

**NOTA TÉCNICA 4713****IDENTIFICAÇÃO DA REQUISIÇÃO****CÂMARA/VARA:** 2ª VARA CÍVEL, CRIME E JIJ**COMARCA:** Conselheiro Pena**I – DADOS COMPLEMENTARES À REQUISIÇÃO:****IDADE:** 01 ano**PEDIDO DA AÇÃO:** Elaboração de nota técnica específica acerca da realização dos exames SNP array com 750 K e Cariotipo Banda G para averiguação das moléstias**DOENÇA(S) INFORMADA(S):****FINALIDADE / INDICAÇÃO:** Elaboração de nota técnica específica acerca da realização dos exames SNP array com 750 K e Cariotipo Banda G para averiguação das moléstias**REGISTRO NO CONSELHO PROFISSIONAL:** CRMMG- 50032**NÚMERO DA SOLICITAÇÃO:** 2023.0004713**II – PERGUNTAS DO JUÍZO:**

Elaboração de nota técnica específica acerca da realização dos exames SNP array com 750 K e Cariotipo Banda G para averiguação das moléstias

**III – CONSIDERAÇÕES/RESPOSTAS:**

DADOS COPILADOS UP TO DATE

A intensa pesquisa genética aumentou exponencialmente nosso conhecimento do código genético de humanos e outros organismos, levando ao desenvolvimento de vários métodos que facilitam nossa compreensão de processos genéticos normais e anormais. Muitos desses métodos e técnicas relacionadas são agora usados rotineiramente no diagnóstico molecular de distúrbios hereditários e doenças que resultam de mutações somáticas, como as doenças hematológicas malignas. Os diagnósticos genéticos e citogenéticos moleculares são acréscimos inestimáveis aos testes laboratoriais e avaliação clínica, fornecendo

informações diagnósticas, terapêuticas e prognósticas.

Embora o advento de métodos moleculares aprimorados e mais rápidos tenha transformado o processo de diagnóstico tradicional, manter-se atualizado com os avanços mais recentes é assustador. Uma abordagem conceitual para uma seleção dos padrões mais comuns e novas ferramentas de diagnóstico será aplicada a esta revisão. Um esboço das vantagens e limitações de cada uma das técnicas é incluído, bem como alguns exemplos de suas aplicações. Uma breve introdução aos termos necessários para entender adequadamente esses aplicativos é fornecida separadamente.

Três categorias gerais de teste podem ser distinguidas.

- **A detecção de mutação de alterações de sequência conhecidas** pode ser realizada. Este tipo de teste é direcionado e normalmente limitado a um número predefinido de mudanças de sequência, selecionadas com antecedência. A seleção é geralmente baseada na associação com fenótipos clínicos. As alterações de sequência podem estar localizadas em um único gene ou em vários genes. Dependendo do método de teste usado, o número de alterações de sequência incluídas pode variar de uma única mutação a milhares de mutações.

- **Os estudos citogenéticos de grandes variantes estruturais** são normalmente realizados quando o fenótipo não parece limitado a mutações pontuais e deleções e duplicações relativamente pequenas. Esses estudos são úteis em fenótipos sindrômicos e para constelações de sintomas tipicamente associados a anormalidades na escala dos cromossomos, em vez de exons ou genes únicos.

- **Os métodos de genotipagem podem ser aplicados para identificar mutações não selecionadas com antecedência.** Esses métodos têm como objetivo descobrir mutações e podem ter como alvo um gene com uma distribuição heterogênea conhecida de mutações ou podem ter como alvo segmentos maiores do genoma para identificar variações conhecidas ou novas.

## DETECÇÃO DE MUTAÇÕES CONHECIDAS

Existem muitas abordagens diferentes para a identificação de mutações conhecidas e selecionadas. Normalmente, estes começam com a reação em cadeia da polimerase, após a qual etapas de ensaio adicionais são realizadas. A seção a seguir lista exemplos de algumas das técnicas usadas com frequência, junto com suas vantagens e desvantagens. Métodos gerais de detecção de mutações, como sequenciamento de DNA, também podem ser aplicados à identificação de mutações conhecidas. Embora toda a sequência em um fragmento amplificado pudesse ser lida, as mutações dentro desse segmento seriam prontamente identificadas por este método mais abrangente.

**Reação em cadeia da polimerase** - A reação em cadeia da polimerase automatizada (PCR) é comumente a primeira etapa na grande maioria das análises de DNA porque aumenta a quantidade de DNA disponível para análise.

**Digestão por enzima de restrição** - a digestão por enzima de restrição pode ser usada para detectar mutações que criam ou destroem um sítio de enzima de restrição. Enzimas de restrição específicas, geralmente isoladas de bactérias, reconhecem sequências curtas únicas dentro de um fragmento de DNA. Essas enzimas podem clivar as fitas de DNA naquele local exato. Se uma mutação altera o código de DNA para uma

sequência que cria um novo sítio de enzima de restrição ou oblitera um sítio de enzima de restrição existente, a mutação pode ser detectada com base na presença ou ausência do sítio .

Um exemplo de tal teste é um ensaio de digestão de restrição para a síndrome de Muenke, um tipo de síndrome de craniossinostose definida por uma única mutação (c.749C> G, p.Pro250Arg) no gene FGFR3 que cria um novo sítio de restrição. Neste ensaio, o exon 7 é amplificado por PCR, e a amostra é submetida a uma digestão de restrição com Ban I, a enzima que reconhece o novo local. O DNA de pacientes portadores da mutação é clivado pela enzima, enquanto o DNA de controle sem a mutação permanece não clivado.

As vantagens desta técnica incluem o seguinte:

- É tecnicamente fácil e pode ser executado em um dia.
- A análise de restrição enzimática detecta mutações específicas e pode ser aplicada a muitas amostras simultaneamente. Essas amostras são então executadas lado a lado em um único gel.

As desvantagens são as seguintes:

- Este método é impraticável para distúrbios causados por um grande número de mutações diferentes e para a detecção de mutações associadas a sequências de nucleotídeos que requerem o uso de enzimas de restrição caras.
- Apenas uma pequena fração das mutações pontuais existentes realmente criam ou removem um site de restrição. Em alguns casos, este

problema pode ser contornado pela introdução de um sítio de restrição artificial durante a amplificação por PCR .

- A digestão incompleta pode produzir resultados errôneos. Este problema pode ser superado usando controles adequados.

Sistema de mutação refratário à amplificação - O sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS) pode ser usado para detectar mutações pontuais conhecidas. Esta técnica requer uma reação PCR multiplex . Nesta reação, dois pares de primers são adicionados a um único tubo de PCR e duas sequências separadas de um pedaço de DNA são amplificadas na mesma reação. Uma reação (usando o par de primer de controle) é um controle interno para demonstrar que a própria reação de PCR funcionou. A outra reação (usando um par de primer específico para a mutação em estudo) amplificará a sequência alvo dependendo da presença ou ausência de uma mutação pontual específica. Um segundo tubo contém DNA do mesmo paciente e inclui o par de primer de controle e um par de primer que amplifica apenas a sequência normal. A única diferença entre os iniciadores para a sequência normal e mutante é a complementaridade de um iniciador na extremidade 3', onde um é idêntico ao normal e outro à sequência variante. O outro primer é o mesmo para ambas as reações, e o tamanho do produto será o mesmo. Quando executadas lado a lado em um gel, essas amostras exibirão homozigose para a sequência normal, homozigose para a mutação ou heterozigosidade

Este ensaio é uma modificação real do próprio PCR, em vez de uma etapa adicional após a amplificação original. ARMS pode ser executado para apenas uma ou um pequeno número de mutações testadas simultaneamente. Um exemplo é um teste ARMS para a mutação BRAF

c.1799T> A (p.V600E), que foi identificado no carcinoma colorretal, melanoma e carcinoma papilar da tireoide. Como a mutação é uma mutação pontual, alterando um nucleotídeo para outro, os iniciadores podem ser projetados de modo que a sequência do tipo selvagem ou mutante corresponda perfeitamente à extremidade 3 do iniciador. Em um ensaio otimizado, um produto de PCR seria então esperado apenas com o par de primer que corresponde inteiramente.

As vantagens desta técnica incluem o seguinte:

- É fácil de executar e concluir em um dia.
- Ele pode detectar mutações pontuais específicas e avaliar muitas amostras simultaneamente. A modificação do método permite a análise de várias mutações em um tubo de ensaio.

As desvantagens são as seguintes:

- É impraticável para distúrbios causados por um grande número de mutações.
- Os pares de primer devem ser projetados para todas as reações. A amplificação dessas reações nas mesmas condições é um pré-requisito. Se as condições forem subótimas para um dos pares de primers, a amplificação fraca ou não específica pode resultar em resultados ambíguos.
- Cada amostra de paciente requer vários tubos de PCR.

Hibridização de oligonucleotídeo específico de alelo - a hibridização de oligonucleotídeo específico de alelo (ASO) envolve a colocação ("spotting") de DNA amplificado por PCR desnaturado em uma membrana e

subsequente hibridização com sondas marcadas específicas de alelo curtas. Em condições ideais de hibridização e lavagem, a hibridização só ocorrerá se a sequência da sonda for perfeitamente complementar à amostra de DNA de fita simples.

Normalmente, os produtos de PCR de uma amostra de paciente são fixados em duas membranas idênticas (um "dot-blot"), uma das quais é hibridizada com uma sonda que contém a sequência normal, enquanto a outra é hibridizada com uma sonda para a sequência mutante. As duas sondas devem diferir em apenas um nucleotídeo, correspondendo à mutação pontual sob investigação. Após a exposição a um filme autorradiográfico no caso de marcação de sonda radioativa, ou após tratamento químico no caso de oligômeros biotinizados, os sinais positivos são marcados e a heterozigosidade ou homozigosidade para a sequência normal ou mutante pode ser determinada

A hibridização ASO pode ser modificada para analisar um painel de mutações para um único paciente. Na hibridização específica de alelo "reversa", por exemplo, sondas específicas de sequência são colocadas na membrana e apenas uma membrana é usada por paciente. O ASO reverso é menos econômico do que o ASO normal, mas pode diminuir o tempo de resposta por amostra. Este método é frequentemente aplicado em testes moleculares para fibrose cística.

As vantagens da hibridização ASO incluem o seguinte:

- É adequado para análise de mutações específicas ou polimorfismos em várias amostras
- É altamente sensível e específico se for otimizado corretamente.

- São possíveis adaptações para análise PCR multiplex ou análise automatizada de microarray (chip de DNA).

As desvantagens incluem:

- Cada sonda ASO pode detectar apenas uma sequência específica.
- A hibridização ASO é sensível apenas a pequenas mutações de DNA.
- Há potencial não especificidade se as condições de hibridização e / ou lavagem não forem totalmente otimizadas.

Microarrays de genotipagem - microarrays de genotipagem estão disponíveis em uma variedade de plataformas moleculares diferentes. Todos eles podem interrogar um número flexível de mutações ao mesmo tempo, o que os torna atraentes para análises de alto rendimento em um ou vários genes, para um ou vários pacientes diferentes ao mesmo tempo. Esses ensaios são normalmente automatizados e em uma configuração de alto rendimento (ou seja, análise automatizada de várias amostras simultaneamente), não requerem trabalho prático após o início da execução do ensaio.

As vantagens deste método incluem o seguinte:

- É adequado para análises de alto rendimento de mutações ou polimorfismos específicos em várias amostras.
- É necessário um trabalho relativamente menos prático por amostra.
- A interpretação dos dados também pode ser altamente automatizada.

As desvantagens incluem:

- O equipamento de análise de microarray, bem como os arrays individuais, podem ser caros.
- Frequentemente, esse método não é adequado para teste de baixo volume, em particular quando os microarrays podem ser usados apenas uma vez, independentemente de apenas uma ou várias amostras serem testadas.

#### **IV – CONCLUSÕES**

- ✓ As ferramentas de diagnóstico citogenético e molecular são aplicadas para três propósitos principais em genética clínica: detectar mutações específicas, estudar grandes variantes estruturais cromossômicas e genotipagem para encontrar mutações que não foram previamente identificadas.
- ✓ Mutações conhecidas - a maioria das ferramentas para identificar mutações selecionadas envolve a tecnologia de reação em cadeia da polimerase (PCR). Técnicas envolvendo enzimas de restrição específicas podem ser usadas para encontrar mutações que podem afetar o local de clivagem alvo da enzima, embora apenas uma pequena fração de mutações pontuais sejam passíveis de tais técnicas. O sistema de mutação refratária à amplificação (ARMS) envolve uma reação de PCR multiplex e pode detectar mutações pontuais específicas. Outras técnicas envolvem hibridização de oligonucleotídeos e genotipagem de microarranjos. Microarrays podem permitir alto rendimento.
- ✓ No caso em tela trata-se de mutação conhecida
- ✓ A demanda em tela solicita um tipo específico de teste genético (microarrays) para paciente que já apresenta diagnóstico por outro método de teste genético (cariótipo)
- ✓ Uma desvantagens do método ( para padrões de países de primeiro

mundo ) é o alto custo

- ✓ Não ficou demonstrado os benéficos que o novo teste poderia trazer para o paciente e/ou familiares
- ✓ Não ficou demonstrado que condutas seriam tomadas ou não em benefício do paciente com a realização de um novo teste uma vez que já existe diagnóstico

#### **IV – REFERÊNCIAS:**

- ✓ Tools for genetics and genomics: Cytogenetics and molecular genetics. Authors: [Iris Schrijver, MD](#) [James L Zehnder, MD](#) Section Editor: [Benjamin A Raby, MD, MPH](#) Deputy Editor: [Jennifer S Tirnauer, MD](#) Contributor Disclosures. All topics are updated as new evidence becomes available and our [peer review process](#) is complete. Literature review current through: Oct 2021. | This topic last updated: Aug 07, 2021.

**V – DATA:** 14/11/2021

NATJUS - TJMG