

# PRINCIPAIS MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO EM HUMANOS

MARIANO, Paula Araújo Grein<sup>1</sup>; JESUS, Dyessica Kerolaine Oliveira de<sup>2</sup>;  
GODOY, Sara Mataroli de<sup>3</sup>

**Palavras-chave:** Microarray; qPCR; NGS.

## INTRODUÇÃO

Entretanto, devido o tempo necessário para a obtenção do diagnóstico ou mesmo à imprecisão que métodos padrão podem gerar, muitas vezes o início do tratamento é comprometido, levando à menor eficiência nas terapias adotadas. Assim, com a necessidade de aperfeiçoar diagnósticos, o uso de técnicas moleculares, especialmente as baseadas na análise de DNA, para identificação de doenças trouxe grandes avanços e perspectivas, tornando tais diagnósticos mais rápidos, específicos e sensíveis, ainda que alguns equipamentos e reagentes possam ter custo elevado (LAURI; MARIANI, 2009; DWIVEDI et al., 2017). Além das doenças infectocontagiosas, a identificação de mutações e rearranjos cromossômicos, por meio da aplicação de técnicas moleculares como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - *Polymerase Chain Reaction*) e suas variantes, o sequenciamento de DNA, FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) e microarray (microarranjos), se faz imprescindível para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças genéticas, cromossomopatias e vários tipos de câncer.

## OBJETIVO

Apresentar as vantagens da utilização de metodologias moleculares, no diagnóstico oncológico, de doenças hereditárias e infectocontagiosas de etiologia variada em humanos.

## MÉTODO

A presente pesquisa foi desenvolvida por meio de revisão bibliográfica, utilizando-se artigos disponíveis nas bases de dados científicos Scielo, Pubmed,

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [paulagrein@outlook.com](mailto:paulagrein@outlook.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [dyessicakerolaine@gmail.com](mailto:dyessicakerolaine@gmail.com)

<sup>3</sup>Orientadora. Docente Dra. do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP [godoy.sm@hotmail.com](mailto:godoy.sm@hotmail.com)

VIII Congresso Multidisciplinar/ XVI Fórum Científico/ II Simpósio Internacional da FAP - 2022 – Apucarana, PR.

Google Acadêmico, além de livros. O estudo traz o levantamento, breve descrição e aplicação dos principais métodos moleculares de diagnóstico em humanos.

## DESENVOLVIMENTO

A medicina diagnóstica oferece avanços e bons resultados para a área da pesquisa científica. Conhecido como diagnóstico genético, o diagnóstico molecular pode ser definido como uma coleção de métodos analíticos usados no exame molecular de amostras fornecidas por pessoas que têm suspeita ou sintomas de uma determinada doença. O desenvolvimento e avanço da PCR, método baseado na replicação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA, que gera bilhões de cópias de fragmentos-alvo (MULLIS, 1990), impulsionou o uso do DNA como analito na prática clínica. Exames via PCR têm sido recomendados como padrão ouro para o diagnóstico de várias doenças, como por exemplo, a tuberculose tireoidiana primária, doença rara e mal diagnosticada, que hoje pode ser facilmente identificada (SUN et al., 2022). A partir da PCR e dos avanços que ela trouxe, vários métodos diagnósticos em humanos foram desenvolvidos, como pode ser visto mais adiante.

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa (qPCR), que permite a detecção e quantificação de regiões genômicas em tempo real, foi descrita em 1993 por Higuchi e colaboradores. O procedimento é semelhante à PCR convencional, diferindo desta, por não ser necessário a realização de eletroforese para visualização do resultado, uma vez que na qPCR uso de sondas fluorescentes presentes nos fragmentos recém sintetizados de DNA, permite sua detecção e quantificação em tempo real (BURTIS; BRUNS, 2016). Em 2006, Mendy e colaboradores otimizaram um protocolo de qPCR para detecção do vírus da hepatite B. A técnica trouxe aumento na sensibilidade e permitiu uma quantificação mais precisa da carga viral, tornando a detecção mais eficiente, visto que, variantes genéticas do vírus da hepatite B podem continuar se replicado no fígado do paciente sem secretar a proteína HBeAg, utilizada para detecção sorológica do vírus. Com a quantificação precisa da carga viral, a qPCR se mostrou mais eficiente em avaliar o prognóstico a eficácia da terapia antiviral do que os marcadores sorológicos (MENDY et al., 2006).

Outro método que revolucionou a área de diagnóstico, além de inúmeras

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [paulagrein@outlook.com](mailto:paulagrein@outlook.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [dyessicakerolainee@gmail.com](mailto:dyessicakerolainee@gmail.com)

<sup>3</sup>Orientadora. Docente Dra. do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP [godoy.sm@hotmail.com](mailto:godoy.sm@hotmail.com)

VIII Congresso Multidisciplinar/ XVI Fórum Científico/ II Simpósio Internacional da FAP - 2022 – Apucarana, PR.

outras áreas, foi o sequenciamento de Sanger, utilizado rotineiramente no laboratório clínico, e que permite detectar diretamente mudanças em bases de DNA que possam alterar a codificação dos aminoácidos e, por consequência, modificar a função das proteínas (BURTIS; BRUNS, 2016). Para determinar a sequência de nucleotídeos de uma região do DNA geralmente uma PCR convencional é realizada antes, a fim de aumentar a quantidade de fragmentos-alvo. A identificação de mutações, por meio do sequenciamento de DNA, permitiu elucidar a origem de diversas doenças genéticas, bem como relacionar variantes mutantes aos sintomas apresentados. Com o método de Sanger, SVIDNICKI et al. (2018) relataram a existência de variantes mutacionais no gene responsável pela síntese de piruvato quinase, enzima cuja deficiência causa a anemia hemolítica não esferocítica. Além disso, os autores correlacionaram as variantes identificadas à gravidade do fenótipo clínico apresentado pelos pacientes.

A técnica de FISH consiste num método sensível e específico, que utiliza corantes fluorescentes para identificar alterações nos cromossomos, sendo amplamente aplicada em várias áreas, como na biologia do desenvolvimento, na citotaxonomia, melhoramento genético e citogenética clínica (GUERRA, 2004). A FISH permite maior detalhamento das alterações cromossômicas quando comparada às técnicas citogenéticas convencionais. Este método equivale a um aperfeiçoamento da hibridização *in situ* (HIS), desenvolvida em 1969 por Gall e Pardue, e permite o diagnóstico de inúmeras cromossomopatias e diferentes tipos de câncer, como por exemplo, a identificação de rearranjos no gene ALK. Alterações no gene ALK estão presentes em cerca de 3-7% dos pacientes com câncer de pulmão do tipo carcinoma de células não pequenas (NSCLC), sendo a FISH é considerada padrão ouro na identificação de tais rearranjos, o que permite a escolha mais eficiente de drogas na terapia medicamentosa (SAVIC; BUBENDORF, 2012).

Também se utilizando de corantes fluorescentes, a tecnologia de *microarrays*, ou microarranjos de DNA, proporciona a análise simultânea da expressão de milhares de genes em diversos tecidos de determinado organismo, e em diferentes estágios de desenvolvimento ou condições ambientais. Desta maneira, os microarranjos permitem avaliar concomitantemente grande quantidade de fenótipos (e mutações), tendo iniciado seu emprego no final da década de 70, com a chegada do método conhecido como *Dot-Blot* (KAFATOS; JONES;

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [paulagrein@outlook.com](mailto:paulagrein@outlook.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [dyessicakerolainee@gmail.com](mailto:dyessicakerolainee@gmail.com)

<sup>3</sup>Orientadora. Docente Dra. do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP [godoy.sm@hotmail.com](mailto:godoy.sm@hotmail.com)

VIII Congresso Multidisciplinar/ XVI Fórum Científico/ II Simpósio Internacional da FAP - 2022 – Apucarana, PR.

EFSTRATIADIST, 1979). O uso de microarrays estabeleceu-se como método de diagnóstico importante na investigação das causas de deficiência intelectual inexplicável, demora no avanço psicomotor, dificuldades linguísticas, autismo e diversas anomalias congênitas (SALDARRIAGA-GIL; COLLAZOS-SAA; RAMIREZ-CHEYNE, 2017).

A tecnologia NGS, sequenciamento de próxima geração (next-generation sequencing), possibilita maior rapidez e eficiência no sequenciamento de genomas completos, metagenomas, RNA-seq, exomas, e fragmentos alvos, dentre outros. No método de NGS, em razão do grande tamanho, os dados são incapazes de serem avaliados somente pelos olhos humanos, sendo processados por softwares mais robustos (HEATHER; CHAIN, 2016). A utilização do NGS trouxe novas perspectivas para o futuro, como a possibilidade de identificar e classificar variantes mutacionais para incontáveis genes ao mesmo tempo.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os dados aqui apresentados reúnem valiosas informações sobre os avanços biotecnológicos na área da saúde. Atualmente, diferentes técnicas moleculares de diagnóstico encontram-se disponíveis, e a escolha dessas depende da finalidade do diagnóstico, bem como do custo, tempo e sensibilidade do método. Desta forma, fica evidente que a biologia molecular é uma importante ferramenta para auxiliar na identificação de doenças genéticas, infectocontagiosas e cânceres, possibilitando diagnósticos mais rápidos e precisos, além de permitir o direcionamento de terapias mais eficientes.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BURTIS, C.A.; BRUNS, D.E. **Tietz: Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. v. 7. Texas: Elsevier, 2016.

DWIVEDI, S., et al. Diseases and molecular diagnostics: a step closer to precision medicine. **Indian J Clin Biochem**, v. 32, p. 374-398, 2017.

GUERRA, M. **FISH. Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

HEATHER, J.M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [paulagrein@outlook.com](mailto:paulagrein@outlook.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [dyessicakerolaine@gmail.com](mailto:dyessicakerolaine@gmail.com)

<sup>3</sup>Orientadora. Docente Dra. do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP [godoy.sm@hotmail.com](mailto:godoy.sm@hotmail.com)  
VIII Congresso Multidisciplinar/ XVI Fórum Científico/ II Simpósio Internacional da FAP - 2022 – Apucarana, PR.

sequencing DNA **Genomics**, v. 107, p. 1-8, 2016.

KAFATOS, F.C.; JONES, C.W.; EFSTRATIADIST, A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. **Nucleic Acids Research**, v.7, p.1541-1552, 1979.

LAURI, A.; MARIANI, P.O. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. **Genes Nutr**, v. 4, p. 1-12, 2009.

MENDY, M.E., et al. Application of real-time PCR to quantify hepatitis B virus DNA in chronic carriers in The Gambia. **Virology Journal**, v. 3, p. 1-7, 2006.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Ann Biol Clin**, v. 48, p. 579-582, 1990.

RUBIO, S., et al. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. **Univ. Med.**, v. 61, p. 49-63, 2020.

SALDARRIAGA-GIL, W.; COLLAZOS-SAA, L.; RAMIREZ-CHEYNE, J. Síndrome de Cohen diagnosticado con hibridación genómica comparativa por microarreglos. **Latreia**, v. 30, p. 455-462, 2017.

SAVIC, S.; BUBENDORF, L. Role of Fluorescence in situ Hybridization in Lung Cancer Cytology. **Acta Cytologica**, v. 56, p. 611–621, 2012.

SVIDNICKI, M.C.C.M., et al. Novel mutations associated with pyruvate kinase deficiency in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell The.**, v. 40, p. 5-11, 2018.

SUN, L-L., et al. Clinical diagnosis and treatment of primary thyroid tuberculosis: a retrospective study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 140, p. 547-552, 2022.

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [paulagrein@outlook.com](mailto:paulagrein@outlook.com)

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. [dyessicakerolaine@gmail.com](mailto:dyessicakerolaine@gmail.com)

<sup>3</sup>Orientadora. Docente Dra. do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP [godoy.sm@hotmail.com](mailto:godoy.sm@hotmail.com)