al. (2011) utilizando o método TaqMan® foram capazes de desenvolver uma técnica capaz de identificar *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em amostras de fezes suínas, ração e do ambiente.

Considerações finais

Foi observado através dessa revisão bibliográfica que a PCR tem sido uma boa ferramenta para a otimização de análises microbiológicas em alimentos, apresentando resultados rápidos e confiáveis, a partir do momento que o protocolo, bem como a padronização para a realização da quantificação, para o microrganismo em questão são estabelecidos.

A RT-PCR, por se utilizar da transcriptase reversa para se obter cDNA a partir de RNA para então se prosseguir com a PCR, é ideal para se medir a expressão gênica tanto em eucariotos quanto em procariotos. Apesar de não ser costumeiramente aplicado no diagnóstico de patógenos alimentares, pode ser usado na detecção de vírus de RNA, como o vírus da hepatite E.

A PCR em tempo real é capaz de quantificar a amplificação do material genético na medida em que a reação ocorre, sendo possível avaliar os resultados da amplificação sem que seja necessário manejo pós-PCR. Deste modo, é possível obter resultados não apenas quanto a presença de microrganismos, mas também sobre sua quantidade.

O mais importante é que todas essas técnicas são capazes de oferecer resultados de maneira mais rápida que os métodos de cultivo de microrganismos tradicionais. Essa característica garante que este método gera informação de maneira mais rápida para os agentes de saúde pública, tornando mais eficiente sua intervenção no caso de surtos de doenças transmitidas por alimentos.

A eficiência com que podem ser feitas as análises também enfatizam o caráter preventivo da inspeção de alimentos. De tal forma que os alimentos que forem condenados com impróprios para consumo podem ser rapidamente retirados do mercado, garantindo alimentos mais seguros para a população.

Referencias

ALVARES. L. E. Aplicação da RT-PCR nos estudos da expressão gênica. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia molecular aplicada a produção animal*. Brasília: Embrapa, 2001. Pag 135-150.

APPLIED BIOSYSTEMS. *Relative Quantification Getting Started Guide*. Applied biosystems. 2005. Disponível em: <<http://www.genomics.bham.ac.uk/Documents/Relative%20quantification%20guide.pdf>>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2011.

APPLIED BIOSYSTEMS. *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*. Applied Biosystems. 2008. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf>. Acesso em: 06 de Dezembro de 2011.

BARRY, R. E.; BELL, S. D.; *DNA Replication in the Archaea*. *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol 70. N°4. Dezembro. 2006. Disponível em: <<http://mmb.asm.org/content/70/4/876.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

BLEVE, G.; RIZZOTTI, L.; DELLAGLIO F.; TORRIANI, S.; *Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products*. *Applied and environmental microbiology*. Vol 69. N°7. 2003. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/69/7/4116.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

BUSTIN, S. A. *Real time PCR*. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*. 2005. Disponível em: <<http://pages.123-reg.co.uk/stephenabustin-1222168/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/qPCR.pdf>>. Acesso em: 06 de Dezembro de 2011.

DALE, J. W.; PARK, S. F. Molecular genetics of bacteria. 4th ed. Chichester: John Wiley & Son, 2004. xii, 346 p.

DAUM L. T.; BARNES, W. J.; McAVIN, J. C.; NEIDERT, M. S.; COOPER, L. A.; HUFF, W. B.; GAUL, L.; RIGGINS, W. S.; MORRIS, S.; SALMEN, A.; LOHMAN, K. L.; Real-Time PCR Detection of *Salmonella* in Suspect Foods from a Gastroenteritis Outbreak in Kerr County, Texas. Journal of clinical microbiology. Vol 40. N°8. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120641/>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. Bases da biologia celular e molecular. 4. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2006. 389 p.

ERLICH, A. E.; PCR Technology. In: MEYERS, R. A. Molecular biology and biotechnology: A comprehensive desk reference. New york: Vch, 1995. Pag 641-648.

FERREIRA. H. B. Organização gênica de procariotos. In: ZAHA. A. Biologia molecular básica. Porto Alegre: Mercado aberto, 2001. Cap.3, pag 64-77.

FRICKER, M.; MESSELHÄUßER, U.; BUSCH, U.; SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M.; Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. Applied and Environmental microbiology. Vol 73. N°6. 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/73/6/1892.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

FUJIKAWA H.; SHIMOJIMA Y.; Estimation of Viable Salmonella Cell Numbers in Meat and Meat Product Using Real-Time PCR. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. Vol 49. N°4. 2008. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/shokueishi/49/4/49_261/_article>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

FUKUSHIMA, H.; KATSUBE, K.; HATA, Y.; KISHI, R.; FUJIWARA, S.; Rapid Separation and Concentration of Food-Borne Pathogens in Food Samples Prior to

Quantification by Viable-Cell Counting and Real-Time PCR. Applied environmental microbiology. Vol. 73. N°1. 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/73/1/92.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

FUKUSHIMA, H.; KATSUBE, K.; TSUNOMORI, Y.; KISHI, R.; ATSUTA, J.; AKIBA, Y.; Comprehensive and Rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Foodborne Outbreaks. International Journal of Microbiology. Vol 2009. 2009. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2009/917623/>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

FUKUSHIMA, H.; KAWASE, J.; ETOH, Y.; SUGAMA, K.; YASHIRO, S.; NATSUKO, I.; YAMAGUCHI K.; Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis. International Journal of microbiology. Vol. 2010. 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2010/864817/abs/>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

GAUSE, W. C.; ADAMOVICZ, J.; The use of the PCR to quantitate gene expression. Genome research. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol 33. 1994. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/3/6/S123.full.pdf>>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2011.

GRIPP, E.; HLAHLA, D.; DIDELOT, X.; KOPS, F.; MAURISCHAT, F.; TEDIN, K.; ALTER, T.; ELLERBROEK, L.; SCHREIBER, K.; SCHOMBURG, D.; JANSSEN, T.; BARTHOLOMAUS, P.; HOFREUTER, D.; WOLTEMATE, S.; UHR, M.; BRENNEKE, B.; GRUENING, P.; GERLACH, G.; WIELER, L.; SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C.; Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. BMC Genomics. Vol. 12. N°584. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/584>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M.; Real-time quantitative PCR. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Genome research. Vol. 6. 1996.

Disponível em:
<http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.full.pdf+html?sid=295e1398-ffa-4864-ad81-380248e76947>>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2011

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. PCR protocols: A guide to Methods and applications. Academic press. 1990. Cap. 01. Pag 3-12. Disponível em: <http://a32.lehman.cuny.edu/webwurtzel/course/PCR%20PROTOCOLS%20.pdf>>. Acesso em: 08 de Dezembro de 2011.

LEWIN, B. Genes IX. Porto Alegre: Artmed, 2009. xvii, 892 p.

LIMA, J. B. M.; EFEITO DO GRAU DE SUPERENROLAMENTO DE PLASMÍDEOS NA SUA ESTABILIDADE ESTRUTURAL E FUNÇÃO BIOLÓGICA. 2008. 43f. Dissertação (Mestrado em biologia molecular e genética). Departamento de biologia vegetal, faculdade de ciências, Universidade de Lisboa. Lisboa.

LOPEZ, A. C.; ALIPPI, A. M.. Enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* isolates recovered from honey. Revista argentina de microbiologia., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, vol 42, n. 3, setembro. 2010 . Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000300014&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 08 de Dezembro de 2011.

MACIEL, B.M.; DIAS J.C.T.; ROMANO ; SRIRANGANATHAN, N.; BRENDDEL, M.; REZENDE R.P.; Detection of *Salmonella* Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. Genetic and molecular research. 10 (4): 2578-2588. 2011. Disponível em: <http://www.geneticsmr.com/articles/1326>>. Acesso em: 29 de Novembro de 2011

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A.; Real time PCR in virology. Nucleic acids research. Vol. 30. Nº06. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101343/>>. Acesso em: 08 de Dezembro de 2011.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; NETO, C. F.; Molecular genetics of non-melanoma skin câncer. *Anais Brasileiros De Dermatologia E Sifilografia*. Vol. 81. Nº05. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v81n5/en_v81n05a03.pdf>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

MARTINHAGO, C. D.; OLIVEIRA, R. M.; CANAS, M. C. T.; VAGNINI, L. D.; OLIVEIRA, J. B. A.; PETERSEN, C. G.; JUNIOR, J. G. F.; Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno. *Revista Brasileira de Ginecologia e obstetrícia*. Vol. 28. Nº03. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032006000300009>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

NAKAJIMA, O.; AKIYAMA, H.; TESHIMA, R.; Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Contamination of Beef by Material from Genetically Engineered Cattle. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 32. Nº08. 2009. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/32/8/1313/_pdf>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. In: ZAHA. A. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado aberto, 2001. Cap.15, pag 307-331.

PELISSER M. R.; KLEIN C. S.; ASCOLI K. R.; ZOTTI T. R.; ARISI A. C. M.; Ocurrence of staphylococcus aureus and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal Microbiology*. 2009. Acesso em: 08 de Dezembro de 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1517-83822009000100025&lng=en>.

PERES, N.D.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ACURI, E. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, Belo Horizonte, v. 62, n. 4, Agosto. 2010 . Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000400029&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 de Dezembro de 2011.

RUDI K., NATERSTAD K., DRØMTORP S.M.; HOLO H.; Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Letters in applied microbiology*. V.40. p. 301-306. 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2005.01672.x/pdf>>. Acesso em: 4 de Dezembro de 2011.

SALEHI, T. Z.; MADANI, S. A.; KARIMI, V.; KHAZAELI, F. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*., São Paulo, v. 39, n. 3, Sept. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000300015&lng=en&nrm=iso>. acesso em: 08 de Dezembro de 2011.

SHRANK. A. Estrutura dos ácidos nucléicos. In: ZAHA. A. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado aberto, 2001. Cap.2, pag 36-63.

SCHRANK. I. S.; SILVA. S. C. Replicação do DNA. In: ZAHA. A. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado aberto, 2001. Cap.5, pag 93-115.

SCHRANK. I. S.; SILVA. S. C. Síntese de RNA - Transcrição. In: ZAHA. A. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado aberto, 2001. Cap.8, pag 183-200.

SHIPLEY, G. L.; An introduction to real time PCR. In: DORAK, M. T.; *Real-time PCR*. New York: Taylor & Francis group, 2006. Cap.1, pag 1-31. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/33376790/Real-Time-PCR>>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2011.

TORO, E.; SHAPIRO, L.; *Bacteria chromosome organization and segregation*. Cold spring Harbor Laboratory press. 2010. Disponível em:

<<http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/2/a000349.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 de Outubro de 2011.

WEAVER, R. F. Molecular biology. 4th ed. Boston: Higher Education, 2008. .

WILLIAMS, P. M.; The beginnins of real-time PCR. Clinical Chemistry. Vol 55. N°04. 2009. Disponível em: <<http://www.clinchem.org/content/55/4/833.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2011.