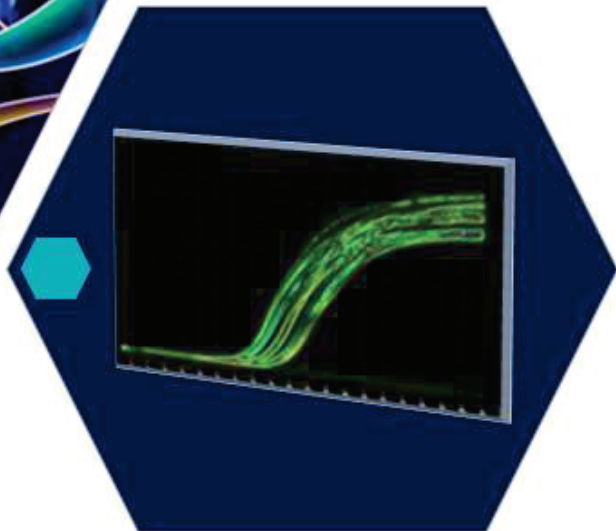
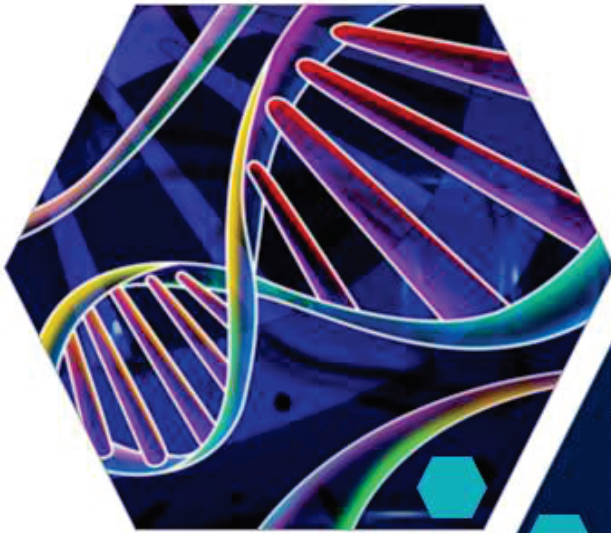


Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 278

Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos

*Carolina Vianna Morgante
Rosana Blawid*

Esta publicação está disponibilizada no endereço:

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros: Diana Signor Deon

Fernanda Muniz Bez Birolo

Francislene Angelotti

Gislene Feitosa Brito Gama

José Maria Pinto

Juliana Martins Ribeiro

Mizael Félix da Silva Neto

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Rafaela Priscila Antonio

Roseli Freire de Melo

Salette Alves de Moraes

Supervisor editorial: Sidinei Anuniação Silva

Revisor de texto: Gilberto de Souza Pires

Normalização bibliográfica: Sidinei Anuniação Silva

Capa: Carolina Vianna Morgante

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2016): Formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação

Embrapa Semiárido

Morgante, Carolina Vianna.

Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos / Carolina Vianna Morgante, Rosana Blawid. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

63 p. il. (Embrapa Semiárido. Documentos, 278).

ISSN 1808-9992.

1. Biologia molecular. 2. Genética vegetal. 3. Biotecnologia. 4. PCR. I. Morgante, Carolina Vianna. II. Blawid, Rosana. III. Título. IV. Série.

CDD 571.6

© Embrapa 2016

Autores

Carolina Vianna Morgante

Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora na Embrapa Semiárido. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE

Rosana Blawid

Engenheira-agrônoma, PhD em Ciências da Horticultura, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, Brasília, DF

Apresentação

Investir em pesquisas para o melhoramento de plantas é essencial, tendo-se em vista que, com as mudanças climáticas, um dos principais desafios é a necessidade de produzir mais e melhor, usando-se menos insumos. Assim, é urgente aprimorar as técnicas de melhoramento para conferir alta produtividade e precocidade às culturas agrícolas.

Atualmente, muitos estudos vêm sendo conduzidos para dotar plantas de resistência a herbicidas, pragas e doenças e, neste contexto, técnicas como a PCR são fundamentais para o conhecimento das culturas agrícolas e o mapeamento das características desejáveis das plantas para programas de melhoramento.

Técnicas como a PCR são de fundamental importância na superação de desafios relacionados à produção de alimentos para atender a uma demanda crescente. Tal produção deve ter como base a agricultura sustentável, causando menor impacto ao homem e ao meio ambiente.

Neste trabalho são apresentados os conceitos fundamentais da análise da expressão gênica pela técnica de PCR e reúne informações importantes para aqueles que se dedicam ao estudo da genética vegetal.

Pedro Carlos Gama da Silva
Chefe-Geral da Embrapa Semiárido

Sumário

Introdução	9
Termos básicos utilizados na qPCR	13
Sistemas para a detecção da fluorescência	15
Etapas anteriores à reação de qPCR	20
Parâmetros para a padronização da qPCR	30
Métodos de quantificação gênica	42
Referências	54
Glossário	58

Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos

Carolina Vianna Morgante

Rosana Blawid

Introdução

Os crescentes estudos de análise do transcriptoma e de expressão gênica, em diversas espécies sob condições experimentais específicas, vêm propiciando o acúmulo de informações que permitem o melhor entendimento de processos celulares e fisiológicos. Técnicas como a construção de bibliotecas de cDNA, micro ou macroarranjos de DNA, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (VELCULESCU et al., 1995) e o RNA-Seq (WANG et al., 2009), constituem fonte primária para análises da regulação transcricional dos genomas.

Os métodos acima mencionados requerem uma etapa adicional de refinamento e validação para a confirmação ou refutação dos resultados, uma vez que envolvem técnicas de análise passíveis de erro. Esses podem ocasionar enviesamentos nos resultados finais, gerando falsos positivos ou falsos negativos. A validação dos resultados pode ser realizada por meio de: (a) *Northern Blotting* (ALWINE et al., 1977), técnica laboriosa que demanda até 10 μg de RNA total (KEVIL et al., 1997), quantidade elevada e que pode ser um fator limitante; (b) análise semi-quantitativa clássica da expressão gênica, pela da quantificação do mRNA por meio da transcrição reversa (CHELLY et al., 1998); (c) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (qPCR), atualmente, a técnica prioritariamente empregada para tal finalidade, por causa da sua simplicidade, alta sensibilidade, praticidade e exatidão (UDVARDI et al., 2008).

Vale enfatizar que a comunidade científica procura uniformizar o uso da abreviatura qPCR para a técnica de PCR quantitativa em tempo real, ao invés de “RT-PCR” (*Real Time PCR*). Essa última pode causar confusão com a mesma abreviatura utilizada para designar a técnica de PCR que tem como alvo o cDNA (DNA complementar ao RNA mensageiro), produto da transcrição reversa (RT-PCR) (BUSTIN et al., 2009). Os termos RT-qPCR ou qRT-PCR também são frequentemente utilizados para referência à PCR quantitativa em tempo real, em que o alvo é o cDNA, apesar de a sigla RT-qPCR ser a recomendada (BUSTIN et al., 2009). Nesta técnica, a expressão gênica é medida pelo o acúmulo do RNA mensageiro.

A qPCR combina a amplificação exponencial de um fragmento de DNA alvo específico com métodos de quantificação, por meio de medidas da fluorescência associada à síntese de um amplicon, ao longo dos ciclos da PCR. Essa combinação faz com que a qPCR seja um método sensível, robusto e com boa reprodutibilidade para medidas quantitativas. Esta técnica funciona essencialmente da mesma maneira que a PCR convencional, com ciclos subsequentes nos quais ocorrem: (1) a desnaturação do DNA em fitas simples por aquecimento a 90-95 °C; (2) o anelamento de iniciadores (*primers* ou oligonucleotídeos) a sequências complementares específicas nas fitas simples de DNA e; (3) a extensão de novas fitas complementares, mediada por uma enzima DNA polimerase termoestável, resultando em um aumento exponencial do número de amplicons ao longo dos ciclos da reação. No entanto, na qPCR esse aumento é registrado em tempo real ao longo da fase exponencial por meio da detecção do sinal de uma fluorescência repórter.

A intensidade deste sinal é diretamente proporcional à quantidade de amplicons acumulados ao longo dos ciclos, que varia em função da quantidade inicial do DNA alvo: quanto mais moléculas de DNA alvo inicial, um maior número de moléculas será amplificado e mais intenso será o sinal da fluorescência ao longo dos ciclos da reação. Já na PCR convencional, a quantidade de amplicons gerados é medida apenas ao final da reação (análise do tipo *endpoint*), após a fase exponencial, quando já não há mais amplificação e a reação atinge um platô, possivelmente por causa da ligação da DNA polimerase a seus produtos de amplificação (KAINZ, 2000) (Figura 1). Na qPCR, ao término da reação, os resultados já podem ser visualizados e analisados, sem a necessidade de um processamento pós-reação das amostras, como na PCR convencional, para a qual é necessário proceder uma eletroforese em gel para a visualização dos resultados da amplificação.

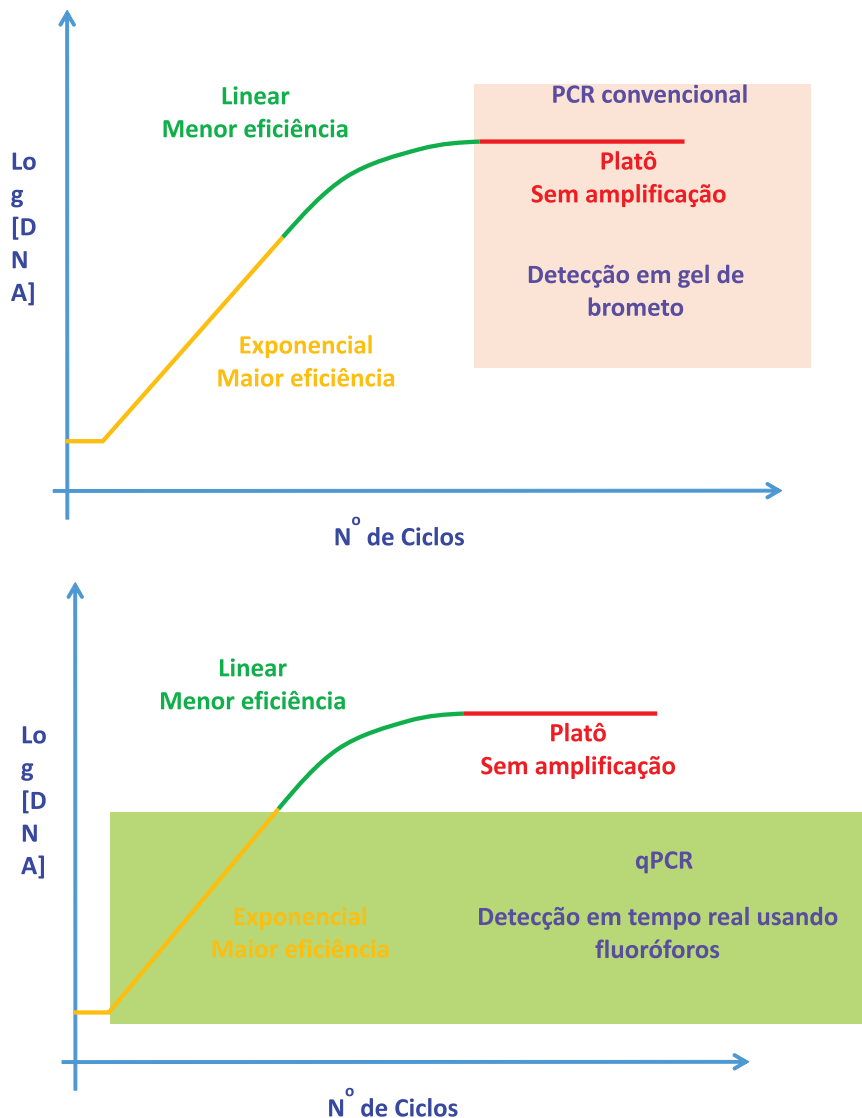


Figura 1. Fases da PCR: exponencial, em que a quantidade de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo; linear, em que a eficiência de amplificação é reduzida; platô, fase final em que não há mais amplificação. Na PCR convencional (A), a detecção da quantidade de moléculas é realizada ao final da reação, enquanto que na qPCR (B), a detecção é realizada em tempo real, a cada ciclo da reação, na fase exponencial.

Higuchi et al. (1992, 1993) foram os pioneiros no desenvolvimento de um sistema automatizado para a amplificação e detecção simultâneas de uma sequência específica de DNA, técnica inicialmente denominada de PCR cinética. Os autores adicionaram brometo de etídeo, agente intercalante de ácidos nucleicos, à reação e usaram um sistema acoplado de câmeras para medir a fluorescência deste corante, que aumentava na presença de DNA de dupla fita. A cada ciclo da PCR uma imagem era gerada e, ao final da reação, as imagens eram analisadas por um *software* que media a intensidade luminosa média emitida por cada tubo e gerava os gráficos de amplificação.

Ao longo do tempo, os sistemas de detecção evoluíram, tornando-se ainda mais automatizados, e novos fluoróforos foram desenvolvidos para a detecção do DNA amplificado, evitando, desta forma, a interferência do corante na eficiência de amplificação e o uso de reagentes tóxicos. Uma variação da técnica é a análise em multiplex, em que múltiplos alvos são amplificados em uma única reação de PCR, utilizando-se diferentes fluoróforos conectados a sondas para a detecção específica de cada amplicon, representando uma economia de reagentes e tempo. Neste caso, os mesmos cuidados para uma reação convencional devem ser seguidos, observando-se, sobretudo, a especificidade dos iniciadores e sondas, além da formação de dímeros entre eles.

Adicionalmente, na qPCR em multiplex, os fluoróforos devem ser compatíveis. Quanto ao tempo de análise, atualmente estão disponíveis equipamentos para o preparo das reações e medição da fluorescência que chegam a superar a capacidade de processamento simultâneo de 384 amostras, o que, dependendo do desenho experimental, permite a análise conjunta de dezenas de genes em diferentes tratamentos. Isso traz ganhos significativos, tanto para a facilidade de geração de resultados, diminuição de custos por reação, como também para a robustez das análises estatísticas. Essa ampliação na capacidade de gerar resultados pela qPCR facilita, por exemplo, a análise da expressão de genes relacionados que fazem parte de uma mesma via metabólica ou então a análise da expressão de membros de uma mesma família gênica, como por exemplo em análises de fatores de transcrição (CZECHOWSKI et al., 2004).

Apesar de ser quantitativa, a técnica de qPCR pode ser usada para análises qualitativas, em que o objetivo é verificar a presença ou ausência de uma sequência específica. É o caso de seu uso para a discriminação entre alelos selvagens e mutantes, entre diferentes SNPs

(*Single Nucleotide Polymorphisms* ou Polimorfismos de Base Única) ou entre múltiplas formas de *splicing*. Nestes casos, diferentes fluoróforos são associados a cada alelo/forma e o sinal obtido ao final da reação pode ser correlacionado a sua presença/ausência.

Termos básicos utilizados na qPCR

A seguir, estão listados e esquematizados (Figura 2) conceitos essenciais para o entendimento da técnica de qPCR.

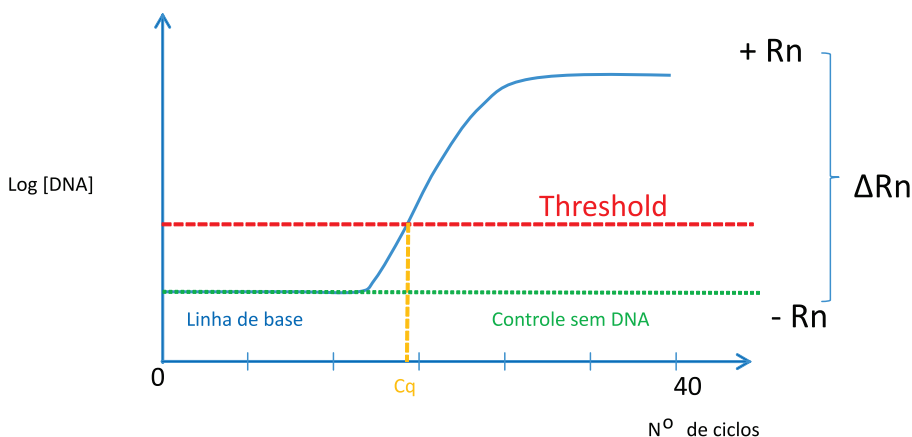


Figura 2. Curva de amplificação da qPCR e conceitos.

Linha de base (ou *baseline*): refere-se à fluorescência de fundo ou ruído. É detectada nos primeiros ciclos da reação, nos quais há pouca variação do sinal. Esse valor deve ser desconsiderado na análise. Somente valores de quantificação da fluorescência acima da linha de base são considerados como referentes à amplificação da molécula alvo. A linha de base pode ser calculada automaticamente pelo programa de análise ou determinada manualmente pelo usuário.

Fluorescência repórter: é aquela emitida pelo fluoróforo escolhido para detecção do aumento da quantidade de moléculas a cada ciclo. Exemplo: fluorescência emitida pelo SYBR™ *Green*.

Fluorescência passiva: é aquela emitida por um fluoróforo de referência, adicionado ao *mix* da reação de qPCR. Geralmente, utiliza-se o ROX™,

porém, deve-se ter atenção às especificações do equipamento que, excepcionalmente, pode exigir o uso de um outro tipo de fluorescência passiva. A intensidade do sinal da fluorescência passiva não deve variar ao longo das fases da reação e entre amostras. A fluorescência passiva é usada para a normalização da fluorescência repórter para a correção de flutuações no sinal da fluorescência causados por erros técnicos, como alteração do volume da reação por erros de pipetagem, ou por ruídos na detecção da fluorescência pelo equipamento.

Rn: é o valor da fluorescência repórter (R) normalizada (n) pelo corante da fluorescência passiva. Calcula-se como a razão entre a intensidade de emissão da fluorescência repórter e a intensidade de emissão da fluorescência passiva.

Rn + : é o valor de Rn da reação que contém todos os componentes, inclusive a molécula alvo.

Rn-: é o valor de Rn de uma amostra não reagente. Pode ser obtido a partir de um controle negativo, sem molécula alvo, e, portanto, sem amplificação de DNA, ou nos ciclos iniciais da reação, onde o aumento da fluorescência decorrente da amplificação do DNA ainda não é detectável.

ΔRn : é a magnitude do sinal da fluorescência gerado na qPCR. É calculado pela diferença entre os valores de Rn + e de Rn-. Esse é o valor considerado para as quantificações.

Threshold: linha que intercepta o gráfico de amplificação acima da linha de base (ou *baseline*), na fase exponencial da reação. Ela pode ser ajustada manualmente, mas de modo geral é calculada de forma automática pelo equipamento de qPCR, levando em consideração valores de Rn dos ciclos iniciais da reação.

Cq: ciclo de quantificação. Refere-se ao número do ciclo da qPCR no qual o sinal da fluorescência gerada pela amplificação da molécula alvo cruza a linha de *threshold* na fase de amplificação exponencial da reação. É também referido com Ct (ciclo do *threshold*).

Sistemas para a detecção da fluorescência

Para a análise da expressão gênica por qPCR, os sistemas de detecção da fluorescência associada ao amplicon alvo mais utilizados são: 1) o que emprega fluoróforo intercalante, como SYBRTM *Green*, ou similar, como fluorescência repórter e 2) o método por sonda de hidrólise, também conhecido como *TaqMan*[®] ou ensaio para 5' nuclease fluorescente.

O sistema SYBRTM *Green* (Figura 3) baseia-se na capacidade deste corante de se ligar a todas as moléculas de DNA de fita dupla, intercalando-se a bases adjacentes. Uma vez ligado ao DNA de fita dupla, o reagente emite um sinal fluorescente após excitação luminosa. Este método é o menos oneroso, porém, exige o uso de iniciadores altamente específicos para que os produtos de uma amplificação inespecífica não sejam detectados. Isso causaria uma superestimação da quantidade do amplicon, uma vez que a fluorescência do produto inespecífico também estaria sendo detectada e contabilizada no resultado final. Para garantir a especificidade da reação, há também a necessidade de otimização da concentração dos iniciadores, que não devem formar dímeros entre si. Ao final da reação, deve-se obter uma curva de dissociação para a confirmação de que o sinal da fluorescência detectado provém somente do amplicon alvo. Para a análise da expressão gênica por qPCR em esquema *multiplex*, o sistema SYBRTM *Green* não é comumente empregado, pois exige uma etapa criteriosa de padronização, uma vez que os diferentes amplicons devem apresentar temperaturas de dissociação diferentes para que possam ser distinguidos. Para experimentos no esquema multiplex, utiliza-se com frequência o método de sonda de hidrólise.

No método de sonda de hidrólise, utiliza-se uma sonda que se hibridiza especificamente a uma região interna do amplicon. Esta sonda possui, em sua extremidade 5', um fluoróforo repórter e, na 3', uma molécula silenciadora (ou *quencher*). Quando próximos, a molécula silenciadora inibe a emissão de fluorescência pelo repórter por um processo denominado de transferência de energia por ressonância de fluorescência (ou FRET, do inglês "*Fluorescence Resonance Energy Transfer*").

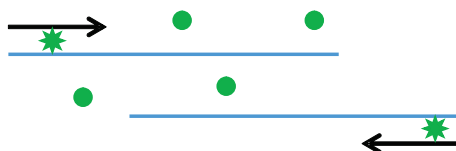
1 - Quando excitado, o SYBR Green fluoresce se ligado ao DNA fita dupla.



2 - Durante a desnaturação do DNA, o SYBR Green é liberado e o sinal da fluorescência é reduzido.



3 - O anelamento dos iniciadores começa a síntese de uma nova fita de DNA e a fluorescência do SYBR Green é detectada.



4 - Ao final do ciclo de amplificação, o SYBR Green liga-se ao DNA dupla fita e um aumento no sinal da fluorescência é detectado.

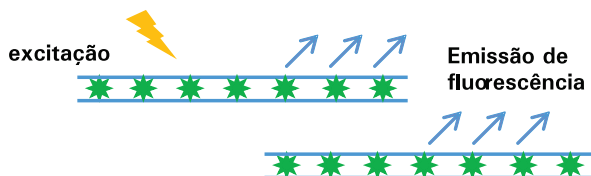
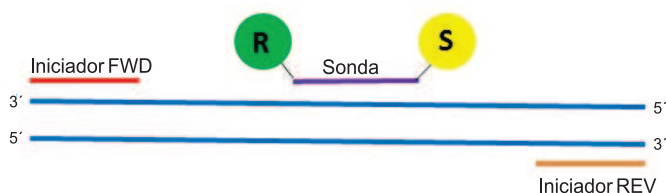


Figura 3. Princípio da técnica que utiliza o SYBR Green I como um sistema de detecção de fluorescência na técnica de qPCR.

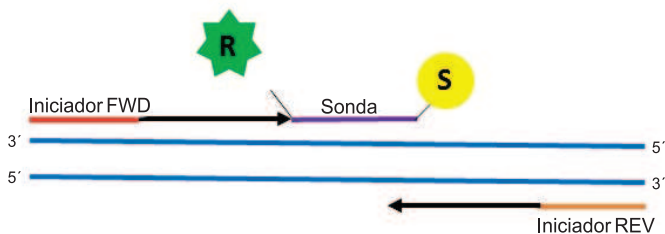
Durante a etapa de anelamento da PCR, iniciadores e sonda ligam-se a sequências complementares. Na etapa seguinte, de extensão, a enzima *Taq* DNA polimerase, com atividade exonucleásica 5'-3', promove a clivagem do fluoróforo na região 5' da sonda. Tal ação faz com que um sinal de fluorescência seja liberado e detectado, porque o fluoróforo não está mais próximo à molécula silenciadora (Figura 4). A amplificação

da região alvo é medida pela liberação e intensidade da fluorescência repórter na fase de extensão de cada ciclo. A especificidade da reação é também conferida pela sonda, a qual assegura que a fluorescência provém do acúmulo de um único amplicon. Este sistema permite a realização de um protocolo multiplex, em que diferentes pares de iniciadores, com respectivas sondas marcadas com diferentes fluoróforos, podem ser usados, possibilitando que múltiplos amplicons sejam gerados e quantificados simultaneamente em uma só reação. Os

1- Os iniciadores forward (FWD) e reverse (REV) e a sonda anelam-se a regiões complementares do DNA alvo. Um fluoróforo repórter (R) e uma molécula silenciadora (S) encontram-se ligadas às extremidades 5' e 3' da sonda, respectivamente. Quando próximos, a molécula silenciadora inibe a emissão do sinal do fluoróforo repórter.



2- Na fase de extinção, a DNA polimerase cliva o fluoróforo repórter da sonda



3- Uma vez liberado da sonda e distante da molécula silenciadora, o repórter emite sua fluorescência

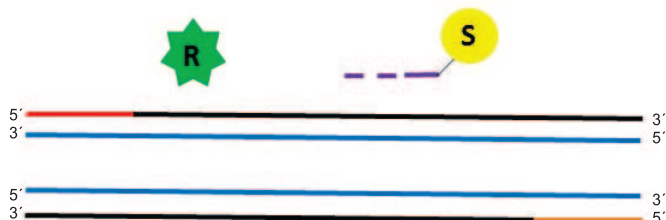


Figura 4. Princípio da técnica que utiliza sonda de hidrólise (TaqMan) como um sistema de detecção de fluorescência na técnica de qPCR.

equipamentos de qPCR disponíveis têm múltiplos canais de detecção, permitindo o trabalho com uma diversidade de fluoróforos. No entanto, é importante que as fluorescências escolhidas para a detecção nos experimentos sejam compatíveis com os limites de excitação e detecção do equipamento. Além disso, ao se utilizar o sistema por sonda de hidrólise, deve-se atentar à compatibilidade de fluorescência entre o fluoróforo repórter e a molécula silenciadora. Para melhor desempenho, o valor de absorvância da fluorescência da molécula silenciadora deve ser o mais próximo possível do espectro de emissão do fluoróforo alvo. Por exemplo, o fluoróforo HEXTM possui máxima emissão de fluorescência a 555 nm. Pode ser usado em combinação com TAMRA, como molécula silenciadora, a qual possui absorvância máxima de luz a 555 nm.

Ao se utilizar o sistema de sonda de hidrólise em multiplex, deve-se evitar a sobreposição do sinal de emissão do sinal das fluorescências repórteres escolhidas para a análise. Recomenda-se a utilização de fluoróforos com a máxima distância no espectro de emissão de fluorescência, no intuito de se evitar o sinal cruzado entre os genes em análise. Na Figura 5, os principais fluoróforos utilizados na qPCR estão organizados de acordo com os valores de comprimento de excitação e emissão do sinal da fluorescência.

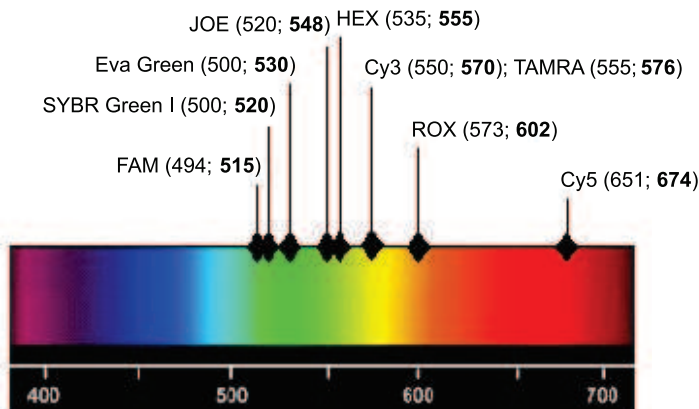


Figura 5. Principais fluoróforos usados na qPCR, esquematizados em função do comprimento de onda de máxima excitação e emissão (em negrito), respectivamente.

A opção por sistemas baseados em sondas exige uma reação controle adicional denominada NAC (*No Amplification Control*). Nesta, são adicionados todos os seus componentes habituais, exceto a DNA polimerase. A detecção de sinal é um indicativo de autofluorescência da sonda por causa da sua degradação.

Outro controle recomendado é o IAC (*Internal Amplification Control*) e tem como objetivo a exclusão de resultados falso-negativos ocasionados por substâncias presentes na reação que possam inibir a amplificação da molécula alvo ou por erros no preparo da reação. Neste caso, além dos componentes usuais da qPCR (tampão, dNTP, DNA polimerase e seu cofator, iniciadores e molécula alvo), são adicionados à reação um DNA controle e seus respectivos iniciadores. Desta forma, ocorrerá uma coamplificação das sequências alvo e controle. A não detecção do amplicon controle é um indicativo da ocorrência de problemas na reação (HOORFAR et al., 2004; D'HAENE; HELLEMANS, 2010).

A escolha do sistema para a detecção da fluorescência dependerá das características de cada experimento e também da quantidade de recursos financeiros disponível, já que o sistema por sonda de hidrólise é mais oneroso. Normalmente, quando há a necessidade de se quantificar a expressão de diversos genes, o sistema SYBR™ *Green* é o mais utilizado. O sistema de sonda de hidrólise é muito utilizado em análises clínicas, em que resultados muito precisos são fundamentais. Na Tabela 1, está esquematizada uma breve comparação entre os sistemas de sonda de hidrólise e SYBR™ *Green*.

Tabela 1. Características dos sistemas por sonda de hidrólise e SYBR™ *Green* de detecção de fluorescência.

Características	Sonda de hidrólise	SYBR™ <i>Green</i>
Química	Sonda fluorogênica para detectar produtos de PCR específicos	Fluoróforo que se liga especificamente à fita dupla de DNA
Especificidade	Detecta amplicons específicos	Detecta todas as moléculas de DNA de fita dupla, inclusive produtos inespecíficos da reação
Vantagens	Reação específica, redução de <i>backgrounds</i> e falso positivos. Permite multiplex e não necessita de curva de dissociação	Não há necessidade de sonda (redução de gastos). É universal e sensível em sua detecção
Desvantagens	Uma sonda deve ser sintetizada para cada amplicon, especificamente (aumenta gastos)	Pode gerar sinais falso-positivos e exige realização da curva de dissociação

Etapas anteriores à reação de qPCR

Delineamento experimental

A principal etapa é a do delineamento experimental. Os objetivos devem ser definidos com clareza para assegurar que, ao final do experimento, as hipóteses sejam esclarecidas com os dados gerados. Os ensaios devem ser bem delineados, levando-se em consideração controles e repetições, para que os resultados possam ser validados por métodos estatísticos. A escolha dos genes a terem sua expressão quantificada pode ser baseada em dados da literatura, informações sobre vias metabólicas, dados gerados por bibliotecas de cDNA ou microarranjo, por exemplo.

Para que a análise estatística seja realizada com precisão, é necessário realizar replicatas. Estas podem ser de dois tipos:

- Replicata técnica: é a repetição da reação de qPCR, mantendo-se as mesmas condições e amostra a ser analisada. Permite a detecção de erros técnicos, como pipetagem, contaminações, problemas de leitura do aparelho etc. É recomendada em número ímpar, geralmente em triplicata.
- Replicata biológica: é a repetição do experimento biológico. Permite a identificação de variações individuais, não decorrente do tratamento aplicado. Pode ser realizada em duplicata ou mais repetições.

Qualidade do ácido nucleico

A qualidade da molécula alvo também é um ponto importante e sua quantidade inicial deve ser a mesma em todas as reações. A obtenção de cDNA de boa qualidade é fundamental para o êxito nas reações. A síntese de cDNA deve ser feita a partir de RNA de alta qualidade, sem a presença de inibidores da reação da transcriptase reversa, como dodecil sulfato de sódio (SDS), EDTA, sais de guanidina, formamida, pirofosfato de sódio e espermidina. A quantificação do RNA deve ser bem precisa. Um RNA de boa pureza deve ter a razão entre a medida da absorbância a 260 e 280 nm (A260/A280) entre 1,8 e 2,0 (GREEN; SAMBROOK, 2012). O método mencionado acima não dispensa a necessidade de verificação da qualidade do RNA por eletroforese em gel de agarose para que possíveis degradações possam ser identificadas. O RNA utilizado deve estar livre de contaminações com DNA genômico

e o tratamento do material com DNase livre de RNase é imprescindível para que não haja risco de amplificação de DNA genômico na reação de RT-qPCR. A contaminação com DNA genômico nas amostras de RNA pode ser identificada, por exemplo, a partir de uma amostra controle em que uma alíquota da preparação de RNA total é pipetada como molécula alvo na qPCR. Dessa forma, a detecção de amplificação indica contaminação da amostra com DNA genômico. Outra forma de se detectar uma contaminação com DNA genômico é utilizar iniciadores que flanqueiam uma região intrônica, a qual estará presente no DNA genômico, mas, não no cDNA. Sendo assim, caso haja presença de tal contaminante, serão gerados amplicons com tamanhos distintos, a depender da molécula alvo utilizada na amplificação. A diferença entre os amplicons deve ser distinguível por meio das curvas de dissociação. No caso de sequências não intrônicas, como a de bactérias, vírus e certas sequências de plantas e mitocôndrias, devem-se utilizar métodos eficientes para isolamento de RNA e eliminação do DNA genômico contaminante.

Síntese de cDNA

A análise da expressão gênica pela técnica de RT-qPCR baseia-se na medida indireta da quantidade de RNA mensageiro (mRNA) pela quantificação do resultado de uma PCR usando cDNA como alvo. A primeira fita de cDNA é sintetizada a partir de uma preparação de RNA total, ou somente de mRNA, usando a enzima transcriptase reversa. Nesta reação, há a opção de se utilizar três tipos diferentes de iniciadores (Figura 6; Tabela 2): (1) Oligo (dT), complementar à cauda poli-A do mRNA em sua região 3'; (2) Iniciadores randômicos, que constituem uma mistura de segmentos de DNA, geralmente hexâmeros, que representam todas as combinações de bases ($4^6 = 4.096$ diferentes combinações na mistura) e, por serem complementares a diferentes regiões da molécula, permitem múltiplos sítios de início da síntese ao longo de um mesmo mRNA e (3) Iniciadores específicos para amplificação de uma sequência alvo de interesse.

A desvantagem do uso de iniciadores randômicos é que, caso sejam usadas amostras de RNA total, a grande parte do cDNA sintetizado a partir do RNA total será ribossomal, o que pode ser um problema se o mRNA de interesse estiver presente em baixos níveis (BUSTIN et al., 2005). Além disso, por permitirem diversos sítios de início da síntese, podem provocar uma super-estimação do número de cópias de mRNA

(ZHANG; BYRNE, 1999). A principal vantagem desse método é que seu emprego aumenta a probabilidade de que as extremidades 5' dos transcritos sejam convertidas em cDNA. Por meio do método oligo-dT, a transcrição reversa de mRNAs longos, geralmente, não alcança essa extremidade. De outra forma, é válido salientar que iniciadores randômicos possuem ampla aplicação em organismos cujos mRNAs não possuem cauda poli-A, a exemplo de bactérias, dentre outros.

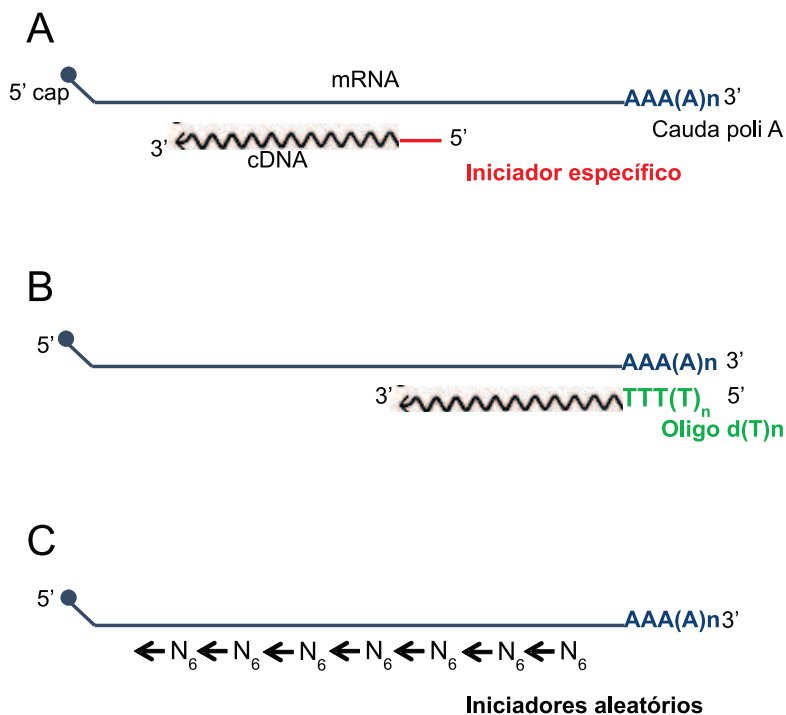


Figura 6. Síntese de cDNA a partir de mRNA usando (A) Iniciadores específicos; (B) oligo d(T)_n; (C) Iniciadores randômicos.

Tabela 2. Comparação entre os tipos de iniciadores para síntese de cDNA.

Tipo de iniciador	Vantagens	Desvantagens
Iniciador com sequência específica	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidade para a transcrição reversa apenas da sequência alvo; - Frequentemente usado na reação do tipo one-step - aumenta a probabilidade de que as extremidades 5' dos transcritos sejam convertidas em cDNA 	<ul style="list-style-type: none"> - A transcrição reversa deve ser realizada para cada gene a ser analisado, o que onera a metodologia e pode ser limitante nos casos de baixa eficiência no processo de extração de ácido nucleico ou de restrição na disponibilidade de tecido ou célula.
Oligo d(T) _n	<ul style="list-style-type: none"> - Usado para a transcrição reversa de todos os mRNA eucarióticos e de retrovírus com cauda poli-A - Permite que diferentes genes alvos sejam analisados a partir de um mesmo pool de cDNA 	<ul style="list-style-type: none"> - Pode apresentar limitações na transcrição reversa de mRNA longos ou que contenham <i>hairpin loops</i>; - Não deve ser utilizado para a transcrição reversa de RNAs não poliadenilados, como o de bactérias e RNA ribossomal. - Não deve ser usado em reações do tipo one-step.
Iniciadores aleatórios	<ul style="list-style-type: none"> - Pode ser usado para a transcrição reversa de RNAs não poliadenilados; - Permite que diferentes genes alvos sejam analisados a partir de um mesmo pool de cDNA - Boa alternativa para a transcrição reversa de RNA longos ou com tendência a formar <i>hairpin loops</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Pode provocar uma superestimação do número de cópias de mRNA; - Pode limitar a transcrição reversa de mRNAs menos abundantes, uma vez que há também transcrição de rRNA, o mais frequente; - Não devem ser usados em reações do tipo one-step.

O uso de oligo (dT)_n promove maior especificidade a mRNAs que os iniciadores randômicos e é o melhor método para uma representação mais fidedigna do *pool* de mRNA. Ponto negativo está associado à necessidade de moléculas íntegras de mRNA, o que pode causar limitações dependendo da origem e condição do material biológico inicial. Outra desvantagem é que a síntese de cDNA pode não abranger a região 5' do mRNA, o que ocorre quando há formação de estruturas secundárias ao longo da molécula ou quando as sequências são longas, principalmente na região 3' não traduzida da molécula. Um aperfeiçoamento da técnica é a utilização de oligo (dT)_n ancorado, o qual consiste em uma mistura de, geralmente, 12 iniciadores, cada um com aproximadamente 20 nucleotídeos de timina, seguidos por dois nucleotídeos adicionais representados por VN, onde V pode ser A, C ou G (adenina, citosina ou guanina) e N qualquer um dos quatro nucleotídeos (A, C, G ou T). Esta modificação permite que o anelamento dos iniciadores ocorra apenas na região 5' da cauda poli (A) do RNA mensageiro e não internamente na sequência, evitando, desta forma, a geração de cDNAs truncados (NAM et al., 2002).

Pode também ser utilizada uma combinação de oligo d(T)_n e iniciadores randômicos em uma mesma reação, mas isso necessita de padronização prévia das concentrações de cada um.

A utilização de iniciadores específicos permite com que apenas o cDNA da região alvo seja sintetizado, não sendo gerado, neste caso, um conjunto representativo dos mRNAs presentes no momento da análise. Caso o objetivo seja a análise da expressão de mais de um gene, há necessidade de que as reações para a síntese de cDNA sejam feitas separadamente para cada um, o que aumenta os gastos e a quantidade de RNA necessária para as análises (BUSTIN et al., 2005). As principais considerações para cada tipo de iniciador utilizado estão resumidas na Tabela 2.

Para a síntese da primeira fita de cDNA é utilizada uma enzima de origem retroviral, a transcriptase reversa, que possui atividades DNA polimerase dependente de RNA (é capaz de sintetizar DNA utilizando uma molécula de RNA como molde) e RNase H. Esta última atividade tem, originalmente, a função de degradar o RNA viral após a síntese da fita de DNA complementar por meio da hidrólise das ligações fosfodiésteres do RNA de uma molécula híbrida DNA:RNA. No entanto, em uma reação de síntese de cDNA *in vitro* para a quantificação gênica, essa atividade de degradação do RNA não é desejada, uma vez que pode diminuir a produção e a extensão dos cDNAs. Alternativas para contornar esse problema são representadas pela utilização de

enzimas geneticamente modificadas, de modo a perderam a atividade RNase H, ou a adição de uma enzima inibidora da atividade RNase H à reação de síntese de cDNA. Para evitar a ação de RNases, é também recomendada a adição de DTT (ditiotreitól), agente redutor que protege pontes dissulfeto da oxidação.

Os dois principais tipos de transcriptase reversa disponíveis variam de acordo com sua origem viral: M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) e AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*). A enzima M-MLV é normalmente utilizada para a transcrição reversa de RNAs longos, superiores a 5 kb, por causa da sua menor atividade RNase H em relação à AMV (PROMEGA, 2013). Por outro lado, a enzima AMV apresenta melhor termoestabilidade quando comparada à M-MLV convencional (YASUKAWA et al., 2008). Assim, a reação com a AMV pode ser realizada em temperaturas mais elevadas, o que pode ser uma boa alternativa para evitar a formação de estruturas secundárias na molécula de mRNA e aumentar a eficiência da reação. Atualmente existem enzimas M-MLV modificadas por mutagênese que apresentam termoestabilidade aumentada, sendo possível realizar a reação de transcrição reversa a até 55°C (BIOMERIEUS, 2009).

A enzima AMV é mais efetiva quando comparada à M-MLV convencional, sendo que quantidades menores da primeira enzima são necessárias para a síntese da mesma quantidade de cDNA: 25 U da enzima AMV correspondem, em atividade, a 200 U da M-MLV convencional (PROMEGA, 2013), no entanto, em termos de custo por reação, as duas enzimas são equivalentes. Ståhlberg et al. (2004), comparando a eficiência de oito transcriptases reversas comerciais, incluindo enzimas AMV e M-MLV, verificaram que a eficiência da reação de transcrição reversa pode variar em até 100 vezes, a depender da enzima utilizada, e que essa variação é gene dependente. As maiores variações foram observadas na análise de genes com nível de expressão intermediário a alto, como para os genes da beta actina e da gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase. Assim, os referidos autores sugerem que para que os resultados de qPCR (técnica que executa passos de transcrição reversa, previamente) apresentem poder de comparação entre laboratórios, o mesmo tipo de enzima transcriptase reversa e iniciadores devem ser empregados.

Desta forma, é importante salientar que as mesmas condições devem ser mantidas em todas as reações de um mesmo experimento, pois a quantidade inicial da molécula alvo, o tipo e concentração de iniciadores, o tipo e concentração da enzima utilizada e a temperatura

em que a reação é realizada são variáveis que interferem diretamente na eficiência da síntese de cDNA. Deprez et al. (2002) demonstraram que fatores como a concentração de $MgCl_2$ no tampão e a presença de DTT alteram a eficiência da reação de cDNA e, no caso do DTT, pode influenciar na ligação do corante SYBRTM Green ao alvo na reação de qPCR. É preciso minimizar as variações decorrentes da técnica para registrar com mais precisão a real variação entre as amostras.

Desenho e especificidade de iniciadores e sondas

Para a definição da sequência dos pares de iniciadores e sondas a serem utilizados na qPCR, recomenda-se o uso de programas especializados para este fim, como Primer3 Plus (UNTERGASSER et al., 2012), QuantPrime (ARVIDSSON et al., 2008), PrimerExpress (Life Technologies), entre outros, a maioria disponível gratuitamente. Muitos destes programas possuem a opção dos parâmetros para qPCR já pré-estabelecidos. Os iniciadores devem ter tamanho entre 20 e 30 nucleotídeos, conter cerca de 50% de conteúdo de GC e a temperatura de dissociação (T_m , *Temperature of Melting* ou temperatura de dissociação) deve estar entre 58 e 60°C. A diferença entre a temperatura de anelamento dos iniciadores *reverse* e *forward* deve ser de, no máximo, 1 °C (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Caso seja utilizada uma sonda, esta deve apresentar T_m aproximadamente 10 °C superior à T_m dos iniciadores. O amplicon deve ter um tamanho ideal entre 80 e 120 pares de bases pois, quanto menor o amplicon, maior será a eficiência da PCR.

A sonda deve ter o tamanho ideal de 20 nucleotídeos, porém, pode variar entre 18 e 30 nucleotídeos. Contudo, é possível o uso de sondas de tamanhos maiores que 30 nucleotídeos. Recomenda-se, no entanto, que a molécula silenciadora esteja posicionada mais internamente, entre 18 e 25 nucleotídeos da região 5', e acoplada a uma timina. O conteúdo de GC da sonda deve conter idealmente concentrações entre 40 a 60%. A sonda deve ser desenhada de maneira que fique o mais próximo dos iniciadores e sem sobreposição. Regras de complementariedade devem ser observadas, evitando, assim, sequências repetitivas do mesmo nucleotídeo dentro da sonda, especialmente de guanosina trifosfato na região 5' terminal, que pode interferir com a eficiência de vários fluoróforos, incluindo o FAM (qPCR Guide, Eurogentec). Sondas que serão utilizadas em análises de multiplex ou em genotipagem devem ter o polimorfismo localizado na região central da sonda.

Além disso, é importante não somente evitar a falta de complementaridade (*mismatches*) entre os iniciadores ou sonda e o gene-alvo, como também evitar sequências repetidas de guanina e citosina, especialmente na região 3' do iniciador. A formação de estrutura em grampo (*hairpins*), por causa da complementaridade entre bases do iniciador ou sonda, e a formação de dímeros, em função da complementação entre os iniciadores usados na reação, deve ser evitada. Sendo assim, deve-se ter atenção para que os iniciadores não contenham regiões complementares, principalmente de dois ou mais pares de bases na sua região terminal 3', sobretudo, em reações no sistema multiplex. Além disso, uma análise criteriosa deve ser realizada para a identificação de formação de dímeros entre os iniciadores, geralmente realizada pelos programas acima citados. Informações mais detalhadas sobre o desenho de iniciadores e sondas para uso em qPCR podem ser obtidas em Rodríguez et al. (2015).

Por último, recomenda-se checar os iniciadores quanto a sua especificidade, isto é, se o anelamento ocorre especificamente em uma única região do genoma. Tal etapa tem o objetivo de evitar a amplificação de mais de um loco. Para este fim, pode-se utilizar o programa Primer-BLAST (YE et al., 2012) no banco de sequências da espécie em estudo. Dificuldades para tal serão encontradas em espécies com pouca informação genômica disponível.

Atenção especial deve ser tomada quando se trabalha com famílias multigênicas, nas quais a sequência de nucleotídeos de seus membros pode ser bastante similar, o que dificulta a amplificação específica de somente um dos transcritos. Recomenda-se, caso possível, alinhar entre si as sequências de todos os transcritos membros da família gênica, procurando desenhar os iniciadores em regiões com maior divergência. Neste caso, para aumentar a especificidade dos iniciadores, pode-se posicionar essas regiões de divergência (*mismatches*) na região 3' do iniciador. Caso ainda restem dúvidas quanto à especificidade dos iniciadores, deve-se sequenciar os fragmentos amplificados com o objetivo de verificar se apenas um loco está sendo amplificado.

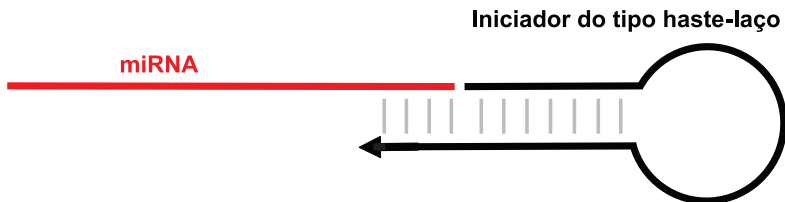
Análise da expressão de micro RNAs

Os passos para análises de expressão de mRNAs, via qPCR, são, relativamente, simples e muito bem documentados na literatura científica. Entretanto, no ambiente celular, existem uma gama de tipos

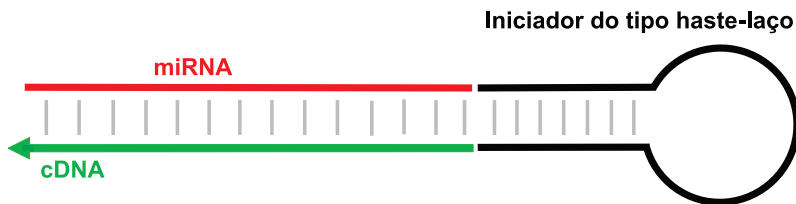
de RNAs. Esses podem ser, sumariamente, divididos em dois tipos: os codificantes (como os mRNAs) e os não codificantes, como os *small interfering* RNAs (siRNAs), micro RNAs (miRNAs), *Piwi-interacting* RNA (piRNA), entre outros. Por causa da estrutura diferenciada dos RNAs não codificantes, estes apresentam métodos específicos de análises. Como é o caso de miRNAs, que são pequenas moléculas de RNA não codificantes e de fita simples, com tamanho variando entre 18 a 25 nucleotídeos. A análise de sua abundância pode ser utilizada no estudo de diversos processos celulares. Ocorrem naturalmente no genoma de plantas e animais e têm a capacidade de regular a expressão gênica por meio da clivagem do mRNA ou impedir sua tradução.

Por serem moléculas pequenas, os miRNAs têm sua análise de expressão dificultada pelos métodos padrões. Chen et al. (2005) propuseram um método de quantificação de miRNAs em dois passos, utilizando um iniciador do tipo haste-laço (do inglês, *stem-loop*), com complementaridade à região 3' do miRNA, para sua transcrição reversa. A segunda etapa, de quantificação por qPCR, é realizada pelo método de sonda de hidrólise, utilizando-se um iniciador *forward* complementar à sequência do miRNA, adicionado de uma cauda na região 5' para aumento da T_m do iniciador, a depender da sequência do miRNA. O iniciador *reverse* deve ser complementar à sequência do iniciador tipo haste-laço, inserida na etapa anterior. A sonda é posicionada de forma a ser complementar tanto à sequência do cDNA como a do iniciador *reverse* (Figura 7).

1- O iniciador do tipo haste-laço anela-se à extremidade 3' do miRNA



2- Ocorre a síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa



3- Para a reação de RT-qPCR, é utilizado um iniciador *forward* complementar à sequência do cDNA e o *reverse*, complementar ao iniciador do tipo haste-laço. A sonda, com o silenciador (S) e o fluoróforo repórter (F), é posicionada de forma complementar às sequências do cDNA e do iniciador do tipo haste-laço.

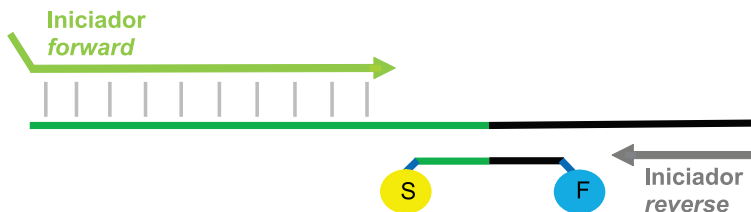


Figura 7. Representação esquemática da síntese de cDNA e RT-qPCR a partir de miRNA. Fonte: Adaptado de Chen et al. (2005).

Parâmetros para a padronização da qPCR

Definição do kit a ser utilizado

Para a realização da reação, pode-se utilizar kits compostos por solução que inclui uma DNA polimerase termoestável, dNTPs, tampão, fluoróforo para a referência passiva (geralmente o ROX) e, dependendo do sistema utilizado, o fluoróforo repórter, como o SYBRTM *Green*. No caso do uso do sistema de sonda de hidrólise, o fluoróforo repórter está associado à sonda. O uso de um fluoróforo como referência passiva é alternativo, porém aconselhável para a identificação de erros técnicos decorrentes de pipetagem ou problemas com a detecção da fluorescência pelo equipamento, já que o sinal da fluorescência passiva não deve variar ao longo dos ciclos da reação. São oferecidos kits comerciais com ou sem ROX. Na opção do kit com o fluoróforo de referência, o ROX pode já estar adicionado à mistura (*mix*) da reação ou ser fornecido à parte. O usuário deve estar atento a esses detalhes no momento da escolha do kit. Por causa da simplicidade dessa solução, é possível adquirir os componentes separadamente e prepará-la em laboratório, porém, a uniformidade oferecida pelos kits comerciais faz com que estes sejam a opção mais comum entre os usuários.

Alguns kits utilizados na qPCR contêm, em sua mistura de reação, dUTPs e a enzima uracil-N-glicosilase (UDG) como passo inicial de descontaminação.

Fragmentos de DNA amplificados em reações anteriores podem contaminar reações seguintes e serem alvos não específicos. O uso no *mix* de reação de dUTP, ao invés de dTTP, assegura que qualquer molécula de DNA amplificada na qPCR conterá uracila, ao invés de timina, sem interferência na eficiência da reação. A enzima UDG remove todo resíduo de uracila de moléculas de fita simples ou dupla de DNA, impossibilitando que sejam alvo inespecífico em uma reação de PCR (LONGO et al., 1990). No início da qPCR, é realizada uma pré incubação da reação, geralmente a 50 °C, para a atividade ótima da UDG e eliminação de possíveis contaminantes provenientes de reações anteriores. Em seguida, a enzima é termo-inativada pela elevação da temperatura. Esta etapa é essencial para que moléculas que serão sintetizadas na nova reação não sejam degradadas, uma vez que conterão uracila. Desta forma, as moléculas alvo inicial da nova reação corresponderão somente ao DNA adicionado conscientemente, o qual contém timina ao invés de uracila.

RT-qPCR em um ou dois passos

A reação de qPCR pode ser realizada em um (*one-step*) ou dois passos (*two-step*). A diferença básica entre esses métodos está na etapa de síntese de cDNA (Figura 8). Na reação em apenas um passo, as reações de RT-PCR e qPCR são realizadas em um mesmo tubo, utilizando-se iniciadores específicos para a amplificação apenas da molécula alvo. Este processo é rápido e permite o processamento de diversas amostras simultaneamente. A diminuição de etapas permite maior reprodutibilidade entre as repetições e minimiza o risco de contaminações. Este método é ideal quando os mesmos genes são amplificados repetidamente em diferentes amostras, utilizando condições de reações bem estabelecidas. No entanto, quando se deseja analisar a expressão de muitos genes, é necessária a realização da reação de síntese de cDNA para cada um separadamente, o que demanda a utilização de mais reagentes e RNA e pode ser um fator limitante. Na reação em um passo, não é possível ajustar a concentração do cDNA, o que pode causar dificuldades caso o gene em questão seja pouco ou muito expresso na amostra em análise. Além disso, deve-se ser mais cuidadoso quanto à formação de dímeros entre os iniciadores gene específicos, já que estes estarão presentes na reação de qPCR e também na RT-PCR, a qual é realizada em temperaturas inferiores.

Já na reação em dois passos, as reações de RT-PCR e qPCR são realizadas independentemente. Primeiramente, o RNA é usado na RT-PCR para a síntese de cDNA e, em seguida, uma alíquota desta reação é utilizada na qPCR. Esse método oferece maior flexibilidade para a otimização da qPCR, uma vez que permite o maior controle da quantidade de cDNA a ser utilizada para se atingir a máxima eficiência de amplificação. Isso é desejável quando se trabalha com genes que apresentam expressões muito variáveis. Além disso, caso sejam utilizados oligo d(T)_n ou iniciadores randômicos, o produto de uma mesma amostra de RT-PCR pode ser utilizado na análise da expressão de múltiplos genes. Isso promove economia de reagentes e torna mais fidedigna a comparação de resultados entre os experimentos, uma vez que a única fonte possível de variação estará na qPCR, facilitando também a detecção de erros metodológicos durante a análise.

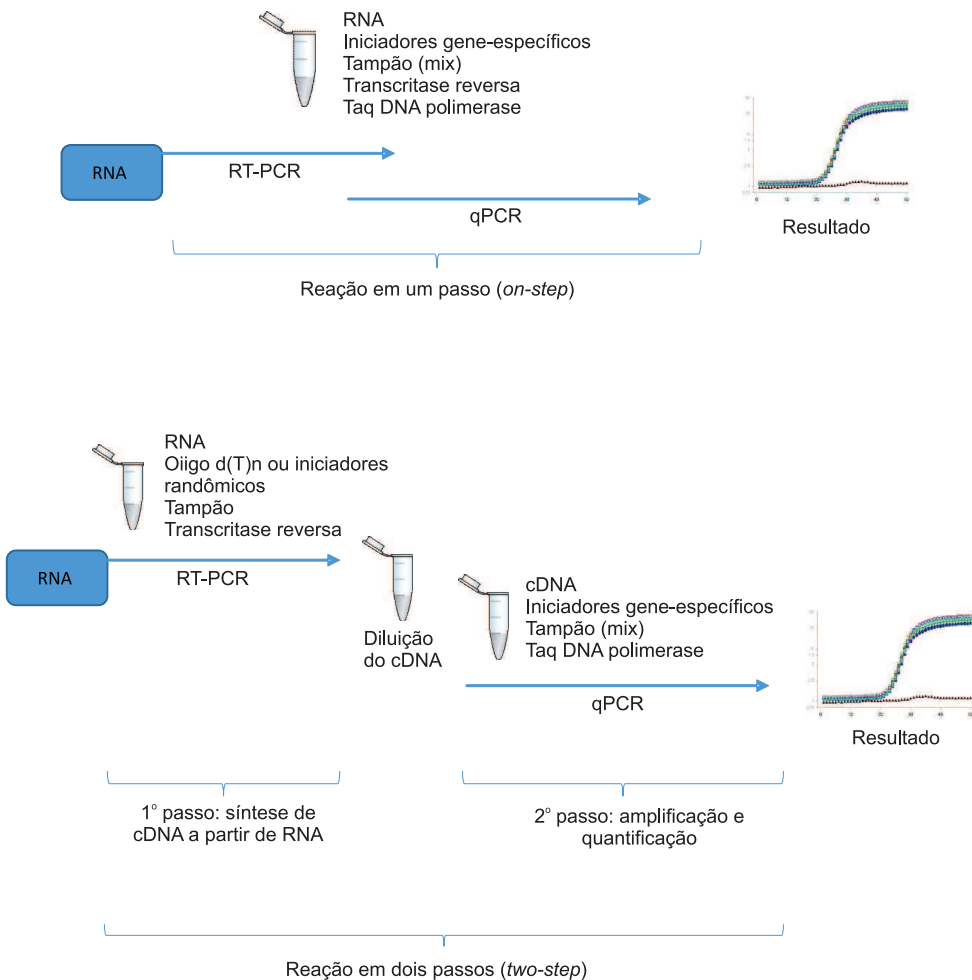


Figura 8. Comparação entre as reações em um passo (*one step*) e dois passos (*two step*).

Para a realização do método em dois passos, uma alíquota de cDNA, diretamente da reação de transcrição reversa, pode ser utilizada como alvo na qPCR, sem necessidade de purificações. Entretanto, não se deve ultrapassar 10% do volume da reação, a fim de se evitar inibição da qPCR pelos reagentes usados na síntese de cDNA. Sugere-se a realização de um teste com diferentes diluições do cDNA para a padronização da quantidade mais adequada, aquela em que não ocorre inibição da qPCR e o valor de eficiência é máximo.

A escolha da estratégia para a realização das reações dependerá do objetivo principal do experimento. O método em um passo é amplamente utilizado em diagnósticos clínicos, enquanto o método em dois passos é a opção mais frequente quando se deseja analisar a expressão de diversos genes em uma única amostra. Vale ressaltar que os kits oferecidos para os métodos em um ou dois passos são diferentes. No primeiro, os reagentes para a RT-PCR, incluindo a transcriptase reversa, estão também incorporados ao *mix* de reação. O usuário deve estar atento a este detalhe no momento da escolha do kit.

Curva padrão e eficiência de amplificação da qPCR

A eficiência de amplificação indica o quanto as moléculas alvo são duplicadas a cada ciclo da reação de qPCR, ou seja, o quanto a reação é exponencial. Uma reação ideal tem eficiência igual a 100% e alguns programas indicam tal valor como 1 ou 2.

O método clássico para o cálculo da eficiência de reação é através da construção de uma curva padrão, em que são utilizadas amostras padrão em diluições seriadas e conhecidas (Figura 9). A qualidade e acurácia das amostras padrão são essenciais para o êxito do método. Recomenda-se a utilização de pelo menos cinco diluições em um fator de no mínimo dez vezes, em três replicatas técnicas, para a construção da curva.

Os valores de C_q de cada amostra diluída são plotados em função do logaritmo da quantidade de moléculas alvo. Obtém-se uma reta de regressão linear de função inversa, pois, quanto maior a quantidade inicial de molécula alvo, menor será o valor de C_q , uma vez que amostras mais concentradas atingem o valor do *threshold* em ciclos anteriores, em comparação àquelas mais diluídas. O coeficiente angular da reta (*slope*) indica a eficiência da qPCR (Eficiência da PCR = $10^{(-1/slope)} - 1$) e valores aceitáveis variam entre $100 \pm 10\%$. Um *slope* de - 3,322 significa que a eficiência da PCR é de 100%. Neste caso, a quantidade de amplicon exatamente dobra a cada ciclo da reação, em sua fase

exponencial. Um *slope* menor que -3,322 mostra que a eficiência é menor que 100%. Algumas reações não atingem 100% de eficiência por causa de limitações experimentais, como falhas no delineamento, erros de manipulação ou excesso ou exaustão dos reagentes na reação. Valores de *slope* acima de -3,322 indicam eficiência superior a 100%. Isso ocorre quando os valores medidos das amostras padrão não são lineares ou quando há presença de inibidores na reação. O valor de R^2 , correspondente ao coeficiente de determinação da regressão linear, indica o quanto os valores das amostras padrão se sobrepõem à reta e deve ser maior ou igual a 0,985. Diversos fatores influenciam a eficiência da amplificação, como: qualidade da molécula alvo (cDNA); especificidade e concentração dos iniciadores, sonda e sequência alvo; tamanho do amplicon (fragmentos menores, de até 150 pb, geralmente geram eficiências melhores) e, erros de pipetagem.

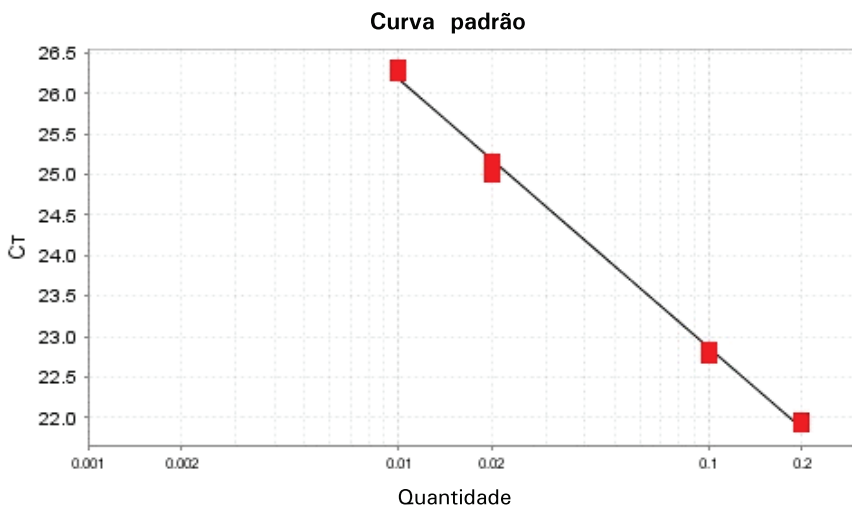


Figura 9. Exemplo de curva padrão gerada pelo programa StepOne (Applied Biosystems). As amostras padrão foram diluídas 5, 10, 50 e 100 vezes. Slope = -3,322, eficiência = 100,005%, $R^2 = 0,997$.

Métodos alternativos podem ser utilizados para a determinação da eficiência da reação. Zhao e Fernald (2005) desenvolveram um método para o cálculo direto da eficiência de reação, sem a necessidade da construção da curva padrão: os dados da fluorescência bruta são analisados em um modelo logístico com quatro parâmetros para a identificação da fase exponencial da reação. Em seguida, é aplicado um

modelo exponencial simples com três parâmetros para um ajuste da fase exponencial utilizando-se um algoritmo iterativo de regressão não linear. Considerando apenas a fase exponencial da curva de amplificação, são identificados valores candidatos de regressão e uma média ponderada é usada para computar a eficiência final para a quantificação. Este programa está disponível gratuitamente no sítio www.miner.ewindup.info/, no qual os resultados das reações de qPCR podem ser analisados diretamente.

Titulação de iniciadores e sondas

Tal processo é definido como um teste de variação na concentração final dos iniciadores e sondas na reação, visando-se alcançar melhor desempenho na reação. A concentração dos iniciadores pode variar entre 50 e 500 nM, sendo a de 200 nM a normalmente utilizada. A titulação de iniciadores é recomendada quando se deseja aumentar a sensibilidade da reação, pela diminuição dos valores de C_q; aumentar a especificidade da reação, evitando a formação de dímeros entre iniciadores e amplificações inespecíficas; aumentar a reprodutibilidade entre replicatas técnicas ou aumentar a eficiência da reação. Devem ser realizados testes variando-se estabelecer a concentração de cada iniciador em diferentes combinações.

Vale ressaltar que o aumento da concentração do iniciador pode causar um aumento da sensibilidade, porém, também uma redução da especificidade. A necessidade de titulação de iniciadores é mais frequente quando se trabalha com o sistema multiplex e, em algumas situações, testes variando-se a concentração da sonda, normalmente entre 100 a 500 nM, são também recomendados.

Curva de dissociação (*melt curve*)

Para experimentos que utilizam SYBRTM *Green*, ou similares, como fluorescência repórter, é necessária a construção de uma curva de dissociação, a qual é realizada automaticamente pelos equipamentos ao final da reação de qPCR. Esta curva é necessária para a certificação da especificidade dos iniciadores à molécula alvo e identificação de possíveis contaminações na reação, já que o SYBRTM *Green* se liga inespecificamente a qualquer molécula de DNA de fita dupla.

Para a construção da curva de dissociação, ao final da qPCR, os amplicons são rapidamente desnaturados a 94-95 °C e, em seguida, renaturados gradualmente até a temperatura de 60 °C. Esse procedimento é realizado para que, ao final, todas os amplicons estejam na forma de fita dupla. A partir deste ponto, inicia-se, novamente,

o aumento da temperatura para a desnaturação dos amplicons até a temperatura de 94-95 °C. Durante esse processo, o equipamento capta o sinal da fluorescência do SYBR™ *Green*, que diminui com a desnaturação das moléculas (Figura 10).

Curva de Dissociação

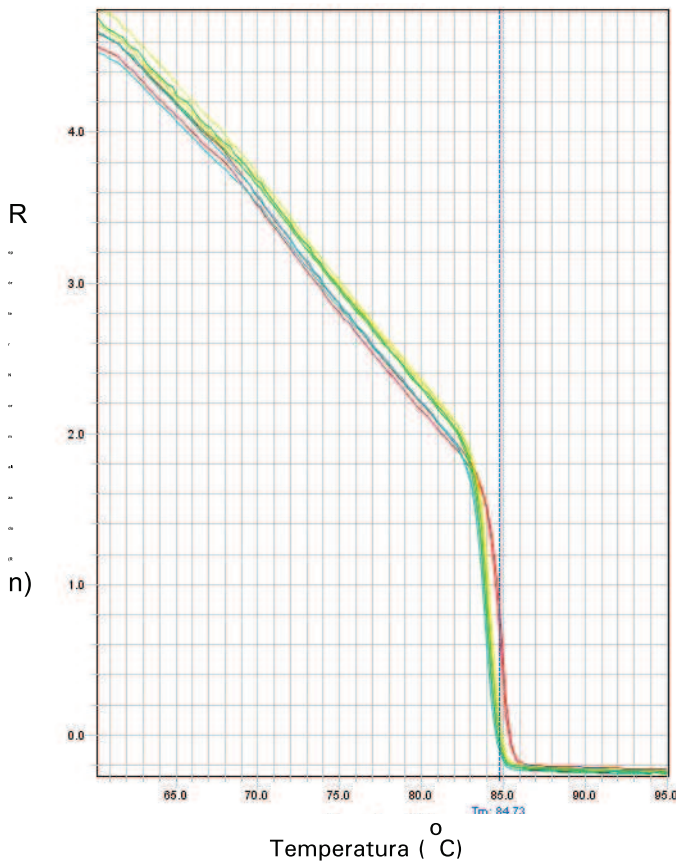


Figura 10. Curva de dissociação (melt curve) do sinal do fluoróforo repórter (SYBR™ *Green*) normalizado (Rn) em função da temperatura.

O aumento da temperatura provoca a desnaturação das moléculas de DNA e, conseqüentemente, a redução do sinal do fluoróforo repórter, uma vez que a detecção da fluorescência do SYBR™ *Green* é possível somente quando este se encontra ligado a moléculas de DNA de dupla fita. A linha azul pontilhada indica a T_m (temperatura de dissociação) de 84,73 °C, na qual metade dos pares de bases da molécula alvo amplificada encontra-se desnaturada. Curva gerada pelo programa Step One 2.1 (Applied Biosystems).

Determina-se então a temperatura de dissociação, aquela em que metade dos pares de bases de uma molécula alvo amplificada encontra-se desnaturada (Figura 11) e que é específica para cada amplicon, uma vez que depende diretamente de seu tamanho e composição de suas bases nitrogenadas.

A avaliação da curva de dissociação é facilitada quando são plotados valores da primeira derivada negativa de R_n , o sinal da fluorescência repórter normalizado, em função da temperatura. Assim, é observado um pico correspondente à temperatura de dissociação que caracteriza o amplicon (Figura 12). Essa temperatura é comparada com o valor disponibilizado para esse parâmetro pelos softwares a partir dos quais os iniciadores foram desenhados. Caso sejam semelhantes, a amplificação foi específica para o segmento que serviu de molde para o desenho dos iniciadores. De outra forma, caso seja distinta, outro segmento foi amplificado e sua análise de qPCR está quantificando um outro transcrito. Adicionalmente, podem ser detectados outros problemas na reação a partir da análise da curva de dissociação (vide item abaixo).

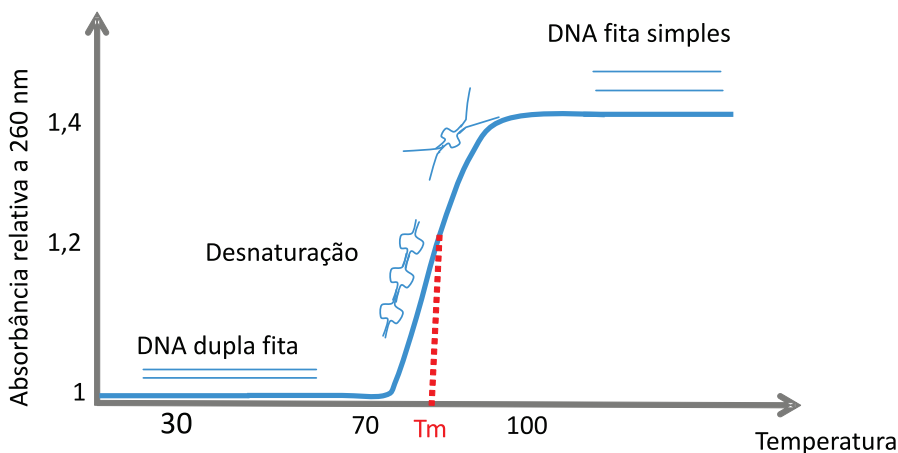


Figura 11. Dinâmica da determinação da T_m (temperatura de dissociação). O aumento de temperatura provoca a desnaturação progressiva do DNA até o ponto em que todas as moléculas encontram-se na forma de fita simples.

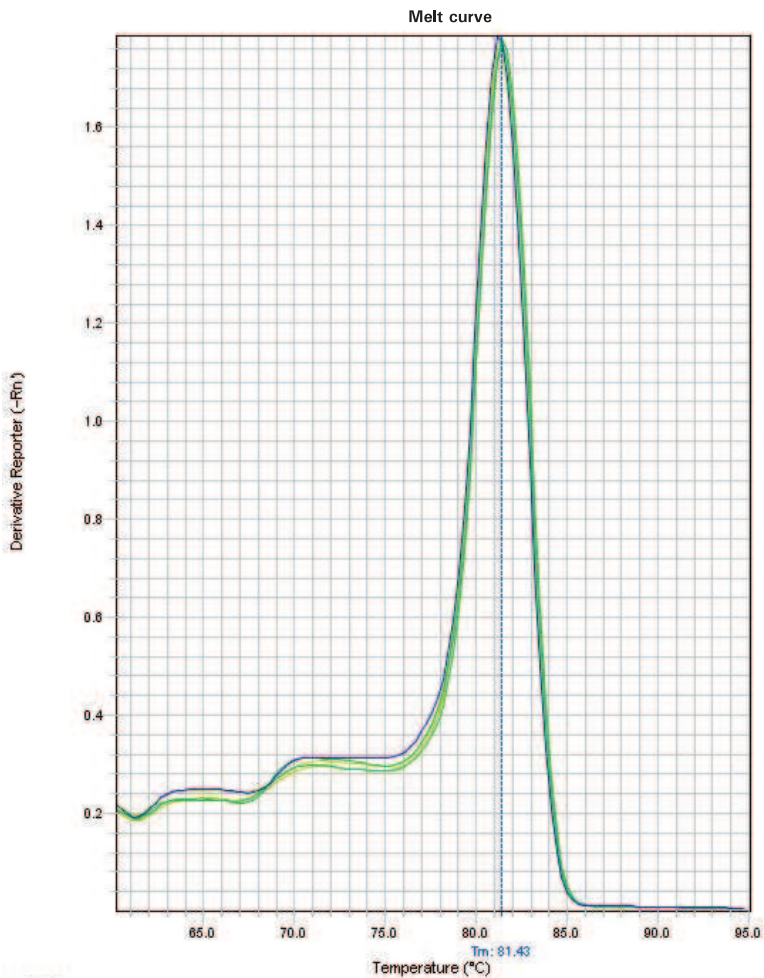


Figura 12. Curva de dissociação (melt curve) ideal do sinal do fluoróforo repórter (SYBR Green I) (-Rn) em função da temperatura.

Observa-se a formação de um pico único referente à T_m , o (81,43 oC), sem sinais interferentes, o que indica a amplificação de apenas um tipo de amplicon. Curva gerada pelo programa Step One 2.1 (Applied Biosystems).

Anormalidades da curva de dissociação

Anormalidades detectadas na curva de dissociação refletem problemas na qPCR, com interferência direta em sua eficiência. Algumas dessas alterações estão comentadas a seguir:

Presença de contaminantes

Se ocorrer amplificação no controle negativo sem a molécula alvo, NTC (*no template control*), com a curva de dissociação é possível identificar a natureza da contaminação, que pode ser com o amplicon de interesse ou com um fragmento de outro segmento de DNA. No primeiro caso, o pico da curva de dissociação da amostra NTC irá se sobrepor ao pico das demais amostras testes (Figura 13), indicando uma possível contaminação do *mix* da reação ou do poço do NTC com a molécula alvo. Esta contaminação pode ocorrer também por causa da selagem ou fechamento inadequado da placa ou do tubo. Recomenda-se a repetição da reação com a substituição de seus reagentes. No segundo caso, aparecerão dois tipos de curvas de dissociação: a do amplicon oriundo do transcrito alvo nas amostras testes; e uma outra existente somente na reação da amostra NTC. Isso é um indicativo que somente tal amostra está contaminada por uma amostra de DNA diferente daquela usada como alvo da reação.

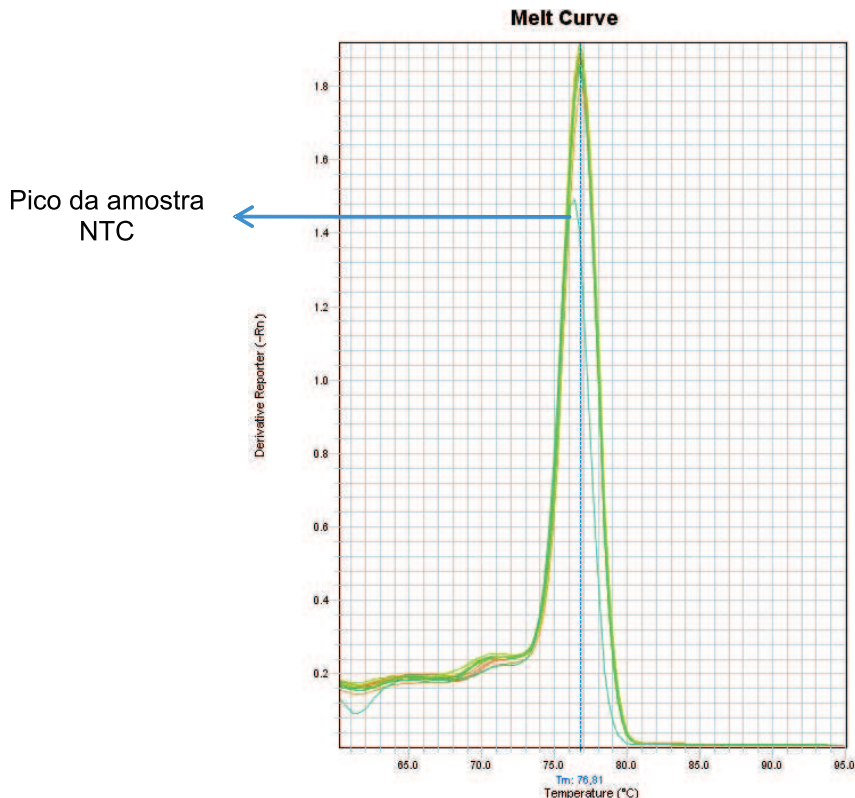


Figura 13. Curva de dissociação indicando contaminação do controle negativo NTC (*no template control*) com a molécula alvo. A amplificação no NTC iniciou-se no Ct 34. Curva gerada pelo programa Step One 2.1 (Applied Biosystems).

Amplificação inespecífica

A amplificação inespecífica é verificada nas amostras testes. Os iniciadores utilizados na reação amplificam mais de um segmento de DNA, gerando mais de um amplicon. Este problema é identificado na curva de dissociação das referidas amostras pela presença de mais de um pico nas curvas de dissociação (Figura 14). Os dados de quantificação não serão confiáveis, pois mais de um tipo de amplicon foi sintetizado e a reação terá de ser refeita com iniciadores mais específicos.

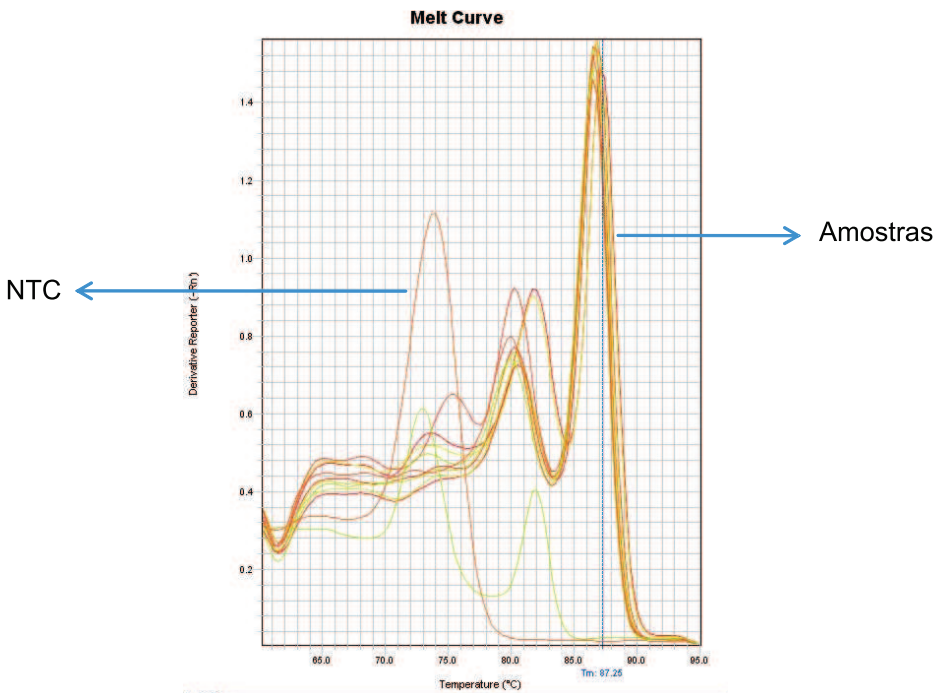


Figura 14. Curva de dissociação evidenciando a amplificação inespecífica do amplicon de interesse pela presença de múltiplos picos. Nesta reação, houve ainda contaminação ou formação de dímeros de iniciadores, já que um pico também foi detectado para a amostra NTC. Curva gerada pelo programa Step One 2.1 (Applied Biosystems).

Formação de dímeros de iniciadores

A formação de dímeros de iniciadores também pode ser identificada pela análise da curva de dissociação. Estes são identificados pela presença de um pico menor e anterior ao pico referente ao amplicon de interesse (Figura 15). O problema pode ser resolvido com a titulação de iniciadores, em que a concentração de cada iniciador é otimizada na reação, ou com o desenho de um novo par de iniciadores. A detecção da formação de dímeros pode ser confundida com uma contaminação, que também pode se manifestar como um pico menor e anterior ao pico do amplicon de interesse. Para distinguir a contaminação da formação de dímeros, pode-se repetir a reação com novos reagentes, como estratégia para se livrar de contaminações, ou realizar a titulação dos iniciadores. Novamente, os dados de quantificação não serão confiáveis, pois mais de um tipo de amplicon será sintetizado e a reação terá de ser refeita com iniciadores mais específicos.

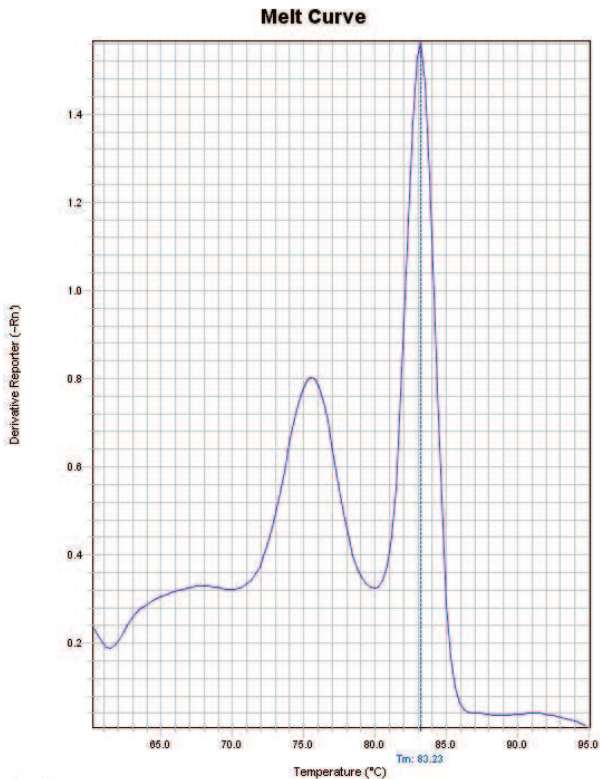


Figura 15. Curva de dissociação evidenciando a formação de dímeros na reação de qPCR pela presença de um segundo pico menor e anterior ao pico do amplicon de interesse. A linha azul pontilhada indica a temperatura de dissociação ($T_m = 83,23$). Curva gerada pelo programa Step One 2.1 (Applied Biosystems).

Métodos de quantificação gênica

Existem dois métodos de quantificação gênica: quantificação absoluta, em que é determinada a quantidade exata da sequência alvo, expressa em valores absolutos de número de moléculas, cópias ou concentração; e a quantificação relativa, em que se deseja identificar alterações da expressão gênica de uma amostra teste em relação a uma amostra calibradora.

Quantificação Absoluta

A quantificação absoluta permite a determinação precisa da quantidade de moléculas, cópias ou concentração de uma molécula alvo. Para tanto, em cada corrida, é necessário o estabelecimento de uma curva padrão, a qual é constituída de uma série de diluições de padrões com número de cópias conhecidas, que devem variar entre 10^1 a 10^{10} moléculas. Portanto, é importante que os padrões sejam originados de uma molécula única e não devem estar contaminados, para que não haja superestimação do número de cópias calculado. Os padrões devem ser diluídos em concentrações próximas às do alvo nas amostras biológicas.

O material usado na curva padrão em quantificações absolutas pode ser de diferentes origens (BUSTIN, 2000, 2002; PFAFFL; HAGELEIT, 2001). Padrões feitos com DNA plasmidial ou genômico são mais estáveis, duráveis e de maior reprodutibilidade em relação aos padrões feitos com RNA. O material usado na curva padrão deve ser quantificado da forma mais precisa possível, já que o conhecimento de sua concentração é essencial para o sucesso da técnica. Abaixo, estão listados os tipos de moléculas que podem ser usados como padrões:

- *DNA plasmidial*: a sequência de interesse é clonada em um plasmídeo. As vantagens desse método são a facilidade de gerar grandes quantidades do padrão, de verificar a sequência clonada por sequenciamento e de quantificação. Recomenda-se que o plasmídeo utilizado na curva padrão esteja linearizado, uma vez que a eficiência de amplificação difere quando este está na forma linearizada ou superenrolada. Estando linearizado, terá eficiências mais próximas daquelas da amplificação de DNA genômico ou cDNA. Se a eficiência de amplificação do plasmídeo superenrolado for similar a das amostras teste, a etapa de linearização pode ser eliminada. Para se determinar

o número de moléculas a partir de valores de concentração de DNA, é necessário o cálculo do peso molecular da molécula. Assume-se que o peso molecular médio de um par de base de DNA é 650 Da ou 650 g/mol. Multiplicando-se o tamanho (pb) da molécula de DNA por 650, obtém-se seu peso molecular, ou massa molar, expresso em Da ou g/mol. Considerando o número de Avogrado, $6,022 \times 10^{23}$ g/mol, que define o número de moléculas em um mol, é possível calcular o número de moléculas em $1\mu\text{L}$ de uma solução cuja concentração, em $\text{g}/\mu\text{L}$, é conhecida, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{No de moléculas}/(\mu\text{L}) = \left(\frac{X \text{ g}/(\mu\text{L})\text{DNA}}{\text{Tamanho do plasmídeo (pb) x 650}} \right) 6,022 \times 10^{23}$$

- *Fragmentos de PCR*: o produto da PCR, contendo a sequência de interesse em diluições seriadas, também pode ser usado para a construção da curva padrão. Recomenda-se incluir, pelo menos, 20 pb a montante e a jusante dos sítios de ligação dos iniciadores. O número de cópias é calculado pela fórmula acima citada, substituindo-se o tamanho do plasmídeo pelo tamanho do fragmento da PCR.
- *Iniciadores sintetizados comercialmente*: seguem o mesmo princípio descrito para o uso de fragmentos de PCR.
- *DNA genômico*: pode ser usado se o gene alvo estiver presente em número conhecido de cópias por genoma haploide. O número de cópias do gene alvo presente no DNA genômico pode ser diretamente calculado se o tamanho do genoma for conhecido. Considerando-se novamente o princípio da constante de Avogrado, que estabelece o número de $6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol, e o peso molecular médio de um par de base de DNA (650 g/mol), é possível calcular a massa de DNA por genoma haploide pela seguinte fórmula:

$$m = n \left(\frac{650}{6,022 \times 10^{23}} \right)$$

Em que:

m = massa de DNA em gramas

n = número de pares de bases (pb) por genoma haploide

Por exemplo, o tamanho do genoma haploide da planta modelo *Arabidopsis thaliana* é $0,135 \times 10^9$ pb. Portanto, a massa de DNA será de $0,146 \times 10^{-12}$ g que é igual a 0,146 pg. Em seguida, divide-se o valor da massa pelo número de cópias do gene por genoma haploide. Se o gene alvo estiver presente em cópia única, assume-se que 0,146 pg do DNA genômico contém uma cópia do gene. Esse valor é então utilizado para a definição das diluições a serem utilizadas na curva padrão.

- *RNA/cDNA*: os padrões de RNA podem ser criados clonando-se parte ou todo transcrito de interesse em um vetor. O inserto a ser clonado é gerado por RT-PCR e o vetor deve conter promotores para a RNA polimerase, como T3, T7 ou SP6. Realiza-se, então, a transcrição *in vitro* para a geração do transcrito no sentido senso. Em seguida, o DNA plasmidial é removido com uma DNase, pois, pode interferir na quantificação do transcrito ou até mesmo servir de alvo em PCR subsequentes. Após a quantificação do RNA, o número de moléculas pode ser estimado, utilizando-se fórmula semelhante àquela para DNA plasmidial, porém, assumindo-se que o peso molecular médio de uma única base é de 340 Da:

$$\text{No de moléculas}/(\mu\text{L}) = \left(\frac{X \text{ g}/(\mu\text{L})\text{DNA}}{\text{Tamanho do plasmídeo (pb)} \times 340} \right) 6,022 \times 10^{23}$$

Finalmente, devem-se usar, pelo menos, cinco séries de diluições com número de cópias ou concentração conhecidas. Com isso, se estabelecerá uma curva de regressão linear dos valores de Cq em função da quantidade absoluta logarítmica da molécula alvo. Os iniciadores e sondas utilizados para a construção da curva padrão e análise das amostras teste devem ser os mesmos, pois, os amplicons devem ser idênticos. A reação de amplificação do material genético usado na curva padrão e do gene alvo deve ocorrer com eficiências as mais próximas possíveis. O número de cópias do gene alvo pode ser calculado a partir da regressão linear obtida da curva padrão, ou seja, pela interpolação dos valores de Cq obtidos na curva padrão, a qual deve ser repetida a cada experimento (Figura 16). A vantagem desse método é que os valores das quantidades são gerados diretamente, sem a necessidade de análises intermediárias.

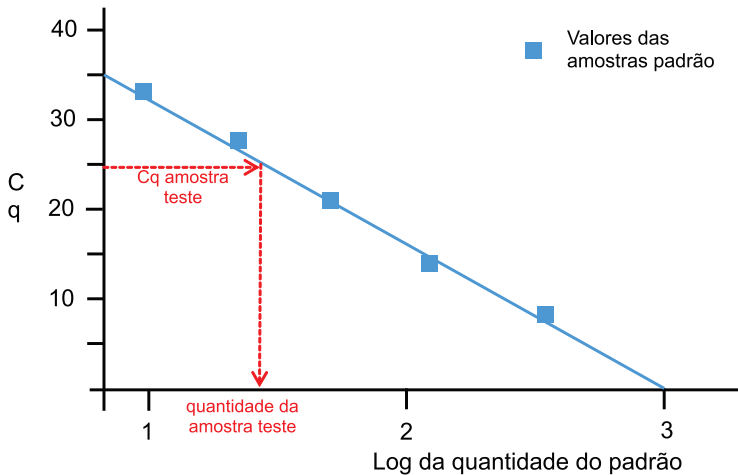


Figura 16. Curva padrão realizada com cinco diferentes amostras padrão com quantidades conhecidas. A concentração da amostra teste é obtida diretamente pela interpolação do valor de Cq na curva padrão.

Quantificação Relativa

Os métodos de quantificação relativa da expressão gênica permitem a quantificação das diferenças dos níveis de expressão de um gene alvo específico entre diferentes amostras. Os dados gerados não são expressos em números absolutos e sim em quantidades de vezes a mais ou a menos em relação a uma amostra denominada calibradora. Os métodos de quantificação relativa são: método da curva padrão relativa e método do Cq comparativo ($\Delta\Delta Cq$). A quantificação relativa demanda a avaliação da expressão gênica do gene alvo e de um gene de referência. Este último é usado como controle para a normalização da quantidade inicialmente adicionada da molécula alvo nas reações.

1) Genes de referência

Para a obtenção da quantificação dos níveis de mRNA, deve-se, também, realizar a avaliação concomitante da expressão de um ou mais genes de referência, que é aquele cuja expressão não varia significativamente entre tecidos, estágio de desenvolvimento e tratamentos, ou seja, a relação entre os valores de expressão no controle e no tratamento deve ser próxima ou igual a um. Genes

envolvidos em processos celulares básicos e que são expressos constitutivamente na célula, como o da actina, ubiquitina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, são comumente utilizados como genes de referência (CZECHOWSKI et al., 2005). No entanto, estudos indicam que a expressão desses genes constitutivos pode variar e não há um gene de referência universal para todos os experimentos. Sendo assim, para que a interpretação dos dados possua o máximo de consistência, o teste e a identificação de genes de referência adequados a cada experimento é imperativo.

O uso de múltiplos genes de referência também aumenta a exatidão das análises (VANDESOMPELE et al., 2002). Atualmente, o uso de ao menos três genes de referência é condição elementar para publicação de dados de expressão gênica via qPCR (BUSTIN et al., 2009). Existem softwares que medem a estabilidade dos genes de referência ao longo das amostras analisadas, entre eles estão o GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

Uma vez que se assume que a expressão dos genes de referência não varia entre amostras e tratamentos, qualquer variação observada é atribuída a erros metodológicos e utilizada para a correção dos valores de expressão dos genes alvo.

2) Método da curva padrão relativa

O princípio deste método é o de interpolação dos dados de Cq de uma amostra teste a uma curva padrão (LARIONOV et al., 2005). Uma vantagem do método é que a quantificação dos padrões para a construção da curva não é necessária. Realiza-se apenas a diluição seriada de uma mesma amostra que pode ser qualquer cDNA a partir do qual possam ser amplificados os genes alvo e de referência. Este método é recomendado para um número pequeno de genes a serem analisados e quando as eficiências dos genes alvo e de referência não são próximas, o que facilita a etapa de padronização do gene de referência a ser utilizado e elimina problemas práticos e teóricos associados à eficiência da PCR. É um método que emprega cálculos e análises estatísticas simples e com boa precisão, uma vez que os dados são obtidos diretamente por interpolação na curva padrão.

É importante que o valor do nível de expressão da amostra teste esteja entre os limites estabelecidos na curva padrão. A desvantagem do método é que a construção da curva padrão para o gene alvo e de

referência é obrigatória a cada corrida (amostras teste e amostras para a construção da curva padrão devem ser analisadas em uma mesma placa), o que demanda o uso de mais reagentes e aumenta os gastos do procedimento. Além disso, as amostras de diluição seriada para a construção das curvas padrão demandam mais espaço na placa, o que limita a quantidade de genes ou amostras que podem ser analisados em uma mesma corrida.

A seguir, é exemplificado um experimento hipotético para a determinação da expressão relativa de um gene "X" em uma amostra submetida a um tratamento, em relação ao seu controle. Amostras de RNA foram extraídas independentemente, controle (amostra calibradora), tratamento (amostra teste) e amostra padrão (para a construção da curva). Foi realizada a síntese de cDNA a partir de $1\mu\text{g}$ de RNA total de cada amostra. Em seguida, o cDNA da amostra padrão foi utilizado para uma diluição seriada em escala decimal, cinco vezes (Figura 17).

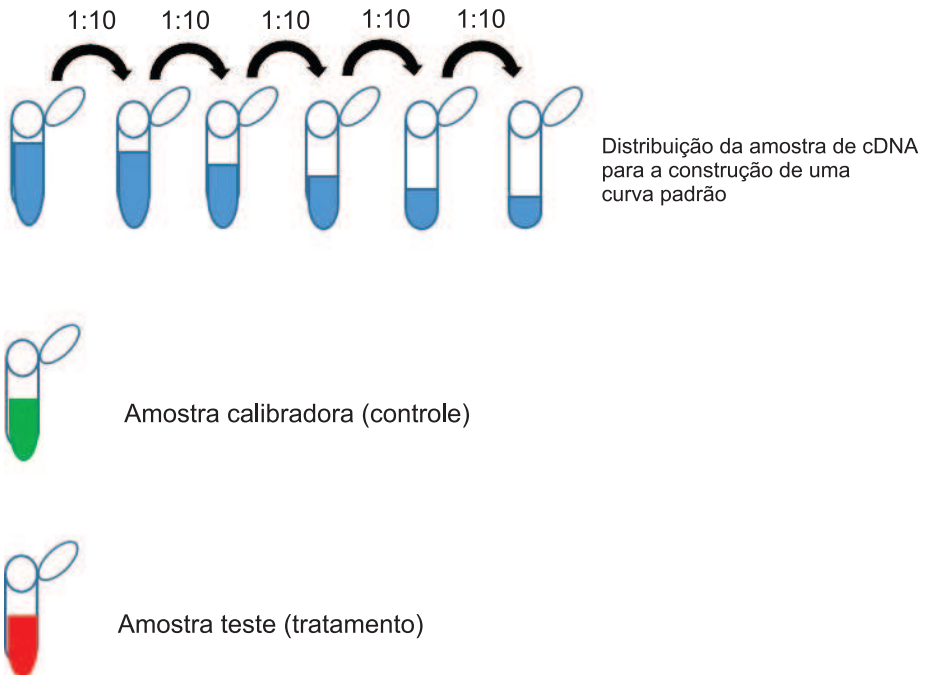


Figura 17. Amostras utilizadas para quantificação pelo método da curva padrão relativa. Amostras em diluição seriada para a construção da curva padrão, amostra calibradora (controle não tratada) e da amostra teste (tratada).

Para a reação de qPCR, a amostra padrão foi diluída cinco vezes, variando de 10^{-1} a 10^{-5} , para a construção de uma curva padrão.

As reações de qPCR foram realizadas para a amplificação independente do gene alvo "X" e de um gene de referência, utilizando as mesmas amostras de cDNA. Desta forma, uma curva padrão foi construída tanto para o gene alvo como para o gene de referência (Figura 18).

Uma vez obtida a curva padrão, os valores médios de Cq das amostras teste e calibradora podem ser interpolados para o cálculo da concentração de RNA (Tabela 3).

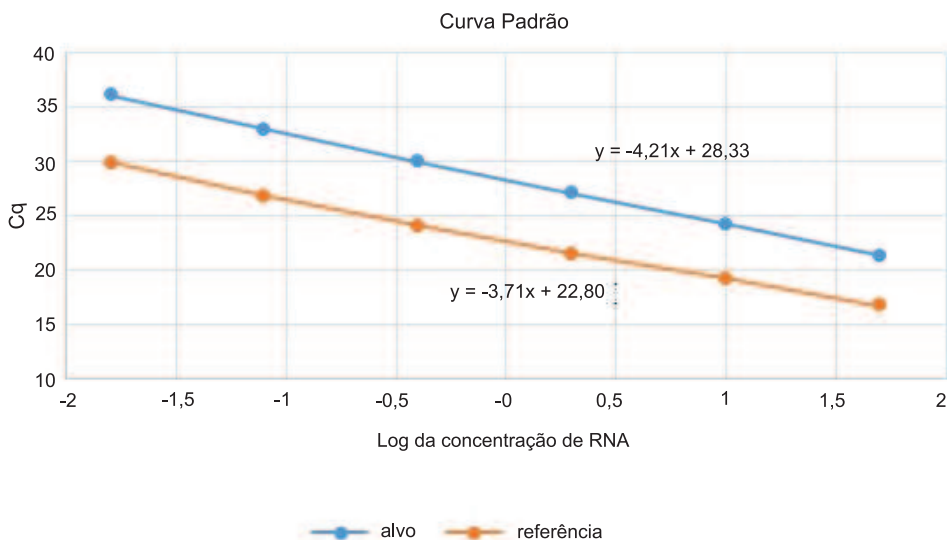


Tabela 3. Valores de quantidades de RNA obtidos com a interpolação dos dados de Cq.

Tipo de Amostra	Cq alvo	Concentração RNA alvo (ng/reação)	Cq referência	Concentração RNA referência (ng/reação)
Amostra teste	25,08	5,909	20,53	4,115
Amostra calibradora	29,77	0,46	20,41	4,426

Em seguida, os valores obtidos para o gene alvo, tanto para a amostra teste como para a calibradora, devem ser normalizados em relação ao gene de referência. Este procedimento corrige possíveis erros técnicos da metodologia.

Normalização da amostra = valor gene alvo/valor gene de referência

No exemplo, o valor normalizado para a amostra calibradora é $0,46/4,43 = 0,10$ e para a amostra teste, $5,91/4,12 = 1,43$. Os valores normalizados são então divididos um pelo outro para a obtenção de um valor relativo em quantidade entre a amostra teste e a calibradora.

Valor relativo = valor normalizado amostra teste/valor normalizado amostra calibradora.

Desta forma, o valor relativo neste exemplo é $1,43/0,1 = 14,3$. Isso significa que o gene alvo analisado é 14,3 vezes mais expresso na amostra alvo (tratada) em relação à amostra calibradora (não tratada).

3) Método do Cq comparativo ($\Delta\Delta Cq$)

Este método, desenvolvido por Livak e Schmittgen (2001), é similar àquele da curva padrão relativa, porém utiliza fórmulas aritméticas para a obtenção dos valores relativos (método $\Delta\Delta Cq$). É possível eliminar a necessidade da curva padrão a cada corrida e as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência devem ser próximas. Os autores consideraram que em reações bem otimizadas, em que o amplicon é inferior a 150 pb, a eficiência da amplificação é próxima a 1 ou 100%. No entanto, para que este método seja aplicado, é necessária a confirmação da compatibilidade das eficiências entre os genes analisados. Para isso, é feita uma análise para a verificação de como os valores de ΔCq ($Cq_{\text{alvo}} - Cq_{\text{referência}}$) variam com a diluição seriada da amostra padrão. Sendo assim, são construídas curvas padrão para o gene alvo e de referência, usando sempre a mesma amostra padrão nas mesmas diluições. Os valores calculados de ΔCq são usados para a construção de uma curva de regressão linear em função, por exemplo, do logaritmo do fator de diluição das amostras de cDNA utilizadas para a construção da curva (Figura 19).

Caso o valor absoluto da inclinação da reta seja próximo a zero, as eficiências de amplificação dos genes analisados são próximas e o método do $\Delta\Delta Cq$ pode ser empregado. Caso contrário, recomenda-se a substituição dos iniciadores ou a análise pelo método da curva padrão relativa ou quantificação absoluta (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). No caso do exemplo da Figura 19, o valor de 0,0471 valida o método.

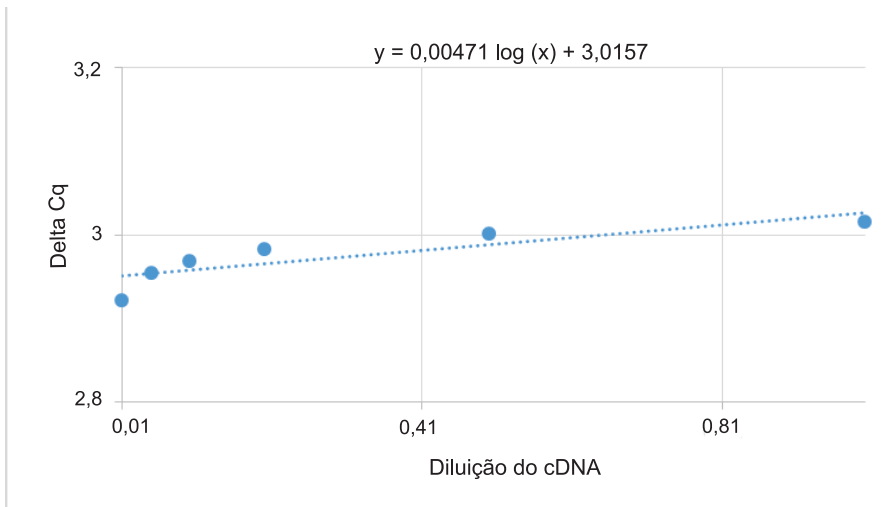


Figura 19. Curva padrão para a validação do experimento para análise pelo método do $\Delta\Delta Cq$. Os dados de ΔCq foram plotados em função da diluição do cDNA, que variou de 0,01 a 1. Fonte: Adaptado de: Livak e Schmittgen (2001).

Após a validação do experimento, deve-se estabelecer a diluição das amostras teste a ser utilizada. Recomenda-se a utilização de uma diluição em que os valores de Cq encontram-se no intervalo de 15 a 31. Amostras muito concentradas e que apresentam um valor baixo de Cq atingem o platô precocemente. Já em amostras diluídas, com Cq mais alto, observa-se que a incidência de formação de dímeros de iniciadores é maior.

Em seguida, realiza-se a reação com as amostras teste na diluição definida. Recomenda-se manter a mesma diluição para todas as amostras. É possível fazer a correção dos valores de uma amostra mais diluída ou concentrada que as demais, porém torna as análises mais trabalhosas e trata-se de mais uma fonte de erro. As reações com os genes alvo e referência devem ser analisadas em uma mesma corrida e ser realizadas em replicatas, geralmente triplicatas. Se não houver diferenças significativas entre as replicatas biológicas, estas podem ser utilizadas como replicatas técnicas.

Na Tabela 6, são utilizados para a exemplificação do método os resultados publicados por Livak e Schmittgen (2001). A partir dos RNAs totais adquirido comercialmente de cérebro e fígado humano, os autores realizaram a síntese de cDNA e alíquotas foram utilizadas para a amplificação dos genes GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), utilizado como um gene de referência, e do gene do fator de transcrição c-MYC, empregado como gene alvo. O experimento foi realizado em seis replicatas.

A partir dos valores de Cq obtidos para cada reação, obtém-se a média de Cq para o gene alvo e o gene de referência e seus respectivos desvios padrão, para amostras de cada tecido, cérebro e fígado. Em seguida, é realizada a normalização dos dados do gene alvo pelo gene de referência, calculando-se o ΔCq , subtraindo-se do valor do Cq do gene alvo, aquele do gene de referência ($\Delta Cq = Cq_{\text{alvo}} - Cq_{\text{referência}}$). O desvio padrão (SD) do valor de ΔCq é calculado pela fórmula: $SD_{(\Delta Ct)} = (SD^2_{(\text{alvo})} + SD^2_{(\text{referência})})^{1/2}$.

Uma vez obtidos os dados de ΔCq , os valores de $\Delta\Delta Cq$ são calculados. O $\Delta\Delta Cq$ é a diferença entre os ΔCq da amostra teste e da amostra calibradora. A amostra calibradora é aquela que será utilizada como parâmetro de referência para a quantificação relativa. No exemplo da Tabela 4, a amostra calibradora está representada pelo cérebro e a amostra teste, o fígado. O valor de desvio padrão do $\Delta\Delta Cq$ é o mesmo daquele do ΔCq .

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{(\text{amostra teste})} - \Delta Cq_{(\text{amostra calibradora})}$$

Tabela 4. Valores relativos de expressão do gene alvo calculado pelo método $\Delta\Delta Ct$.

Tecido	Cq		ΔCq (Cq alvo – Cq referência)	$\Delta\Delta Cq$ (ΔCq teste – ΔCq calibrador)	Valor relativo
	Alvo (c-myc)	Referência (GAPDH)			
Cérebro	30,72	23,70	6,86 ± 0,17	0,00 ± 0,17	1,0
	30,34	23,56			
	30,58	23,47			
	30,34	23,65			
	30,50	23,69			
	30,43	23,68			
Média ± SD	30,49 ± 0,15	23,63 ± 0,09			
Fígado	27,06	22,76	4,37 ± 0,10	-2,50 ± 0,10	5,6
	27,03	22,61			
	27,03	22,62			
	27,10	22,60			
	26,99	22,61			
	26,94	22,76			
Média ± SD	27,03 ± 0,06	22,66 ± 0,08			

SD = Desvio padrão.

Fonte: Adaptado de: Livak e Schmittgen (2001).

O valor relativo de expressão da amostra teste em função da amostra calibradora é dado por $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Pfaffl (2001) propôs um modelo para quantificação relativa da expressão gênica, baseada no modelo de Livak e Schmittgen (2001), porém com

cálculo baseado na eficiência do desvio de Cq de uma amostra tratamento versus uma amostra controle e expresso em comparação a um gene de referência. O uso de valores de eficiência de amplificação para o cálculo de valores relativos de expressão é considerado hoje essencial.

Alguns programas estão disponíveis para a análise da expressão relativa e, inclusive, já calculam estatisticamente o erro padrão entre replicatas. Programas bem conhecidos são REST (PFAFFL et al., 2002), qBASE (HELLEMANS et al., 2007) e programas disponibilizados pelas empresas fabricantes de equipamentos de qPCR, como o StepOne2.1 e Data Assist™ (Applied Biosystems). Há também pacotes desenvolvidos para análise no programa R (<http://www.r-project.org/>), como o qpcr e "MCMC.qPCR". Este último dispensa o uso de genes de referência.

Padronização dos resultados para publicação

Considerando a falta de consenso de como realizar e interpretar os resultados obtidos pela técnica de qPCR, Bustin et al. (2009) sugeriram um guia, MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), no qual são descritas informações mínimas necessárias para a avaliação de experimentos de qPCR. O objetivo é aumentar a transparência dos experimentos e assim garantir a relevância, acurácia, correta interpretação e repetibilidade dos dados publicados na literatura científica. Os autores apontam como principais deficiências técnicas: (1) a falta de qualidade do DNA ou cDNA usado como molde; (2) a escolha imprópria de iniciadores para a transcrição reversa, além de iniciadores e sondas para a qPCR; (3) análises estatísticas inadequadas. Essas deficiências são ainda reforçadas pela falta de detalhamento dos experimentos nos artigos, impedindo que o leitor faça uma avaliação crítica dos dados apresentados.

Neste guia, são abordados temas como a correta nomenclatura a ser utilizada, conceitos a serem seguidos e cuidados a serem considerados nas análises diagnósticas, na aquisição e preparação das amostras, na quantificação de ácidos nucleicos, na reação de transcrição reversa, na qPCR, na normalização com um gene de referência e nas análises dos dados. É sugerido que autores, revisores e editores sigam uma *checklist* que inclui informações desde o delineamento experimental, até a marca de reagentes e tubos utilizados.

Considerações finais

A técnica de qPCR, desenvolvida no início da década de 90, apresenta uma série de inovações que a torna mais precisa e acessível à comunidade científica. É um método de análise simples, que não demanda uso de reagentes tóxicos, que pode ser altamente automatizada com tendência a robotização para a redução de custos operacionais e aumento da reprodutibilidade e precisão da técnica. Já estão disponíveis, no mercado, equipamentos que fazem a análise em larga escala de mais de 3.000 amostras em uma mesma corrida, assemelhando-se a uma análise em *arrays*.

A crescente adoção da técnica de qPCR para a análise da expressão gênica, genotipagem, exames clínicos de detecção de patógenos, entre outras aplicações, vem gerando um rápido crescimento e inovações neste setor.

Um desdobramento da qPCR é a técnica de dPCR (PCR digital), na qual as moléculas de DNA são separadas em nanogotas, onde ocorre a amplificação em paralelo. Estas são detectadas e quantificadas pelo equipamento. Como vantagens deste método estão: (1) o uso de referências e padrões é desnecessário; (2) há um aumento da precisão dos resultados, pois há mais replicatas da PCR; (3) alto poder de detecção, sendo ideal para a quantificação de moléculas raras na amostra e; (4) baixa interferência de inibidores da reação.

Independentemente das inovações disponíveis, a etapa mais importante na análise por qPCR é a de delineamento experimental, em que os objetivos devem ser bem traçados, bem como os tratamentos e as repetições, tanto técnicas como biológicas. Uma grande pergunta pode ser respondida por um experimento relativamente simples e bem delineado.

Referências

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, D.C., v. 74, p. 5350–5354, 1977.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ARVIDSSON, S.; KWASNIEWSKI, M.; RIAÑO-PACHÓN, D.M.; MUELLER-ROEBER, B. QuantPrime – a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. **BMC Bioinformatics**, [London], v. 9, n. 465, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976492>>. Acesso em: 14 maio 2016.

BIOMERIEUS B.V. Akio Sugiyama; Yoshiaki Nishiya; Bunsei Kawakami. **RNA polymerase mutants with increased thermostability**. US7507567 B2. 1 mar. 2001, 24 mar. 2009.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, p.169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 29, p. 23-39, 2002.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, p. 597-601, 2005.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, D.C., v. 55, p. 611-622, 2009.

CHELLY, J.; KAPLAN, J-C, MAIRE, P.; GAUTRON, S.; KAHN, A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. **Nature**, New York, v. 333, p. 858-860, 1998. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v333/n6176/abs/333858a0.html>>. Acesso em: 14 maio 2016.

CHEN, C.; RIDZON, D. A.; BROOMER, A. J.; ZHOU, Z.; LEE, D. H.; NGUYEN, J. T.; BARBISIN, M.; XU, N. L.; MAHUVAKAR, V. R.; ANDERSEN, M. R.; LAO, K. Q.; LIVAK, K. J.; GUEGLER, K. J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 20, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/33/20/e179/1082564/Real-time-quantification-of-microRNAs-by-stem-loop>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 5-17, 2005.

CZECHOWSKI, T.; BARI, R. P.; STITT, M.; SCHEIBLE, W. R.; UDVARDI, M. K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 38, p. 366-379, 2004.

D'HAENE, B.; HELLEMANS, J. The importance of quality control during qPCR data analysis. **International Drug Discovery**, [Granada], p. 18-24, 2010. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.de/dhaene-hellemans-qc-data-2010.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

DEPREZ, R. H. L.; FIJNVANDRAAT, A. C.; RUIJTER, J. M.; MOORMAN, A. F. M. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBRTM Green depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, [Oxford], v. 307, p. 63-69, 2002.

EUROGENTEC. **qPCR guide**. Seraing, [2015]. Disponível em: <<http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 2, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1852402/>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences, **Nature Biotechnology**, [London], v. 10, p. 413-417, 1992.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nature Biotechnology**, [London], v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical considerations in design of Internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington. D.C., v. 42, n. 5, 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/42/5/1863>>. Acesso em: 17 out. 2016.

KAINZ, P. The PCR plateau phase: towards an understanding of its limitations. **Biochimica et Biophysica Acta**, [Oxford], v. 1494, n. 1/2, p. 23-27, 2000.

KEVIL, C. G.; WALSH, L.; LAROUX, F. S.; KALOGERIS, T.; GRISHAM, M. B.; ALEXANDER, J. S. An improved, rapid Northern protocol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 238, n. 2, p. 277-279, 1997.

- LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, [London], v. 6, p. 62-78, 2005.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} Method. **Methods**, Oxford, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LONGO, M. C.; BERNINGER, M. S.; HARTLEY, J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. **Gene**, [Oxford], v. 93, n. 1, p. 125-128, 1990.
- NAM, D. K.; LEE, S.; ZHOU, G.; CAO, X.; WANG, C.; CLARK, T.; CHEN, J.; ROWLEY, J. D.; WANG, S. M. Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, D.C., v. 99, n. 9, p. 6152-6156, 2002.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [Oxford], v. 29, n. 9, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/>>. Acesso em: 5 maio 2016.
- PFAFFL, M. W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, Cham, v. 23, p. 275-282, 2001.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, [Oxford], v. 30, n. 9, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC113859/>>. Acesso em: 7 out. 2016.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; NEUVIANS, N. T. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Cham, v. 26, p. 509-515, 2004.
- PROMEGA. **Choosing the right reverse transcriptase**. São Paulo, 2013. Disponível em: <<https://www.promega.com/resources/pubhub/choosing-the-right-reverse-transcriptase/#referenceList>>. Acesso em: 20 jun. 2015.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4th. [Long Island]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. vol. 1, p. 345-454.
- RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J. J.; ANDRADE, M. J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. IN: BASU, C. (Ed.). **PCR primer design**. New York: Springer Science: Business Media, 2015. p. 31-56.
- STÅHLBERG, A.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. **Clinical Chemistry**, Washington, D.C., v. 50, p. 1678-1680, 2004.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Top ten pitfalls in quantitative real-time PCR primer probe design and use**. Pittsburgh, 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/rtpcr-analysis/general-articles/top-ten-pitfalls-in-quantitative-real-time-pcr-primer.html>>. Acesso em: 30 set. 2016.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W-R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 1736-1737, 2008.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; FAIRCLHOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 15, 2012. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730293>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 18, n. 7, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, D.C., v. 270, p. 484-487, 1995.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, [London], v. 10, p. 57-63, 2009.

YASUKAWA, K.; NEMOTO, D.; INOUE, K. Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. **Journal of Biochemistry**, [Oxford], v. 143, p. 261-268, 2008.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, [London], v. 13, p. 134, 2012.

ZHANG, J.; BYRNE, C.D. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. **Biochemical Journal**, London, v. 337, p. 231-241, 1999.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, New Rochelle, v. 12, n. 8, p. 1045-1062, 2005.

Glossário

ACURÁCIA: refere-se à proximidade entre medidas experimentais e a concentração real, representada em vezes a mais/menos ou estimativas de número de cópias.

AMPLICON: é o produto da PCR gerado a partir de um DNA ou cDNA alvo.

BACKGROUND ou SINAL DE FUNDO: é o sinal de fluorescência não específico da reação, também denominado ruído, proveniente do meio. É calculado e matematicamente removido pelos *softwares* dos equipamentos de qPCR.

CALIBRADOR: é amostra usada como referência em análises de quantificação relativa. O resultado final será: o gene A é Y vezes mais (ou menos) expresso em uma amostra teste em relação ao calibrador.

cDNA: DNA complementar ao RNA mensageiro.

COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R²): calculado a partir da regressão linear dos valores da curva padrão. Varia entre zero e um e é utilizado para verificar o ajuste da curva padrão aos dados observados. Quanto mais próximo a um, melhor é o ajuste. Para a qPCR recomenda-se valores maiores ou iguais a 0,985.

CONTROLE POSITIVO: reação controle em que uma quantidade conhecida da molécula alvo é usada para certificação de que os iniciadores ou iniciadores-sondas funcionam.

Cq ou Ct: é o ciclo em que o sinal da fluorescência gerada pela amplificação cruza a linha de *threshold*. Os valores de Cq são dados em uma escala logarítmica e podem ser usados diretamente, no método de Cq comparativo, ou, indiretamente, por interpolação dos dados a uma curva padrão para criar valores lineares. O termo Cq deve ser o preferencialmente utilizado, referindo-se ao ciclo de quantificação.

ΔCq: é o valor da diferença entre o Cq do gene alvo e do gene de referência. É usado para a normalização da quantidade de moléculas alvo utilizada inicialmente, $\Delta Cq = Cq_{(\text{gene alvo})} - Cq_{(\text{gene de referência})}^*$

$\Delta\Delta Cq$: é a diferença entre a o valor de ΔCq de uma amostra de interesse e da amostra calibradora usada na quantificação relativa.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{(amostra teste)}} - \Delta Cq_{\text{(amostra calibradora)}}.$$

CURVA PADRÃO: curva construída com pelo menos quatro padrões em diluições seriadas e conhecidas. Os valores de Cq são plotados em função do log da quantidade da molécula alvo. Obtém-se uma reta de regressão linear de função linear. O coeficiente angular da reta (*slope*) deve estar entre -3,6 e 3,1 e é diretamente proporcional à eficiência de amplificação.

DNA POLIMERASE: enzima que promove a síntese de DNA. Está presente em todas as células de procariotos e eucariotos. Na PCR, é utilizada a *Taq* DNA polimerase, uma enzima termoestável extraída da bactéria extremófila *Thermus aquaticus*.

EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO: é a taxa em que o amplicon é gerado, comumente medida em valor percentual durante a PCR. Se a quantidade do amplicon dobra na fase geométrica, a eficiência será de 100%.

ESPECIFICIDADE ANALÍTICA: refere-se à precisão de um ensaio de qPCR em detectar somente a sequência alvo não alvos inespecíficos presentes na amostra.

ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA: é a porcentagem de indivíduos sem um determinado fenótipo que é detectada pelo ensaio como negativo para a condição em questão.

FLUORÓFORO: é o componente ou grupo de funcional de uma molécula capaz de absorver energia a um comprimento de onda específico e emití-la em um comprimento de onda maior, de menor energia.

GENE DE REFERÊNCIA: gene utilizado para a normalização dos dados, para correção de problemas metodológicos, como erros de quantificação e qualidade do alvo.

LIMITE DE DETECÇÃO: também denominado LOD (*limit of detection*). É a concentração mínima capaz de ser detectada com precisão razoável (95% de probabilidade) em um ensaio analítico.

LINHA DE BASE (*BASELINE*): é a fluorescência de fundo emitida durante os primeiros ciclos, antes do equipamento detectar a amplificação do produto de PCR pelo sinal repórter, inerente aos produtos da reação. O valor da linha de base é usado na normalização do sinal repórter.

microRNA (miRNA): pequenas moléculas de RNA de fita simples, com comprimento variando entre 18 a 25 nucleotídeos, não codificadoras e capazes de regular a expressão gênica pela degradação das mRNAs alvos por impedir sua tradução em plantas, animais e em alguns vírus.

MOLÉCULA SILENCIADORA (*QUENCHER*): molécula localizada normalmente na extremidade 3' da sonda que é capaz de absorver a fluorescência repórter quando em proximidade (6 a 10 nucleotídeos). É também denominada molécula aceptora.

MULTIPLEX: reação de PCR em que dois ou mais pares de iniciadores são utilizados simultaneamente, gerando diversos amplicons diferentes.

NO AMPLIFICATION CONTROL (NAC): reação controle na qual são adicionados todos os seus componentes, exceto a DNA polimerase. A detecção de sinal durante a reação é um indicativo de autofluorescência da sonda, por causa da sua degradação ou contaminação no bloco do termociclador.

NO TEMPLATE CONTROL (NTC): é uma reação controle que contém todos os componentes essenciais para a amplificação, exceto a molécula alvo. Permite a identificação de contaminações.

PADRÃO: amostra com concentração, número de moléculas ou diluição conhecidas que é utilizada para a construção da curva padrão.

PCR: reação em cadeia da polimerase, em inglês, *Polymerase Chain Reaction*.

qPCR: PCR quantitativa em tempo real.

QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA: método utilizado para a determinação precisa da quantidade de moléculas, cópias ou concentração de uma molécula alvo em uma amostra, tendo como referência um padrão.

QUANTIFICAÇÃO RELATIVA: método utilizado para a determinação da concentração de uma amostra teste em relação àquela de uma amostra calibradora. Os dados gerados não são expressos em números absolutos e sim em quantidades de vezes a mais ou a menos em relação a uma amostra denominada calibradora.

REFERÊNCIA ATIVA: trata-se de um sinal ativo, gerado como resultado da amplificação por PCR, usado para normalizar os resultados do experimento. É o sinal gerado pela amplificação do gene de referência.

REFERÊNCIA PASSIVA: é um sinal de fluorescência de referência, de preferência não variável, que será utilizado para a normalização do sinal repórter. O fluoróforo usado como referência, normalmente o ROX, não participa da PCR. Esta normalização corrige flutuações do sinal da fluorescência causada por mudanças da concentração e volume da reação.

REPLICATA TÉCNICA: é a repetição de uma reação mantendo as mesmas condições. Usada para detecção de erros técnicos, como pipetagem, contaminações, problemas de leitura do aparelho etc. Recomendada em número ímpar, geralmente em triplicata.

REPLICATA BIOLÓGICA: é a repetição do experimento biológico. Na replicata biológica, as condições da reação são mantidas. O que muda é o DNA ou cDNA alvo. Exemplo: tratamento com diferentes indivíduos (cada indivíduo é uma replicata biológica). Permite a validação estatística do experimento.

REPETIBILIDADE: refere-se à variação intraexperimental. É a precisão e robustez de um ensaio com a mesma amostra analisada repetitivamente em um mesmo experimento (replicata técnica). Pode ser expressa em valores de desvio padrão ou variância de C_q ou número de cópias. O coeficiente de variação não deve ser usado para esse fim.

REPRODUTIBILIDADE: indica a variação interexperimental. Refere-se à variação nos resultados de experimentos independentes até mesmo realizados em laboratórios diferentes. É expressa em valores de desvio padrão ou variância de C_q ou número de cópias.

R_n: é a intensidade de emissão da fluorescência repórter dividida pela intensidade de emissão de fluorescência passiva.

$Rn +$: é o valor de Rn da reação que contém todos os ingredientes, inclusive a molécula alvo.

$Rn -$: é o valor de Rn de uma amostra não reagente, por exemplo, do controle negativo, sem molécula alvo.

ΔRn : é a magnitude do sinal da fluorescência gerado pela qPCR. É calculado subtraindo-se de $Rn +$ o valor de $Rn -$. Esse é o valor considerado nas quantificações.

RT-PCR: PCR que tem como alvo o produto de uma transcrição reversa, o cDNA.

ROX: 6-carboxi-X-rodamina. Utilizado como fluorescência passiva para a normalização do sinal do fluoróforo repórter e cálculo de linha de base. Há equipamentos que não requerem ROX ou qualquer outra referência passiva.

RT-qPCR ou qRT-PCR: PCR quantitativa em tempo real em que o alvo é o cDNA gerado por uma reação de transcrição reversa.

SEQUÊNCIA ALVO: sequência de DNA, cDNA, RNA ou um gene de interesse.

SINAL REPÓRTER: é aquele associado à amplificação na PCR do seu alvo, Exemplo: sinal da fluorescência do SYBR Green.

SLOPE: é o coeficiente angular da reta de regressão linear da curva padrão. Refere-se à eficiência de amplificação da PCR. Um *slope* de -3,222 indica uma eficiência de 100% (1 ou 2) em que a quantidade do amplicon dobra a cada ciclo da reação.

SENSITIVIDADE ANALÍTICA: refere-se ao número mínimo de cópias de uma amostra que pode ser mensurado com precisão.

SENSITIVIDADE CLÍNICA: refere-se à porcentagem de indivíduos com um fenótipo específico (por exemplo, portador de uma doença ou anomalia) que o método é capaz de identificar como positivo para essa condição.

SONDA DE HIDRÓLISE: sonda que tem complementaridade a uma região do amplicon e que, na fase de extensão da PCR, é hidrolisada

pela Taq DNA Polimerase, por meio de sua atividade 5' endonucleásica. É um dos sistemas de detecção mais utilizados na qPCR. Ex: *TaqMan*[®].

TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO ou *Temperature of Melting* (T_m): temperatura em que metade dos pares de bases de uma molécula de DNA encontra-se desnaturada.

THRESHOLD: nível do sinal repórter normalizado pela linha de base e referência passiva para a determinação de valores de C_q. O valor de threshold é traçado acima da linha de base e na fase exponencial da curva de amplificação. É calculado automaticamente pelos programas de análise, mas, pode ser ajustado manualmente.

TRANSCRIPTASE REVERSA: enzima capaz de promover a síntese de uma fita de DNA a partir de uma molécula de RNA.

UDG: uracil-N-glicosilase. Enzima presente em certos *míx*s para qPCR capaz de remover resíduos de uracila das moléculas de DNA. Utilizada como método para a prevenção de contaminação na qPCR oriunda de reações anteriores.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE 13549