

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE BIOMEDICINA
MIRELLY CRISTINA DA SILVA

ANÁLISE DE TÉCNICAS MOLECULARES E SUA IMPORTÂNCIA NA
BIOMEDICINA

FORMIGA – MG
2017

MIRELLY CRISTINA DA SILVA

ANÁLISE DE TÉCNICAS MOLECULARES E SUA IMPORTÂNCIA NA
BIOMEDICINA

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Biomedicina do UNIFOR-MG,
como requisito parcial para obtenção de
título de bacharel em Biomedicina.
Orientadora: Dra. Lília Rosário Ribeiro.

FORMIGA – MG

2017

S586 Silva, Mirelly Cristina da.
Análise de técnicas moleculares e sua importância na biomedicina /
Mirelly Cristina da Silva. – 2017.
50 f.

Orientadora: Lília Rosário Ribeiro.
Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina)-Centro Universitário
de Formiga-UNIFOR, Formiga, 2017.

1. Biologia molecular. 2. Citogenética. 3. Genética. I. Título.

CDD 572.8

MIRELLY CRISTINADA SILVA

ANÁLISE DE TÉCNICAS MOLECULARES E SUA IMPORTÂNCIA NA
BIOMEDICINA

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Biomedicina do UNIFOR-MG,
como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Lília Rosário Ribeiro
Orientadora

Prof^a. Dra. Daniela Rodrigues de Faria Barbosa
UNIFOR-MG

Prof^a.Ma. Tânia Aparecida de Oliveira Fonseca
UNIFOR-MG

Formiga, 10 de novembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de cursar Biomedicina e por proporcionar que cada obstáculo fosse ultrapassado.

Aos meus pais Juliana e Elder, por todo amor a mim concedido. Essa conquista é de vocês, obrigada por tudo!

Aos meus amigos Helder, Thaíza, Rhayane, Christian, Amanda, Thainá, Nathália, Poliana e Bruna, pela amizade, momentos descontraídos e por estarem comigo a tanto tempo.

Aos meus amigos de curso, Lorena, Sarah, Gabriella, Camila, Douglas, Dayane, Rosielle e Leila, pelos quatro anos maravilhosos que passamos juntos. Que nossa amizade nunca acabe.

A minha amiga Elciane, pelas orações e todo apoio.

A minha família, tios e primos, pelos incentivos.

Aos professores, por todo auxílio e aprendizado.

E por fim, a minha orientadora Lília, pela dedicação, motivação e por sempre acreditar na minha capacidade, tornando possível a conclusão dessa etapa.

RESUMO

A biologia molecular é uma das áreas que estão em mais constante avanço, podendo ser utilizada na saúde, pecuária, agricultura ou indústria. Na saúde, o diagnóstico molecular apresenta importância significativa mediante o rápido e sensível resultado perante as doenças ou comparações genéticas. Diante disso, o presente trabalho apresenta algumas técnicas capazes de proporcionar esses benefícios, como a PCR convencional, que utiliza um termociclador permitindo alternâncias de temperatura que visam a replicação de partes específicas do DNA, a eletroforese em gel, que possibilita a separação de bandas de acordo com o tamanho através de impulso elétrico, a PCR multiplex, que permite à amplificação simultânea de materiais genéticos distintos ou sequências variadas de um mesmo organismo, a PCR em tempo real, que proporciona a quantificação da intensidade fluorescente detectada em tempo real durante a amplificação, sendo esta referente ao produto gerado, a FISH, que permite a identificação de partes específicas de DNA ou RNA através da utilização de sondas fluorescentes, a genética forense, que permite identificar e incriminar indivíduos suspeitos e crimes, acariotipagem humana, que possibilita a comparação citogenética das espécies, o diagnóstico pré-implantacional, que proporciona a análise de células embrionárias com o intuito de evitar um embrião portador de alguma anomalia genética e os marcadores moleculares que conseguem identificar a variabilidade genética permitindo a comparação entre indivíduos ou relação com supostas doenças. Essas técnicas são de extrema importância na detecção prévia de doenças infecciosas e genéticas, além de ser eficaz na comparação genética de uma mesma espécie, visando sempre a capacitação do Biomédico, quesito crucial que reduz a taxa de erros.

Palavras-chave: Biologia Molecular.Citogenética.Genética.

ABSTRACT

Molecular biology is one of the areas that are in constant progress, and can be used in health, livestock, agriculture or industry. In health, molecular diagnosis is significant because of the rapid and sensitive result in disease or genetic comparisons. Therefore, the present work presents some techniques capable of providing these benefits, such as conventional PCR, which uses a thermocycler allowing temperature alternations that aim at the replication of specific parts of the DNA, the gel electrophoresis, that allows the separation of bands of multiplex PCR, which allows the simultaneous amplification of distinct genetic materials or varied sequences of the same organism, real-time PCR, which provides quantification of the fluorescent intensity detected in real time during amplification, which refers to the generated product, FISH, which allows the identification of specific parts of DNA or RNA through the use of fluorescent probes, forensic genetics, which allows to identify and incriminate suspects and crimes, human karyotyping, which enables the cytogenetic comparison of the species, -implantacional, which provides analysis of embryonic cells in order to avoid any carrier embryo genetic anomaly and molecular markers that can identify the genetic variability allows for comparison between individuals or related to alleged diseases. These techniques are extremely important in the prior detection of infectious and genetic diseases, as well as being effective in the genetic comparison of the same species, always aiming at Biomedical training, a crucial issue that reduces the error rate.

Keywords: Molecular Biology. Cytogenetics. Genetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	13
Figura 2: PCR transcrição reversa	16
Figura 3: Eletroforese em gel	18
Figura 4: Emissão de fluorescência da PCR em tempo real	21
Gráfico 1: Quantificação de DNA alvo amplificado	21
Figura 5: Etapas da Hibridização <i>in situ</i>	23
Figura 6: Teste de paternidade positivo e negativo	27
Figura 7: Cariograma humano	29
Figura 8: Idiograma humano	29
Figura 9: Representação esquemática do <i>Slippage</i>	34
Figura 10: <i>Southern blotting</i>	35
Figura 11: Polimorfismo em base única (G-A)	36

LISTA DE SIGLAS

cDNA - DNA complementar
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos
DST's - Doenças sexualmente transmissíveis
HPV - Papiloma vírus humano
mPCR - PCR multiplex
Pb - Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
qPCR - PCR em tempo real
RFLP – Polimorfismo em comprimentos de
fragmentos de restrição
RNA - Ácido ribonucleico
rRNA - RNA ribossômico
SNP - Polimorfismo mononucleotídeo
STR - Microssatélites

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	METODOLOGIA.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	Reação em Cadeia da Polimerase.....	12
3.2	Eletroforese em Gel.....	17
3.3	PCR Multiplex.....	19
3.4	PCR em Tempo Real.....	20
3.5	FISH.....	23
3.6	Genética Forense.....	25
3.7	Citogenética e Cariotipagem Humana.....	27
3.8	Diagnóstico Pré-Implantacional.....	31
3.9	Marcadores Moleculares.....	32
4	DISCUSSÃO.....	37
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia consiste na utilização de organismos vivos para o desenvolvimento de produtos com a finalidade de proporcionar bem-estar ao homem (OLIVEIRA; SPENGLER, 2014). Todavia, Borém, Santos e Pereira (2016), ressaltam que a biotecnologia trabalha a nível molecular de forma que são estudados tanto os genes como seus produtos, as proteínas.

A biotecnologia ainda se qualifica por abranger técnicas que são desenvolvidas com o intuito de solucionar questões biológicas, fornecendo o conhecimento em áreas distintas, no qual, abrange a saúde humana, pecuária, agricultura, bioenergia, entre outros (OLIVEIRA; RAMOS, 2016).

A área responsável pela manipulação de DNA ou RNA é denominada engenharia genética, a qual, desenvolve genes artificiais que são transferidos para outros organismos (BORÉM; SANTOS; PEREIRA, 2016; MELO, 2006). Dessa forma, a biologia molecular atua na utilização de técnicas provenientes do uso de amostras biológicas contendo material genético procedente de células (BRUNO, 2017).

As células armazenam em seu interior o material genético que se constitui em milhões de pares de bases, mas para compreender como ocorre todo o processamento genético, são necessárias técnicas eficazes e especializadas. As criações de todas essas técnicas impulsionaram a otimização da biologia molecular nas últimas décadas, possibilitando que as barreiras adquiridas pelos métodos diagnósticos convencionais sejam ultrapassadas (GATTÁS; SEGRE; FILHO, 2002; RAMOS, 2012; WATSON et al., 2006).

Com o surgimento de doenças infecciosas e genéticas, tornou-se importante a inclusão de métodos moleculares no diagnóstico das mesmas, pois contribuem na rápida intervenção e apresentam elevada sensibilidade (MELO, 2006). No entanto, esses procedimentos também são essenciais na área biológica na detecção de espécies de animais ou plantas, na agropecuária melhorando a resistência dos animais a determinadas doenças, transgenia ou identificação de patógenos, na agricultura com controle de qualidade e melhoramento genético (CORDEIRO, 2011).

Diante da importância da biologia molecular na Biomedicina, o presente trabalho possui o objetivo de enfatizar as técnicas moleculares através da revisão bibliográfica destacando sua importância no diagnóstico de doenças, visto que, quando prévio, o método terapêutico se torna mais eficaz perante o diagnóstico tardio, minimizando a possibilidade de contágio de doenças infecciosas além de contribuir na melhoria do estilo de vida de indivíduos portadores de doenças genéticas, que são decorrentes de alterações nas sequências de leitura das proteínas e ainda possibilitar a comparação genética entre indivíduos de uma mesma espécie. Contudo, observa-se que as técnicas citadas são de grande importância para o biomédico, de modo que, abrange as áreas de atuação como ciência forense, análises clínicas, reprodução humana, citogenética, biotecnologia e biologia molecular.

2 METODOLOGIA

O estudo proposto se constitui de uma pesquisa bibliográfica e descritiva, sendo desenvolvido mediante trabalhos publicados como artigos, livros, monografias e teses (BORGES; ALENCAR, 2014). Segundo Prodanov e Freitas (2013), a revisão bibliográfica permite a avaliação do produto de pesquisas antecedentes, enfatizando conceitos, discussões, procedimentos, resultados e conclusões. A utilização da metodologia ocorre devido ao fato do objeto de estudo estar disponível em materiais bibliográficos, possibilitando maior amplitude de informações que viabilizam a extensão do conhecimento referente ao objeto de estudo (LIMA; MIOTO, 2007).

De acordo com Rampazzo (2005), a pesquisa descritiva enfatiza a descrição precisa de como o fenômeno ocorre, frequência, sua relação com a comunidade e características. Contudo, tem como finalidade entender e esclarecer a veracidade dos fenômenos sem modificá-los, buscando descrevê-los e interpretá-los através das características apresentadas (VIEIRA, 2002).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR, Reação em Cadeia da Polimerase, é uma técnica utilizada na área da biologia molecular com intuito de reproduzir cópias referentes a partes de DNA e RNA, tanto para correlacionar porções referentes ao DNA, como também para analisar sua abundância (COELHO, 2013). Descrita por Kary Mullis em meados dos anos 80, o procedimento foi considerado uma revolução da época e tornou-se precursor para a elaboração de outras técnicas que seriam utilizadas em humanos, transgênicos e animais (PAULA; FERREIRA, 2015).

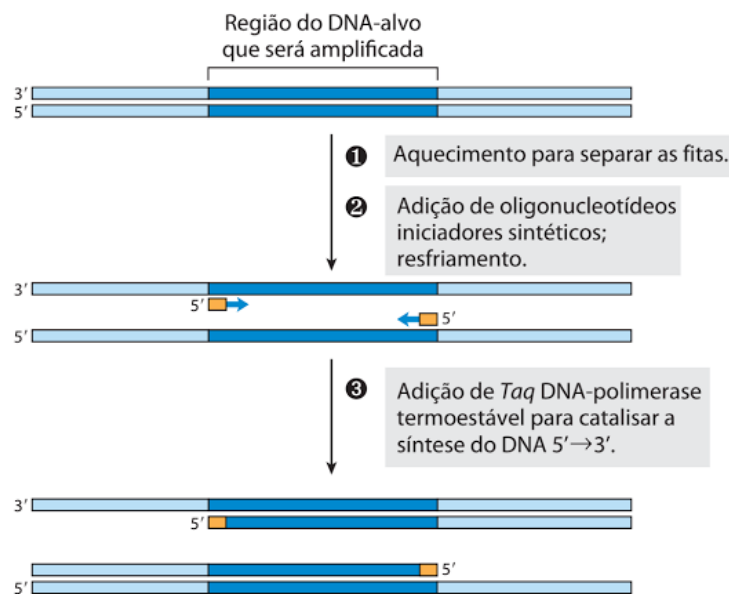
O aparelho responsável pela realização da PCR é o termociclador, que possibilita as alternâncias da temperatura e nele são inseridos microtubos portando reagentes e água ultrapura (BRUNO, 2017). Os elementos essenciais para a amplificação são o DNA, DNA polimerase (Taq polimerase, obtida da bactéria *Thermusaquaticus*), *primers* (responsáveis por identificar a sequência que será ampliada), tampão (incumbido de preservar o pH apropriado além da temperatura dos *primers*), magnésio (promove sustentabilidade aos íons durante a ação da Taq polimerase) e os dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato do DNA – dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015).

A utilização da técnica é de grande sucesso mediante sua agilidade e simplicidade, portanto, sua replicação é seletiva e só ocorrerá em um determinado ponto do segmento (NAOUM, 2001). Diante disso, são desenvolvidos *primers*, oligonucleotídeos inseridos no sentido 5'→3' que apresentam em sua extremidade 3' uma hidroxila livre, responsável pela ligação da DNA polimerase iniciando a replicação (MALACINSKI, 2005). Dessa forma, são criados aproximadamente 15-25 nucleotídeos que se ligam a fita que possui o fragmento alvo da fita complementar (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015).

A PCR (FIG. 1) ocorre mediante alterações de temperatura e conforme Camargo e Silva ([2016]), as seguintes etapas são necessárias: desnaturação, anelamento e extensão. A desnaturação ocorre em temperatura de 92°C a 96°C, onde haverá o rompimento das pontes de hidrogênio, separando as fitas complementares. O anelamento se determina pela utilização de *primers* que

anelarão a fita recém desnaturada ocorrendo a duplicação do DNA em temperatura de 58°C a 65°C e na extensão a Taq polimerase é acrescentada possibilitando a ampliação do molde a partir da utilização de dNTP's, em temperatura de 72°C. Logo após ocorre a desnaturação novamente que será utilizada como molde para o próximo ciclo que irá se iniciar. A técnica procede cerca de 30 a 35 vezes.

Figura 1: Etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).



Fonte: NELSON; COX, 2014, p. 328.

A probabilidade de erros da Taq polimerase no momento da incorporação de nucleotídeos é induzida pelas circunstâncias proporcionadas pela reação, como dNTPs, temperatura, concentração de cloreto de magnésio e Ph (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006).

A preparação da PCR se embasa no emprego de vários reagentes que contém concentrações apropriadas para a análise. Existem comercialmente kits de PCR com reagentes ideais e padronizados. Após a extração, deve ser analisada a quantidade e qualidade do DNA obtido a fim de evitar problemas na amplificação (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015).

Segundo Cury, Furuse e Araújo (2005), a preparação da PCR é iniciada com a extração do DNA, que pode ser coletado de líquidos corporais e tecidos secos com ou sem parafina e coloração. Posteriormente à extração de DNA, em tubos de PCR ou de microcentrifugação incorporados desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) junto

ao DNA molde promovendo energia além de sua importância na produção da fita de DNA complementar.

A PCR possui variadas aplicabilidades e, em relação à hematologia, o rápido diagnóstico traz benefícios para o paciente desde o pré-natal, visto que, são diversas as doenças hematológicas existentes e de modo geral, esta técnica possibilita a detecção de inserções, deleções ou mutações em genes responsáveis pelas funções hematológicas (NAOUM, 2001). Um exemplo é a anemia falciforme, caracterizada pela substituição do aminoácido ácido glutâmico por uma valina (GAG>GTG), na posição 6 da cadeia beta, originando a hemoglobina S (HbS), responsável por apresentar sintomas moderados ou graves (ZAMARO et al., 2002). O diagnóstico é realizado para comprovar a anemia drepanocítica no período neonatal ou durante o pré-natal além de distinguir a anemia falciforme da beta talassemia, uma vez que a anemia falciforme é ocasionada por uma disfunção qualitativa na funcionalidade e síntese inadequada da globina e a talassemia um defeito quantitativo devido a redução da síntese das globinas (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015).

Na alfatalassemia, o indivíduo não possui funcionalmente os genes α da globina e conforme a quantidade de deleções, a doença pode ser alfatalassemia⁺ (um gene inativo e três ativos – portador silencioso), alfatalassemia⁰ (dois genes inativos e dois ativos – traço alfatalassêmico), doença por hemoglobina H (três genes inativos e um ativo) ou hidropisia fetal por hemoglobina Bart (incapacidade da síntese de cadeia α) (CANÇADO, 2006). Contudo, o diagnóstico apresenta certa dificuldade devido ao fato de somente a doença por hemoglobina H e a hidropisia relatarem alterações clinicamente significativas, tornando importante a pesquisa por deleções através da PCR (BEZERA, 2009).

A betatalassemia é provocada mediante defeito ou ausência da síntese de cadeias β das globinas, podendo ser classificada em homozigótica ou major e heterozigótica ou minor. No caso da homozigótica, ocorre a acumulação de cadeias alfas livres originando tetrâmeros alfa que provocam hemólise quando precipitados, já a heterozigótica é mais branda e geralmente os pacientes são assintomáticos (TORRES, 2016). No diagnóstico é possível a análise de aproximadamente 619 deleções além da detecção de mutações *frameshift* (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015).

Na hemocromatose hereditária ocorre a mutação do gene HFE localizado no braço curto do cromossomo 6 sendo considerada uma enfermidade autossômica recessiva responsável pela elevação da absorção de ferro no intestino e retenção do mesmo em tecidos ou órgãos como coração, fígado, pâncreas, articulações e pele podendo provocar lesão tecidual e celular, incapacidade da funcionalidade ou fibrose (BONINI-DOMINGOS, 2007). Neste caso, o diagnóstico ocorre por meio do reconhecimento das mutações C282Y, H63D e S65C no gene HFE, no qual, a mutação C282Y é designada pela transição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 845 ocasionando a substituição de uma tirosina por uma cisteína, já na mutação H63D ocorre a transversão de uma de uma citosina por uma guanina no nucleotídeo 187 resultando na troca do ácido aspártico por uma histina e na mutação S605C consiste na substituição de uma serina por uma cisteína (VALADÃO et al., 2014).

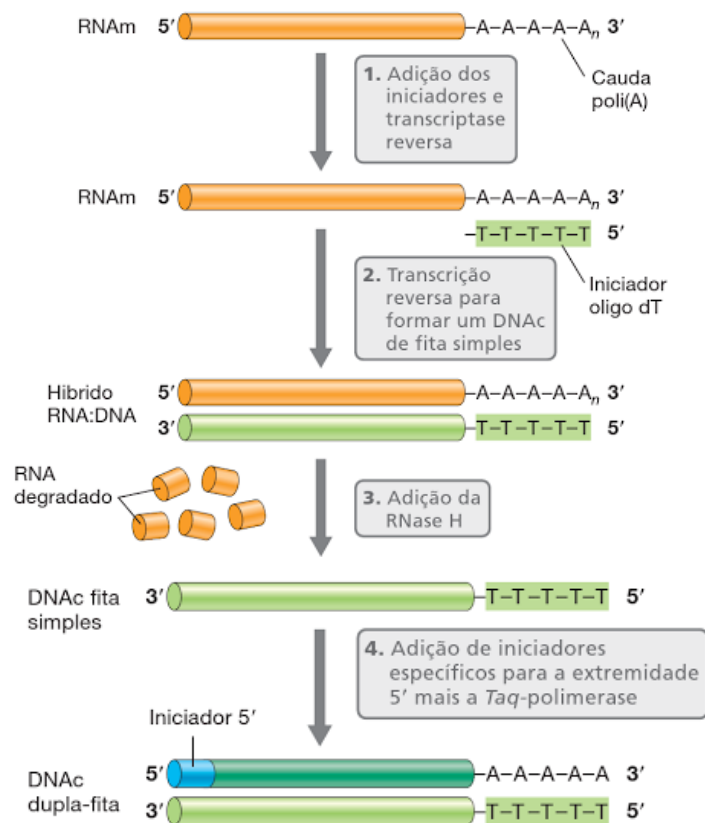
Na microbiologia clínica, são utilizados *primers* específicos para cada tipo de patógeno independentes de culturas ou respostas imunológicas do indivíduo (MADIGAN et al., 2016). Em relação às bactérias, o ribossomo possui a subunidade maior (50S) composto pelo rRNA 23S e 5S e a subunidade menor, constituído pelo rRNA 16S (SANTOS, 2011). Geralmente, a região 16S é utilizada para o desenho dos *primers* devido a quantidade reduzida de mutações e por possuir partes responsáveis pela distinção de gêneros ou espécies, contudo, pode ser codificada a região intergênica do rRNA de 16S e 23S em virtude do elevado número de cópias (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015).

A região 16S do rRNA possui aproximadamente 1550 pb que se dispõem em áreas conservadas e variáveis, responsáveis pela especificidade de cada bactéria, portanto, a pesquisa da região 16S é mais utilizada para o estudo da filogenia quando comparado com a análise entre a região 16S e 23S, portanto, aquelas espécies sem identificações devem passar pela análise do sequenciamento do gene 16S para serem reconhecidas e identificadas (CAMACHO, 2010).

Em relação aos vírus, a PCR convencional permite a identificação da carga viral independente dos níveis adquiridos de tecidos e células (RODRIGUES et al., 2009). Contudo, ressalta-se que os vírus podem ser compostos tanto por DNA como RNA e para a identificação de um patógeno com material genético de RNA é fundamental que a PCR seja realizada posteriormente à transcrição reversa, a qual,

se baseia no uso da enzima transcriptase reversa com o intuito de copiar o RNA em DNA complementar que se tornará o alvo da PCR (FIG 2) (CAVALCANTI et al., 2008). A importância da técnica também se associa ao fato do difícil diagnóstico sorológico e da resistência viral ser tratada de modo mais acessível (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015). No caso do HPV (Papiloma vírus humano) são utilizados dois tipos de *primers*, MY09 e MY11, que se ligam a porções conservadas do vírus contendo cerca de 450 pb. A importância se baseia na detecção do vírus em seus variados estágios em células cervicais coletadas a partir de lesões uterinas (NONNENMACHER et al., 2002).

Figura 2: PCR transcrição reversa.



Fonte: MADIGAN et al., 2016, p. 320.

Os fungos também podem ser identificados através da criação de *primers* específicos, tornando o diagnóstico promissor devido ao fato da grande maioria dos casos serem assintomáticos. Dessa forma, a disseminação do microorganismo pelo corpo é evitada pela via hematogênica, além da sua eficácia no diagnóstico de

Pacientes imunocomprometidos como: transplantados, queimados, portadores de cânceres ou HIV (PEREIRA, 2010).

Na parasitologia, sua relevância baseia-se na possibilidade de monitoramento quanto à presença e comprovação da doença independente do estágio e principalmente quando os testes sorológicos são imprecisos (CAMARGO; SILVA, [2016]). Contudo, essa técnica indica apenas um resultado qualitativo (MARQUES, 2016). Um exemplo é o *Toxoplasma gondii*, que possui como principal alvo o gene B1 que apresenta uma porção repetida 35 vezes no genoma do parasito (MESQUITA, 2010).

Em relação a tumores e cânceres, a técnica de PCR identifica mutações genéticas que variam de deleções, inserções ou alteração de um único nucleotídeo que motivam o desenvolvimento da doença, mediante a isso, é possível estabelecer um diagnóstico precoce, tratamento menos invasivo e o monitoramento eficaz da doença (MOREIRA, 2014).

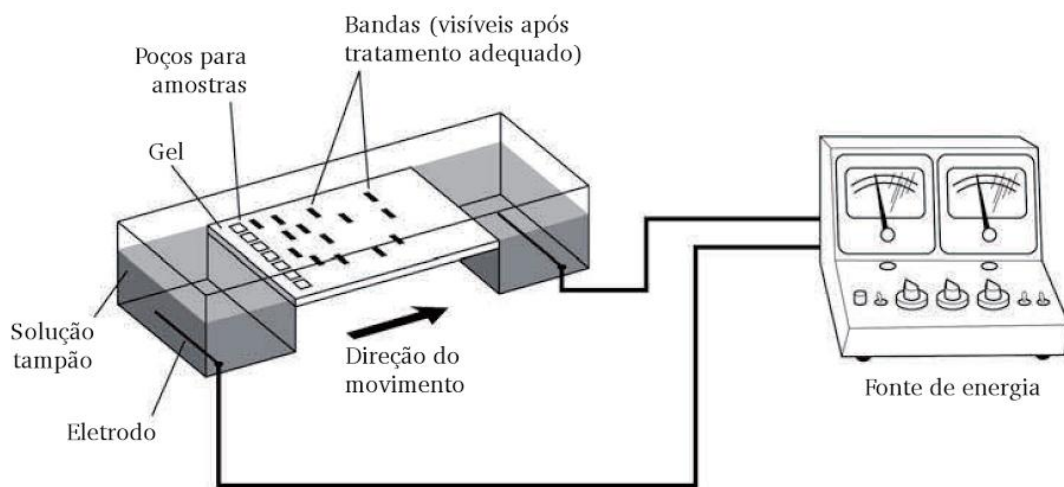
Os processos da PCR tornaram viáveis as realizações de testes de paternidade até mesmo em circunstâncias como óbito do suposto pai (PENA, 2009). Em situações de falecimento e material genético degradado, são coletadas amostras biológicas dos supostos avós paternos e a exclusão da paternidade ocorre quando não existe alelo em comum entre ambas as partes, mas podem ser coletadas amostras de supostos irmãos paternos ou tios, contudo, os índices são menores devido ao fato de não identificar se os alelos são maternos ou paternos para confirmação do parentesco (JOBIM et al., 2008).

3.2 Eletroforese em Gel

A eletroforese é uma técnica que promove a visualização do produto final da PCR convencional por meio da separação do material genético de acordo com o tamanho. As moléculas de DNA possuem cargas negativas proporcionando a migração para o lado positivo do gel através de um impulso elétrico (FIG. 3) (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015). Neste caso, o DNA é transferido para o gel com um tampão capaz de manter o pH ideal e conduzir a eletricidade (HEPP; NONOHAY, 2016). Esses géis são constituídos por substâncias como agarose e poliacrilamida,

denominados polímeros, sendo estes elementos essenciais para tornar a matriz homogênea (PIMENTEL, 1988). A técnica pode ser utilizada com moléculas de RNA, entretanto, devem ser tratadas com reagentes que impeçam a formação de estruturas secundárias que são responsáveis pela interferência na motilidade pelo gel, como o glioxal que age impedindo o pareamento das bases nitrogenadas (WATSON et al., 2006).

Figura 3: Eletroforese em gel.



Fonte: HARTL; CLARK, 2010, p. 34.

A separação do DNA ocorre de acordo com o tamanho, permitindo a migração de moléculas para o lado contrário do gel, proporcionando assim, as frações de pesos e tamanhos diferentes (MAGALHÃES et al., 2005). Entretanto, as moléculas que possuem o mesmo tamanho migram paralelamente e estacionam na mesma posição, formando bandas de mesmo tamanho e peso molecular (HEPP; NONOHAY, 2016). Após a eletroforese ocorre a visualização das moléculas de DNA que foram coradas com corantes fluorescentes, geralmente brometo de etídeo quando o gel for de agarose e nitrato de prata quando for de poliacrilamida, unindo ao DNA gerando bandas (WATSON et al., 2006).

O que diferencia um gel de outro é exatamente a proporção de pares de bases que ambos suportam (MAGALHÃES et al., 2005). Os géis de poliacrilamida e agarose podem ser produzidos em diversos tamanhos, porosidades e formas, no entanto, os parâmetros são escolhidos de acordo com o tamanho dos fragmentos. O

gel de poliacrilamida é apropriado para separar pequenos fragmentos, com cerca de 5-500 pb (LEITE et al., 2013). No gel de agarosea concentração pode variar de acordo com a precisão, portanto, em baixas concentrações apresenta utilidade na separação de fragmentos grandes e em altas concentrações mostra eficácia em separação de fragmentos pequenos. Contudo, quando as moléculas possuem um elevado peso molecularé indicada a utilização da eletroforese em gel de campo pulsado (STRACHAN; READ, 2013).

De acordo com Magalhães et al. (2005), na eletroforese de gel em campo pulsado o material genético é reorientado após a fase estacionária. Neste caso os fragmentos maiores demoram mais para se reorientar devido a adaptação com o novo percurso.

Os géis de poliacrilamida e agarose requer uma marcação ou coloração do DNA separado, de forma que, quando submetido a luz ultravioleta tornem possível a visualização das bandas (ALBERTS et al., 2017).

A aplicação da eletroforese em gel ocorre mediante a extração do DNA e o produto da PCR convencional, onde será permitida a visualização das bandas conforme os locais de ligação dos *primers* quando expostas a luz ultravioleta, promovendo um resultado qualitativo, entretanto, a técnica também pode ser utilizada em RNA e proteínas (HEPP; NONOHAY, 2016).

3.3 PCR Multiplex

A PCR multiplex (mPCR) é uma das diversas modificações da PCR convencional, no entanto, é caracterizada por aplicar maior quantidade de *primers* em uma única reação, permitindo que a ampliação seja realizada de forma simultânea além de requerer menor custo quando comparado com outras técnicas moleculares (BASTOS, 2008). O procedimento permite a amplificação simultânea das porções alvo de organismos distintos ou de várias sequências de um mesmo organismo (SILVA, 2010).

Para haver uma amplificação eficaz é necessário não haver interações entre os *primers*, sendo cada um para seu determinado alvo (RAMOS, 2012). São inseridos *primers* com alvos distintos em um único microtubo, devido a isso, são necessários cuidados com a temperatura durante o anelamento e estes devem

originar produtos com tamanhos diferentes e especificidade quanto ao anelamento de cada sequência alvo (ROCCHETTI, 2011).

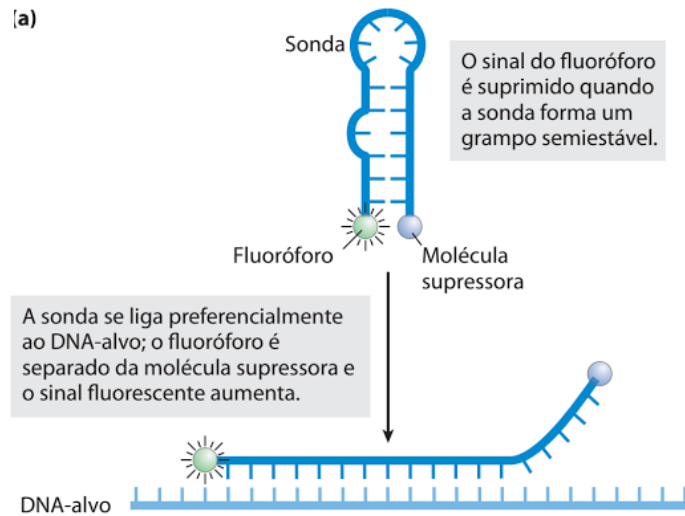
A elaboração dessa técnica teve como objetivo distinguir gêneros ou espécies microbianas com a vantagem da rapidez no resultado e conseqüentemente o menor gasto de reagente enquanto são ampliadas as áreas específicas (HAAS; TORRES, 2016). Ressalta-se que com todas as vantagens, a técnica permite um tratamento precoce e correto, decréscimo em dias de internações sem comprovação diagnóstica e diminuição da taxa de mortalidade especialmente em indivíduos imunodeprimidos (LIMA, 2010).

A mPCR é recomendada na identificação de vários genótipos de forma simultânea sendo importante na pesquisa de cepas resistentes a antibióticos, na identificação de bactérias patogênicas responsáveis por sepse e testes de paternidade (ANDRADE, 2009; MENEZES et al., 2015; RAMOS, 2012). De um modo geral, sua utilização é realizada em grande maioria na distinção microbiana (LIMA, 2010).

3.4 PCR em Tempo Real

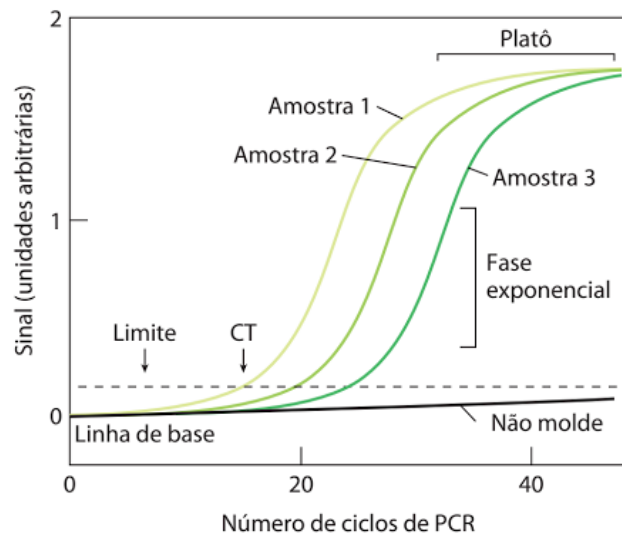
A técnica de PCR em tempo real (qPCR) é considerada um procedimento quantitativo, o qual, permite a obtenção de um rápido resultado (HAAS; TORRES, 2016). A técnica visa a quantificação dos produtos obtidos através da amplificação das fases da PCR. Nesse caso, o acúmulo das amplificações é reconhecido em tempo real em cada ciclo da técnica (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015). Sondas são ligadas a compostos fluorescentes permitindo que a intensidade da fluorescência seja detectada (JANEIRO, 2012), possibilitando a quantificação eficaz do número de cópias do gene alvo, sendo a fluorescência proporcional ao produto da PCR (FIG. 4 e GRAF. 1) (RAMOS, 2012).

Figura 4: Emissão de fluorescência da PCR em tempo real.



Fonte: NELSON; COX, 2014, p. 331.

Gráfico 1: Quantificação de DNA alvo amplificado.



Fonte: NELSON; COX, 2014, p. 331.

A qPCR identifica e quantifica a fluorescência das partes amplificadas do DNA, diante disso, o termociclador capta a fluorescência através de um sistema óptico enquanto um computador recebe os dados e analisa a reação por meio de um software específico (LIPAY; BIANCO, 2015).

A quantificação é realizada quando os fragmentos amplificados pela PCR são correspondentes à quantidade de *primers* inseridos na amostra. A qPCR proporciona a verificação durante a amplificação, ao contrário da PCR convencional

que permite a análise após o processo de amplificação (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015).

Essa técnica fornece a ampliação seletiva de regiões exclusivas, porém deve ser realizada com equipamentos adequados e sondas apropriadas (LEITE et al., 2013). São utilizados corantes que intercalam no DNA, possibilitando sua detecção. As sondas mais utilizadas são a Taqman, específica que apresenta um fluoróforo na extremidade 5' da sonda que hibridiza a fita complementar e o SYBRGreen, uma sonda não específica que se liga ao DNA de fita dupla da amostra, emitindo fluorescência através da excitação da própria luz do termociclador (SILVA; RIBEIRO NETO, 2015).

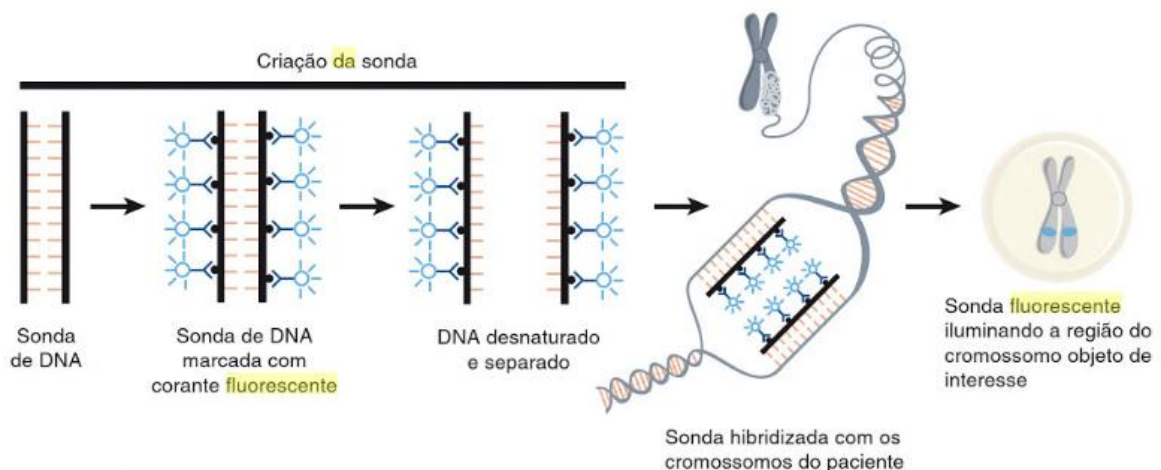
As aplicações da qPCR são variadas, contudo, a técnica se mostrou extremamente eficiente em casos de diagnóstico genético pré-implantacional com o propósito de identificar doenças antes da implantação de embrião *in vitro*. É utilizada também na detecção e quantificação da sensibilidade da metilação do DNA, sendo esta, uma alteração química do nucleotídeo importante na leitura e interpretação do DNA pelas células (como ocorre no câncer), na genotipagem identificando mutações responsáveis pelo desenvolvimento de doenças genéticas, na dosagem gênica em casos de trissomias, monossomias ou deleções gênicas, na oncologia clínica para detecção de células com genes tumorais, na quantificação viral e de proteínas, identificação microbiológica de bactérias e em transplantes, através análise de moléculas citolíticas e apoptóticas responsáveis pelas rejeições (OLIVEIRA, 2010). Além disso, a técnica é muito usada na área forense utilizando tanto o DNA genômico como o DNA mitocondrial, expressando um resultado mais rápido (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015).

Essa técnica também é utilizada no diagnóstico de DST's, visto que possibilita a identificação do agente causador da doença mesmo quando o paciente estiver em janela imunológica (JANEIRO, 2012). Em relação aos vírus é possível detectar quantidades mínimas, sendo muito utilizado em casos de dengue para a identificação do sorotipo e em infecções hematológicas (GROCHOCKI, 2016; ROCCHETTI, 2011).

3.5 FISH

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente– FISH, é um procedimento citogenético que possibilita a identificação de um trecho específico do DNA ou RNA e dessa forma, uma sonda marcada com corante fluorescente é hibridizada com o intuito de indicar a sequência que complementa a sonda (FIG. 5). A técnica é realizada em uma lâmina, por esse motivo o nome *in situ*, que diz respeito a tecidos e preparações citológicas, nos quais, os cromossomos são espalhados, desnaturados e hibridizados mostrando fluorescência (ALMEIDA; FORMIGA, 2010). A vantagem de sua utilização deve-se à possibilidade de visualizar os ácidos nucléicos na metáfase, sem a necessidade de danificar a célula (NEVES; GUEDES, 2012).

Figura 5: Etapas da Hibridização *in situ*.



Fonte: CUNNINGHAM et al., 2016, p. 276.

A hibridização fluorescente *in situ* se baseia em quatro etapas, sendo estas: fixação da amostra, hibridização das sondas, lavagem para retirar o excesso de sondas e visualização pelo microscópio de fluorescência (FOPPA, 2009). Contudo, se as sondas não forem específicas e não houver a complementariedade dos nucleotídeos, não haverá hibridização e a sonda será desprezada na etapa de lavagem (SANTOS, 2011).

A FISH tem como fundamento as particularidades recombinantes do cDNA. Criada por volta de 1960, esta técnica tem favorecido a evolução da ciência, contudo, somente por volta de 1980 o método foi utilizado em maior demanda junto com a avançada tecnologia da época (PINTO-MAGLIO, 2011).

O diferencial da técnica é sua eficiência em identificar anormalidades relacionadas ao cromossomo, “esta técnica permite detectar uma translocação em qualquer região de qualquer cromossomo, podendo ser no braço curto, no braço longo ou, até mesmo, na região centromérica.” (MONTENEGRO; SANTOS; VEITH, 2008, p. 6).

Essa técnica é muito utilizada e suas aplicações são variadas:

- Classificação de leucemias através da análise das translocações e inversões apresentadas em cada tipo de leucemia (QUIXABEIRA; SADDI, 2008);
- Investigação de microdeleções responsáveis por síndromes como a de Angelman e Prader-Willi que ocorre no cromossomo 15 (FOPPA, 2009);
- Identificação de deleções e ampliações de genes específicos, além de sua eficiência no reconhecimento de monossomias e trissomias nos cromossomos (NAOUM, 2001). Um exemplo de amplificação é o gene HER2 que se apresenta em excesso em pacientes com carcinoma mamário (FOPPA, 2009).

Segundo Neves e Guedes (2012), a FISH também pode ser usada no diagnóstico patológico de microrganismos e, conforme Menezes et al. (2015), é possível a identificação de infecções provocadas por bactérias, onde são hibridizadas as sequências específicas do rRNA. Após a fixação da célula bacteriana, ocorre a penetração das sondas promovendo uma ligação estável com a região 16S do rRNA através das pontes de hidrogênio, promovendo a emissão de fluorescência (SANTOS, 2011). Além disso, Leite et al. (2013) constata que é possível observar, reconhecer, especificar e estabelecer um local em que esteja presente um microorganismo, sem a exigência de exercer cultivos, pois através de cortes histológicos é possibilitada a visualização.

3.6 Genética Forense

A genética forense teve início através de exames de paternidade, onde, na década de 80 pesquisadores constataram que o DNA possuía porções variáveis, importantes na distinção de uma pessoa, mas somente em 1985 foi realizada a primeira análise do material genético na área forense (VIEIRA, 2011).

As provas físicas são importantes, no entanto, muitas vezes não são testemunhas confiáveis, visando isso, a investigação correta do local e a coleta de vestígios podem ser o motivo de uma apuração eficaz (DECANINE, 2016).

Segundo Leite et al. (2013), a molécula de DNA genômica é muito utilizada na análise forense por ser linear, no entanto, a molécula de DNA mitocondrial é de grande relevância para estas análises, visto que essas moléculas possuem resistência contra digestão enzimática devido à sua forma circular proporcionando uma análise eficaz em tecidos envelhecidos ou arqueológicos (dentes, cabelos e ossos) ou em situações em que o material genético se encontra danificado ou impossibilitado de ser extraído do núcleo. De acordo com Vieira, Tavares e Bouchardet (2010), o DNA de origem mitocondrial é transmitido apenas pelas mães, o que permite identificar a linhagem materna.

O perfil genético é diferente em cada indivíduo, exceto em gêmeos univitelinos que possuem o mesmo material genético e mesma sequência de DNA por serem originados de um único zigoto (CHAVES; NICOLAU, 2013).

Após a implantação do sequenciamento de DNA originado da mitocôndria, houve uma grande evolução na biologia molecular, visto que, a partir dessa descoberta o DNA não precisaria ser necessariamente de uma célula nucleada. Atualmente, são inúmeros os tipos de amostras biológicas utilizadas, podendo ser sêmen, sangue, osso, unha, cabelo, urina, dente e saliva (LEITE et al., 2013).

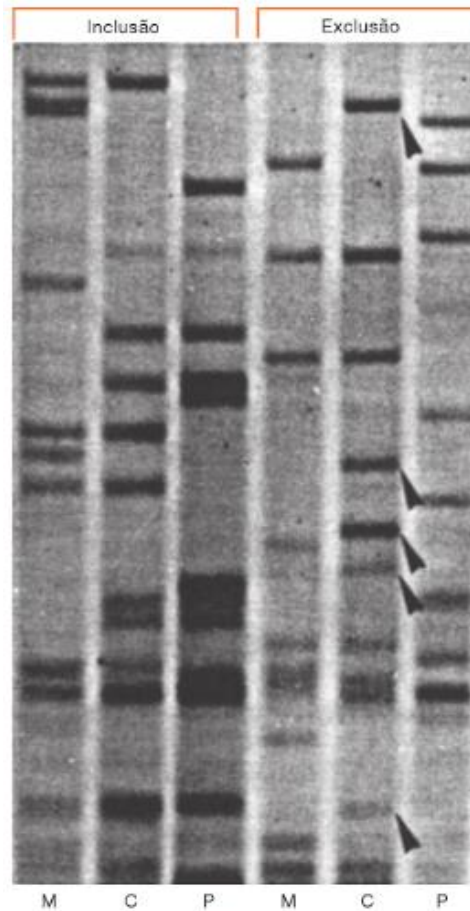
A coleta do material biológico depende do seu estado de conservação. Em caso de fluidos em pequenas quantidades e em estado líquido, a coleta é realizada com *swab* estéril e, para maiores quantidades, é utilizada seringa estéril descartável. Se a amostra estiver seca e em pequena quantidade em roupas ou objetos, a mesma deve ser conduzida para análise e caso esteja em maiores quantidades devem ser removidos, já a pinça é utilizada caso o objeto esteja presente no corpo (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015). Devem-se impor cuidados a fim de evitar

contaminação, pois as evidências criminais podem ser comprometidas além de proporcionar um diagnóstico incorreto. Para evitar esses acontecimentos é necessário o uso de equipamentos de proteção individual como luvas, gorros cirúrgicos e máscaras (LEITE et al., 2013). Após a extração e amplificação por PCR, o DNA passa pela eletroforese em gel de agarose para comprovação (VIEIRA, 2011).

Em 1998, foi implantado nos Estados Unidos o CODIS (*Combined DNA Index System*), que consiste na utilização de um programa eletrônico que compara dados referentes a perfis genéticos coletados a partir de amostras biológicas de cenas criminais contendo o DNA dos indivíduos condenados por diversos crimes, como violência, abuso ou desaparecimento, permitindo a verificação e comparação dos condenados com os supostos crimes cometidos (LEITE et al., 2013).

O DNA possibilita o reconhecimento humano especialmente quando não é possível a coleta de digitais, análise antropométrica ou arcas dentárias (VIEIRA; TAVARES; BOUCHARDET, 2010). São diversas as aplicações da genética no meio forense, sendo essas isentar inocentes, responsabilizar criminosos, reconhecer corpos ou fragmentos humanos, indicar paternidade com credibilidade (FIG. 6), esclarecer trocas de bebês e indicar falhas patológicas (VIEIRA, 2011).

Figura 6: Teste de paternidade positivo e negativo.



Fonte: BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013, p. 641.

3.7 Citogenética e Cariotipagem Humana

Os primeiros cromossomos humanos foram ilustrados em 1882 pelo professor e citologista Walther Flemming, considerado um dos pioneiros na descoberta da citogenética. Em 1888, foi designado o termo cromossomo por Waldeyer e colaboradores, mas somente em 1900 foi intitulada a Teoria Cromossômica da Herança, no qual, Sutton uniu a Genética com a Citologia, iniciando o estudo dos cromossomos (MALUF; RIEHGEL, 2011). A citogenética se baseia na porção da genética que analisa e pesquisa a estrutura, funcionalidade, patologias e questões hereditárias dos cromossomos (MONTENEGRO; SANTOS; VEITH, 2008).

A citogenética foi amplificada de modo que fosse possível sua utilização em outras áreas da Biologia, como aperfeiçoamento vegetal e animal, medicina e

bioquímica, abrangendo o estudo referente aos cromossomos incluindo arranjo e replicação (GUERRA, 1988).

Atualmente, o estudo cromossômico é de grande relevância para o diagnóstico eficaz nas áreas relacionadas a medicina, sendo empregada para a correlação de modificações anormais do cariótipo com determinadas patologias (CHAVES; NICOLAU, 2013).

O avanço tecnológico possibilitou grande evolução no diagnóstico de modificações cromossômicas, porém, ainda que a procura por essa técnica tenha aumentado, continua sendo inferior a proposta por sistemas automatizados que contribuem para o diagnóstico (KURTZ et al., 2015).

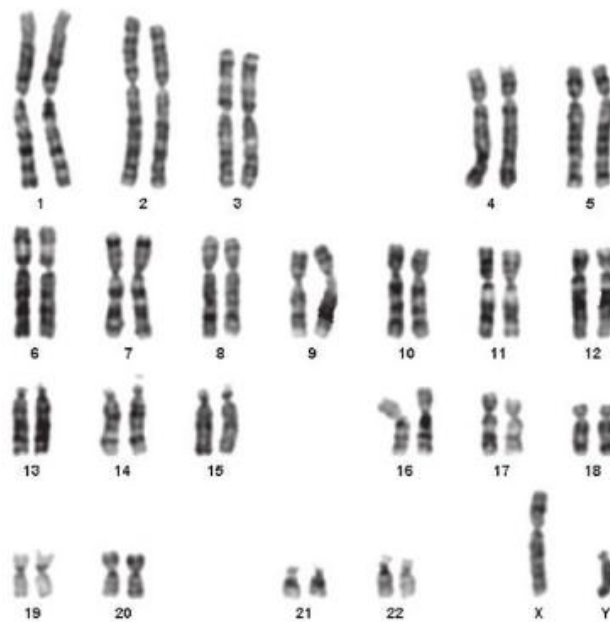
A cariotipagem proporciona a comparação citogenética da mesma ou de espécies distintas, além de analisar as modificações de uma única espécie. A realização ocorre com base no tamanho e número do cromossomo. Todo indivíduo possui dois tipos diferentes de cromossomos, os gaméticos ou haplóides (n) e os somáticos ou diplóides ($2n$), sendo estes, decorrentes da fecundação e característico por exibir cromossomos homólogos (dois de cada tipo), variando de acordo com a espécie (GUERRA, 1988).

Na realização do cariótipo, são utilizados cromossomos metafásicos, pois nesse estágio, os cromossomos se encontram mais condensados e proporcionam que as fibras do fuso se vinculem ao centrômero, porção responsável por dividir o cromossomo em braço curto e longo, característica encarregada por classificar os cromossomos em metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico ou telocêntrico. Contudo, os telocêntricos não são comuns em humanos, mas podem ser visualizados em rearranjos cromossômicos (MONTENEGRO; SANTOS; VEITH, 2008). Na cariotipagem, além da posição do centrômero também são analisados os tamanhos e as bandas, que são regiões claras e escuras expostas no eixo longitudinal do cromossomo. Essas bandas são distribuídas diferentemente em cada indivíduo, fazendo eficaz a sua análise (KURTZ et al., 2016).

O cariótipo pode ser apresentado de duas formas, cariograma ou idiograma. O cariograma é representado por fotografia ou através do desenho especificado da metáfase, no qual os cromossomos vão estar individualizados e corados (FIG. 7). Logo após, é realizado o recorte desses cromossomos e os homólogos são emparelhados e numerados. O idiograma é a reprodução esquemática dos

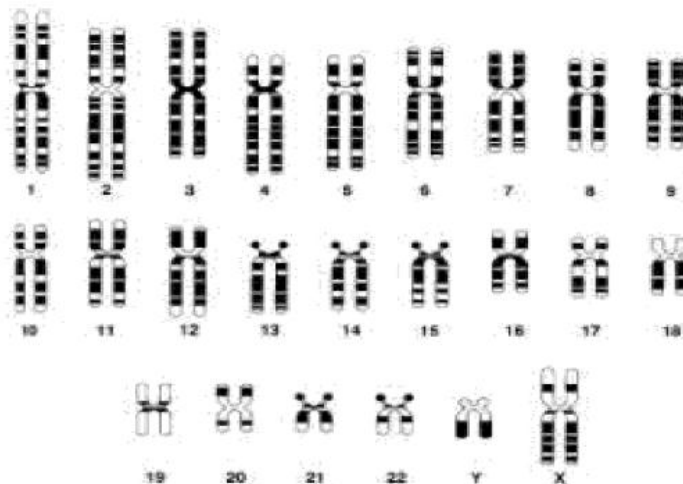
Cromossomos haplóides, onde as medidas são realizadas de acordo com a análise de várias células do mesmo ou de indivíduos diferentes (FIG. 8) (CHAVES; NICOLAU, 2013).

Figura 7: Cariograma humano.



Fonte: MALUF;RIEHGEL, 2011, p. 64.

Figura 8: Idiograma humano.



Fonte: TORQUATTO, 2013, p.76.

O tipo de tecido coletado para a análise do cariótipo varia de acordo com o paciente, indicação clínica e finalidade da análise, contudo, sua cultura é usualmente

empregada para preparar os cromossomos. A cultura vai depender do tipo de tecido (sangue periférico, medula óssea, líquido amniótico, biópsia de pele ou de vilosidades coriônicas) (MALUF; RIEHGEL, 2011).

Na identificação e análise dos cromossomos cada imagem demora cerca de 30 minutos para ser produzida. O método manual de identificação engloba algumas fases, entre elas, a obtenção da imagem que ocorre por meio de uma câmera vinculada ao microscópio, fracionamento e reconhecimento dos cromossomos, desenho manual de no mínimo 50 metáfases que serão analisadas e recortadas após impressas, por fim, a identificação de anomalias, sendo essas relacionadas ao número ou estrutura cromossômica (KURTZ et al., 2015).

A FISH é uma das técnicas mais utilizadas em associação com os cariótipos, pois permite uma melhor detecção de anomalias em humanos. Esse método consiste na elaboração de lâminas, isolamento, sequência de DNA marcados (que se pretende identificar *in situ*) e posteriormente a hibridização. Para ser possível a visualização deve-se combinar um corante com a sonda e outro com os cromossomos restantes (CHAVES; NICOLAU, 2013).

A cariotipagem é muito utilizada como diagnóstico durante o pré-natal para detecção de alterações cromossômicas como Síndrome de Down, que apresenta uma trissomia do cromossomo 21 (SANTOS; FRANCESCHINI; PRIORE, 2006). Entretanto, também é possível a identificação de outras síndromes como a Síndrome de Edwards, caracterizada pela trissomia do cromossomo 18, Síndrome de Patau (trissomia do cromossomo 13), ambos letais na maioria dos casos, Síndrome 47/XYY provocada mediante a não disjunção da meiose II, Síndrome de Klinefelter ou 47/XXY caracterizada por apresentar dois cromossomos X, Síndrome de Turner que apresenta um único cromossomo sexual X, a Síndrome de Cri-Du-Chat determinada pela deleção do braço curto de um dos cromossomos 5 e a Monossomia 18p caracterizada pela deleção do braço curto de um cromossomo 18 (TEIXEIRA, 2015).

Além disso, a cariotipagem humana pode ser utilizada no diagnóstico de neoplasias como Leucemia Mielóide Crônica, caracterizada pela translocação do braço curto do cromossomo 12 para o braço longo do cromossomo 9, responsável pela alta atividade da tirosina quinase que resulta em desequilíbrio celular, inibição

da apoptose e autonomia celular perante ao crescimento da mesma (LAGO; PETRONI, 2017).

3.8 Diagnóstico Pré-Implantacional

O Diagnóstico Pré-implantacional baseia na pesquisa genética através de células embrionárias com o intuito de escolher um embrião e transferi-lo para o útero isento de anomalias genéticas (LEITE; HENRIQUES, 2014). Criada por Edwards e Gardner na década de 60, a técnica tinha o objetivo de prevenir doenças genéticas (CAMPOS, 2016).

A fecundação pode ocorrer de duas formas, por meio da fertilização *in vitro* convencional ou através da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (PIZZATO et al., 2016).

O procedimento geralmente é realizado através de uma biópsia embrionária do blastômero no terceiro dia de desenvolvimento possuindo cerca de seis a oito células, no entanto, também pode ser utilizado o corpúsculo polar de ovócitos, sendo este pouco utilizado mediante ao fato de não haver informações referentes ao espermatozóide por se tratar de células sexuais femininas produzidas nos ovários e nem irregularidades genéticas, pois o *crossing-over* acontece só na meiose I. Outra forma seria a análise utilizando blastocisto com 32-64 células (CAMPOS, 2016).

A técnica é indicada por ser menos invasiva quando comparada com outros procedimentos como cordocentese (remoção de células-tronco proveniente do cordão umbilical) e amniocentese (remoção de células procedentes do líquido amniótico) (CORREIA, 2015).

A FISH e a PCR são as técnicas utilizadas em pesquisas pré-implantacionais, sendo que, a FISH proporciona a análise dos cromossomos em pares e a PCR permite a análise de um gene específico (CAMPOS, 2016). Contudo, podem existir erros gerando o mosaicismo, que ocorre quando não há divisão correta da mitose originando tecidos com componentes cromossômicos distintos. O impacto do mosaicismo vai variar de acordo com o momento em que não houve a disjunção, dos cromossomos atingidos e tecido acometido (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

A bioética está fortemente associada à fertilização, uma vez que existem obstáculos relacionados às práticas, aplicações e pesquisas. Os questionamentos sobre os limites se intensificam com o passar dos anos, tornando-se questões de conflito. Contudo, o diagnóstico pré-implantacional tem colaborado tanto para o decréscimo da taxa de abortos como também para a elevada proporção de tratamentos bem-sucedidos (PIZZATO et al., 2016).

Esta técnica é aplicada em casos que o casal possui risco elevado de gerar um filho com disfunções genéticas relacionadas ao sexo, principalmente quando a mulher dispõe de uma idade avançada, entretanto, também pode ser utilizada quando um casal considerado normal sofre vários abortos ou possui dificuldade na implantação *in vitro*, além de ser indicado em transplante a fim de conter a compatibilidade por meio da seleção embrionária que visa posteriormente a utilização das células do cordão umbilical (CAMPOS, 2016).

Sua utilização também se baseia no diagnóstico de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, pois podem existir modificações genéticas nos pais, como aneuploidias (perda ou ganho dos cromossomos) ou translocações, que quando transmitidas aos filhos ocasionam a má-formação do feto ou até serem responsáveis pela infertilidade dos pais e dependendo do cromossomo envolvido pode desencadear aborto ou até mesmo síndromes (CORREIA, 2015).

3.9 Marcadores Moleculares

A espécie humana possui elevada variabilidade genética, sendo esta, expressada pelos fenótipos. A sequência de DNA passa por variação devido a inserção, deleção, duplicação ou substituição de nucleotídeos, denominadas mutações. As mutações podem ser de origem somática, causa do desenvolvimento dos cânceres ou germinativa, responsável por transmitir a variabilidade ao longo das gerações (TOMAZ; SANTOS; SANTOS, 2016).

Os marcadores moleculares são etiquetas genéticas utilizadas na marcação de alelos de difíceis reconhecimentos e para sua eficácia, é necessário que a característica seja expressa, indicando a presença do alelo de interesse (RAMALHO et al., 2012). A obtenção dos marcadores dispõe de fases distintas como extração

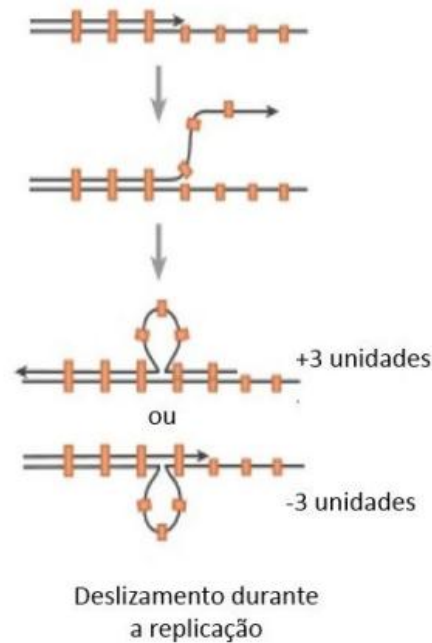
de DNA, ampliação por PCR, separação de bandas por eletroforese, fotodocumentação e avaliação estatística (FALEIRO, 2007).

Os marcadores moleculares são divididos em duas classes: os de proteínas e os que utilizam o próprio DNA. Os de proteínas são conhecidos como bioquímicos e normalmente utilizam isoenzimas que são isoladas, analisadas e associadas aos substratos gerando produtos que geralmente são identificados através da coloração (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004). Já os de DNA, possuem como vantagem o aumento da quantidade de marcadores, sendo possível identificar todos os alelos dos genes de cada espécie mediante a variabilidade genética pertencente em indivíduos de uma mesma espécie (RAMALHO et al., 2012).

A localização do gene geralmente ocorre através da genética reversa, que utiliza a sequência de aminoácidos da proteína codificada e por meio do código genético, determina a sequência de nucleotídeos equivalente a proteína que será responsável por representar parte do gene de interesse (BORÉM; SANTOS; PEREIRA, 2016).

Ao longo dos anos foram desenvolvidas técnicas designadas a identificar as mutações existentes no organismo, como as sequências curtas de repetições em tandem (STR ou microssatélites) que são sequências repetidas de 2 a 6 nucleotídeos espalhados pelo genoma. As repetições são pequenas e mostram resultados concretos além da facilidade e rapidez técnica (MAGALHÃES; SILVA, 2006). Os STR são originados devido a falhas que ocorrem durante a replicação do DNA, que conseqüentemente, aumentam ou diminuem o número de repetições. Com o auxílio de *primers* específicos, os fragmentos são amplificados utilizando a técnica de PCR que revela o polimorfismo provocado por *slippage* caracterizado pelo deslizamento da DNA polimerase durante a replicação resultando em mutação (FIG. 9) ou devido *crossing-over* desigual durante a meiose, que realiza trocas de porções repetidas dos cromossomos homólogos (CAMPOS, 2015).

Figura 9: Representação esquemática do *Slippage*.



Fonte: RIBEIRO, 2016, p. 19.

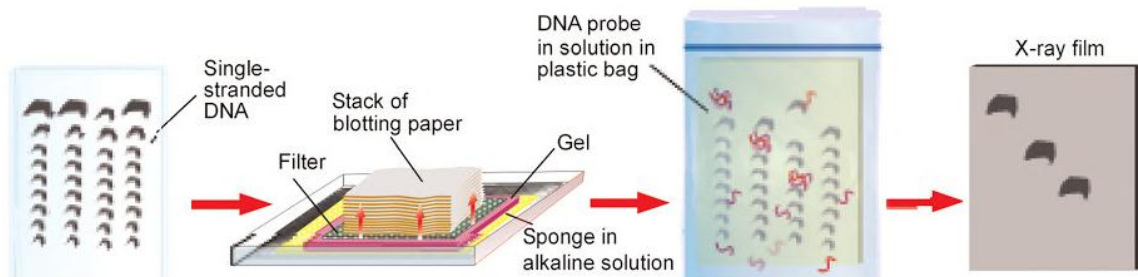
No *slippage*, a fita de DNA reproduzida se desassocia da fita molde gerando alças causadas pelo pareamento inadequado das fitas complementares e quando acometem a fita molde, os produtos são menores, já no *crossing-over* desigual, são formadas inserções ou deleções de moléculas de DNA, sendo os mesmos, responsáveis pela variação no número de repetições (PEDROSA, 2006).

Ainda que a grande maioria dos microssatélites sejam pertencentes a regiões não-codificadoras, uma porção considerável se encontra em regiões codificantes, sendo de extrema importância para a funcionalidade adequada do sistema biológico como: formação do centrômero, organização da cromatina, controle do ciclo celular e replicação, modulação de mutações, inibição da tradução, controle da transcrição e estrutura do DNA (LEITE, 2006).

Outro marcador molecular é o RFLP (Polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição), caracterizado pela utilização de uma ou mais enzimas de restrição com o intuito de clivar o DNA genômico em fragmentos de tamanhos distintos que serão identificados através da eletroforese e sondas complementares (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004). A obtenção do RFLP abrange a extração do DNA, clivagem por enzimas de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese em gel, transferência das bandas para membrana de nylon, hibridização com sondas

complementares e visualização por autorradiografia (FALEIRO, 2007). Esse procedimento é designado *Southern blotting* (FIG. 10), no qual, a membrana de nylon fixa os fragmentos de DNA do gel que foram absorvidos por um papel toalha (RAMALHO et al., 2012).

Figura 10: *Southern blotting*.



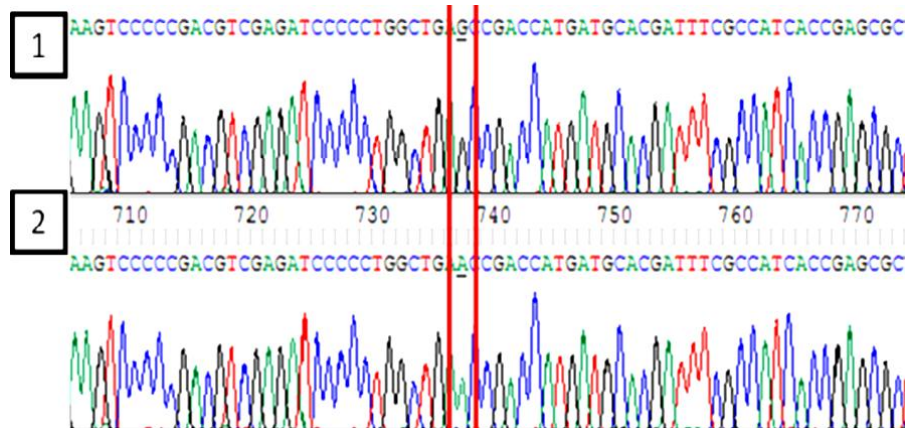
Fonte: KLIPP et al., 2016, p.363.

O polimorfismo reconhecido pelo RFLP ocorre mediante deleções, inserções ou substituições de base identificada pela enzima de restrição, apresentando conseqüentemente quantidades de fragmentos de nucleotídeos diferenciados nos sítios de clivagem, entretanto, a técnica possibilita o reconhecimento de alelos paternos e maternos em indivíduos denominados de heterozigotos por analisar todo o genoma, permitindo um estudo minucioso de mapeamento genético ou comparação de características (SARTORETTO; FARIAS, 2010).

Apesar disso, a técnica possui algumas limitações quando comparada com as outras provenientes da PCR, como necessitar de quantidade elevada e de alta qualidade de DNA genômico, requerer da construção prévia de sonda, demora na execução e o uso de agentes radiotivos (POLIDO et al., 2012).

O polimorfismo mononucleotídeo (SNP) é um marcador caracterizado pela modificação pontual de um único nucleotídeo na sequência de DNA (FIG. 11) (VIRMOND et al., 2016).

Figura 11: Polimorfismo em base única (G-A).



Fonte: SANTORO, 2010, p. 26.

Os SNPs são os tipos mais comuns de variação genética e podem ser encontrados em regiões codificadoras ou não, com frequência de mutação de um a cada 1.350 pb (ARAÚJO et al., 2009). Quando essas mutações ocorrem em regiões codificadoras, são classificadas em não sinônimas e sinônimas. As não sinônimas são caracterizadas por apresentar mudança na leitura da proteína, determinar um códon de terminação ou reestabelecer a leitura diante de um códon de parada. Já nas sinônimas, a proteína expressada continua sendo a mesma (OLIVEIRA; ABATH; FRANCO, 2008). Neste caso, as mutações geralmente ocorrem com nucleotídeos de formação estrutural parecida (A-G / C-T) e a identificação ocorre através da PCR (BORÉM; SANTOS; PEREIRA, 2016).

Atualmente, os SNPs estão sendo utilizados no desenvolvimento de fármacos, pois um único polimorfismo pode ter relação com a susceptibilidade ou proteção do indivíduo perante a doença. Dessa forma, o estudo farmacogenético torna possível criar uma droga que proporciona um resultado positivo ao tratamento (FRIDMAN et al., 2004).

A aplicação dos marcadores moleculares ocorre principalmente na vinculação genética forense, testes de paternidade, identificação de doenças (FERNANDES, 2015; PEDROSA, 2006).

4 DISCUSSÃO

De acordo com Leite et al. (2013), a técnica de PCR é rápida e necessita de quantidade mínima de DNA, permitindo o reconhecimento de alelos específicos. Contudo, Hass e Torres (2016) enfatizam que a técnica possui variações, como a tempo real e multiplex, que possui intuito de qualificar e aprimorar os resultados. No entanto, Camargo e Silva ([2016]) ressaltam que a técnica possui como desvantagem seu elevado custo e a variação de resultados entre laboratórios devido a não padronização dos protocolos, além de necessitar de um local específico para sua realização.

Segundo Foppa (2009), a utilização da FISH na citogenética promove maior agilidade, sensibilidade e especificidade nos resultados, entretanto, seu custo é elevado devido aos equipamentos fundamentais e seus insumos.

Chaves e Nicolau (2013) constatam que os métodos baseados na cariotipagem fornecem informações sobre alterações cromossômicas importantes tanto na área médica como também na melhoria de espécies de importância econômica.

Segundo Pizzato et al. (2016), o diagnóstico pré-implantacional é eficiente na redução da quantidade de abortos espontâneos e consequentemente aumento na quantidade de implantações *in vitro* bem-sucedidas. No entanto, Campos (2016) enfatiza que existem questões éticas importantes relacionadas a descarte e utilização de embriões que devem ser respeitadas.

Polido et al. (2012) afirma que os marcadores moleculares são ferramentas importantes com diversas finalidades, portanto, a escolha provém dos objetivos da pesquisa e material em análise, associado a disponibilidade do laboratório e credibilidade da técnica.

Muitas doenças são diagnosticadas apenas por testes sorológicos, com isso, a biologia molecular se apresenta mais eficiente mediante ao fato de conseguir detectar a presença do microorganismo mesmo quando o paciente estiver na forma latente da doença.

Essas técnicas apresentam um alto custo para serem realizadas e apresentarem pouca demanda e isso se torna inviável para os laboratórios de porte

pequeno ou médio, fazendo-se necessário a terceirização com laboratórios maiores e de referência.

Outra questão seria o fato dos médicos pedirem rotineiramente testes sorológicos em vez de moleculares justamente por se tratarem de exames baratos, no entanto, a pesquisa pela descoberta clínica pode ser lenta quando comparado com algumas técnicas moleculares apropriadas, onde seria possível realizar vários testes ao mesmo tempo em um curto prazo.

Seria importante a implementação de técnicas moleculares como PCR e suas variações em ambientes hospitalares, visto que, tornaria a pesquisa de um microorganismo causador de sepse mais rapidamente, de modo que, o tratamento se tornaria eficiente.

Ao longo dos anos, a biologia molecular tem proporcionado inovações tecnológicas essenciais para o conhecimento dos genes e entendimento sobre como sua funcionalidade impõe características específicas nos organismos. A criação de novas técnicas e protocolos são importantes na pesquisa molecular desde o princípio de doenças e em como as células correspondem a elas, particularidade essencial na descoberta de novos tratamentos farmacogenéticos, sendo esta, uma questão de grande interesse na área da biologia molecular.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no trabalho realizado é possível concluir que a biologia molecular é uma área em constante expansão, abrangendo disciplinas distintas.

Na área da saúde, as técnicas moleculares ainda estão em fase de progressão e devido seu alto custo quando comparado com outros métodos de diagnóstico, acabam sendo menos utilizados, contudo, seus resultados mostram grande eficácia além de permitir um rápido diagnóstico. Em relação as doenças infecciosas e genéticas sua importância se faz necessária, de modo que o profissional possa intervir antes mesmo do paciente apresentar qualquer sinal ou sintoma, tornando possível a detecção prévia do microorganismo patogênico ou da anomalia responsável por alterar a condição funcional humana. Se tratando da área forense, as técnicas moleculares permitem a comparação dos materiais biológicos podendo responsabilizar ou inocentar pessoas culpadas por crimes cometidos, além de associar parentesco com supostas vítimas.

Contudo, torna-se necessário o aperfeiçoamento profissional por se tratar de técnicas sensíveis, evitando a possibilidade de erros nas etapas de extração ou realização das técnicas, no qual, o Biomédico atua.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017.

ALMEIDA, M. M.; FORMIGA, C. K. M. R. Avaliação da motricidade ampla e fina na Síndrome de Williams: Relato de caso. **Motriz**, Rio Claro, v. 16, n. 4, p. 913-919, out./dez. 2010. Disponível em: <http://cd.ispa.pt/ficheiros/areas_utilizador/user6/avaliacao-motricidade-ampla-fina-sindrome-williams-relato_de_caso-2010.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2017.

ANDRADE, A. P. C. **Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de *Staphylococcus spp.* isolados de queijo coalhado**. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/573048/1/OT09004.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2017.

ARAÚJO, K. L. de. et al. O papel dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) Pvu II e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs)(TA) na Suscetibilidade do Câncer da Mama (BRCA). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 185-192, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/Rbc/n_55/v02/pdf/13_revisao_literatura4.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2017.

BASTOS, C. P. **Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S.intermedius* e *S. hyicus***. 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br/bitstream/123456789/1310/1/Dissertacao_%20Caroline_Peixoto_%20Bastos.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2017.

BEZERRA, C. M. **Diagnóstico molecular da talassemia alfa⁺ (deleção - $\alpha^{3.7}$) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/13242/1/ChristianeMB.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene HFE. **Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 341-342, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v29n4/a03v29n4>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

BORÉM, A.; SANTOS, F.; PEREIRA, W. **Entendendo a Biotecnologia**. Viçosa: Editora UFV, 2016.

BORGES, T. S.; ALENCAR, G. Metodologias ativas na promoção da formação crítica do estudante: o uso das metodologias ativas como recurso didático na

formação crítica do estudante do ensino superior. **Cairu em Revista**, v. 3, n. 4, p. 119-143, jul./ago. 2014. Disponível em: <<https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/napecco/Metodologias/Metodologias%20Ativas%20na%20Promocao%20da%20Formacao.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BRUNO, A. N. (Org.). **Biotecnologia II: Aplicações e tecnologias**. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017.

CAMACHO, R. A. P. **Detecção de bactérias no ar em ambiente hospitalar com recurso a técnicas moleculares**. 2010. 205 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Universidade da Madeira, Funchal, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.uma.pt/bitstream/10400.13/397/1/MestradoRobertoCamacho.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

CAMARGO, C. F. de.; SILVA, P. R. Q. da. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular**. ([2016]). Disponível em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2017.

CAMPOS, E. C. S. **O diagnóstico genético pré-implantacional e o valor da vida embrionária para o direito**. 2016. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Direito) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/3919/1/eduardacellisdasilvacampos.pdf>>. Acesso em: 8 jul. 2017.

CANÇADO, Rodolfo D. Alpha thalassemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 86-87, abr./jun. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842006000200005&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 set. 2017.

CARVALHO, S. R.; TEIXEIRA, R. R. Políticas da própria vida e o futuro das práticas médicas: diálogos com Nikolas Rose (Parte 3). **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 21, n. 60, p.221-230, 2017. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/1801/180148881020.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2017.

CAVALCANTI, M. P. C. et al. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008. Acesso em: 25 jun. 2017.

COELHO, A. M. **Padronização da técnica de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real para quantificação dos vírus quiméricos FA17D/DEN1, 2, 3, 4 candidatos a vacina tetravalente contra a dengue**. 2013. p. 99. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:

<<https://www.bio.fiocruz.br/images/aline-martins-cardoso-coelho.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

CORDEIRO, M. C. R. Biotecnologia e diagnósticos moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de.; JUNIOR, F. B. dos. R. (Ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. Cap. 7, p. 195-216.

CORREIA, A. N. **Diagnóstico genético pré-implantacional**. 2015. 35 p. Dissertação (Especialização em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Terra Rica, 2015. Disponível em: <<http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/42267/R%20-%20E%20-%20AMANDA%20NARDI%20CORREIA.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 7 jul. 2017.

CRESPO, I. M. **Um estudo sobre o comportamento de busca e uso de informação de pesquisadores das áreas de biologia molecular e biotecnologia: impactos do periódico científico eletrônico**. 2005. 120 p. Dissertação (Mestrado em Comunicação e Informação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/4387/000500810.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 2 out. 2017.

CUNNINGHAM, F. G. et al. **Obstetrícia de Williams**. 24 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

CURY, P. R.; FURUSE, C.; ARAÚJO, N. S. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. **Revista Odontológica de Araçatuba**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 34-39, jul./dez. 2005. Disponível em: <http://apcdaracatuba.com.br/revista/volume_26_02_jul-dez_2005/PDF%20TRABALHOS/POLIMERASE%20EM%20CADEIA.PDF>. Acesso em: 23 fev. 2017.

DECANINE, D. O papel de marcadores moleculares na genética forense. **Revista Brasileira de Criminalística**, n. 5, v. 2, p. 18-27, 2016. Disponível em: <http://rbc.org.br/ojs/index.php/rbc/article/view/123/pdf_51>. Acesso em: 5 jul. 2017.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

FERNANDES, I. L. **Estimativa da taxa de mutação de marcadores STRs do cromossomo Y em uma amostra da população brasileira e sua importância no processo de identificação humana**. 2015. 67 P. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2015. Disponível em: <<http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/handle/tede/2394#preview-link0>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

FOPPA, C. E. **Aplicações da metodologia FISH em citogenética de neoplasias**. 2009. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/132329/20092-CarolinaEFoppa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 6 jul. 2017.

FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **ArchivesofClinicalPsychiatry (São Paulo)**, v. 31, n. 1, p. 19-25, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-60832004000100004&script=sci_arttext>. Acesso em: 2 out. 2017.

FRUEHWITH, M.; DELAI, R. M.; FOLHA, R. de. A. Técnicas da biologia molecular aplicadas a perícia e ciência forense. 2015.

GATTÁS, G. J. F.; SEGRE, M.; WÜNSCH FILHO, V. Genética, biologia molecular e ética: as relações trabalho e saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 159-167, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/csc/v7n1/a14v07n1.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2017.

GROCHOCKI, T. M. **Principais métodos para detecção de viroses transmitidas por Aedes no Brasil**. 2016. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.uniceub.br/bitstream/235/11059/1/21366135.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2017.

GUERRA, M. S. **Introdução à Genética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de pcr no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 1-15, jan. 2016. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5D3lu05EHeEnqPI_2017-1-12-8-29-47.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2017.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HEPP, D.; DE NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **ScientiaTec**, Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 114-124, jun./dez. 2016. Disponível em: <<https://periodicos.ifrs.edu.br/index.php/ScientiaTec/article/view/1592/1351>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

HIRATA, M. H.; TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. **Medicina (Ribeirão Preto Online)**, v. 39, n. 4, p. 522-534, out./dez. 2006.

JANEIRO, D. G. P. **Sífilis congênita: caracterização da infecção e avaliação de técnicas laboratoriais para o seu diagnóstico**. 2012. 97 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 2012. Disponível em: <<https://run.unl.pt/handle/10362/7717>>. Acesso em: 8 ago. 2017.

JOBIM, M. R. et al. Novos testes de DNA na investigação de paternidade com o suposto pai falecido. **RT/Fasc**, v. 104, n. 874, p. 55-69, 2008. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Maria_Jobim/publication/268288966_NOVOS_TESTES_DE_DNA_NA_INVESTIGACAO_DE_PATERNIDADE_COM_SUPOSTO_PAI_FALECIDO/links/551413240cf2eda0df303f45.pdf>. Acesso: 8 ago. 2017.

JÚNIOR, C. R. B.; PEREIRA, M. G. Biologia molecular como ferramenta no esporte de alto rendimento: possibilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 31, n. 3, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-32892010000300016>. Acesso em: 2 out. 2017.

KURTZ, G. C. et al. Organização e estruturação em XML das características morfológicas de cromossomos a partir de uma base de imagens para o processo de identificação de cromossomos. **Revista Brasileira de Computação Aplicada**, Passo Fundo, v. 8, n. 2, p. 60-70, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.seer.upf.br/index.php/rbca/article/view/5251>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

KURTZ, G. C. et al. Software para Auxílio no Processo de Elaboração do Cariótipo. **Revista de Informática Teórica e Aplicada**, Santa Maria, RS, v. 22, n.2, p. 109-123, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.seer.ufrgs.br/index.php/rita/article/view/RITA-VOL22-NR2-109/35622>>. Acesso em: 06 maio 2017.

LAGO, C.; PETRONI, T. F. Fisiopatologia e diagnóstico da Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Saúde UniToledo**, Araçatuba, v. 1, n. 1, p. 121-133, mar./ago. 2017. Disponível em: <<http://ojs.toledo.br/index.php/saude/article/view/2442/107>>. Acesso em: 9 jul. 2017.

LEITE, F. P. N. **Análise da estrutura genética da população do Rio Grande do Sul através de microssatélites autossômicos e de cromossomos sexuais**. 2006. 139 p. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/10938>>. Acesso em: 29 set. 2017.

LEITE, T. H.; HENRIQUES, R. A. de. H. Bioética em reprodução humana assistida: influência dos fatores sócio-econômico-culturais sobre a formulação das legislações e guias de referência no Brasil e em outras nações. **Physis-Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 1, p. 31-47, 2014.

LEITE, V. da S. et al. Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense. **Derecho y Cambio Social**, Camaragibe, p. 1-18, 2013.

LIMA, A. S. **Detecção rápida e diferenciação de espécies de micobactérias através de um sistema de PCR multiplex**. 2010. 82 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2010lima-as.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

LIMA, T. C. S. de.; MIOTO, R. C. T. Procedimentos metodológicos na construção do conhecimento científico: a pesquisa bibliográfica. **Revista Katálisis**, v. 10, p. 37-45, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rk/v10nspe/a0410spe>>. Acesso em: 26 set. 2017.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: Uma revisão técnica. **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n.2, p. 155-161, ago. 2005. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v64n2/v64n2a02.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2017.

MAGALHÃES, I. M.; SILVA, D. M. **Informações acerca de marcadores moleculares uniparentais: dna mitocondrial e cromossomo y**. *Estud. Biol.*, v. 28, n.63, p. 81-88, abr./jun. 2006. Acesso em: 22 ago. 2017.

MALACINSKI, G. M. **Fundamentos da Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2005.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Editora Artmed Ltda, 2011.

MARQUES, D. K. S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006. 114 p. Dissertação (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2006. Disponível em: <<http://cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2006melo-fl.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

MENDES, M. C.; COSTA, A. P. P. Diagnóstico genético pré-implantacional: prevenção, tratamento de doenças genéticas e aspectos ético-legais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.12, n. 3, p. 374-379, set./dez. 2013. Disponível em: <<https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/8269/6677>>. Acesso em: 15 maio 2017.

MENEZES, G. L. et al. Aplicações da biologia molecular no diagnóstico de *Helicobacter pylori*: uma revisão de literatura. **Saúde e Ciência em Ação**, v. 1, n. 1, p.132-140, jun./dez. 2015. Disponível em: <<http://revistas.unifan.edu.br/index.php/RevistaICS/article/view/115/94>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

MESQUITA, R. T. **Diagnóstico molecular da toxoplasmose cerebral: comparação de diferentes marcadores utilizados na PCR para detecção de *Toxoplasma gondii* em pacientes com aids**. 2010. 96 p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://saudepublica.bvs.br/pesquisa/resource/pt/ses-16435>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

MONTENEGRO, V. S.; SANTOS, V. M. V. O.; VEITH, M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. **Rev. Fac. Ciênc. Méd.**, Sorocaba, v. 10, n. 3, p. 5-12, ago. 2008. Disponível em:

<<https://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/viewFile/581/655>>. Acesso em: 3 mar. 2017.

MOREIRA, E. R. D. **Estudo de variações genômicas para a identificação de biomarcadores personalizados e novos alvos terapêuticos em tumores colorretais**. 2014. 202 p. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-20012015-101640/en.php>>. Acesso: 6 ago. 2017.

NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, n. 2, p. 111-119, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: Princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-632, out./dez. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n4/a23v79n4.pdf>>. Acesso em: 3 mar. 2017.

NONNENMACHER, B. et al. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/25308/27053>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

OLIVEIRA, G. C. de.; ABATH, F. G. C.; FRANCO, G. R. Genômica e biologia molecular de schistosoma mansoni. In: CARVALHO, O. dos. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. Cap. 7, p. 245-281.

OLIVEIRA, H. D. de.; RAMOS, M. V. Introdução à Biomedicina. In: RAMOS, M. V.; MELO, D. F. de; SILVA, A. L. C. de. (Coord.) **Biomedicina: a ciência, o bacharelado, a demanda socioeconômica**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2016. Cap. 1, p. 17-29.

OLIVEIRA, H. S. de.; SPENGLER, R. L. Inovações na Área de Biotecnologia em Saúde Humana em Países em Desenvolvimento e sua Importância Econômica e Social: Uma Reflexão sobre o Cenário Atual e Perspectivas Futuras. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 99-116, 2014. Disponível em: <<http://www.univates.br/revistas/index.php/cadped/article/view/902/891>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2010. Disponível em: <<http://ria.ua.pt/bitstream/10773/7230/1/disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

- OSADA, N. M.; COSTA, M. C. A construção social de gênero na Biologia: preconceitos e obstáculos na biologia molecular. **cadernos pagu**, n. 27, p. 279-299, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cpa/n27/32145.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2017,
- PAULA, R. A.; FERREIRA, W. J. PCRSYS: Sistemas Aplicado à Seleção de Primers para Reação em Cadeia da Polimerase. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 2-3, n. 1, p. 65-73, nov. 2003. Disponível em: <<http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/exatas/article/view/1163>>. Acesso em: 2 out. 2017.
- PEDROSA, M. A. F. Composição **genética de quatro populações remanescentes de quilombos do Brasil com base em microssatélites e marcadores de ancestralidade**. 2006. 142 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/3294>>. Acesso em: 29 set. 2017.
- PENA, S. D. J. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. **Revista Bioética**, v. 5, n. 2, 2009. Disponível em: <http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/386>. Acesso em: 8 ago. 2017.
- PEREIRA, A. P. V. **Identificação molecular de candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE métodos convencionais vs. Métodos moleculares**. 2010. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 2010. Disponível em: <<https://run.unl.pt/handle/10362/5355>>. Acesso em: 3 ago. 2017.
- PIMENTEL, A. M. Utilização da técnica da eletroforese em genética florestal. **Série Técnica – IPEF**, Piracicaba, v. 5, n. 15, p. 1-27. Maio. 1988. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr15/cap01.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2017.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F. Mapeamento cromossômico em espécies de café através da técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 66-67, maio 2011. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/agronomico/pdf/v59_artigo17.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2017.
- POLIDO, P. B. et al. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 161-169, jul./dez. 2012. Disponível em: <<http://189.126.110.61/acvzunipar/article/view/16759/17629>>. Acesso em: 29 set. 2017.
- PRODANOV, C. C.; FREITAS, E. C. de. **Metodologia do Trabalho Científico: Métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico**. 2 ed. Novo Hamburgo: Feevale, 2013.
- QUIXABEIRA, V.B. L.; SADDI, V. A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão de literatura. **RBAC**, Rio de

Janeiro, v. 40, n. 3, p. 199-202, jul. 2008. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Vera_Saddi/publication/240617946_A_importancia_da_imunofenotipagem_e_da_citogenetica_no_diagnostico_das_leucemias_um_a_revisao_da_literatura_The_importance_of_immunophenotyping_and_cytogenetics_in_the_diagnosis_of_leukemia_a_literatur/links/547e43b50cf2c1e3d2dc1d13.pdf>.

Acesso em: 5 jul. 2017.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na Agropecuária**. 5 ed. Lavras: Editora UFLA, 2012.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. **Genética na Agropecuária**. 3 ed. Lavras: Editora UFLA, 2004.

RAMOS, E. M. S. **Sistemas multiplex para detecção e caracterização molecular de infecções**. 2012. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012. Disponível em:

<<http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/3575>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

RAMPAZZO, L. **Metodologia científica para alunos dos cursos de graduação e pós-graduação**. 3 ed. São Paulo: Loyola, 2005.

RIBEIRO, S. B. **Sequenciamento e caracterização parcial do genoma de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. 2016. 77 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6232>>. Acesso em: 20 set. 2017.

ROCCHETTI, T. T. **Detecção Bacteriana e de Genes de Resistência a Antimicrobianos pela Técnica de PCR em Tempo Real em Infecções de Corrente Sanguínea de Pacientes Submetidos a Transplante de Órgãos Sólidos**. 2011. 157 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, 2011. Disponível em:

<http://www.lemc.com.br/public/uploads/teses/Talita_Trevizani_Rocchetti-MESTRADO.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2017.

RODRIGUES, A. D. et al. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 457-462, dez. 2009.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v45n6/a04v45n6>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

SANTOS, G. O. F. **Aplicação da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para detecção de *Bacillus spp.*** 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/handle/123456789/5345>>. Acesso em: 6 jul. 2017.

SANTOS, J. A.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E. Curvas de crescimento para crianças com Síndrome de Down. **RevBrasNutrClin**, v. 21, n. 2, p. 144-8, abr./jun. 2006. Disponível em:

<<http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/30895449/volume21->

2.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1499783292&Signature=h%2F2zUQ9AsqM2KscBPP%2BPXY5ayK4%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DO_grau_de_interferencia_dos_sintomas_gas.pdf#page=67>. Acesso em: 9 jul. 2017.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **ACET**, Joaçaba, v. 1, n. 2, p. 155-162, jul./dez. 2010. Disponível em: <https://editora.unoesc.edu.br/index.php/acet/article/view/166/pdf_79>. Acesso em: 29 set. 2017.

SILVA, A. M.; RIBEIRO NETO, L. M. (Org.). LIPAY, M. V. N.; BIANCO, B. (Coord.). **Biologia Molecular: Análises clínicas e toxicológicas, métodos e técnicas**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. 254 p.

SILVA, L. C. A. **Avaliação da reprodutibilidade das reações e da estabilidade dos kits Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para aplicação no diagnóstico de peste**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2010silva-lca.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética molecular humana**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2013.

TEIXEIRA, F. M. **Mutações cromossômicas e principais síndromes**. 2015. 31 p. Dissertação (Especialização em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Foz do Iguaçu, 2015. Disponível em: <<http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/42204/R%20-%20E%20-%20FLAVIA%20MILENA%20TEIXEIRA.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 8 jul. 2017.

TOMAZ, P. R. X.; SANTOS, J. da. R. dos.; SANTOS, P. C. J. de. L. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de *melting*. **RBAC**, v. 48, n. 1, p. 19-23, 2016. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/05/ARTIGO-3_VOL-48_1_-2016-ref-129.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2017.

TORRES, G. A. **Hemoglobinopatias: manifestações clínicas e diagnósticos**. 2016. 19 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.uniceub.br/handle/235/11069>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

TORQUATTO, J. **Genética: O que esse assunto tem haver com você?**. 1 ed. São Paulo, 2013.

VALADÃO, A. F. et al. Diagnóstico molecular para hemocromatose hereditária: um estudo de casos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, Maringá, v. 6, n. 3, p. 23-29, mar-maio 2014. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/periodico/20140501_182435.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2017.

- VIEIRA, V. A. As tipologias, variações e características da pesquisa de marketing. **Revista FAE**, v. 5, n. 1, p. 61-70, jan./abr., 2002. Disponível em: <<https://revistafae.fae.edu/revistafae/article/view/449/344>>. Acesso em: 26 set. 2017.
- VIEIRA, G. S.; TAVARES, C. A. P.; BOUCHARDET, F. C. H. Análise de DNA em odontologia forense. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 64-70, 2010. Disponível em: <<http://200.229.32.55/index.php/Arquivobrasileiroodontologia/article/viewFile/1547/1650>>. Acesso em: 6 jul. 2017.
- VIEIRA, S. **Genética forense**. 2011. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Votorantim, 2011. Disponível em: <<http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/38895/R%20-%20E%20-%20SILVANA%20VIEIRA.pdf?sequence=2>>. Acesso em: 5 jul. 2017.
- VIRMOND, M. B. et al. Fenotipagem forense pelo DNA através de SNPs. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 5, n. 2, p. 37-47, 2016. Disponível em: <http://equilibra.com.br/upload/tiny_mce/Trabalho_Publicado.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2017.
- WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ZAMARO, P. J. A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p.261-266, abr. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v38n4/a03v38n4>>. Acesso em: 3 jun. 2017.
- ZATZ, M. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/csc/v7n1/a08v07n1.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2017.