

## PCR em Tempo Real

Ana Catarina Silva (nº49202), Catarina Afonso (nº 49265), João Almeida (nº49214), Maria Lameira (nº 49205)

---

Após a descoberta do método de PCR, surgiu a possibilidade de conseguir controlar a amplificação do DNA em tempo real, através da monitorização da fluorescência. A fluorescência medida reflete a quantidade de produto que foi amplificado em cada ciclo, num determinado momento, o que permite realizar uma posterior quantificação do DNA, surgindo o PCR em tempo real (qPCR)<sup>1,2</sup>, sendo que, quanto maior for a quantidade de DNA amplificado maior será a fluorescência emitida.

À medida que se realiza o qPCR obtém-se um gráfico de amplificação, que é composto por duas fases, uma fase exponencial seguida por uma de estabilização, denominada plateau. A primeira corresponde à fase em que o DNA está a ser amplificado e, teoricamente, a duplicar após cada ciclo. À medida que a reação ocorre, os componentes vão-se tornando limitantes e atinge-se a fase de plateau, em que não é possível gerar mais produtos de PCR<sup>2</sup>.

O  $C_t$  (threshold cycle) corresponde ao ciclo em que a fluorescência dos produtos de PCR começa a ser detetada<sup>2</sup>. O valor  $C_t$  é então obtido através da interseção entre uma linha limite horizontal (threshold) e a curva de amplificação, correspondendo à quantidade de DNA presente na reação no início da amplificação. Quanto menor for o  $C_t$ , maior será a quantidade de DNA amplificado, logo maior a quantidade de DNA inicial, dado que foram necessários menos ciclos para se começar a detetar a fluorescência.

O método de qPCR apresenta vantagens em relação ao método tradicional de PCR, como a possibilidade de identificar os fragmentos amplificados durante o processo, sendo assim uma análise mais rápida e simplificada<sup>2</sup>. Permite também medir a quantidade de produto durante a fase exponencial, ao contrário do PCR tradicional que apenas permite medir a quantidade de produto durante a fase plateau, sendo que esta medição não indica claramente a quantidade inicial de material<sup>3</sup>. Por outro lado, o PCR requer uma análise após a sua realização, como a realização de eletroforese em gel de agarose, de modo a identificar o produto desejado. No caso do qPCR esta análise não é necessária. Para além disto o qPCR é realizado em sistema fechado e apenas num tubo, o que diminui a probabilidade de contaminação<sup>1,2</sup>.

Existem ainda algumas desvantagens associadas a este processo como o alto custo do equipamento e as elevadas exigências técnicas e científicas necessárias para o correto manuseamento e manutenção do mesmo<sup>4</sup>.

O PCR em tempo real pode ser utilizado para a quantificação de partículas virais de células infetadas<sup>5</sup>. A partir de um PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos do gene viral que irão garantir a amplificação exclusiva deste gene, é possível obter um gráfico de amplificação com várias curvas, em que a carga viral das amostras é conhecida, gerando então um valor de  $C_t$  para o qual a carga viral é conhecida, à exceção das amostras que se desejam quantificar, para as quais a carga viral é desconhecida. Sabendo que quanto maior for o  $C_t$ , menor é a concentração de DNA, é possível também perceber que quanto maior o  $C_t$ , menor será a concentração de partículas virais.

Esta técnica torna possível a obtenção da carga viral nas células infetadas pelo vírus em estudo<sup>5</sup>.

## Referências

1. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.* 2017;8(FEB):1-9. doi:10.3389/fmicb.2017.00108
2. BIO-RAD Laboratories. Applications Guide. 2006:1-99. doi:10.1016/j.mod.2004.07.009
3. MacDonald, H. and Wolfe, R. (2019). Single LabCE course: Real-Time PCR. Acedido em:22/03/2019, em: [https://www.labce.com/spg448465\\_advantages\\_of\\_real\\_time\\_pcr.aspx](https://www.labce.com/spg448465_advantages_of_real_time_pcr.aspx)
4. Oliveira TMS. PCR em tempo real : métodos e aplicações o júri. 2010:111.
5. Mackay, I. M.; Arden, K.E.; Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292-1305. doi:10.1093/nar/30.6.1292