

APLICAÇÕES E CARACTERÍSTICAS DE MARCADORES MOLECULARES

Thalita Cristina Marques da Silva¹, Rodrigo Fabrizzio Inácio², Luis Henrique romano³

¹Aluna – Autora do 8º semestre do curso de Biomedicina do Centro Universitário Amparense – UNIFIA

²Professor do curso de graduação em Biomedicina do Centro Universitário Amparense – UNIFIA

³Professor orientador do curso de graduação em Biomedicina do Centro Universitário Amparense –
UNIFIA

Resumo

Os marcadores moleculares podem ser encontrados em todos os seres vivos, devido às mutações ocorridas em sequências repetidas da molécula de DNA. Eles foram descobertos através do estudo de polimorfismos, com a ajuda da biologia molecular, usando técnicas como a de PCR. Desta maneira, este trabalho tem como objetivo demonstrar através de uma revisão de literatura, a importância de marcadores moleculares para acompanhar o tratamento dos mais diversos tipos de doenças.

Palavras chaves: Marcadores moleculares, DNA. Biologia molecular

Introdução

Em meados do século XX, foi descrito por James Watson e Francis Crick a estrutura da molécula de DNA, sugerindo o modelo de dupla hélice. Essa descrição foi de grande impacto, publicada na revista Nature, em 25 de abril de 1953 e seguida, com pequenos ajustes, até os dias atuais (SCHEID, FERRARI e DELIZOICOV, 2005). O DNA é composto por cadeias de nucleotídeos, constituídas por um grupo de açúcar, outro de fosfato, sendo estes unidos por uma ligação fosfodiéster, além de sempre estar presente uma das quatro bases nitrogenadas sendo estas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) (REYS, MACEDO e DAMALIO, 2011).

Por meio dos conhecimentos que se iniciaram com os trabalhos de Mendel e as descobertas sobre a estrutura da molécula de DNA, entendeu-se que o material genético continha toda a informação necessária para dar origem ao dogma central das características hereditárias (REYS, MACEDO e DAMALIO, 2011). A complementaridade das bases torna possível realizar a produção de outras moléculas de DNA, uma vez que as bases e suas respectivas proteínas a serem traduzidas tornam-se conhecidas novamente observando o princípio do dogma central (SILVA, PASSOS e VILAS BOAS, 2013). Desse modo o DNA é preservado, transmitido e traduzido, por meio de três etapas.

A primeira etapa, chamada de replicação, resume-se a síntese completa e idêntica do DNA, passando para as demais gerações. Quando o objetivo é a produção de proteínas contidas em determinados trechos do DNA, nos genes, a fase iniciada é a transcrição que consiste em passar a informação na forma de uma molécula de RNAm, e por fim a tradução do RNAm, traduzindo a sequência nucleotídica, nos ribossomos, em proteínas (REYS, MACEDO e DAMALIO, 2011).

Para que todo esse processo seja realizado de maneira correta existem as enzimas de restrição responsáveis pelo reparo quando ocorre algum erro nos procedimentos, nas fases de replicação e transcrição. Porém algumas falhas acabaram originando o surgimento de mutações em alguns pontos, na inserção ou deleção de sítios adjacentes, o que resultou em variações no número e na forma da molécula de DNA uma vez que essas variações poderiam ocorrer em mais de 1% de uma população, o processo foi denominado polimorfismo (REGITANO e VENERONI, 2009).

-Os diversos tipos de polimorfismo foram possíveis de serem detectados por meio da aplicação da biologia molecular e engenharia genética na forma de marcadores moleculares. Polimorfismos podem ser obtidos em qualquer organismo vivo, pelo fato de uma sequência com várias repetições chamadas de microsatelites ser rica nesta mutação. Por meio dele passou a desenvolver as primeiras classes de marcadores (genética virtual). Dessa maneira o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão na literatura e elaborar uma descrição sobre como são obtidos e possíveis usos de alguns marcadores moleculares utilizados para seres humanos.

Revisão Bibliográfica e discussão

Os Marcadores são substâncias produzidas pelo corpo, a partir das informações contidas a partir das informações contidas no código genético, e podem ser encontradas nas análises dos fluídos corporais, como urina, e sangue. São identificados como proteínas, com a presença de antígenos na sua superfície. Entretanto, não são exclusivamente classes de proteínas, mas também, enzimas e alguns hormônios (SERDEZ, 2007 e ALMEIDA, 2007).

O seu aparecimento está relacionado com a gênese celular ou também com o crescimento de células neoplásicas, uma vez que a amplificação de determinados genes, permite potencializar o crescimento de uma célula, ou seja, com maior taxa de replicação inativam os genes de deleção, causando supressão tumoral (CAPELOZZI, 2001).

A relação desses genes e da observação dos marcadores relaciona marcadores como indicadores tumorais, produzidos pelo tumor ou pelo próprio organismo, através de uma resposta imune mediante a formação celular desordenada (SERDEZ, 2007). Essa característica é útil para o auxílio de diagnóstico,

localização do tumor, estadiamento, avaliação terapêutica, recidivas e prognóstico (ALMEIDA et al, 2007).

Observa-se que para a utilização e estudo dos marcadores, é necessário que o marcador tenha especificidade e sensibilidade. Essas características já foram observadas em diversos estudos, mas ainda não foi descoberto um marcador que torne possível detectar a doença em estado inicial, visto que sua concentração depende da proliferação do tumor, da sua atividade e liberação das células (SEDREZ, 2007).

Com a aplicação de técnicas cada vez mais modernas da biologia molecular, tornou-se possível a identificação e o desenvolvimento de vários tipos de marcadores, como os moleculares, bioquímicos e isoenzimáticos. Os marcadores moleculares estão relacionados com a variação da sequência de DNA pelos loci, já os isoenzimáticos favoreceram para o aumento do número de marcadores genéticos, enquanto os bioquímicos não utilizam o material genético, mas sim a expressão gênica do produto final, delimitando desse modo sua aplicação (REGITANO e VENERONI, 2009; YANG, 2013).

Para a utilização dos marcadores moleculares, é preciso a aplicação de algumas técnicas. A mais usada é a de PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase), por meio de suas etapas são obtidos os padrões moleculares. Em geral, os resultados obtidos com a técnica de PCR, estudados com o uso da eletroforese, uma vez que os marcadores são amplificados, a análise dos marcadores torna-se facilitada, porém sendo possível, por exemplo, a utilização de Southern blot usando sondas marcadas com isótopos radioativos (REGITANO e VENERONI, 2009; FRIDMAN et al, 2004).

Apesar de sua importância a técnica de PCR é relativamente simples de ser aplicada, sendo desenvolvida em três fases. Na primeira ocorre a abertura da fita de DNA, chamada de desnaturação, com necessidade de temperaturas altas entre 92°C-96 °C. Após esta etapa ocorre a ligação dos oligonucleotídeos que servem como moléculas iniciadoras (primers), gerando o anelamento, essa etapa precisa ter de ser resfriada com temperatura de 58°C -65°C, e por fim a etapa de extensão, em que é utilizada uma enzima específica chamada de taq polimerase, que irá promover a ligação dos dntps (as 4 bases nitrogenadas), aumentando a temperatura para 72 °C. Ocorrendo assim ciclos de repetições frequentes, para a amplificação do material de estudo (SCHEID, FERRARI e DELIZOICOV, 2005).

Na técnica de eletroforese de proteína, para a interpretação dos resultados de análise como a de PCR, é preciso ter uma corrente elétrica levando a separação das moléculas de proteína de acordo com seu peso molecular ou carga elétrica das moléculas envolvidas. Segundo OLIVEIRA, *et al* (2015), nessa separação são utilizadas forças eletroforéticas e eletroosmóticas, permitindo que um pólo negativo e outro positivo criem um campo elétrico a partir desse momento às partículas positivas, migram para o

campo negativo e conseqüentemente as partículas negativas vão para o campo oposto em um gel de agarose. Após a migração das proteínas ocorre a formação de bandas de leitura sendo observadas por corantes sensíveis.

Técnicas específicas podem ser utilizadas para cada tipo de material analisado. Na análise de Southern blot é preciso ter ocorrido à eletroforese, possibilitando a visualização das sondas marcadas. Esse material de interesse será transferido para uma membrana de nitrocelulose, antes do processo de transferência precisa ter então realizar a desnaturação e neutralização (MACIEIRA et al,2009).

Uma vez estabelecidas as técnicas de análise mais comuns, esse trabalho, selecionou alguns marcadores para uma abordagem rápida, tendo como ponto principal a característica de cada um e em que situação pode ser encontrada.

Afp

A alfafetoproteína (afp) é sintetizada no fígado, quando encontrada no saco vitelino participa do transporte plasmático e da pressão oncótica do feto. Considerado o marcador de câncer de fígado, podendo também estar presente no câncer de testículo, e em casos de hepatite crônica. Quando seu valor detectável atinge, de 500mg/dl torna-se indicativo de malignidade, e quando, maior que 1000 mg/dl é considerada como neoplasia (ALMEIDA et al, 2007).

CA 125

Este marcador é utilizado para o câncer de ovário, muito útil para acompanhar todas as fases de tratamento da doença. Pode ser encontrado em concentrações elevadas, tanto em homens como em mulheres que já apresentaram outro tipo de câncer, podendo ocorrer este aumento de concentração em casos de cirrose, como também no de cisto de ovário. Com uma sensibilidade que pode variar de acordo com o estágio da doença em torno de 80-85%, nos casos em que o tratamento envolve quimioterapia este número sobe para 94%, a sensibilidade desse marcador.

Segundo ALMEIDA et al (2007), este marcador também é estudado em crianças com linfoma não Hodgkin, relacionando a redução da presença dos marcadores com a ocorrência de um quadro recidivo.

KRAS

Encontrado com maior frequência no tumor de pulmão, indicando neoplasias malignas como pior prognóstico. As mutações celulares que se tornaram presentes nesse quadro cancerígeno possuem alguns fatores ambientais e mutagênicos relacionados ao quadro clínico, sendo eles o tabagismo e a transverção da guanina (G) pela timina (T) (DUARTE, 2005).

CEA

O antígeno carcinoembrionário (CEA), é produzido pela mucosa gástrica, e está presente nos casos de adenocarcinoma de cólon e reto. Apresenta uma sensibilidade de 40-47% com especificidade de 90-95%. Sua concentração pode ainda ser elevada no caso de distúrbios benignos como alguns tipos de cirrose, e doença de Chron. No caso de fumantes, pode haver certa elevação da concentração, mesmo em situação em que não se observa manifestações do quadro clínico. Segundo ALMEIDA et al (2007) a expressão associada, do CEA com CA125, é a indicação de um pior prognóstico.

CA 19.9

Conhecido como antígeno de Lewis, esse marcador é liberado na superfície da célula cancerosa e vai para a corrente sanguínea. Pode ser utilizado para o câncer colorretal, sendo mais indicativo para o câncer de pâncreas. Se a doença se apresenta em um estado inicial, este marcador já não é considerado bom. Além dos estágios da doença, sua sensibilidade está, relacionada com o local em que o tumor se encontra. Para o câncer de pâncreas sua sensibilidade vai de 70-94%, para vesícula biliar 60-79%, hepatocelular de 30-50% e para o câncer gástrico é de 40-60% (ALMEIDA et al, 2007).

Conclusão

Com o passar dos anos, e o melhoramento das técnicas de biologia molecular tornou-se possível a identificação dos marcadores moleculares relacionando vários estudos quanto à identificação, acompanhamento e possível controle de diversas doenças, como as de origem carcinogênicas. Entretanto, torna-se evidente a necessidade da continuidade dos estudos com marcadores moleculares, na busca de moléculas mais sensíveis e que possibilitem a identificação dos quadros iniciais das doenças relacionadas.

Referências

ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. Revista Brasileira de Cancerologia, v.53, p. 301-316, 2007.

CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. J Pneumol. , v. 27, p. 321-328, 2001.

DUARTE, R. L. DE M; PASCHOAL, M.E.M. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. J Bras Pneumol. , v.32, p. 56-65, 2005.

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S. P.; NETO, E. D.; OJOPI, E. P. B.. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. Rev. Psiq. Clín. v.3, p.19-25, 2004.

MACIERA, D.B.; MENEZES, R. C. A. A.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MESSICK, J.B.. Uso da técnica de Southern Blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções hemoplasma em gatos domésticos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 18, p. 1-6, 2009.

OLIVEIRA de, E.; TRENTIN, T. C.; CAMARGO F.; PINTO, Y. D. P.; MARTINS, D. B.. Eletroforese: conceitos e aplicações: conceitos e aplicações. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11, p.11-34, 2015.

POLIDO, P.B. FERREIRA, F. G.; ALBERTON, O.; SOUZA, S. G. H.. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento Genético de bovinos. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* v. 15, p. 161-169. 2012.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal, 2009, São Carlos. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil. 2009.

REYS. L, F.; MACEDO, J.N. A; DAMALIO, J.C.P. Dogma Central da Biologia Molecular e Introdução à Bioinformática, 2011. Disponível em: <http://lms.ead1.com.br/> acessado em: 14/09/2016.

SCHEID, N.M.J.; FERRARI, J.; DELIZOICOV, D.: A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. *Ciência e educação*, v. 11, n. 2, p. 223-233, 2005.

SEDREZ, A. H. Marcadores tumorais em destaque. Outubro, 2007. Disponível em: <http://www.labvw.com.br/2008/>. Acessado 14/08/2016.

SILVA DA, M.R.; PASSOS, M.M.; VILAS BOAS, A. A história da dupla hélice do DNA nos livros didáticos: suas potencialidades e uma proposta de diálogo. *Ciênc. Educv.* V.19, p. 599-616, 2013.

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; AND FANG, M.. *Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity.* *Journal of animal science and biotechnology*, V. 4, 2013.