

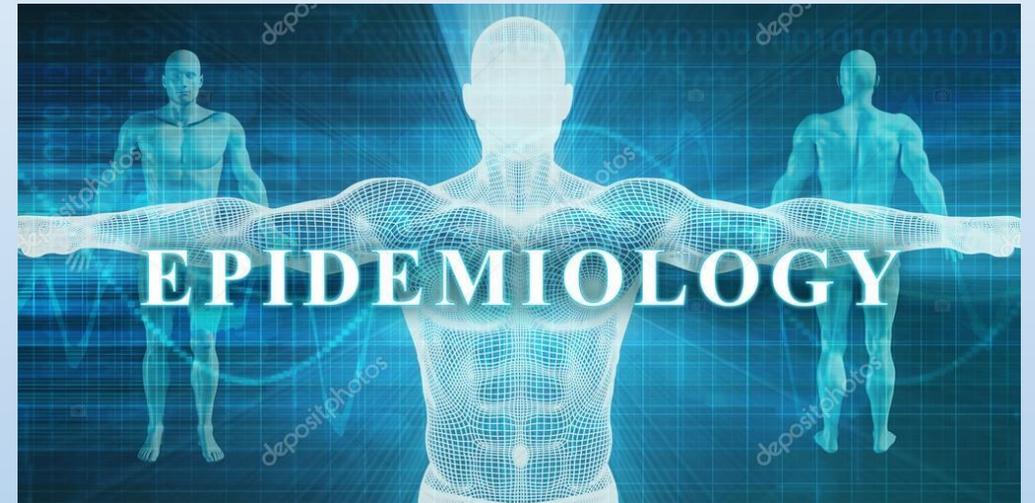
Epidemiologia molecular, genotipagem, fenotipagem

Disciplina de Graduação da Faculdade de Saúde Pública - IMT2003

Thelma S. Okay – Profa. Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-USP) thelma.okay@usp.br

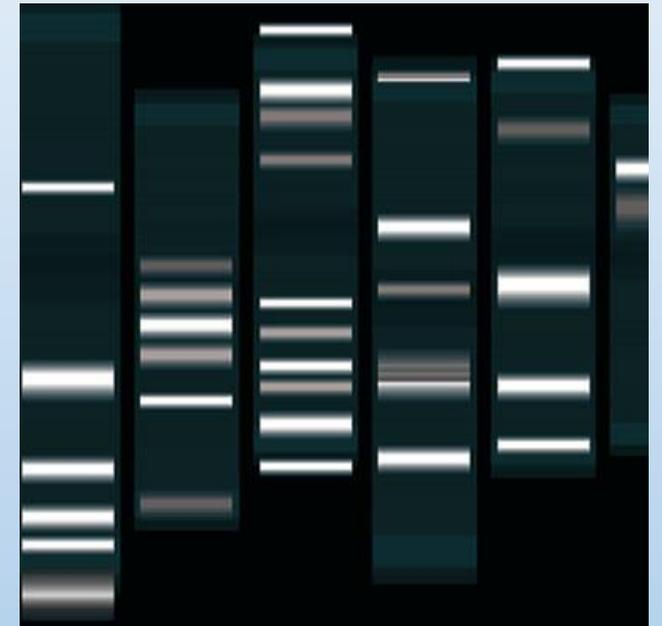
Áreas de atuação da epidemiologia

- **Epidemiologia molecular**
- Epidemiologia genética
- Epidemiologia veterinária
- Epidemiologia das doenças infecciosas e parasitárias
- Epidemiologia das doenças não transmissíveis
- Epidemiologia das doenças neurológicas
- Epidemiologia da violência
- Epidemiologia ambiental
- Epidemiologia aplicada à serviços de saúde
- Epidemiologia das infecções hospitalares

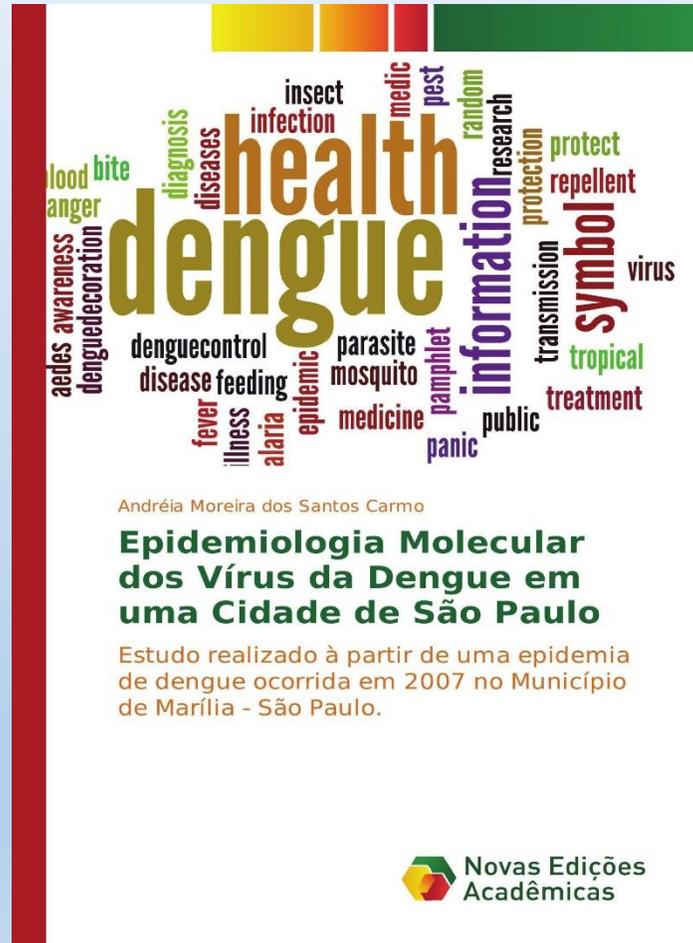


Conceito de epidemiologia molecular

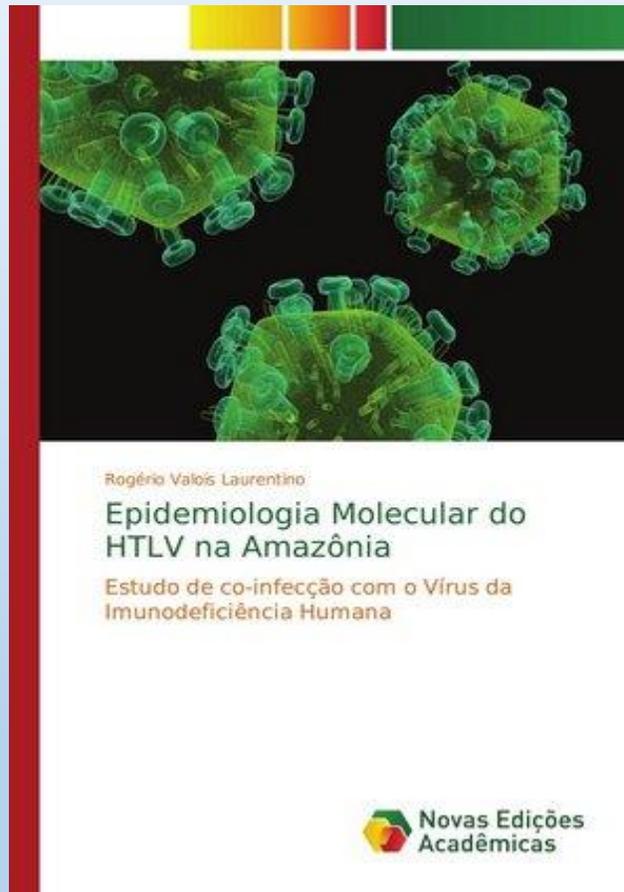
- **Epidemiologia molecular** é um ramo da ciência médica que se preocupa com a: definição, identificação, e monitorização de espécies, subespécies e cepas patogênicas relevantes por meio de tecnologia molecular e biologia evolutiva
- Surgiu do uso de ferramentas criadas para o estudo da genética populacional em investigações epidemiológicas
- Os meios epidemiológicos revestem-se de valioso aspecto transferindo ao laboratório as observações necessárias ao entendimento dos processos mórbidos, com foco na busca da teoria causal ou etiológica
- Além dos princípios da genética, estatística e análises populacionais, a epidemiologia molecular inclui a perspectiva de análise da biologia molecular ou seja, lança mão dos mesmos princípios que orientam a compreensão das reações das células vivas e dos desarranjos bioquímicos e guiam o estudo das doenças e a identificação das populações suscetíveis
- Referências: Int J Molec Epidemiol Genet - homepage of the *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*
- mEpiWorks - homepage of the International Working Group for Molecular Epidemiology (mEpiWorks) - an informal community to support the use of molecular tools in veterinary epidemiology



Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares



Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares



Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares

Epidemiologia Molecular de Hepatite B e C



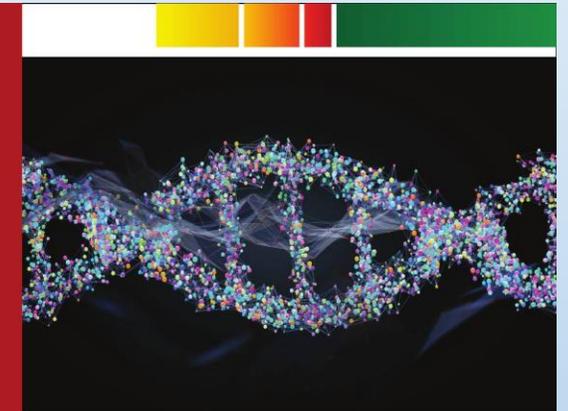
Lia Laura Lewis-Ximenez, MD, PhD
Laboratório de Hepatites Virais
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz
Ministério da Saúde
Rio de Janeiro, Brasil
llewis@ioc.fiocruz.br



Identificação de marcadores fenotípicos e moleculares para obesidade

Na prática clínica, a distinção entre obesidade genética e alimentar muitas vezes não é evidente, provavelmente devido à falta de um teste genético que seja acessível e de baixo custo. Devido à complexidade e gravidade da obesidade é necessário conhecer os fatores etiológicos para direcionar o paciente ao tratamento adequado. Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo identificar marcadores fenotípicos e moleculares para a obesidade e avaliar a viabilidade de uso dos mesmos no acompanhamento multiprofissional de pacientes obesos.

Nutricionista formada na Universidade Federal do Piauí com experiência na área de biologia molecular aplicada em Nutrigenômica e Nutrigenética, padronização de protocolos de bioinformática e de extração de DNA humano. Possui experiência no Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ MINAS) com cultivo in vitro de parasitos de Leishmania.



Juliana de Carvalho Passos · Davi Lima · Daniel Liarte

Identificação de marcadores fenotípicos e moleculares para obesidade

Trabalho de conclusão de curso
apresentado no curso de Nutrição da
Universidade Federal do Piauí



978-613-9-69162-3

 Novas Edições
Acadêmicas

Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares

Epidemiologia Molecular do Papilomavírus Humano em Alagoas, Brasil

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus da família Papillomaviridae e possui o seu genoma constituído de DNA. É o causador da transmissão sexual viral de maior frequência. O câncer cervical ou câncer de colo de útero possui a segunda maior ocorrência nas mulheres de todo o mundo. Estudos recentes têm comprovado que alguns tipos de HPV são os principais responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de câncer. De acordo com a sua atividade na carcinogênese, esse grupo viral foi dividido em tipos de baixo e de alto risco oncogénico. O Brasil ainda não possui uma quantidade representativa de dados relacionados à prevalência de infecção por HPV, os dados de incidência do vírus são obtidos através da análise de portadores de carcinoma invasivo de colo uterino, neoplasias intraepiteliais cervicais e outros tipos de infecções associadas. Ensaio moleculares vêm mostrando ao longo dos anos uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do HPV. Essas técnicas mostram a necessidade da aplicação de um diagnóstico viral mais sensível e específico, contribuindo para o controle da infecção viral e para a diminuição da incidência e da mortalidade causadas pelo câncer cervical.



Formou-se em Biomedicina pelo Centro Universitário CESMAC. É Especialista em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco. É Mestre em Ciências da Saúde/Biologia Molecular pela Universidade Federal de Alagoas. Atualmente cursa o Doutorado em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco.



978-620-2-04775-3



Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho

Epidemiologia Molecular do Papilomavírus Humano em Alagoas, Brasil

Tipagem genética por sequenciamento de DNA

 Novas Edições Acadêmicas

Epidemiologia molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes fontes no Brasil

Andrea Nicke MORENO;
Renata PATXÃO;
Luísa Zanelli MORENO;
Débora D. Sena de OGBBI;
Daniela Cristine RAIMUNDO;
Thais S. P. FERREIRA;
Ernesto HOFER;
Márcia Helena MATTE;
Marina MORENO.

- Dep. de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil;
- Faculdade de Medicina Veterinária da Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo - SP, Brasil;
- Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil;
- Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil.

Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares

Epidemiologia Molecular

A giardíase é uma doença de importância em saúde humana e animal. O enteropatógeno responsável pela enfermidade é o protozoário flagelado *Giardia duodenalis*, causador de diarreia e deficiências nutricionais. Este livro apresenta a distribuição genotípica deste parasito cosmopolita e demonstra métodos moleculares para a detecção do mesmo. Os processos de genotipagem percorrem desde presença parasitária, extração de material genético e diagnóstico molecular.



Biólogo Molecular e Especialista em Análises Clínicas e Avanços Diagnósticos pela Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP). Possui experiência em laboratório de análises clínicas bioquímicas e parasitológicas, e docência nas disciplinas relacionadas às ciências naturais na educação básica, técnica e superior.

Juares Elias Santos Junior

Epidemiologia Molecular
Enteropatógeno *Giardia*



978-3-330-77000-3



DEFESA

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas convida a todos a comparecer à defesa da Dissertação de Mestrado que terá como tema:

***Candida tropicalis*: Epidemiologia molecular de isolados clínicos em Hospital Universitário de Minas Gerais**

Aluna: Lucas Machado Moreira
Orientadores: Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira
Dr. Mauro de Medeiros Muniz

A Comissão Examinadora será constituída pelos professores:
Dr.ª Cristiane da Cruz Lamas - INI/Fiocruz (Presidente)
Dr. André Luis Souza dos Santos - UFRJ (Membro)
Dr.ª Lucimar Ferreira Kneipp - IOC/Fiocruz (Membro)
Dr.ª Danielly Corrêa Moreira de Sequeira - INI/Fiocruz (Suplente)
Dr.ª Livia de Souza Ramos - UFRJ (Revisora)

DIA 28 DE FEVEREIRO, ÀS 09H00, NO AUDITÓRIO DO PAVILHÃO DE ENSINO
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) - Campus Manguinhos / Fiocruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro/RJ - Brasil



Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares



Epidemiologia Molecular e Registros de Câncer

Reunião da Associação Brasileira de Registros de Câncer

Porto Alegre, 13-15 de maio de 2002

Sergio Koifman, Escola Nacional de Saúde Pública/ Fiocruz

Identificación de marcadores moleculares del cáncer colorrectal

El cáncer de colon o cáncer colorrectal (CCR) constituye la segunda causa de muerte en el mundo occidental. A nivel celular, es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen a la transformación de las células normales de la mucosa del epitelio del colon en células neoplásicas. Gracias a los avances en la secuenciación genómica, hoy en día es posible monitorizar y determinar la expresión de miles de genes de manera simultánea en una misma muestra biológica, potenciando la identificación de marcadores para la detección precoz, clasificación y pronóstico de tumores, así como para la identificación de dianas de nuevas terapias. En este trabajo se ha estudiado el CCR bajo dos puntos de vista. Por un lado se han utilizado modelos celulares en los que se ha inducido la sobreexpresión o silenciamiento de los genes Id1 e Id2, muy relacionados con procesos de progresión tumoral. Por otro lado, mediante el uso de biopsias de pacientes afectados con cáncer de colon, se ha llevado a cabo un estudio de expresión génica, identificando un grupo de 9 genes con un valor diagnóstico del 96%.

Amaia García-Bilbao

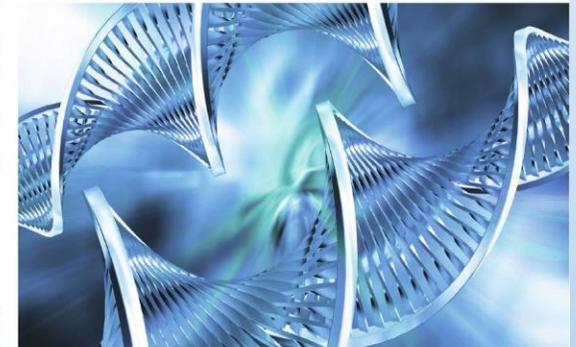
Trabaja como investigadora en Gaiker-IK4. Blanca Suárez Merino, Doctora en Genética Molecular, trabaja como responsable del Área de Biomedicina en Gaiker-Ik4. Ana Alonso-Varona es Profesora Titular de Histología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU.



978-3-659-02256-2

editorial académica española

oao
editorial académica española



Amaia García-Bilbao · Ana Alonso-Varona · Blanca Suárez-Merino

Identificación de marcadores moleculares del cáncer colorrectal

Diagnóstico/pronóstico del cáncer colorrectal

Marcadores del cáncer colorrectal

García-Bilbao, Alonso-Varona, Suárez-Merino

Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares

Marcadores Moleculares del Cáncer Pulmonar

El conocimiento del origen molecular del cáncer ha abierto paso a la búsqueda de biomarcadores que puedan ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, y tratamiento personalizado de esta patología. En el presente texto, se reporta la evaluación de la amplificación de los oncogenes MYCL1, MYCN, MYC, EGFR, ERBB2 Y AKT2, y la metilación de los genes supresores tumorales p16, FHIT, APC, TIMP2, MGMT, RASSF1 en DNA obtenido a partir de tejido pulmonar afectado y plasma sanguíneo de pacientes con cáncer primario de pulmón, y en tejido pulmonar normal y plasma de personas sanas, con el objetivo de determinar si el estado de amplificación y metilación de dichos genes diferencia entre los fenotipos neoplásico y normal. Evaluando también la utilidad del DNA libre en plasma sanguíneo para la detección de las características moleculares del tumor. Esta investigación muestra la importancia de profundizar en el estudio de marcadores moleculares en plasma sanguíneo, pudiendo convertirse este tipo de pruebas en el principal método de tamizaje para el abordaje efectivo de la patología neoplásica pulmonar en sus primeras etapas.



Alba Mayerly Alvarez Mogollón
Bióloga, Magister en Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia. Experiencia en docencia e investigación en las áreas Genética del Cáncer, Epigenética, e Inmunogenética. Actualmente se desempeña como perito en identificación Humana en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses- Colombia.



978-3-8484-6601-6

editorial académica española



Marcadores Moleculares - Cáncer Pulmonar

Alba Mayerly Alvarez Mogollón · Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez · Sandra Janneth Perdomo Lara

Marcadores Moleculares del Cáncer Pulmonar

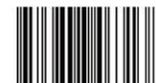
Metilación Génica y Amplificación de Oncogenes, como Marcadores Moleculares del Cáncer Pulmonar

Marcadores moleculares en el cáncer oral

El proceso carcinogénico es complejo y en su desarrollo, están implicados genes y proteínas relacionadas con todas las fases del proceso neoplásico, desde la división y proliferación celular, hasta la destrucción tisular e invasión metastásica. Múltiples genes están involucrados en cada una de estas fases, pero el objetivo de este libro, es desarrollar aquellos que parecen tener implicación directa en el diagnóstico, pronóstico o el tratamiento del COCE. Así vamos a desarrollar la implicación de p16INK4a y p21Waf1/CIP1 como moléculas reguladoras del ciclo celular; c-myc como oncogén implicado en la proliferación tumoral; HIF (factor de hipoxia inducible) y CA (anhidrasa carbónica) como marcadores de hipoxia tumoral; TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) y APC (poliposis adenomatosa coli) en la metástasis tumoral; y el papel de los miRNAs como nuevas moléculas diagnósticas y terapéuticas en el COCE.



Mario Pérez-Sayáns García
Doctor en Odontología "Cum Laude", Premio extraordinario de Licenciatura. Premio extraordinario de la C.A. de Galicia. Primer Premio Nacional. Investigador en la USC y en el grupo IDIS. Autor de 25 artículos internacionales indexados en el JCR, varios libros y capítulos, además de múltiples conferencias y comunicaciones a congresos.



978-3-8484-6313-8

editorial académica española



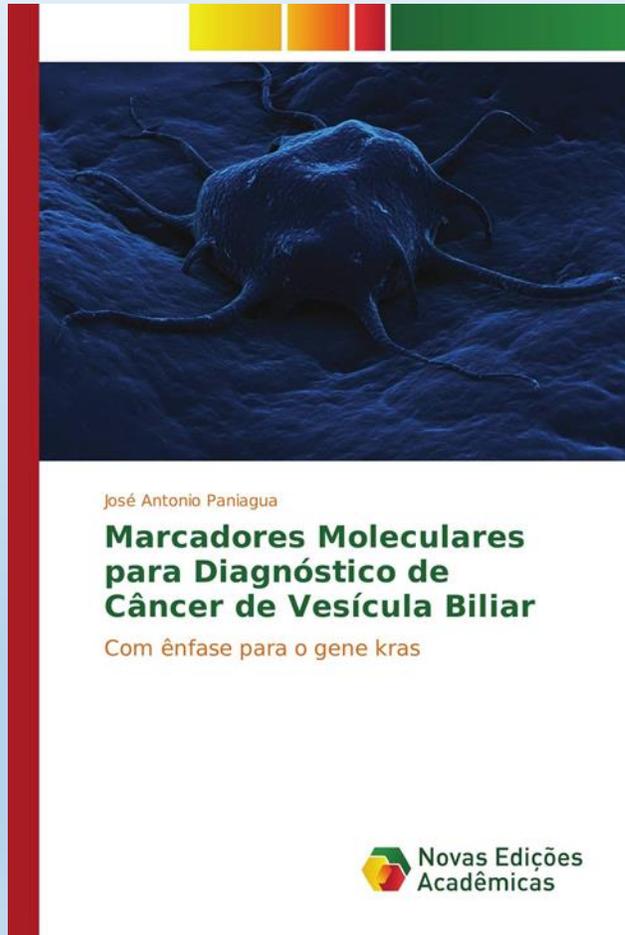
Biomarcadores en el cáncer oral

Mario Pérez-Sayáns García · Abel García García · José M Suárez Peñaranda

Marcadores moleculares en el cáncer oral

Importancia del diagnóstico molecular en el pronóstico y respuesta terapéutica

Exemplos de estudos epidemiológicos moleculares



Marcadores moleculares em oncologia

Tumor	Indicação	Amostra	Genes analisados
Câncer de mama invasivo	Tumor invasivo em estágio inicial com receptor de estrogênio positivo e <i>HER-2</i> negativo	Material de biópsia ou peça cirúrgica	<i>Ki-67, STK15</i> , survivina, ciclina B1, <i>MYBL2</i> , estromelisin-3, catepsina L2, <i>GRB7, HER-2, ER2, PR, Bcl-2, SCUBE2, GSTM1, CD68, BAG1</i> • Genes de referência: Beta-actina, <i>GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC</i>
Carcinoma ductal <i>in situ</i> da mama (CDIS)	CDIS recém-diagnosticado	Material de biópsia	<i>Ki-67, STK15</i> , survivina, ciclina B1, <i>MYBL2, PR, GSTM1</i> • Genes de referência: Beta-actina, <i>GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC</i>
Câncer de próstata	Tumor recém-diagnosticado	Material de biópsia	<i>AZGP1, KLK2, SRD5A2, FAM13C, FLNC, GSN, TPM2, GSTM2, TPX2, BGN, COL1A1, SFRP4</i> • Genes de referência: <i>ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1, PGK1</i>
Câncer de cólon	Câncer de cólon em estágio II ou III-A/B	Peça cirúrgica	<i>Ki-67, C-MYC, MYBL2, FAP, BGN, INHBA, GADD45B</i> • Genes de referência: <i>ATP5E, PGK1, GPX1, UBB, VDAC2</i>

Marcadores moleculares do câncer pulmonar

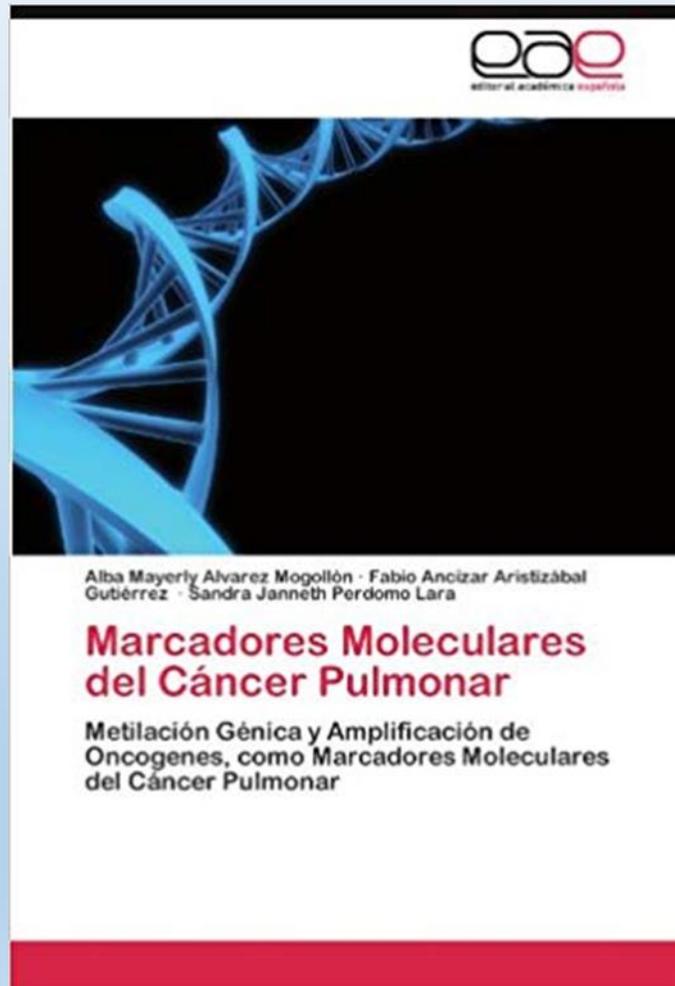


TABELA 1
Imuno-histoquímica dos marcadores neuroendócrinos em câncer de pulmão

Marcadores	SCC	NSSC	Referência
L-dopa descarboxilase	48-82%	12-33%	Gazdar, 1988 ⁽¹⁸⁾
Cromogranina-A	48-93%	0-28%	Graziano, 1989 ⁽¹⁹⁾
Enolase	93-100%	27-57%	Jorgensen, 1990 ⁽²⁰⁾
Bombesina (GRP)	20-69%	1-17%	Gazdar, 1988 ⁽¹⁸⁾
Sinaptofisina	43-88%	10-28%	Gazdar, 1988 ⁽¹⁸⁾
Leu-7	59-89%	16-44%	Gazdar, 1988 ⁽¹⁸⁾

Quadro 2 - Principais diferenças nas frequências dos marcadores moleculares no câncer de pulmão

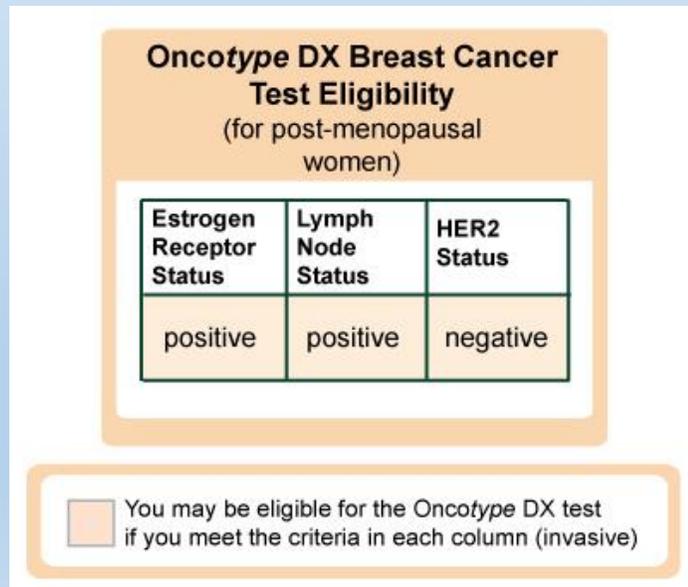
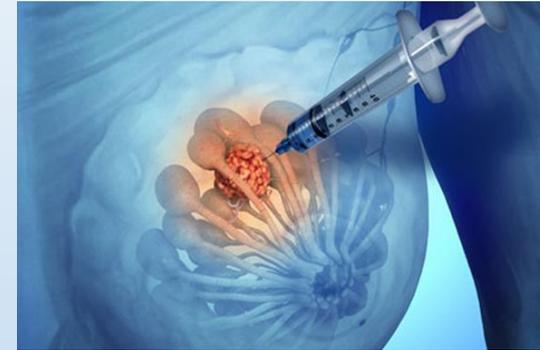
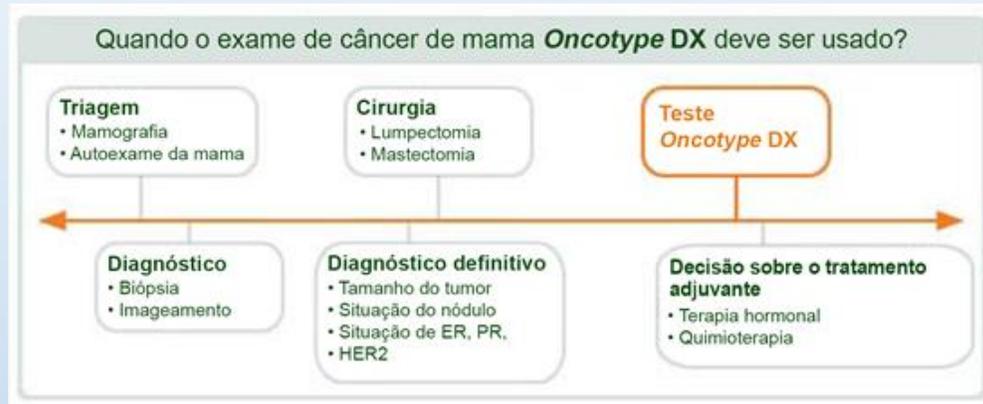
Marcador molecular	CPNPC (%)	CPPC (%)
p53	40-60	40-70
Rb	30	~100
p16	10-40	<1
K-ras	15-20	<1
c-myc	10	80-90
BCL-2	12-25	75-80
c-erbB-2	25	<5
FHIT	40	80
Telomerasas	80-85	~100
GRP/BN	Raro	20-60

CPNPC: carcinoma de pulmão não pequenas células;

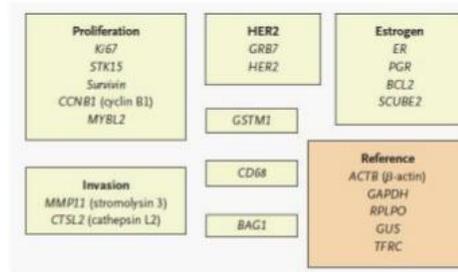
CPPC: carcinoma de pulmão pequenas células.

Fonte adaptada a partir das referências 2, 15 e 22.

Marcadores moleculares no câncer de mama



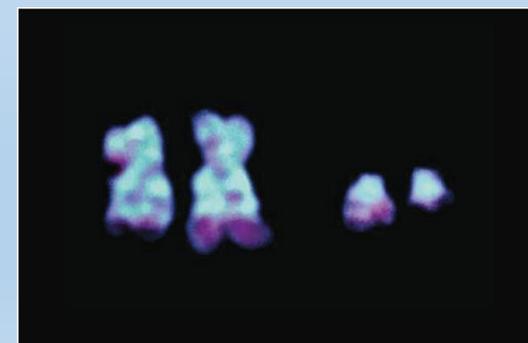
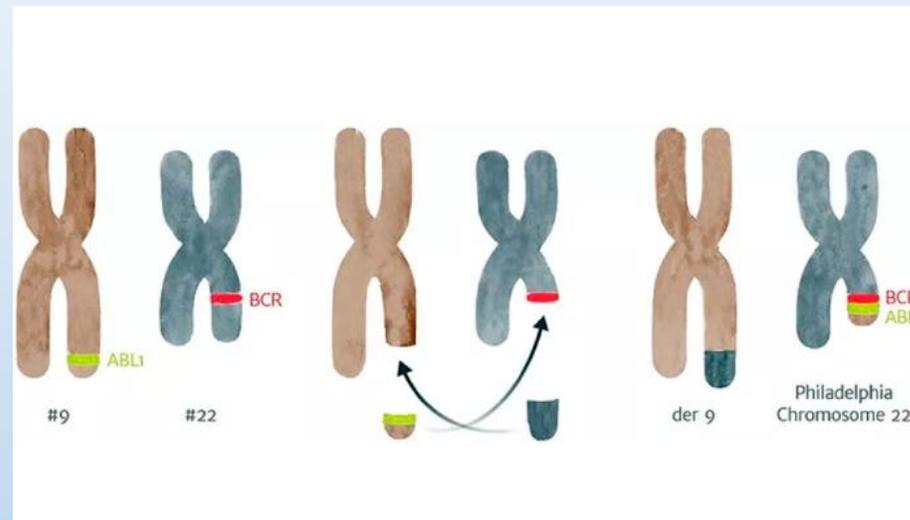
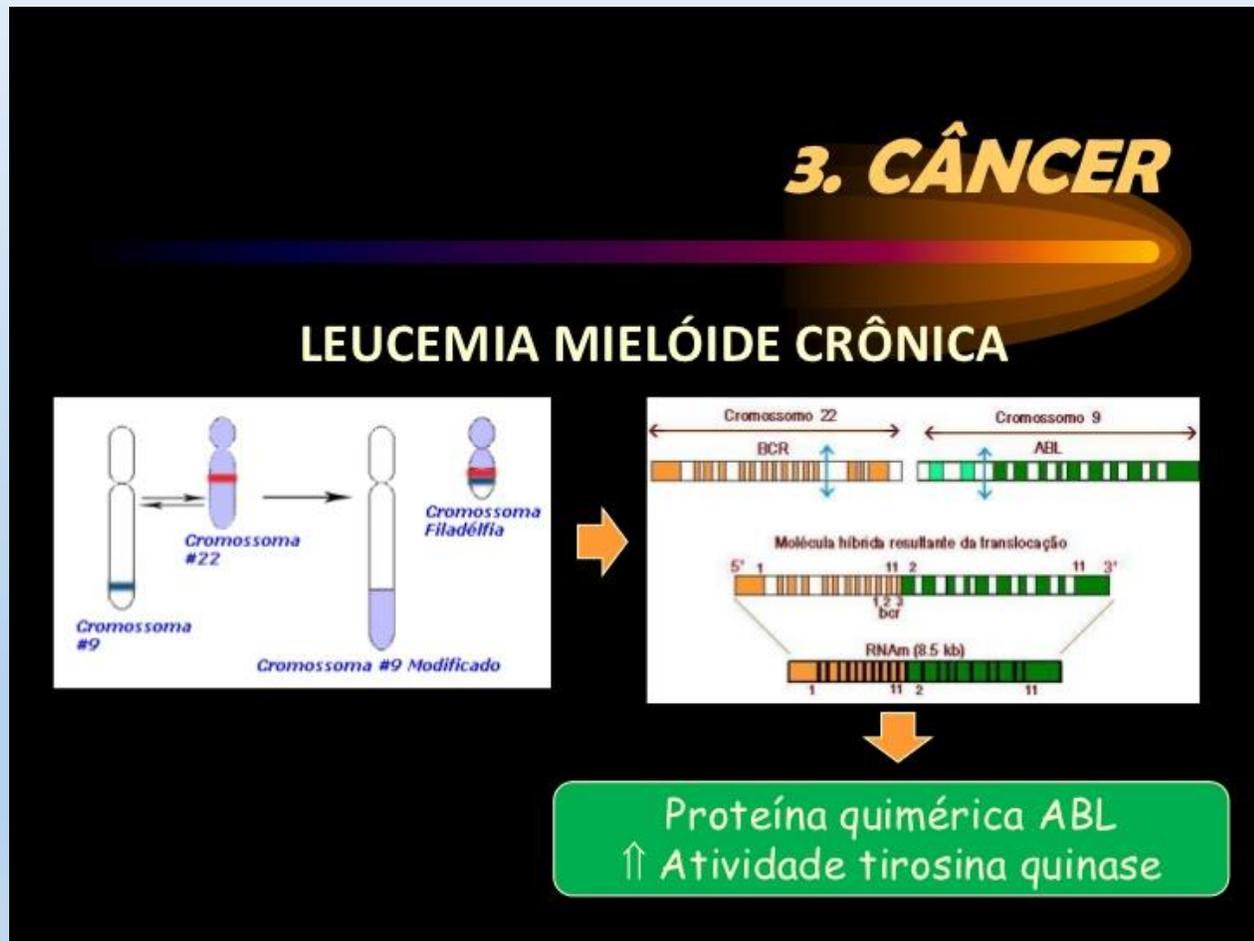
Oncotype Dx: Technology



- Quantifies the standard pathologic characterization
- Complex algorithm that adds the HER2, proliferation, and invasion scores, and subtracts the estrogen score in a weighted fashion

- Reported as a Recurrence Score (RS)
- RS < 18 = low risk
- 18 ≤ RS < 31 = intermediate risk
- RS ≥ 31 = high risk

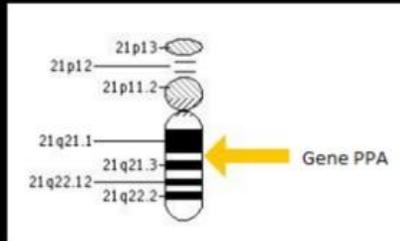
Marcadores na leucemia mieloide crônica



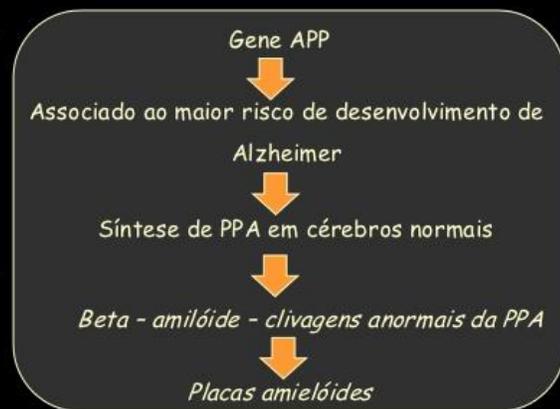
Epidemiologia molecular na doença de Alzheimer e no tratamento de crianças com baixa estatura

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Avalia a suscetibilidade a doença



Alzheimer

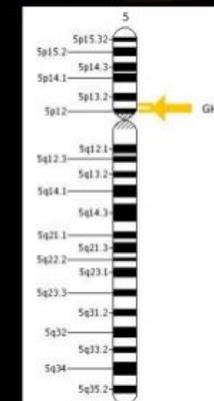
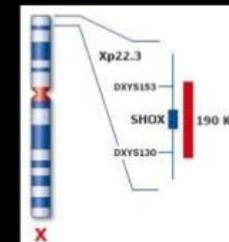


DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Auxilia na determinação da terapia a ser utilizada

Mutação no gene SHOX

Tratamento com GH

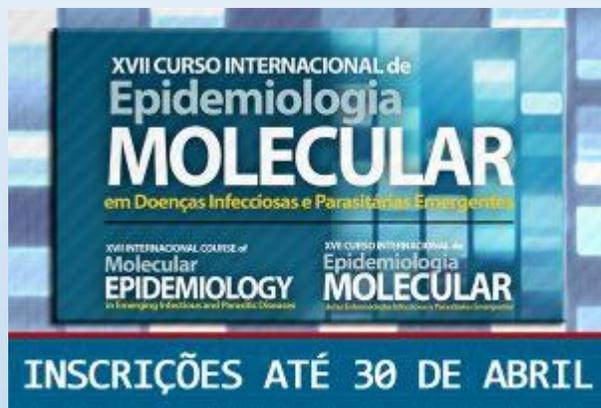


Mutação no gene GHR

Insensibilidade ao GH

TRATAMENTO DE BAIXA ESTATURA

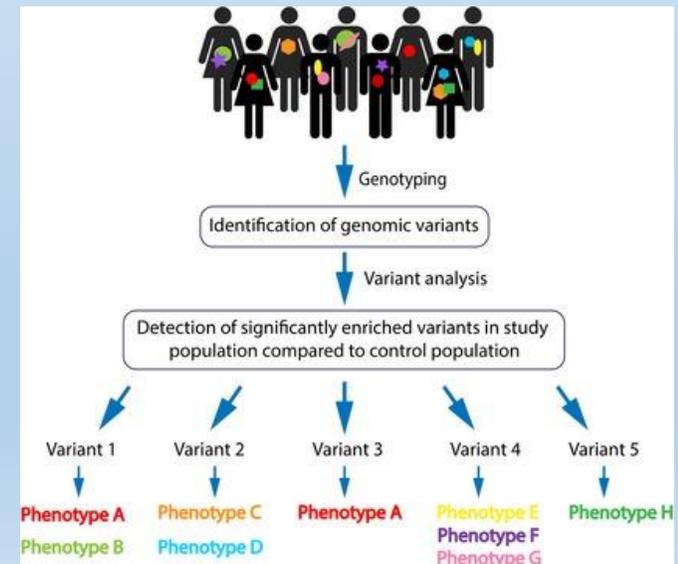
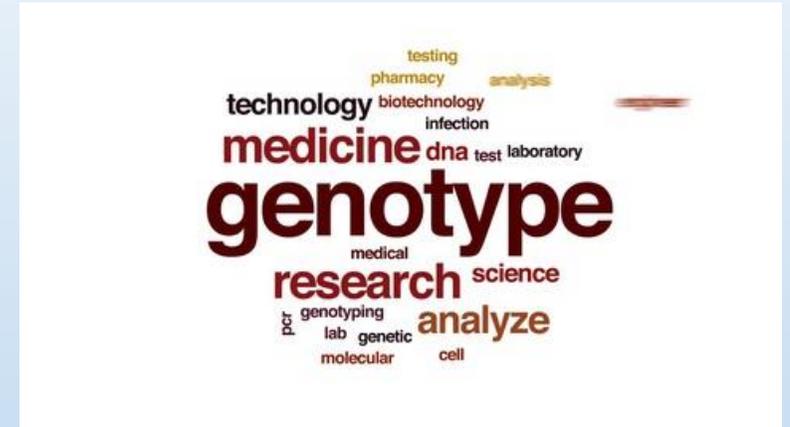
A epidemiologia molecular requer especialização



Genotipagem

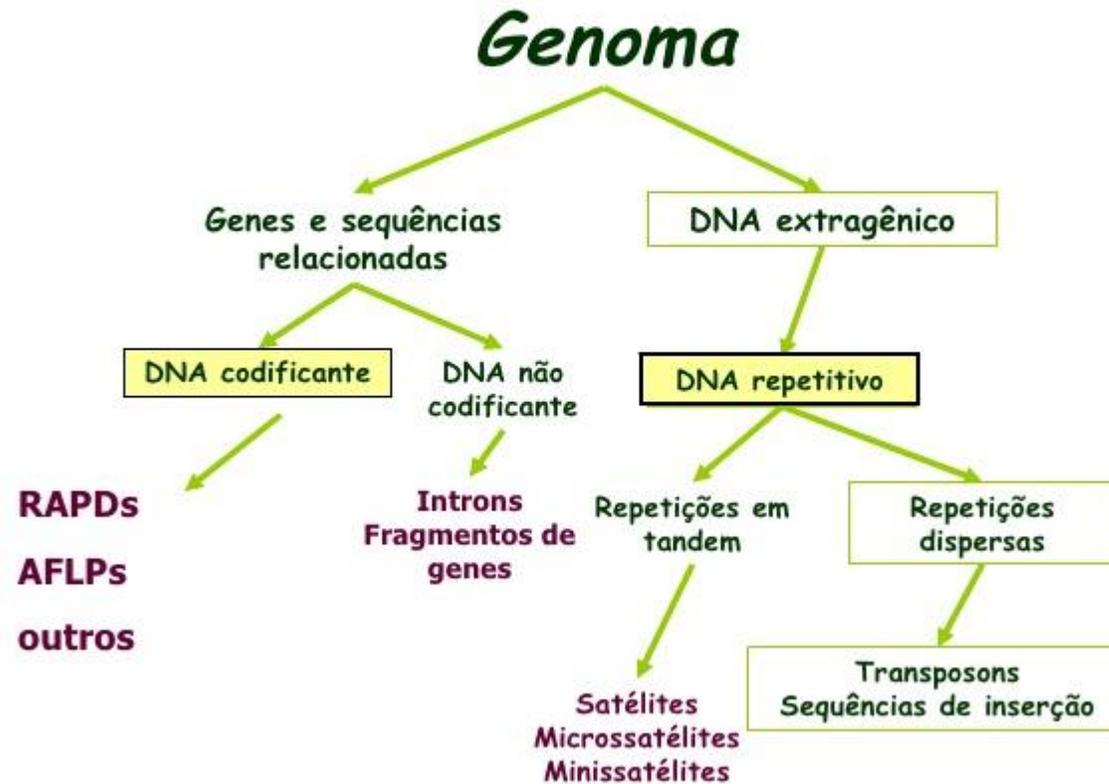
Genótipo e genotipagem

- **Genótipo:** do grego *genos*, originar, é a constituição genética de uma célula, organismo ou indivíduo ou o conjunto de fatores hereditários que compõem um indivíduo ou uma linhagem
- O genótipo ocorre devido à presença de material hereditário herdado dos progenitores
- **Genotipagem** é o processo pelo qual identificamos pequenas regiões do DNA denominadas MARCADORES, que variam de indivíduo para indivíduo

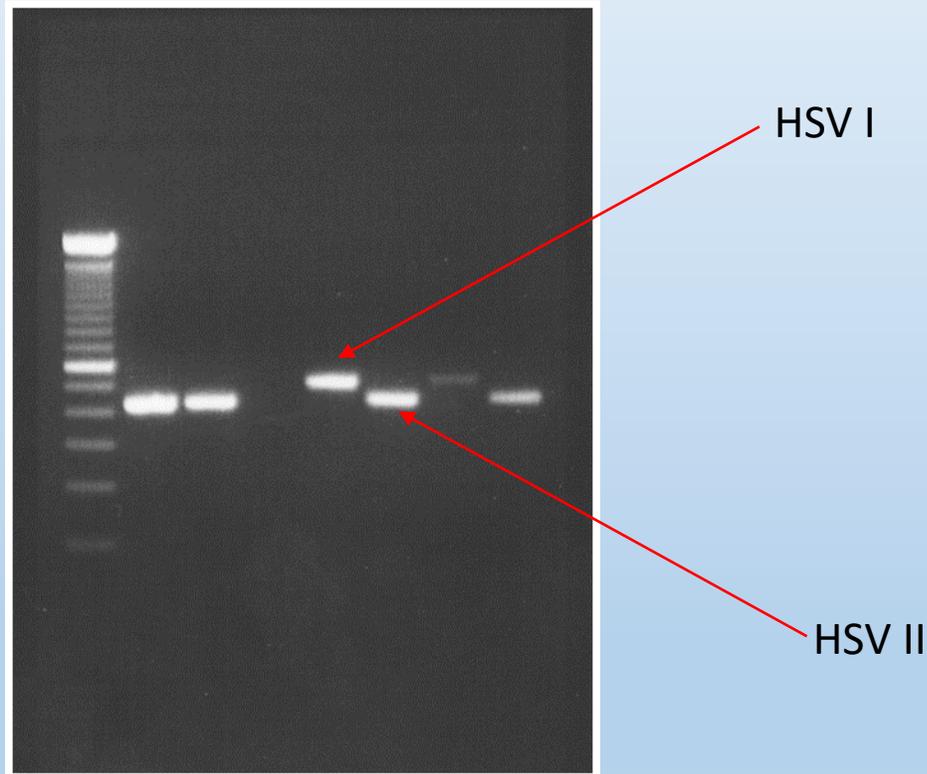


Biomarcadores moleculares no genoma

Onde estão localizados no genoma os marcadores?



Genotipagem de HSV: diferenciação de HSV I e II



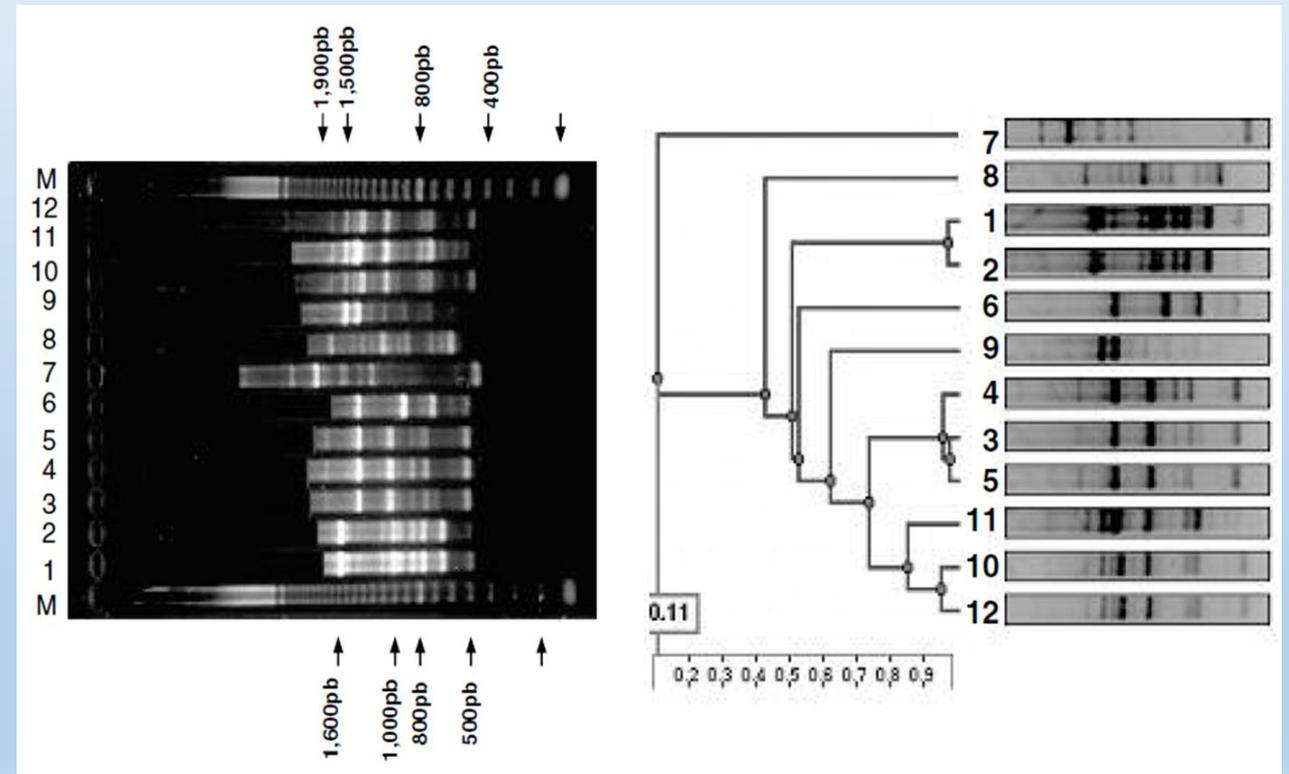
- HSV I: predominantemente herpes labial
- HSV II: predominantemente herpes genital
- Amplificação do gene que codifica a enzima polimerase viral por PCR
- A polimerase do HSV I possui sequência nucleotídica do gene pol maior que HSV II
- Uma única amplificação consegue diferenciar HSV I de II pelo peso molecular do material amplificado (> no HSV I)

Genotipagem de espécies de *Candida*

Identificação e diferenciação de espécies de *Candida* por RAPD

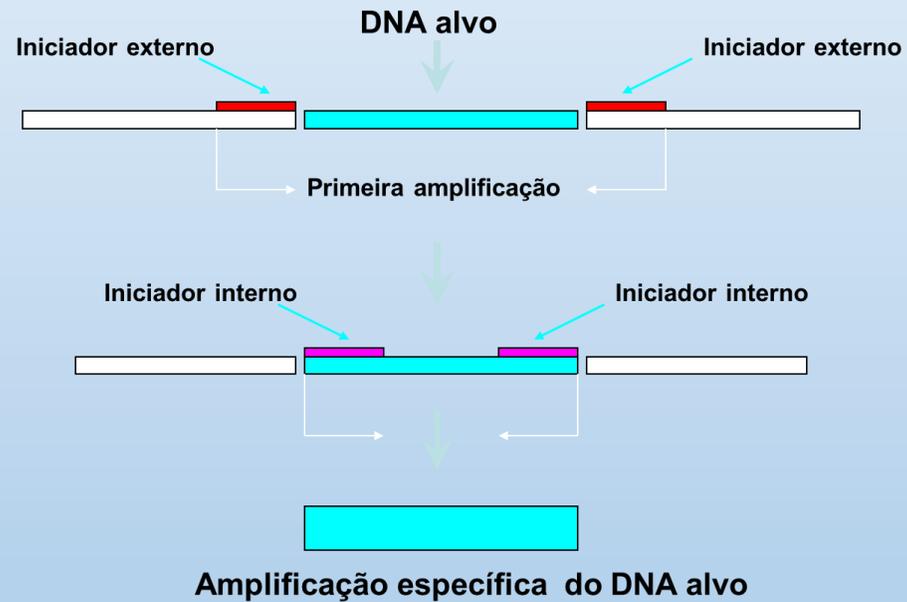
- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
- 34 isolados de *Candida*: 24 *albicans*, 4 *tropicalis*, 2 *parapsilosis*, 2 *dubliniensis*, 1 *glabrata* e 1 *krusei*

Isolado	Amostra	Espécie	fluconazole
1-16	sangue	<i>albicans</i>	S
17-20	sangue	<i>albicans</i>	R
21-23	orofaringe	<i>albicans</i>	R
24	urina	<i>albicans</i>	R
25-27	sangue	<i>tropicalis</i>	S
28	sangue	<i>tropicalis</i>	R
29-30	sangue	<i>parapsilosis</i>	S
31	sangue	<i>dubliniensis</i>	S
32	sangue	<i>dubliniensis</i>	R
33	orofaringe	<i>glabrata</i>	S
34	sangue	<i>krusei</i>	R

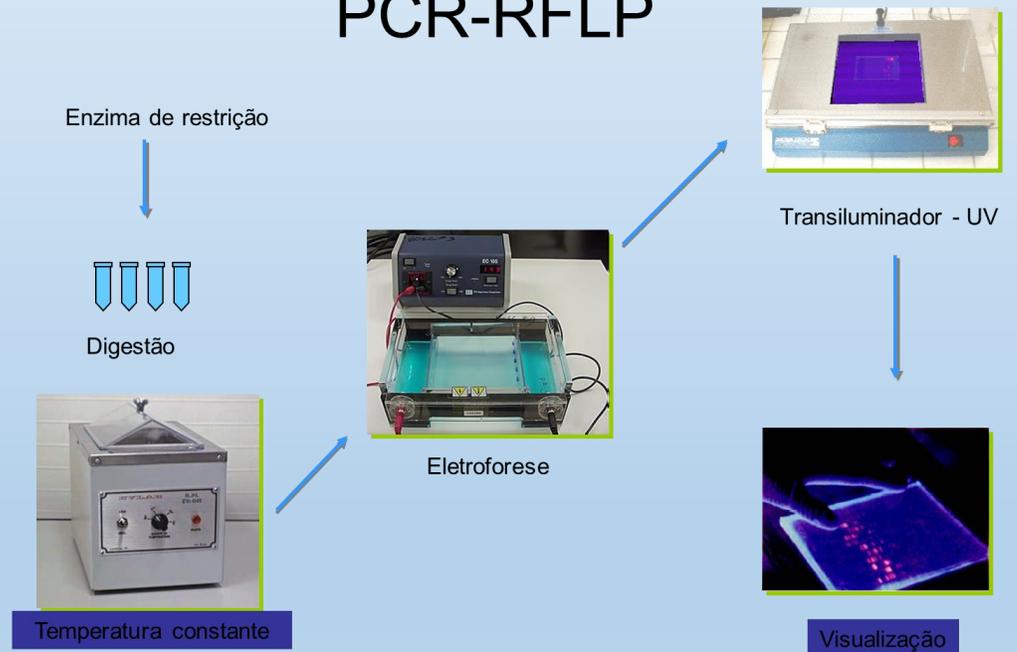


Ferramenta molecular para genotipagem : RFLP

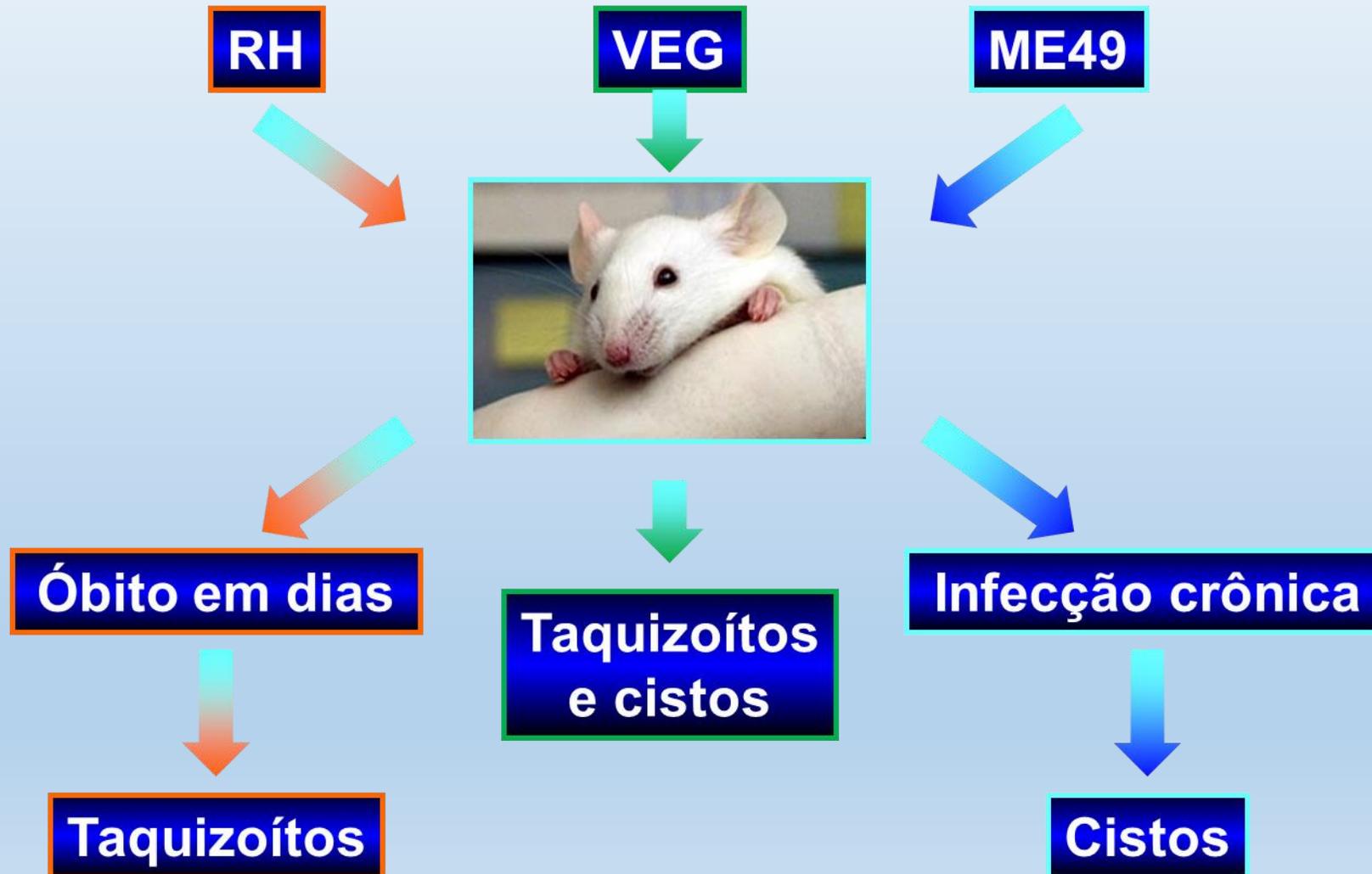
Nested-PCR



PCR-RFLP

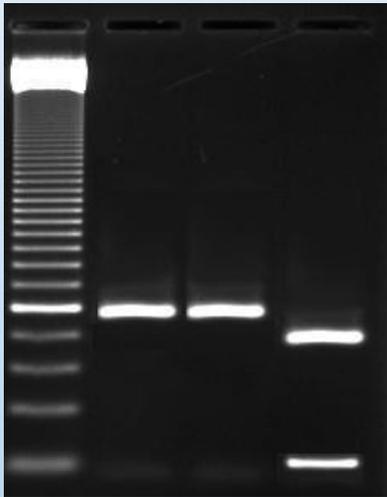


Classificação de *Toxoplasma gondii*



RFLP de *Toxoplasma gondii*

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism – utiliza enzimas de restrição



Extremidade 5'- SAG2 - Enzima *Sau3A* I

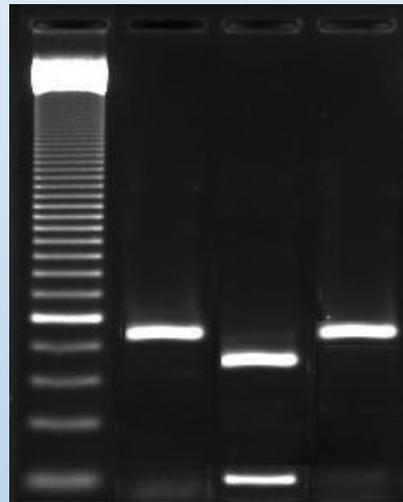
↓ GATC

Amplificado de 242 pb

Tipo I: não cliva

Tipo II: não cliva

Tipo III: 2 fragmentos (186 e 56 pb)



Extremidade 3'- SAG2- Enzima *Hha* I

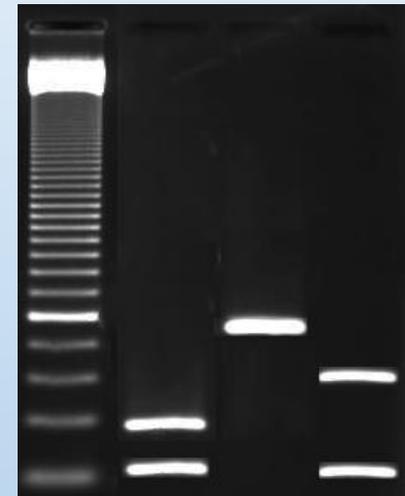
GCG ↓ C

Amplificado de 222 pb

Tipo I: não cliva

Tipo II: 2 fragmentos (169 e 53 pb)

Tipo III: não cliva



SAG3: Enzima *Nci* I

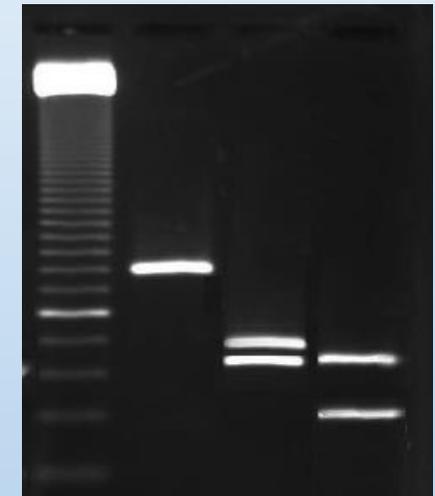
CC ↓ SGG (S = C ou G)

Amplificado de 225 pb

Tipo I: 3 fragmentos (99, 64 e 62 pb)

Tipo II: não cliva

Tipo III: 2 fragmentos (161 e 64 pb)



GRA6- Enzima *Mse* I

T ↓ TAA

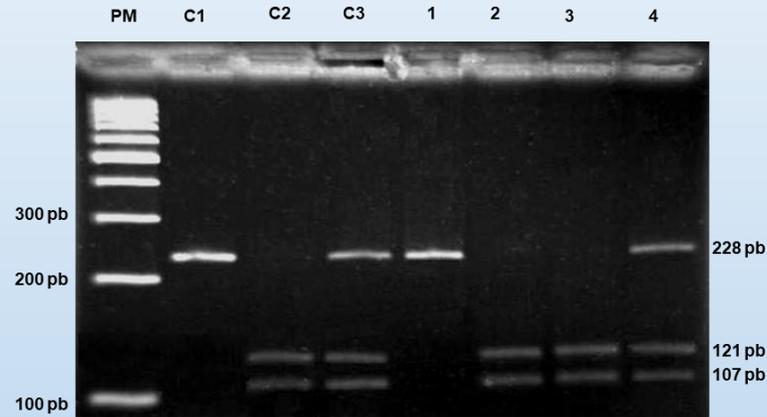
Amplificado de 351 pb

Tipo I: não cliva

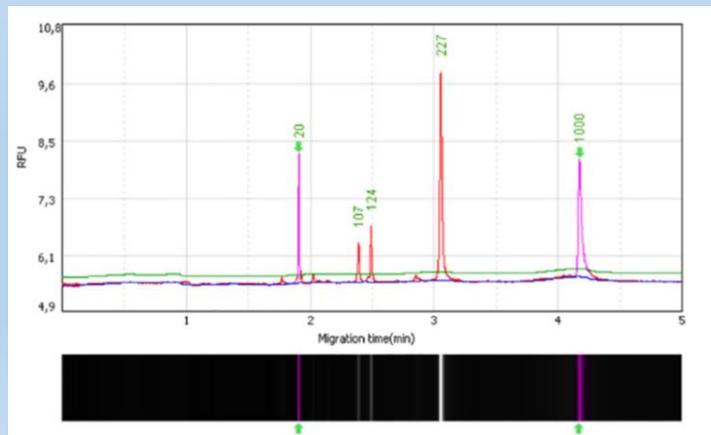
Tipo II: 2 fragmentos (190 e 161pb)

Tipo III: 3 fragmentos (161, 97 e 93 pb)

SNP de IL 10: frequência genotípica e alélica na malária



SNP IL10 -3575
Enzima Apol



IL-10 -3575		MS	AS	Total	p	OR [95% IC]	p corrigido
Genótipo	TT	58 (55,76)	28 (75,67)	86	3,716 0,0269	0,4249 [0,17-1,02]	2,971
	AA	07 (6,73)	01 (2,70)	08			0,0424
	TA	39 (37,5)	08 (21,62)	47			
Total		104	37	141			
Genótipo	TT	58 (55,76)	28 (75,67)	86	4,545 0,0165	0,4053 [0,17-0,94]	0,3747
	AT+AA	46 (44,23)	09 (24,32)	55			0,0264
Alelo	T	155 (74,51)	64 (86,48)	219	4,506 0,0169	0,4570 [0,21-0,95]	3,842
	A	53 (25,48)	10 (13,51)	63			0,0250
Total		208	74	282			

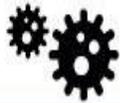
[PRELIMINARY REPORT ON THE PUTATIVE ASSOCIATION OF IL10 -3575 T/A GENETIC POLYMORPHISM WITH MALARIA SYMPTOMS.](#)

Domingues W, Kanunfre KA, Rodrigues JC, Teixeira LE, Yamamoto L, Okay TS.

Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016;58:30. doi: 10.1590/S1678-9946201658030. Epub 2016 Apr 8.

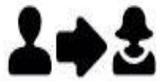
Human Papilloma Virus (HPV) : genotipagem

VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)



O QUE É

Vírus do papiloma humano (HPV) é a doença sexualmente transmissível mais comum entre homens e mulheres. Provoca lesões e verrugas genitais e câncer de colo de útero



TRANSMISSÃO

Contato direto com a pele infectada; durante a relação sexual (HPV genital); compartilhar toalha e roupas íntimas usadas também pode transmitir



PREVENÇÃO

❑ Camisinha diminui risco, mas não protege todas as áreas, como a base do pênis
❑ O exame de rotina Papanicolaou rastreia lesões iniciais. Nesses casos, a chance de cura é de 100%

80% das mulheres entram em contato com o vírus durante alguma situação na vida

95% dos casos de câncer no colo do útero são causados pelo HPV



» TIRA-DÚVIDAS

❑ ONDE SERÁ FEITA A VACINAÇÃO?

Unidades de saúde, escolas públicas ou privadas. Nas pré-adolescentes, é preciso autorização dos pais)

❑ VALE A PENA VACINAR HOMENS?

Sim, pois previne condilomas genitais e lesões precursoras de câncer no pênis e ânus.

❑ QUAL A META DO GOVERNO?

Vacinar 80% do público-alvo, que atualmente soma 5,2 milhões de pessoas

» VACINAS

EXISTEM DUAS DISPONÍVEIS:



BIVALENTE

Contra os tipos 16 e 18



QUADRIVALENTE

Contra os tipos 6,11, 16 e 18

A VACINAÇÃO PÚBLICA SERÁ A QUADRIVALENTE E VAI INCLUIR:

Meninas de 11 a 13 anos, a partir de março de 2014

Meninas de 9 a 11 anos, a partir de 2015

COMO SERÁ A IMUNIZAÇÃO

Ocorrerá de forma estendida: a segunda dose da vacina será aplicada seis meses depois da primeira; a terceira dose, cinco anos após a segunda



EDITORIA DE ARTE / O TEMPO

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE

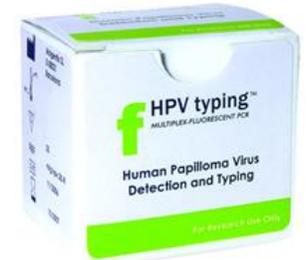
Captura Híbrida

real-time PCR
Técnicas
Biologia
Molecular



Aula 4 - Técnicas Diagnóstico Virologia - Parte II

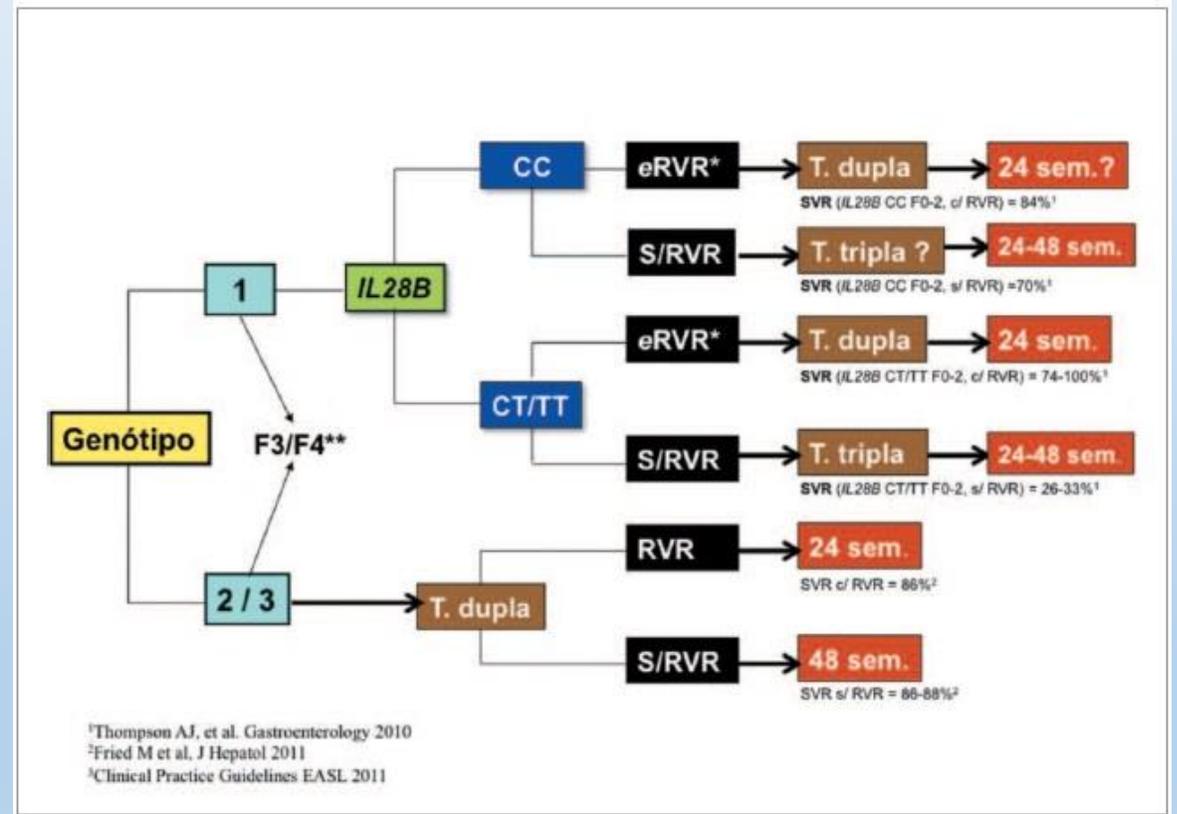
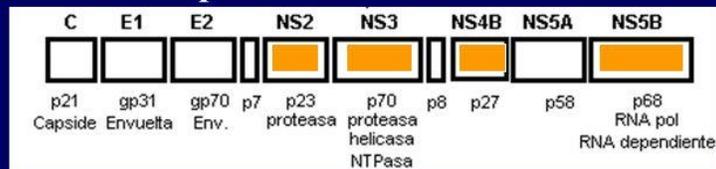
51



Genotipagem do HCV

GENOTIPAGEM DO HCV x TRATAMENTO

- Alta variabilidade genética intrapaciente (maior que o HIV)
- Avaliação genômica do HCV por SNPs (único nt) pois existem genótipos associados ou não à resposta terapêutica
- Escapa do tratamento rapidamente exigindo associações de antivirais
- Genotipagem da região 3' não traduzida (NS5B) para variabilidade intrapaciente
- NS3 e NS4B inibem a produção de Interferon
- NS2 inibe a apoptose e faz com que a célula infectada continue se replicando

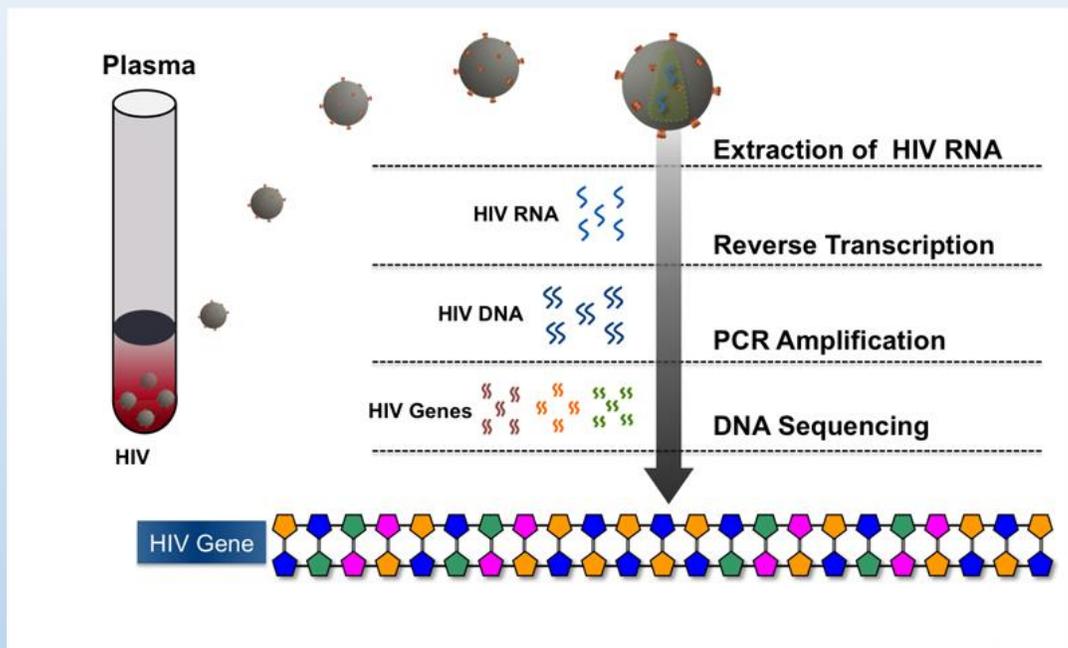


¹Thompson AJ, et al. Gastroenterology 2010

²Fried M et al. J Hepatol 2011

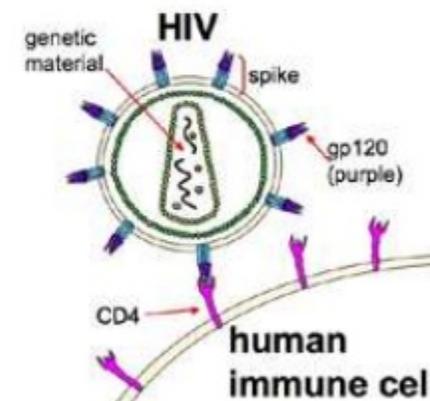
³Clinical Practice Guidelines EASL 2011

Genotipagem do HIV



HIV drug resistance (HIV DR)

- It poses a significant threat to the success of national HIV programmes
- HIV DR results in more rapid VF among people receiving 1st line regimens and ↑ the need for 2nd line regimens → more toxicity, adverse events, poorer adherence and ↑ costs



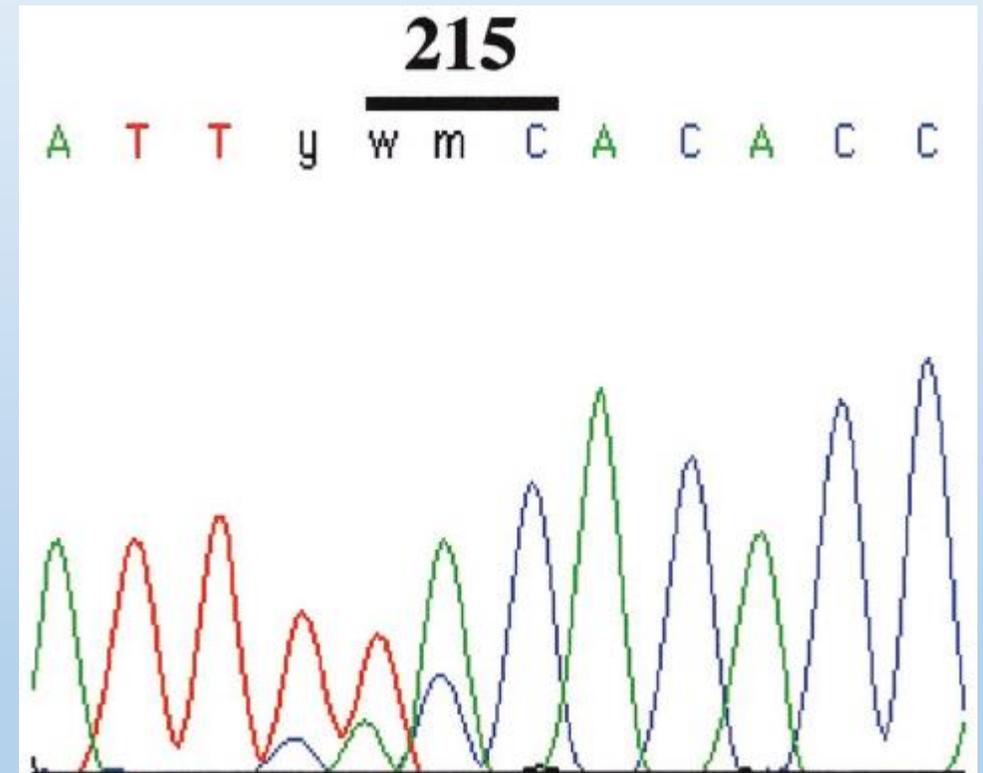
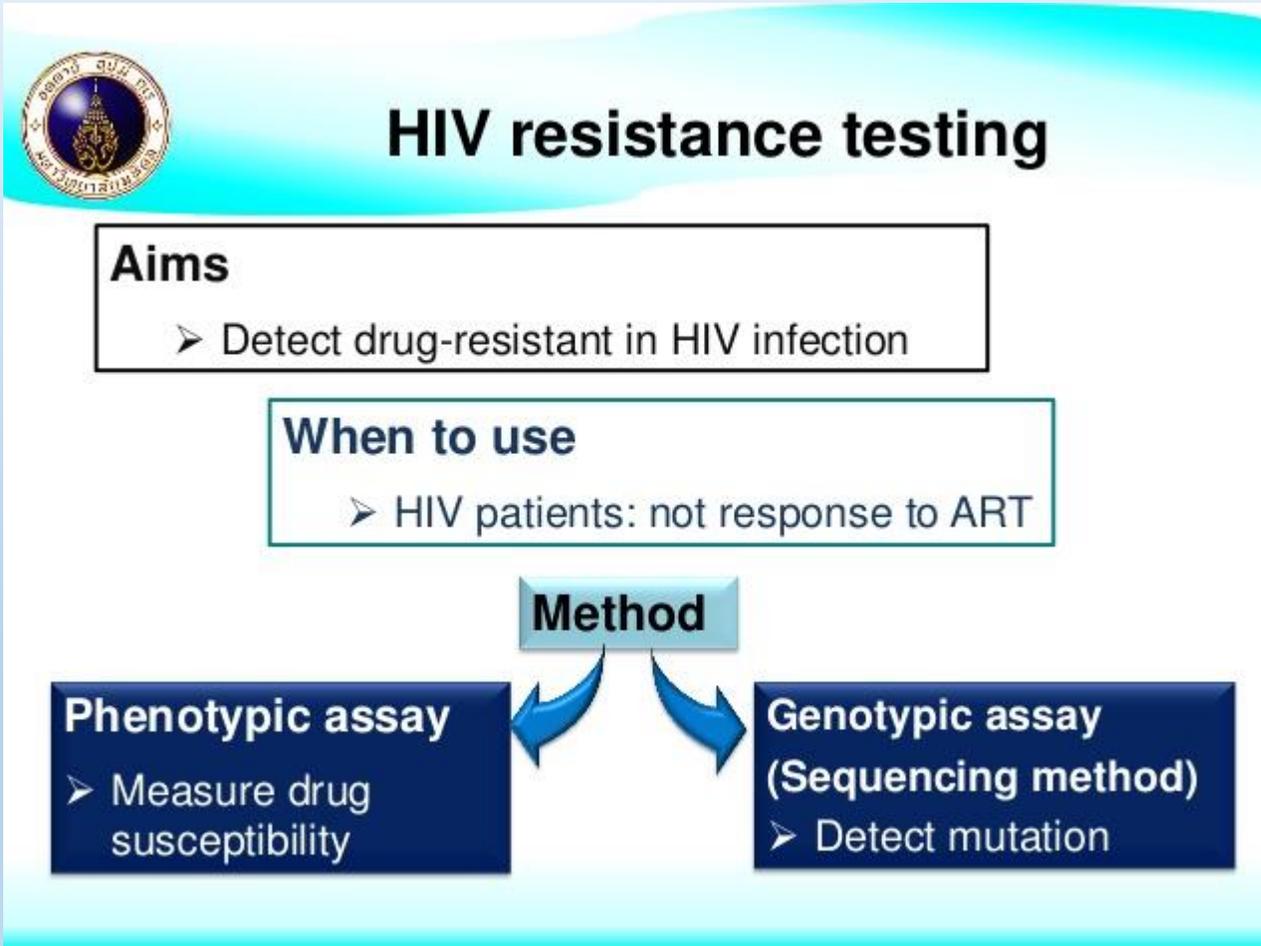
Source : WHO "Consolidated guidelines on the use of ART for treating & preventing HIV infection - 30th June 2013 p.226

5/4/2016

FACE CONSORTIUM

5

Genotipagem do HIV



Mycobacterium tuberculosis

"Controle da Tuberculose – Integração Ensino Serviço"

Os diversos tipos de resistência do *M. tuberculosis*



M. tuberculosis: testes moleculares

Instrument introduction

- GeneXpert MTB/RIF is cartridge based nucleic acid amplification test.
- GeneXpert MTB/RIF is automated diagnostic test.
- It can identify Mycobacterium tuberculosis (MTB) DNA and resistance to rifampicin (RIF) by Nucleic Acid Amplification Test (NAAT).
- It was co-developed by the laboratory of professor David Alland at the university of medicine and dentistry of New Jersey (UMDNJ)



12/29/2017

Clostridium difficile: investigação molecular

FDA Approved PCR Assays for *C. difficile*

Assay	Target Gene	Instrument	TAT (minutes)
BD Gene-Ohm	<i>tcdB</i>	Smart Cycler and Amplification or new Automated Version	75-120
Gen-Probe (Hologics) proGastro	<i>tcdB</i>	Extraction Smart Cycler/Amp	180-200
Cepheid Xpert	<i>tcdB</i> <i>tcdC</i> deletion Binary Toxin	GeneXpert	30-45
Great Basin Portrait	<i>tcdB</i>	Incubator Ind. Cartridge	90
Focus DX Simplexa	<i>tcdB</i>	3M Integrated Cycler	60-90



Staphylococcus aureus: resistência à meticilina



O kit da Cepheid Xpert MRSA/SA SSTI detecta a presença de *S. aureus* (SA) ou de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em infecções de pele e de tecidos (SSTI) em menos de uma hora

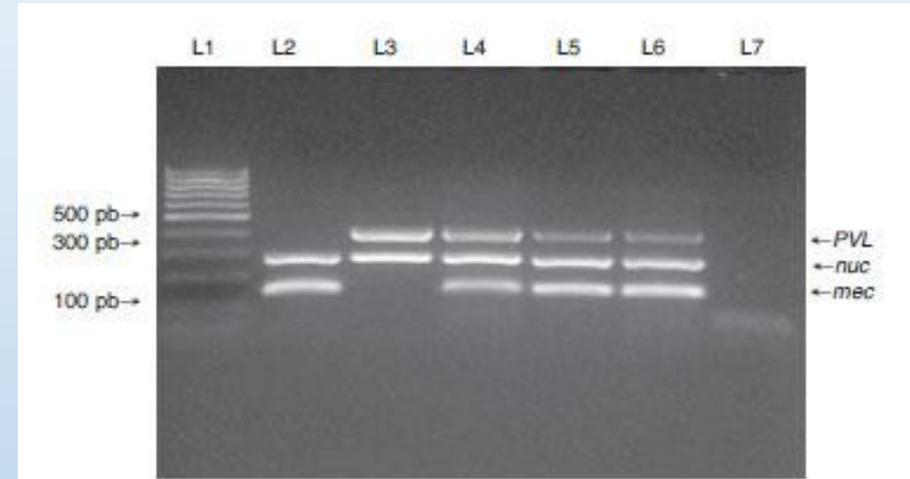
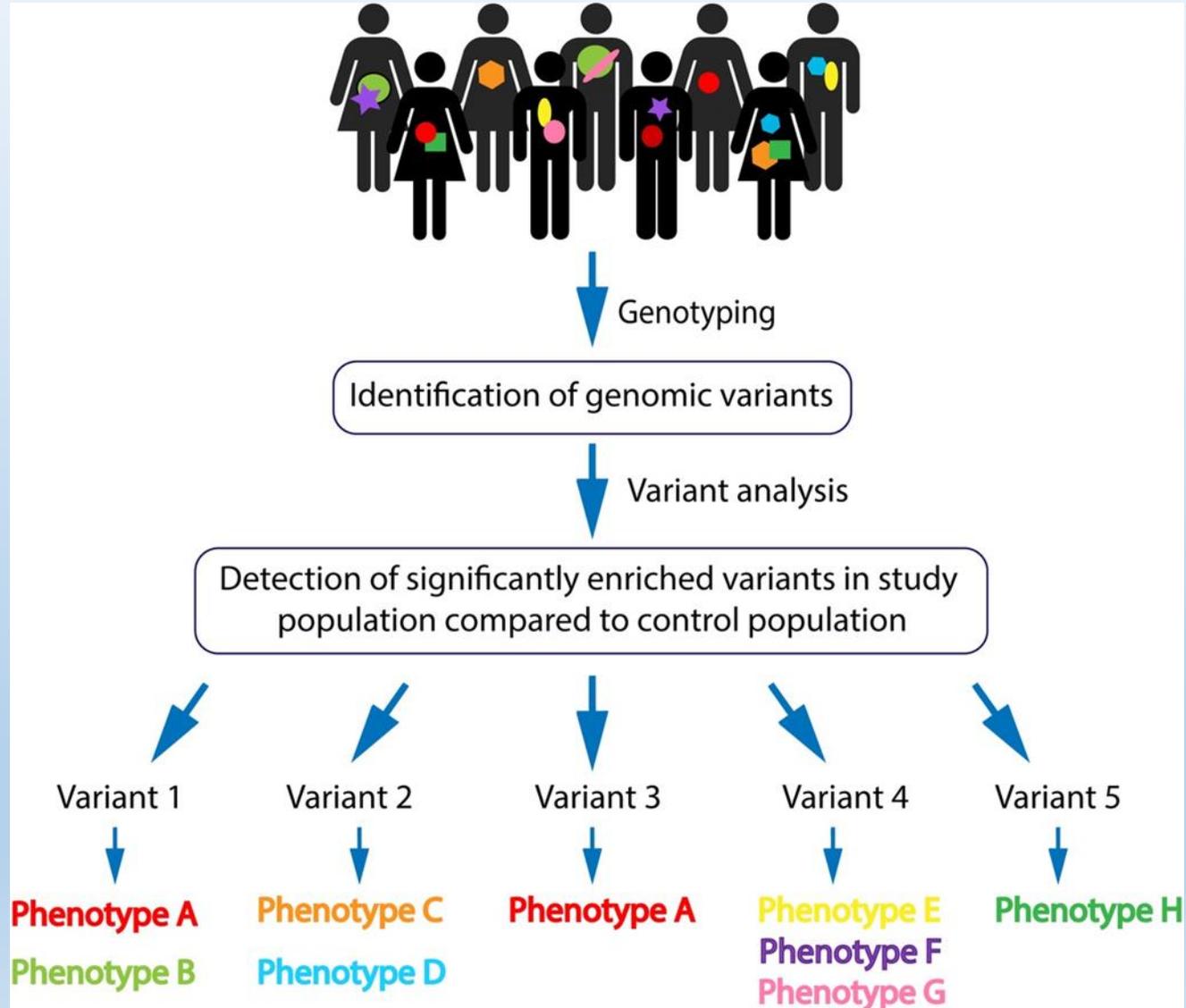


Fig. 1 – Multiplex PCR for detection of nuc, mecA, and PVL genes. Multiplex PCR was performed to detect the presence of nuc, mecA and PVL genes in isolates from medical students to confirm *Staphylococcus aureus* species (nuc gene), methicillin resistance (mecA gene) and presence of PVL genes. Lane 1: MW (DNA molecular weight markers). Lane 2: ATCC 33591 reference strain (nuc+, mecA+, PVL-). Lane 3: ATCC 25923 reference strain (nuc+, mecA-, PVL+). Lanes 4 to 6: MRSA isolates from the study. Lane 7: negative control for the PCR reactions.

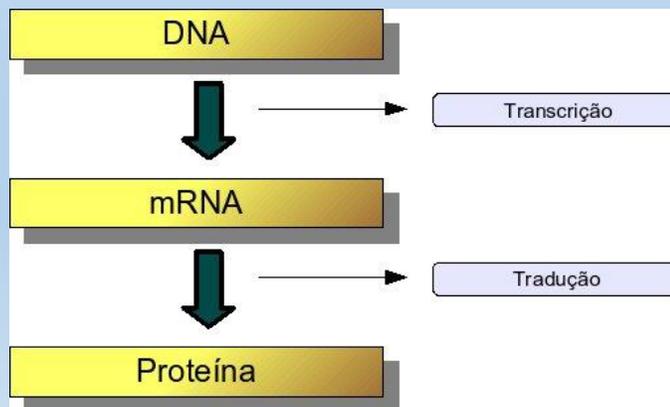
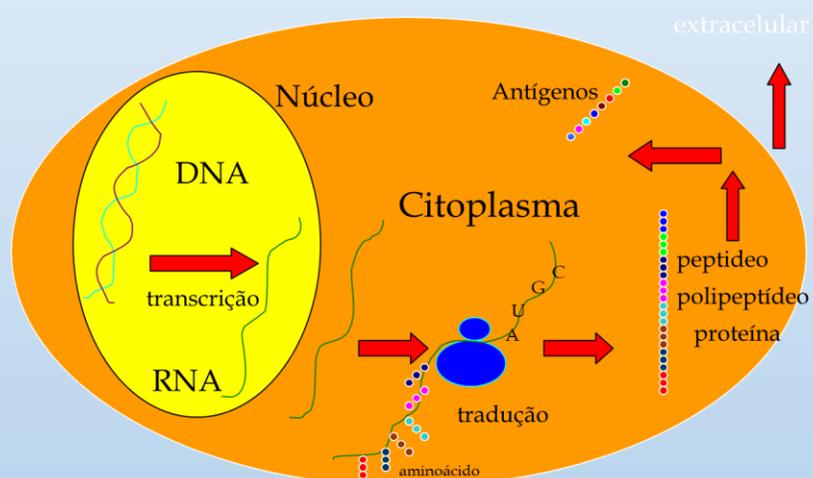
FENOTIPAGEM

Genótipo X Fenótipo



Genotipagem x fenotipagem

Célula eucariótica



- Genotipagem: análise de DNA, tipos de alelos, tipos de cepas, tipos de mutações
- Fenotipagem: estudo de mRNA (transcritos) e de peptídeos e proteínas, portanto estudos de expressão e tipagem de mRNA e de proteínas

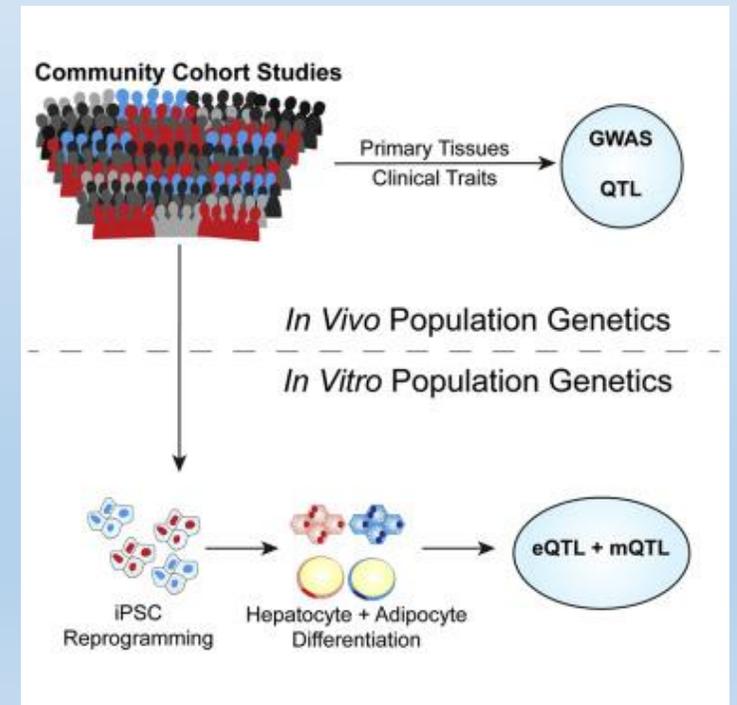
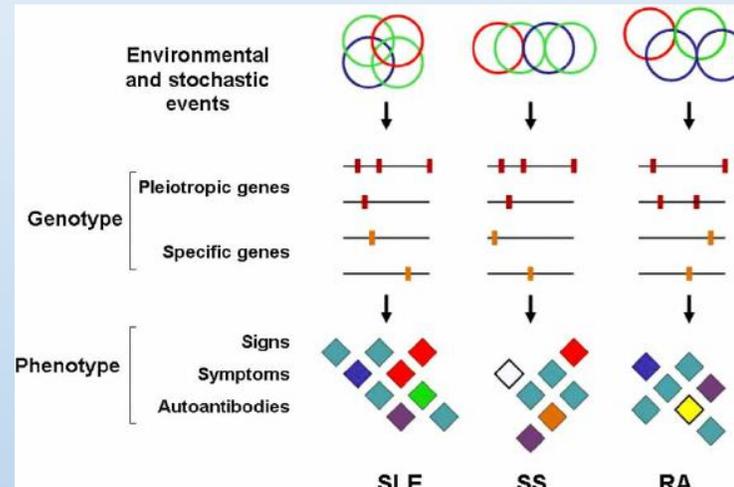
Fenótipo

- **Fenótipo:** manifestação visível, detectável de um genótipo
- Trata-se das características observáveis de um organismo ou de uma população, tais como: morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas ou fisiológicas e comportamento
- O fenótipo resulta da expressão dos genes do organismo, da influência de fatores ambientais e da possível interação entre os dois



Técnicas de fenotipagem

- Técnicas que realizam análise de variação de DNA = genotipagem
- Técnicas que analisam a variação de mRNAs e de proteínas = fenotipagem, portanto análises de variação transcricional e traducional de genes são estudos de fenotipagem



Deficiência de alfa-1 anti-tripsina

- A deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD) é uma doença genética de codominância causada por mutações no gene SERPINA1 (14q31-32)
- A principal função da AAT é inibir uma série de enzimas, dentre elas a tripsina, a elastase neutrofílica e a protease-3
- Até a presente data mais de 100 alelos foram de alguma forma associados a esta doença, e cerca de 30 podem ter implicações clínicas
- Na Europa frequência de 1:2.500 nascidos vivos
- As manifestações clínicas mais graves são doença hepática ou pulmonar fatal
- Os fenótipos ZZ e SZ são fatores de risco para o desenvolvimento de sintomas respiratórios
- O fenótipo ZZ nos pacientes afetados por AATD, também pode levar ao desenvolvimento de doença hepática aguda ou crônica com cirrose e insuficiência hepática por volta dos 50 anos

Deficiência de alfa 1 anti-tripsina

- As variantes da proteína AAT são nomeadas com letras do alfabeto, conforme o sistema Pi (inibidor de protease), de acordo com a velocidade de migração da molécula proteica em um gradiente de pH isoelétrico
- De acordo com os níveis séricos de AAT e a função da proteína, as variantes são classificadas em quatro grupos
 - 1) normal (nível sérico e função normais): alelos M
 - 2) deficiente (nível sérico reduzido para menos de um terço dos valores normais): alelo Z (que é o mais frequentemente relacionado à doença pulmonar), variante S e variantes mais raras
 - 3) nulo (nível sérico de AAT indetectável): alelos QO
 - 4) disfuncional (nível sérico normal, mas com função reduzida): alelos F e Pittsburgh (entre outros)
- Dentre todas as variantes relacionadas à doença clínica, a **mutação Z** é a mais comum (cerca de 95% dos casos) e deriva da substituição de um ácido glutâmico por uma lisina na posição 342 do gene SERPINA1

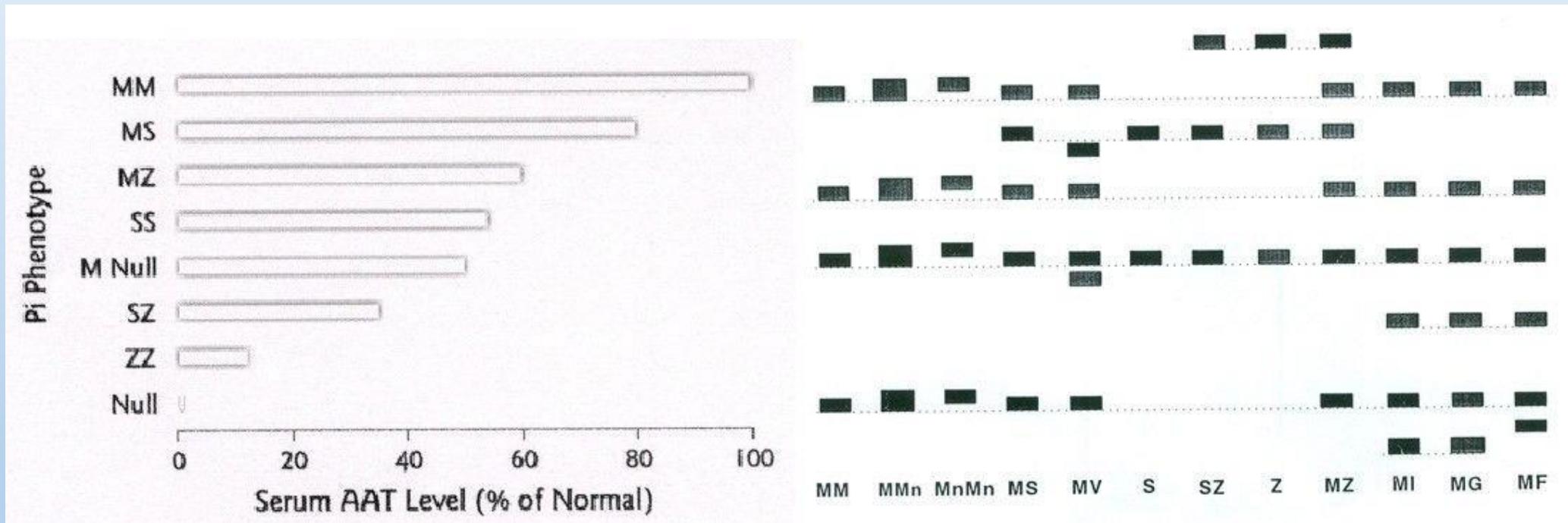
Imunofenotipagem de alfa-1 anti-tripsina

Tabela 1 – Alguns dos alelos mais freqüentemente relacionados à deficiência de alfa-1 antitripsina, mutações envolvidas e dados clínicos associados.⁽¹²⁾

Alelos	Tipo de mutação	Doença(s) associada(s)
Variantes normais		
M (vários subtipos)	Substituição (1 par de bases)	Nenhuma
Variantes deficientes		
S	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar
Z ^a	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar, hepática
M _{malton}	Deleção (3 pares de bases)	Pulmonar, hepática
S _{Iiyama}	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar, hepática
Alelos nulos		
Q0 (subtipos)	Deleção ou substituição	Pulmonar, eventualmente hepática
Alelos disfuncionais		
Pittsburgh	Substituição (1 par de bases)	Diátese hemorrágica
Z ^a	Substituição (1 par de bases)	Pulmonar, hepática

^aO alelo Z é deficiente e também disfuncional.

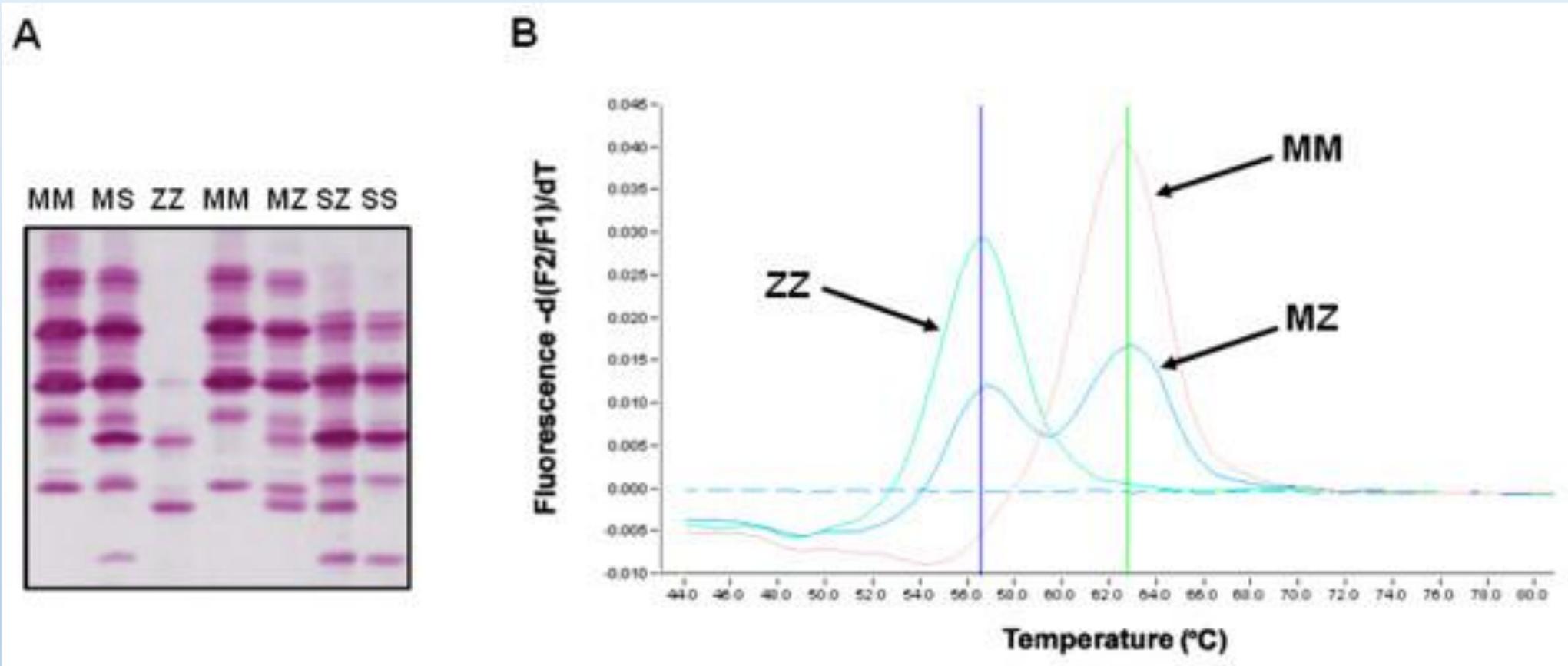
Imunofenotipagem de alfa 1 anti-tripsina



Dosagem de alfa 1 anti-tripsina no soro

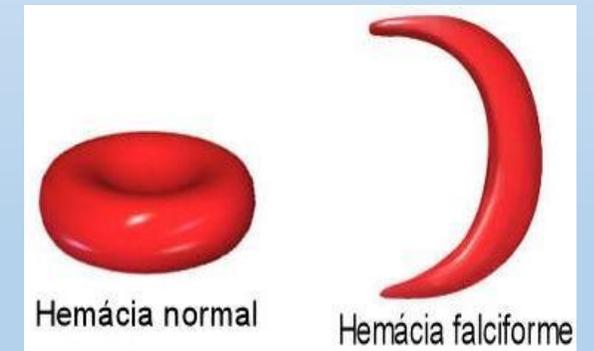
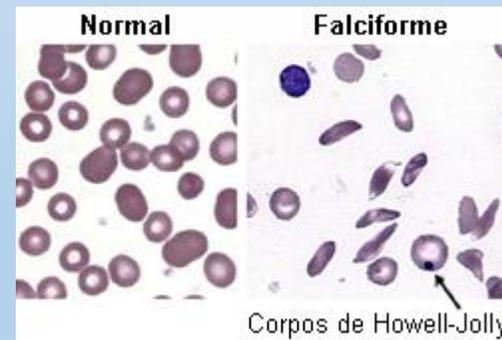
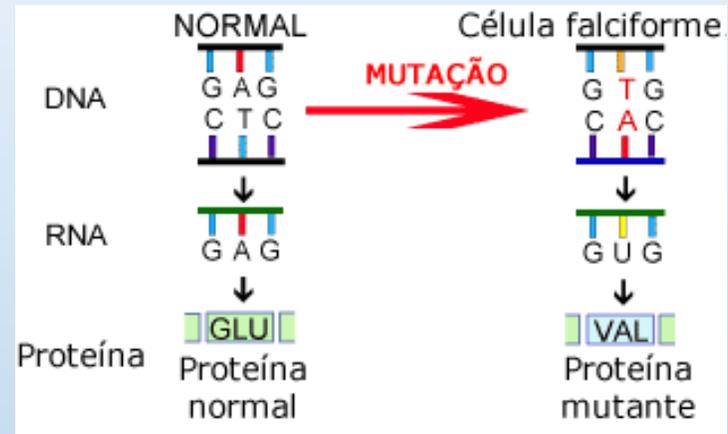
Isoeletrofocalização – imunofenotipagem

Isoeletrofocalização



Anemia falciforme

- **Anemia falciforme** é uma doença hereditária caracterizada pela alteração dos glóbulos vermelhos do sangue, tornando-os parecidos com uma foice, daí o nome **falciforme**. Essas células têm sua membrana alterada e rompem-se mais facilmente, causando **anemia**
- A formação dessa hemoglobina, determinada por um gene no cromossomo 11 que se encontra mutado nos pacientes levando o organismo a produzir a hemoglobina S (HbS)
- Essa hemoglobina é devida à substituição de um único nucleotídeo que altera o códon do sexto aminoácido da beta-globina, de ácido glutâmico para valina (GAA → GUA: Glu6Val)

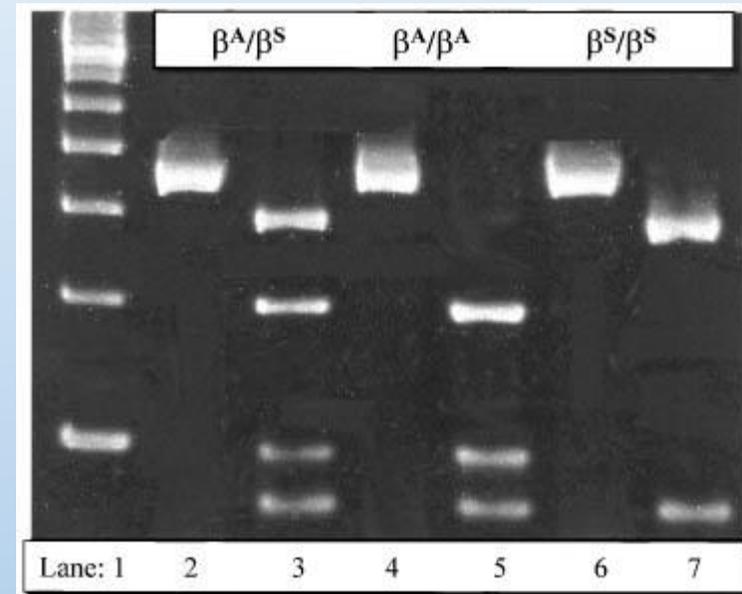


Diagnóstico da anemia falciforme



Teste do pezinho

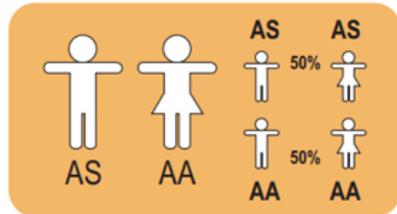
- Mais frequente em afrodescendentes
- Frequência de portadores no Nordeste do Brasil é de 5-6% e no Sul 2-3%



Nested-PCR-RFLP com a enzima de restrição DdeI

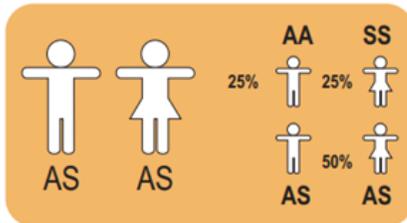
Eletroforese de hemoglobina

para entender o que pode acontecer em cada gravidez:



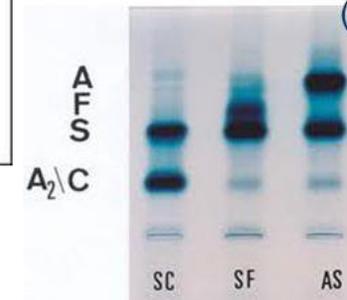
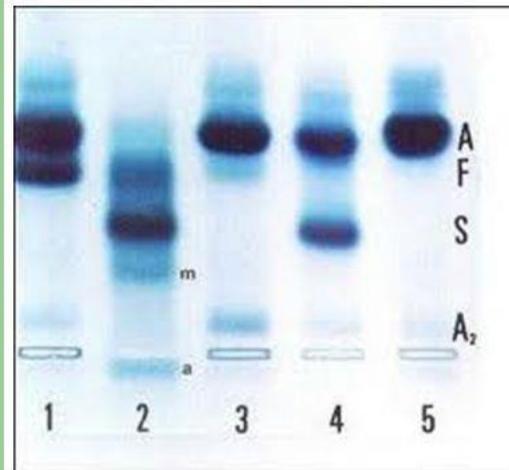
AS - traço falciforme

AA - normal



SS - anemia falciforme

Eletroforese de Hemoglobina



Normal:

- 97% HbA (2alfa+2beta)
- 2% HbA2 (2alf+2delt)
- 1% HbF (2alfa+2gam)

Teste do pezinho



Serviços públicos em São Paulo: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias (incluindo a anemia falciforme) e fibrose cística

Saiba quais são os planos disponíveis para o Teste do Pezinho do seu bebê



Básico

Fenilcetonúria e outras Aminoacidopatias, Hipotireoidismo Congênito e Anemia Falciforme e outras hemoglobinopatias



Ampliado

Os exames do plano Básico mais: Hiperplasia Adrenal Congênita e Fibrose Cística



Plus

Os exames dos planos Básico e Ampliado mais: Galactosemia, Deficiência de Biotinidase e Toxoplasmose Congênita



Master

Os exames dos planos Básicos, Ampliado e Plus mais: Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, Sífilis Congênita, Citomegalovirose Congênita, Doença de Chagas Congênita e Rubéola Congênita



Opcionais

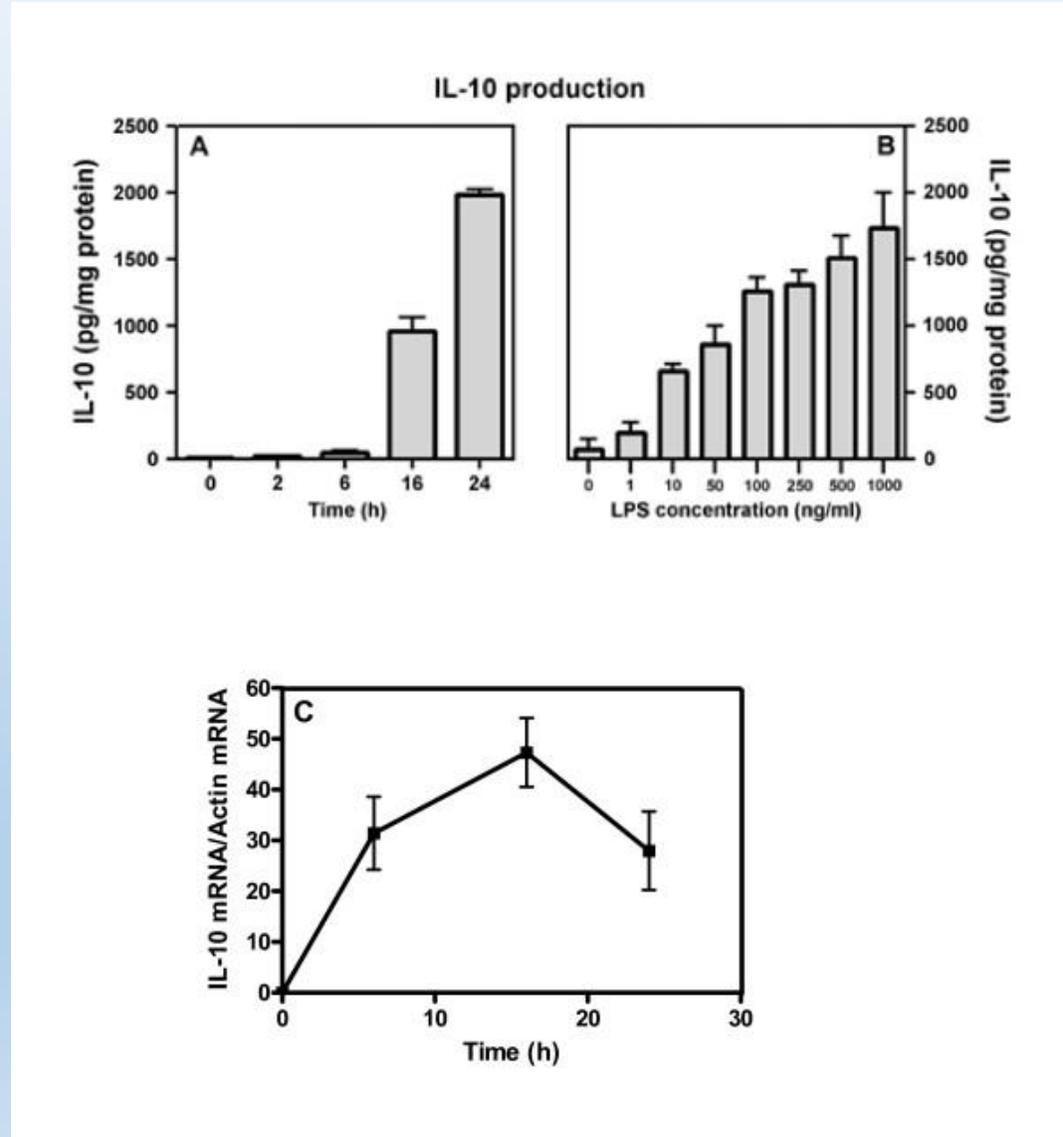
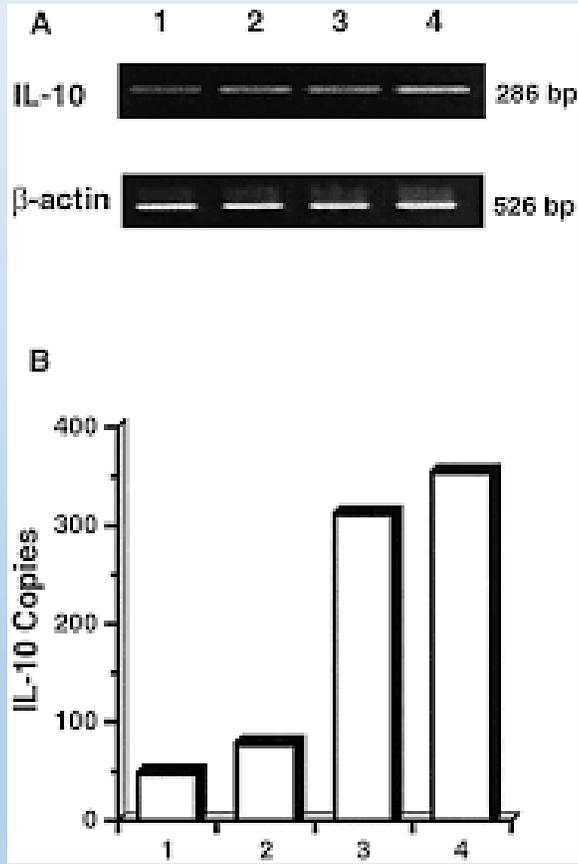
Estes exames podem ser solicitados em todos os planos. São feitos testes para diagnosticar HIV 1 e 2, Deficiência de MCAD, Espectrometria de Massa em Tandem (MS/MS) e Surdez Congênita

Citocinas ou interleucinas

- **Citocina** é um termo genérico empregado para designar um numeroso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes que podem ser produzidas por diversas células, tais como monócitos, macrófagos, linfócitos, dentre outras
- Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF alfa e TNF beta), e fator de transformação de crescimento (TGF beta)

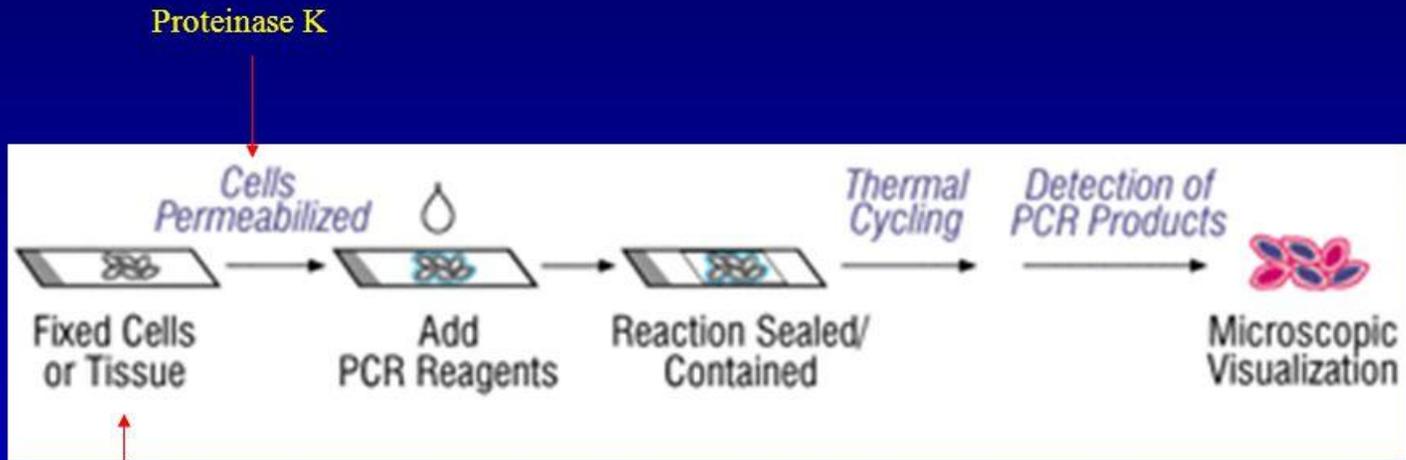


Estudo dos transcritos de IL10 por RT-PCR ou RT-qPCR



PCR *in situ*

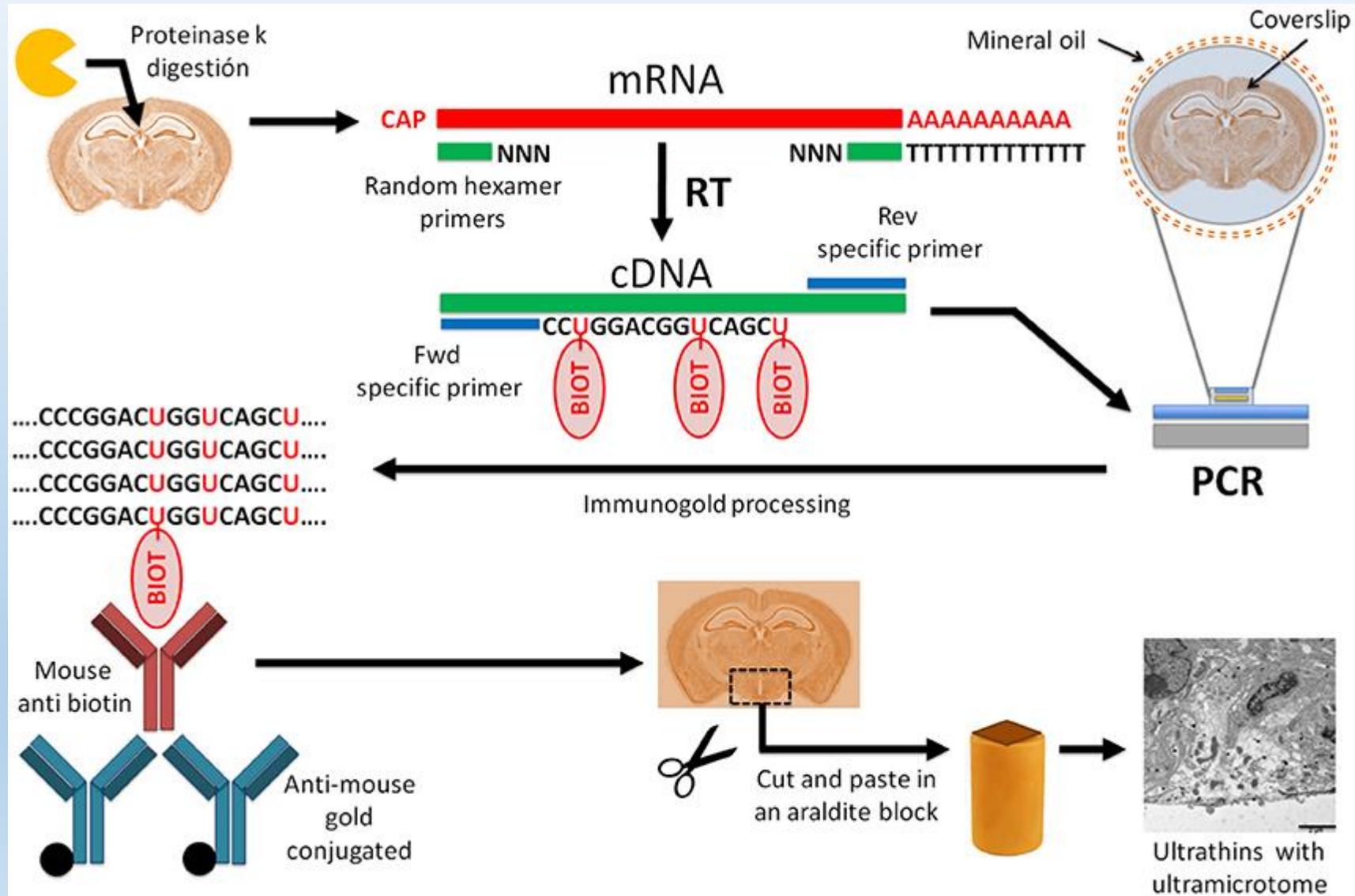
In situ amplification (In situ PCR)



Formalin
paraformaldehyde

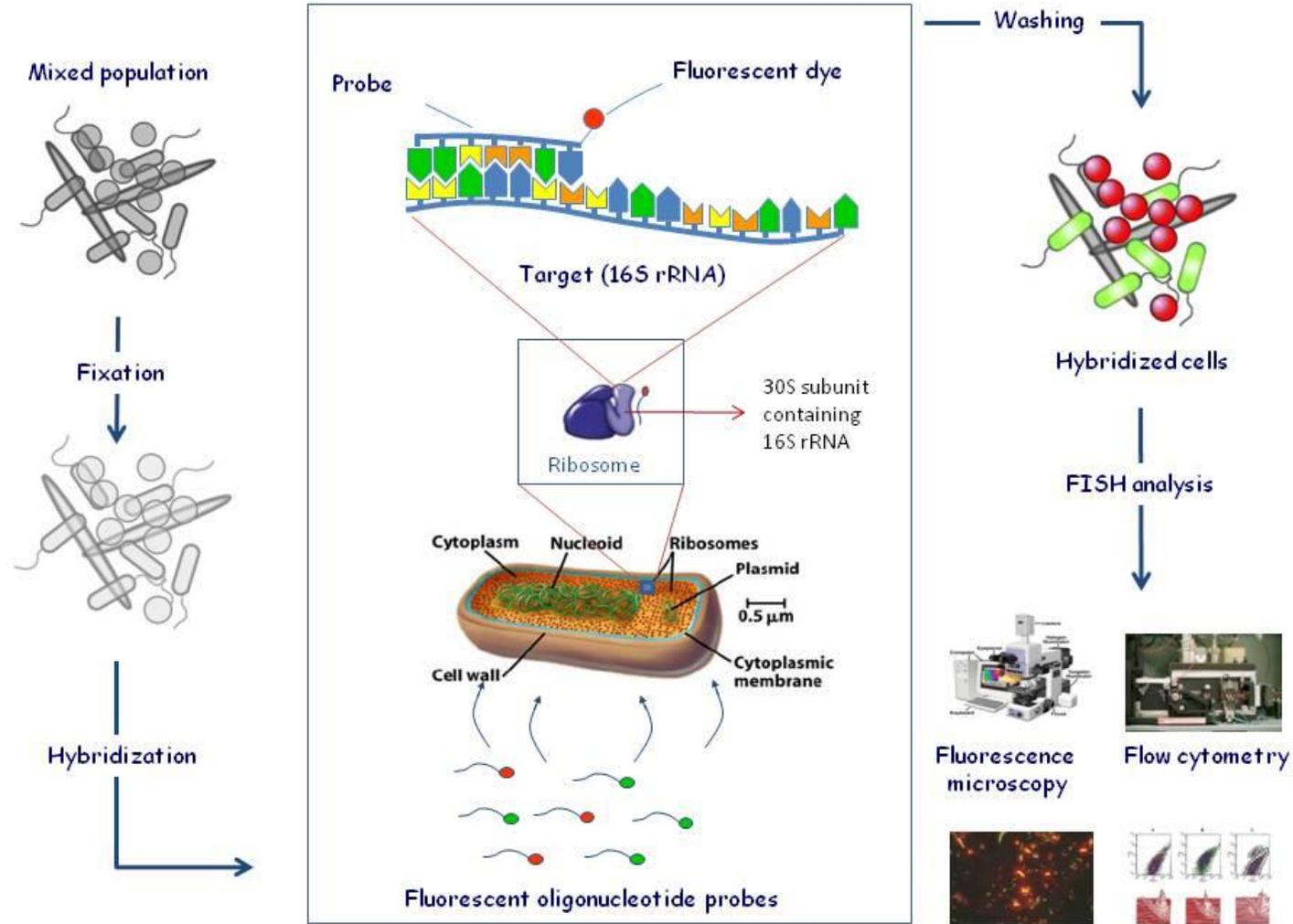
Denhardt's
solution

Detecção por PCR *in situ* de alvos moleculares cerebrais

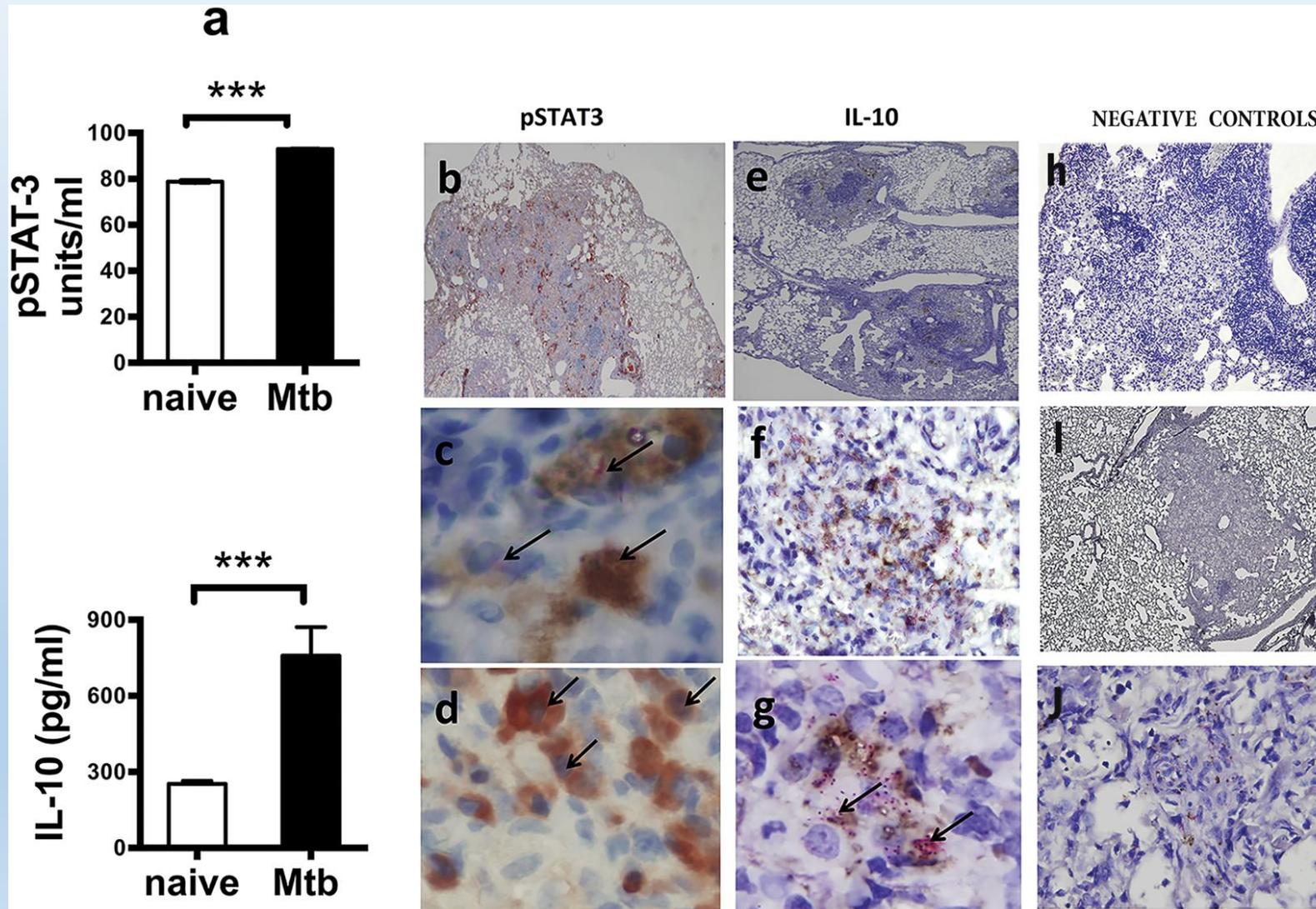


FISH *in situ*

Fluorescent *in situ* Hybridization

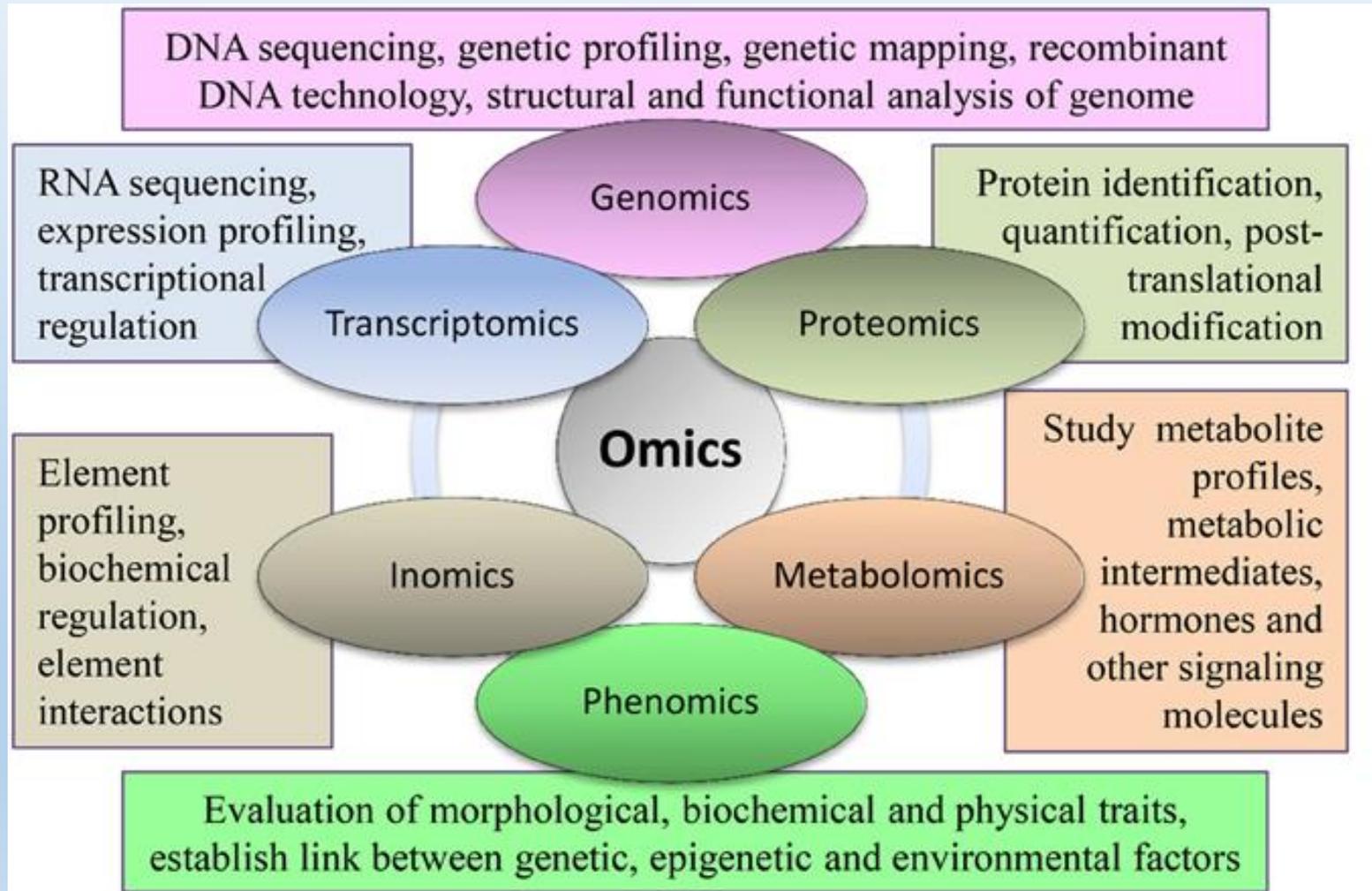


Dosagem e detecção de citocinas, outros peptídeos e proteínas

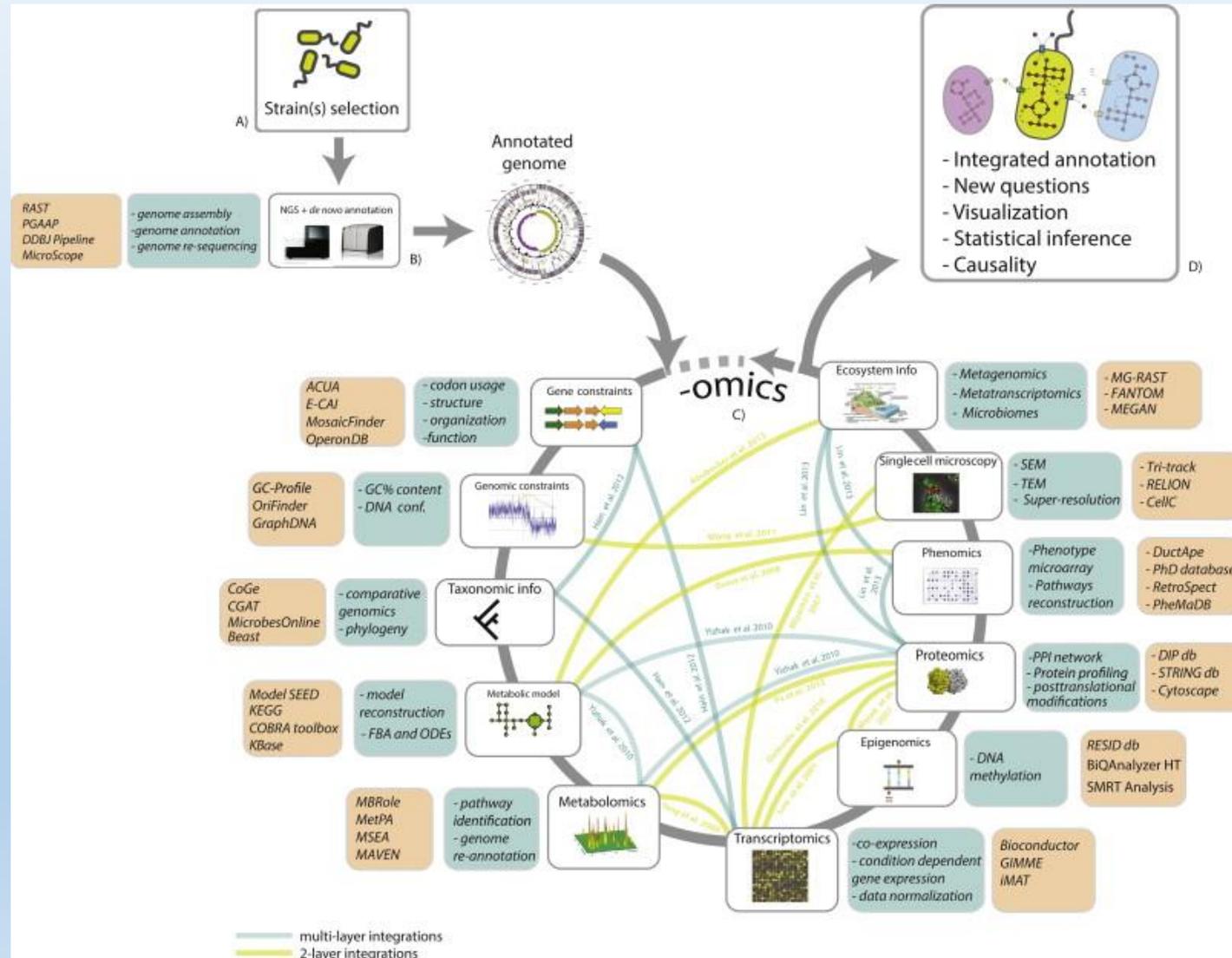


Estas técnicas permitem a definição do diagnóstico e por vezes do tipo de doença (categorias) – fenotipagem

ÔMICAS



ÔMICAS mais de perto...



Melhoramento genético de animais

O que é melhoramento genético animal?

- É um conjunto de processos seletivos que visam o aumento da frequência dos genes desejáveis na população, diminuindo conseqüentemente a frequência de genes indesejáveis.

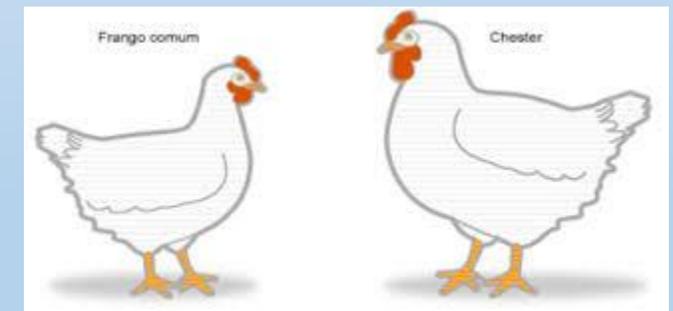


Fonte: Google Imagens

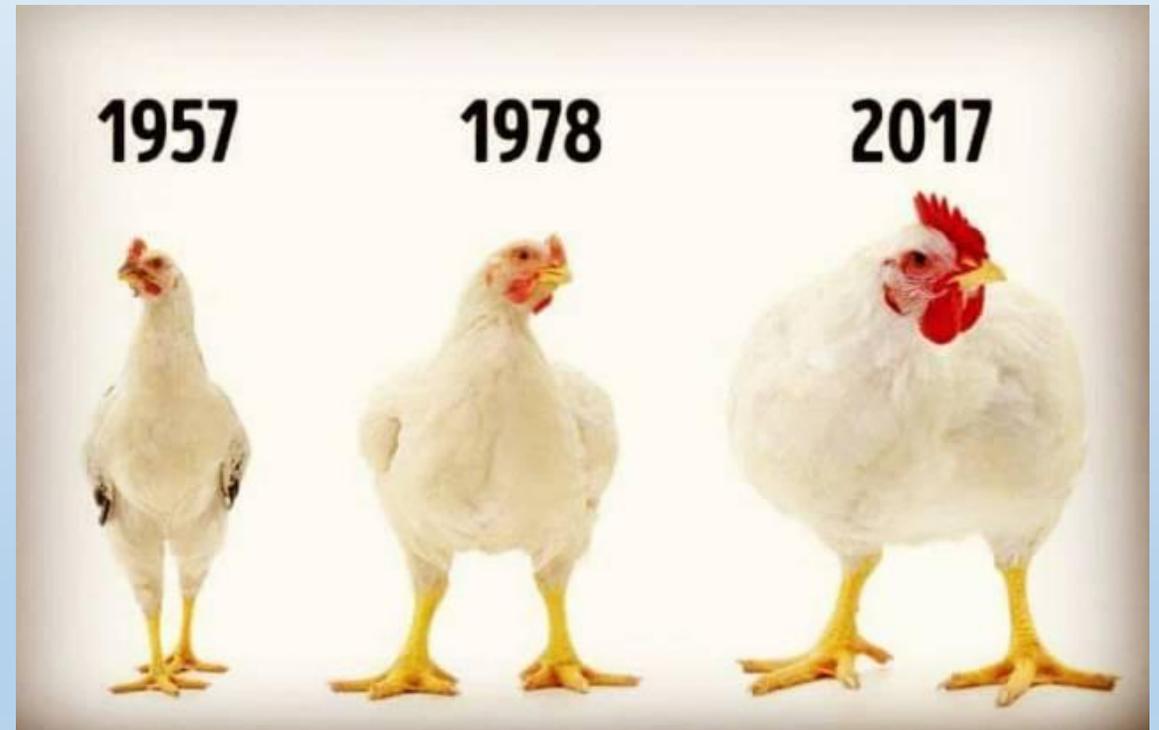
Objetivos do melhoramento genético

OBJETIVO

- Buscar animais com maior potencial genético em determinadas características, compatíveis com o interesse do mercado.



Resultados do melhoramento genético de animais



Melhoramento genético de animais

EXEMPLO DE MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL



Gado Santa Gertrudes, produzido no King Ranch, em Kigsville no Texas, EUA. É um ótimo produtor de carne e resistente a doenças parasitárias e ao calor

Resultante do cruzamento de dois tipos



Gado Shorthorn

Ótimo produtor de carne, mas sensível a doenças e ao calor



Gado Braham (Zebu)

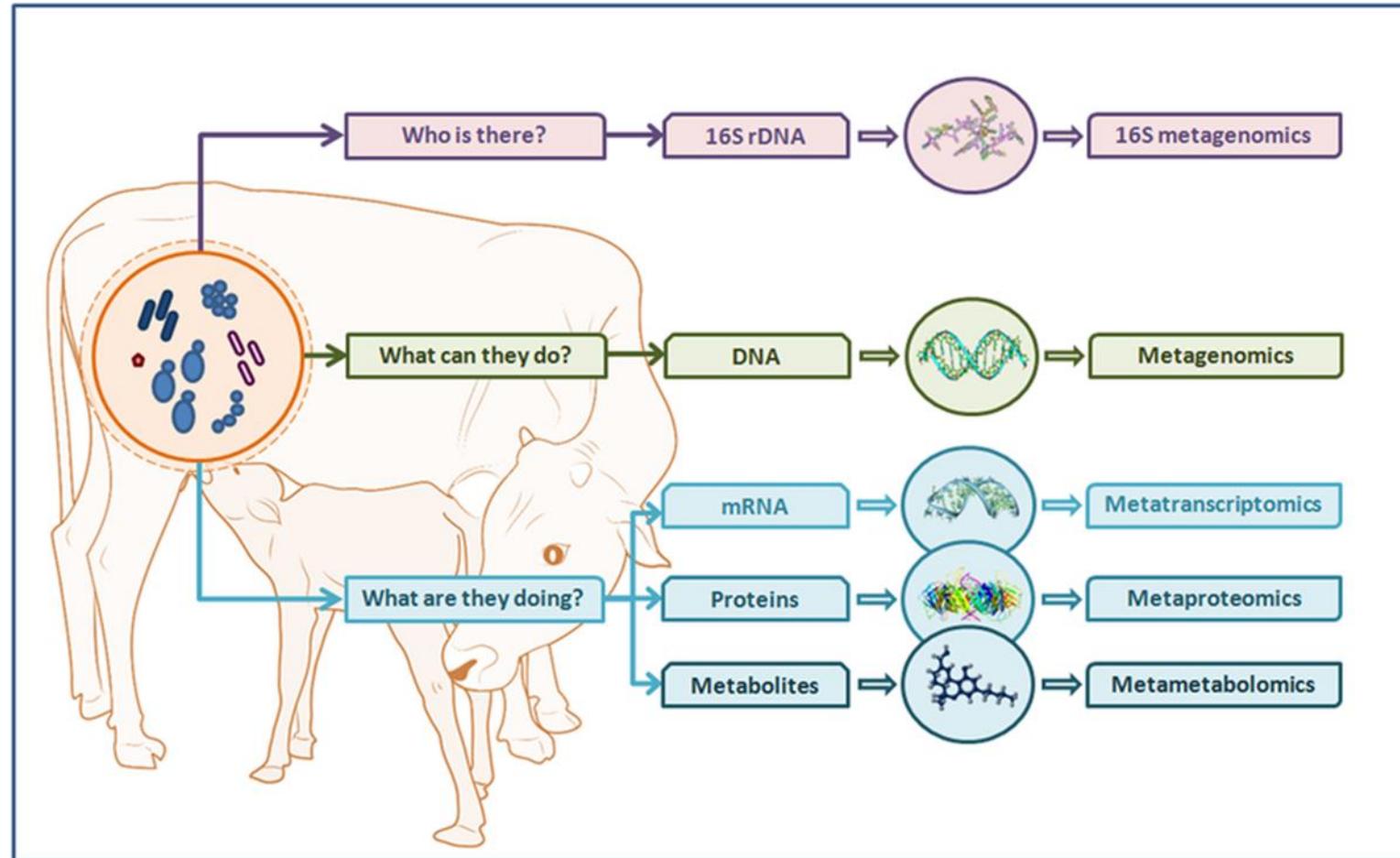
Menor produção de carne e é resistente a doenças e ao calor

Programa de Melhoramento Genético – EMBRAPA Gado de Corte

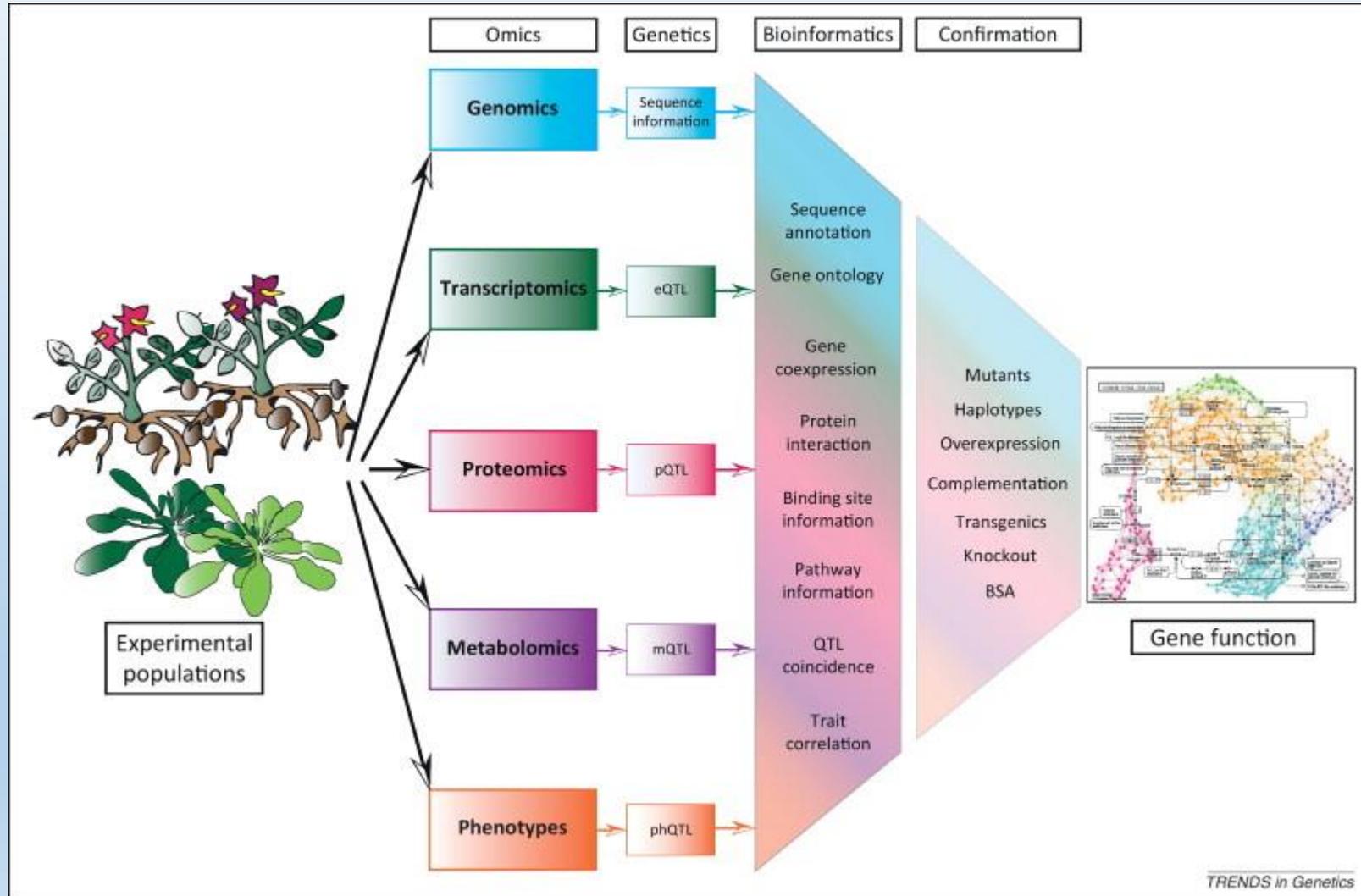


**Letícia Guerra Aldrigui
Laetitia M L Chadouteaud
Ligya M C do Amaral**

Aplicação das técnicas moleculares à análise de carne



Melhoramento genético de plantas



Melhoramento genético de alimentos

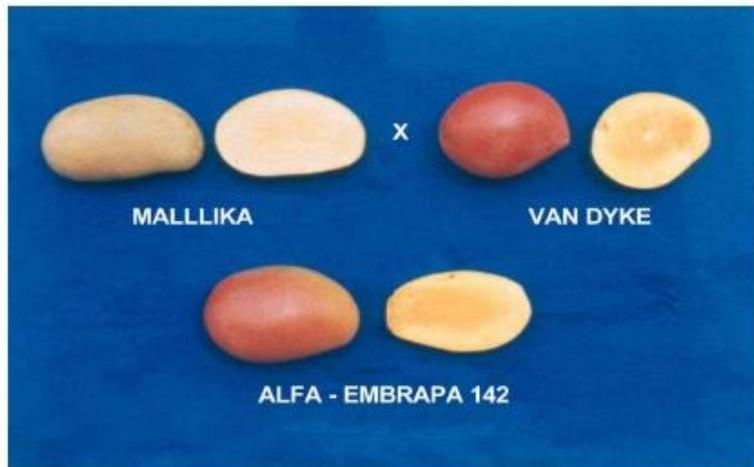
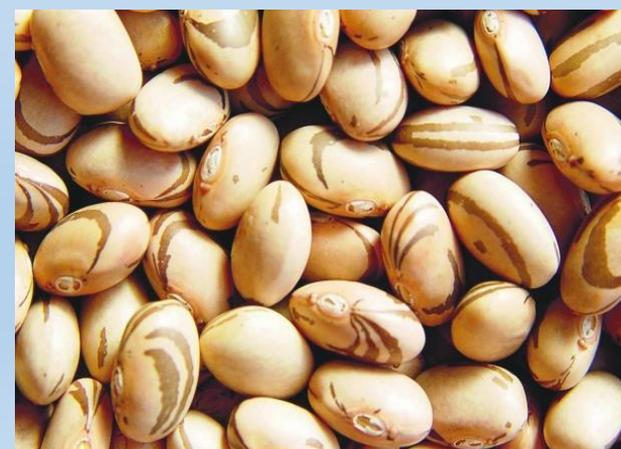


FIGURA 1 – Variedade Alfa possui fruto de coloração rósea, polpa doce e mediana em fibra, sendo muito resistente à mosca-das-frutas e à antracnose.



Ovos com ômega 3



Feijão carioca

Melhoramento genético de alimentos



Transgênicos no Brasil

- Até 2016, estavam aprovadas no país variedades transgênicas de soja, milho, algodão, feijão e eucalipto
- Além de plantas, o governo já autorizou o uso de componentes geneticamente modificados em vacinas, microrganismos (como leveduras e microalgas) e no mosquito *Aedes aegypti*, transmissor de doenças como dengue, zika vírus e febre chikungunya
- Em 2015, o Brasil se tornou o maior produtor mundial de algodão, e 95% da área cultivada foi composta de sementes transgênicas, segundo relatório do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA)
- A cada ano, a utilização de sementes transgênicas no país aumenta sistematicamente. Em cinco anos, entre 2010 e 2015, a taxa de adoção de variedades geneticamente modificadas (GM) de soja saltou de 75% para 94,2%
- Para outras culturas, nesse mesmo período, o cenário é semelhante: enquanto no milho, os índices aumentaram de 55% para 84,6%, no algodão subiram de 26% para 73,3%
- A crescente adesão se deve aos benefícios advindos do uso da biotecnologia, como maior eficiência, facilidade no manejo, menor tempo gasto nas operações, otimização do uso de defensivos químicos e redução de doenças e perdas nas lavouras



Organismos geneticamente modificados (OGM)

Aprovações de OGM no Brasil



Fonte: CTNBio 2019.

Argumentos a favor dos transgênicos

- O alimento geneticamente modificado pode ter a função de prevenir, reduzir ou evitar riscos de doenças, através das plantas modificadas geneticamente para produzirem vacinas ou iogurtes fermentados com OGM's que estimulem o sistema imunológico
- O uso de transgênicos pode reduzir o uso dos agrotóxicos (herbicidas, insecticidas e fungicidas) que podem causar sérios problemas de saúde aos seres vivos e a produção prejudicará menos o meio ambiente
- As plantas geneticamente modificadas podem adquirir resistência ao ataque de insectos, de pragas e à seca
- Através da resistência obtida, a planta sofre menos interferências de pragas e doenças, aumentando, assim, a produtividade agrícola através de lavouras mais produtivas
- Outro ponto é o aumento de produção de alimentos, que alguns especialistas afirmam poder reduzir o problema da fome. Esse aumento ainda poderia reduzir os custos de produção, facilitando assim a vida do agricultor



Argumentos contra os transgênicos

- O lugar em que o gene é inserido não pode ser controlado completamente, o que pode causar resultados inesperados uma vez que os genes de outras partes do organismo podem ser afetados
- Há um considerável aumento do número de casos de pessoas alérgicas a determinados alimentos em virtude das novas proteínas que são produzidas pela alteração genética dos alimentos
- Além dos riscos à saúde, também há os riscos ambientais como o aumento considerável de resíduos de pesticidas, pois alguns dos produtos transgênicos adquirem resistência aos efeitos dos agrotóxicos, necessitando de um uso mais intenso de outro(s) agrotóxico(s), e os restos poderão escoar para os rios e solos, contaminando o lençol freático e diminuindo a potabilidade da água
- A uniformidade genética leva a uma maior vulnerabilidade do cultivo porque a invasão de pestes, doenças e ervas daninhas sempre é maior em áreas que plantam o mesmo tipo de cultivo



Argumentos contra os transgênicos

- Quanto maior for a variedade genética no sistema da agricultura, mais este sistema estará adaptado para enfrentar pestes, doenças e mudanças climáticas que tendem a afetar apenas algumas variedades
- Pragas e doenças poderão tornar-se resistentes se houver a transferência do gene resistente para eles
- Alguns organismos que eram antes cultivados para serem usados na alimentação estão sendo modificados para produzirem produtos farmacêuticos e químicos
- Essas plantas modificadas poderiam fazer uma polinização cruzada com espécies semelhantes e, deste modo, contaminar plantas utilizadas exclusivamente na alimentação

