

APLICAÇÃO DE PCR TETRA-ARMS EM TESTES GENÉTICOS PREDITIVOS

Myrna Campos Ferraz¹, Fernanda Antunes Alves da Costa², Isabella Ariadne Ferrari Bernardes³, Débora Colombi⁴, Sidia Maria Baptista do Amaral⁵, Lucas Porangaba Silva⁶, Matheus Bertanha⁷, Marcone Lima Sobreira⁸

Resumo

Introdução:

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à trombofilia hereditária desempenham papel fundamental na estratificação de risco e na personalização das estratégias antitrombóticas. Embora o sequenciamento Sanger seja considerado o padrão ouro, trata-se de um método caro, demorado e nem sempre acessível em contextos com recursos limitados. A técnica de PCR TETRA-ARMS surge como uma alternativa de genotipagem de baixo custo que pode superar essas limitações.

Métodos:

Estudo experimental transversal realizado com o objetivo de padronizar e validar a técnica de PCR TETRA-ARMS para genotipagem de quatro genes F5 (R506Q), F2 (G20210A) e MTHFR (C677T e A1298C). Foram desenhados primers específicos e realizada otimização das condições de PCR. As condições de eletroforese foram ajustadas para melhorar a resolução das bandas. Os resultados obtidos foram comparados à genotipagem realizada por sequenciamento Sanger.

Resultados:

Foram analisadas 54 amostras de sangue periférico. A PCR TETRA-ARMS apresentou 100% de concordância com o sequenciamento Sanger. A técnica demonstrou discriminação clara entre genótipos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutados. Genótipos heterozigotos foram mais frequentes nos polimorfismos do gene MTHFR, enquanto os genes F5 e F2 apresentaram predominância de alelos selvagens. A metodologia mostrou alta especificidade e sensibilidade, com padrões de bandas reprodutíveis e redução de custos e complexidade técnica.

Conclusão:

A PCR TETRA-ARMS é uma estratégia de genotipagem confiável, precisa e economicamente viável para detecção de SNPs relacionados à trombofilia. Representa uma alternativa factível para aplicação clínica e epidemiológica, especialmente em laboratórios com infraestrutura limitada.

PALAVRAS CHAVES: Reação em cadeia da polimerase; trombofilia; genotipagem.

INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares, baseados em polimorfismos do tipo SNPs (Single Nucleotide Polymorphism ou Polimorfismo de Base Única), envolvem a troca de um nucleotídeo por outro na sequência de DNA e, atualmente, são muito usados na área de diagnósticos genéticos, pois são abundantes na espécie humana, podem estar localizados em regiões codificantes e afetar diretamente a função proteica, além disso, são bialélicos e herdáveis com maior estabilidade e são possíveis de aplicar tecnologias mais fáceis para sua identificação. Diversas metodologias modernas auxiliam na genotipagem de alto rendimento de SNPs. Hoje, o sequenciamento Sanger e o sequenciamento NGS (Next Generation Sequencing) são as tecnologias mais utilizadas na identificação de SNPs em análises genéticas diagnósticas¹⁻².

O sequenciamento direto do gene, também conhecido como método de Sanger ou método de terminação de cadeia³, ainda vem sendo utilizada como padrão ouro na identificação de mutações pontuais na sequência do DNA⁴.

Devido aos altos custos, técnicas alternativas vêm sendo estudadas visando a diminuição desses valores. No presente trabalho, a abordagem por TETRA-ARMS é apresentada como alternativa ao sequenciamento Sanger para identificar mutações (SNPs), que são associadas com predisposição à trombofilia hereditária.

A metodologia da PCR TETRA-ARMS é caracterizada pela amplificação simultânea de duas regiões de um alelo específico, o qual exibe uma variância de interesse. Uma região maior, referente ao controle externo, e outra região menor, referente ao controle interno. A amplificação conta com o uso de dois primers distintos, os quais poderão anelar especificamente aos sítios dos alelos SNPs “selvagens” ou mutados, dependendo das características de homozigose ou heterozigose das amostras em análise⁵. Assim, os indivíduos homozigotos para tais alelos exibirão um único produto de amplificação, enquanto os indivíduos heterozigotos exibirão dois desses produtos, conforme esquematizado na Figura 1.

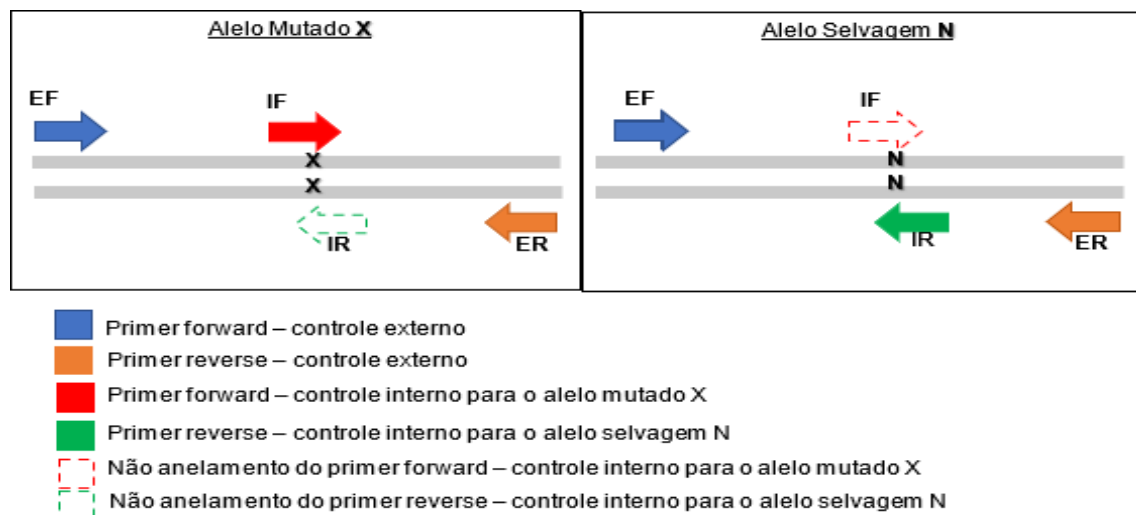


Figura 1: Esquema de amplificação via TETRA-ARMS PCR, usando os conjuntos de primers EF e ER, para amplificação do controle externo; IF e ER, para amplificação do alelo de risco “X” (controle interno mutado); EF e IR, para amplificação do alelo selvagem “N” (controle interno selvagem).

Segundo o Ministério da Saúde⁶, através do exame genético, é possível saber se a pessoa tem uma predisposição genética (hereditária) à trombose e é possível que o médico tome medidas preventivas. A trombofilia hereditária é caracterizada por alterações de nível genético onde ocorrem o aumento de chance da doenças. Essas alterações podem gerar um descontrole na cascata de coagulação, onde os pacientes poderão exibir predisposição para o tromboembolismo venoso, atingindo em sua maioria indivíduos relativamente jovens em até 1/3 dos casos⁷. A trombofilia nos últimos anos passou a ser notada por ser uma das causadoras de mortalidade gestacional com mais recorrência⁸.

De acordo com Ferreira e cols⁹, trombofilia é caracterizada por um distúrbio hemostático que aumenta a incidência de eventos tromboembólicos causada por diversas mutações, entre elas as mais comuns são a mutação do fator V de Leiden - F5 (R506Q) que é o fator de risco genético mais importante para trombose; a mutação do gene da protrombina - F2 (G20210A), que é sintetizado no fígado na presença de vitamina K, sendo este o precursor da trombina, que no final da cascata de coagulação induz a formação de fibrina e as mutações no gene MTHFR (677C> T e 1298A> C); o gene MTHFR leva à produção da enzima de mesmo nome, que atua na conversão da homocisteína em metionina, um aminoácido precursor de vários importantes processos no corpo. Uma deficiência na enzima MTHFR favorece a ocorrência de trombose arterial e venosa¹⁰.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO, EXTRAÇÃO DE DNA E PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS CONTROLES PARA RESPECTIVAS MUTAÇÕES

As amostras de sangue utilizadas foram obtidas a partir de 54 amostras de voluntários da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu (UNESP-Botucatu) e da Empresa Genotyping – Biotecnologia, sendo 34 do Hospital das Clínicas da UNESP e 18 da empresa, deste total, 44 dos pacientes eram do sexo feminino e 10 do sexo masculino com idades entre 19 e 76 anos. As amostras foram padronizadas em concentrações de 40 ng/μL e, em seguida, foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para que, posteriormente, fossem submetidas ao Sequenciamento Sanger.

Para cada uma das sequências analisadas, os controles foram identificados como A para pacientes homozigotos e B para pacientes heterozigotos em relação ao alelo selvagem dos três genes alvo – metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR – c.665C>T e c.1286A>C), Fator V de Leiden (F5 - R506Q) e a Protrombina (F2 - G20210A) (Tab. 1).

Tabela 1: Identificação das sequências dos genes alvo e suas respectivas mutações.

Identificação do gene	Gene	Mutação
1	MTHFR Exon 5	Mutação C.665C>T
2	MTHFR Exon 8	Mutação C.1286A>C
3	F5 Exon 10	Mutação C.1601G>A
4	F2 Exon 14	Mutação F2 - G20210A

As amostras de DNA foram extraídas com o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega), conforme instruções do fabricante. Uma alíquota de 200 µL de cada amostra de sangue foi misturada a 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão de lise, agitada em vórtex por pelo menos 10 s e incubada a 56°C por 10 min. Após, foram adicionados 250 µL de tampão de ligação à cada mistura; seguida de agitação em vórtex e transferência às colunas de ligação, acopladas em tubos de microcentrífuga. Os tubos e colunas foram centrifugados em velocidade máxima, por 1 minuto e as colunas foram posicionadas em novos tubos estéreis e a essas foram adicionados 500 µL de solução de lavagem, para posterior centrifugação em velocidade máxima, por 3 min. Esse último passo foi repetido mais duas vezes e, em seguida, foram adicionados aproximadamente 100 µL de água livre de nucleases às colunas, as quais foram centrifugadas por 1 minuto e, então descartadas.

As amostras de DNA foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop™ Lite Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific), através da comparação de absorbâncias a 260-280 nm e determinação da concentração das mesmas em ng/µL.

PCR, ELETROFORESE E SEQUENCIAMENTO SANGER

As regiões dos genes codificantes para MTHFR, F5 e F2, que contém as mutações de interesse, foram amplificadas para o sequenciamento Sanger. As reações de PCR foram constituídas de 1 µL de DNA obtido (~30ng/ µL), 5 µL de GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, USA), 0,5 µM de *primer forward* e 0,5 µM de *primer reverse* e água ultrapura estéril, em quantidade suficiente para completar o volume total de 10 µL. As reações foram conduzidas em termociclador Biometra TGradient Thermal Cycler (USA), sob as seguintes condições: 5 min a 94°C; 34 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s a 60° C e 1min a 72°C e uma etapa final de 5 min a 72°C.

Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, segundo Sambrook e Russel (11) (2001). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®), eluído em solução tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM), contendo Gel Red, em concentração de 0,1 µL/mL (Biotium). A corrida eletroforética foi realizada a 80 V por 1 hora e as bandas foram visualizadas em um transluminador UV, cujos tamanhos dessas foram estimados por comparação a um marcador de peso molecular, 100 bp DNA Ladder (Ludwig Biotec, Brasil).

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit enzimático Exo SAP-IT® (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento foi usado 100 ng de DNA purificado, 1 uL de *primer forward* (0,32 pmol), 1 uL de 2,5X Big Dye buffer (Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific), 2 uL do Ready Reaction Premix (Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific). O programa usado caracterizou-se por 25 ciclos de 10 s à 96°C, 5 s à 50°C e 4 min a 60°C. Após a secagem dos DNAs, esses foram acrescidos de 3 uL da solução Blue Dextran Loading Solution (Promega). As soluções foram desnaturadas a 95°C durante 5 min e foram armazenadas 20°C, até o momento do sequenciamento, realizado em sequenciador 3730XL, segundo protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

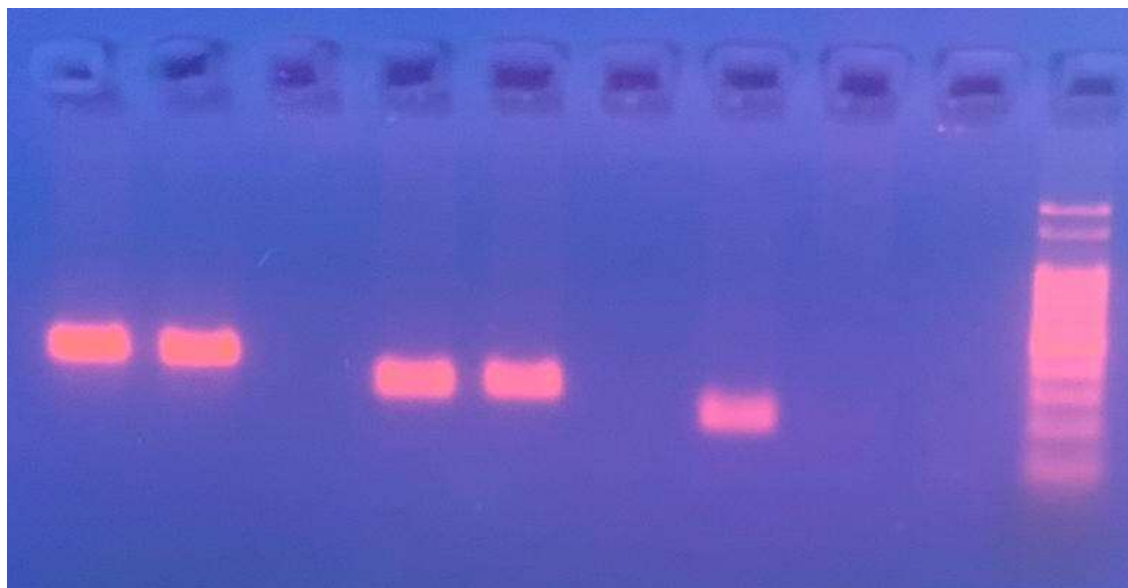


Figura 2: Fotodocumentação em smartphone de eletroforese em gel de agarose 2%, exemplificando o teste de amplificação de alguns conjuntos de primers (MTHFR, F2 e F5), desenhados durante o período referentes a este relatório.

PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO *TETRA-ARMS PCR*

De um total de 25 primers, 16 foram utilizados para as amplificações de SNPs específicos, presentes nos genes MTHFR, F5 e F2. Esses primers foram desenhados com auxílio do programa “Primer 1” <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> (Collins e Ke (14), 2012).

As constituições das reações de *TETRA-ARMS PCR* realizadas para cada gene de interesse (MTHFR, F5 e F2) estão especificadas nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2: Condições de PCR para reações de amplificação dos alelos relativos ao gene MTHFR exon 5

GoTaq® Green Master Mix 2x	10µL
Água livre de nucleases	7,8µL
Primers forward externo (5µM)	0,6 µL
Primers reverse externo (5µM)	0,7 µL
Primers forward interno (5µM)	0,8 µL
Primers reverse interno (5µM)	1 µL
Amostra de DNA (~40 ng/ µL)	1 µL

As condições de termociclagem da *TETRA-ARMS PCR* para o gene MTHFR (c.665C>T) caracterizaram-se por: desnaturação inicial de 95° C durante 3 min, seguidos por 35 ciclos de 95° C por 30 s, 57° C por 30 s e 72° C por 35 s e uma extensão final de 72° C durante 3 min.

Tabela 3: Condições de PCR para reações de amplificação dos alelos relativos ao gene MTHFR exon 8

GoTaq® Green Master Mix 2x	10µL
Água livre de nucleases	7,8µL
<i>Primers forward</i> externo (5µM)	0,7 µL
<i>Primers reverse</i> externo (5µM)	0,4 µL
<i>Primers forward</i> interno (5µM)	0,5 µL
<i>Primers reverse</i> interno (5µM)	0,8 µL
DMSO	0,5
Amostra de DNA (~40 ng/ µL)	1 µL

As condições de termociclagem da TETRA-ARMS PCR para o gene MTHFR (c.1286A>C) caracterizaram-se por: desnaturação inicial de 95° C durante 3 min, seguidos por 35 ciclos de 95° C por 30 s, 54° C por 30 s e 72° C por 35 s e uma extensão final de 72° C durante 3 min.

Tabela 4: Condições de PCR para reações de amplificação dos alelos relativos ao gene F5 exon 10

GoTaq® Green Master Mix 2x	10 µL
Água livre de nucleases	6,2 µL
<i>Primers forward</i> externo (5µM)	0,4 µL
<i>Primers reverse</i> externo (5µM)	0,4 µL
<i>Primers forward</i> interno (5µM)	1 µL
<i>Primers reverse</i> interno (5µM)	1 µL
Amostra de DNA (~40 ng/ µL)	1 µL

As condições de termociclagem da TETRA-ARMS PCR para o gene F5 caracterizaram-se por: desnaturação inicial de 95° C durante 3 min, seguidos por 36 ciclos de 95° C por 30 s, 60-58° C por 20 s e 72° C por 45 s e uma extensão final de 72° C durante 3 min.

Tabela 5: Condições de PCR para reações de amplificação dos alelos relativos ao gene F2 exon 14.

GoTaq® Green Master Mix 2x	10 µL
Água livre de nucleases	6,2 µL
<i>Primers forward</i> externo (5µM)	0,6 µL
<i>Primers reverse</i> externo (5µM)	0,6 µL
<i>Primers forward</i> interno (5µM)	1 µL
<i>Primers reverse</i> interno (5µM)	1 µL
Amostra de DNA (~40 ng/ µL)	1 µL

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para fins de cálculo amostral foi considerado a prevalência de 13%, utilizando 5% de erro e 95% de confiança, assim obtivemos o número amostras de aproximadamente 51 pacientes. Após os resultados foi constatado 100% de correlação entre os dois testes.

RESULTADOS

Todas as reações referentes à metodologia TETRA-ARMS PCR, desenvolvidas para os genes associados à trombofilia, obtiveram sucesso, sendo assim foi possível validar o ensaio. Os resultados encontrados no sequenciamento Sanger, que apresenta padrão ouro na detecção de mutações específica foram idênticos aos encontrados no teste de PCR - TETRA-ARMS (Fig. 3 e 4).

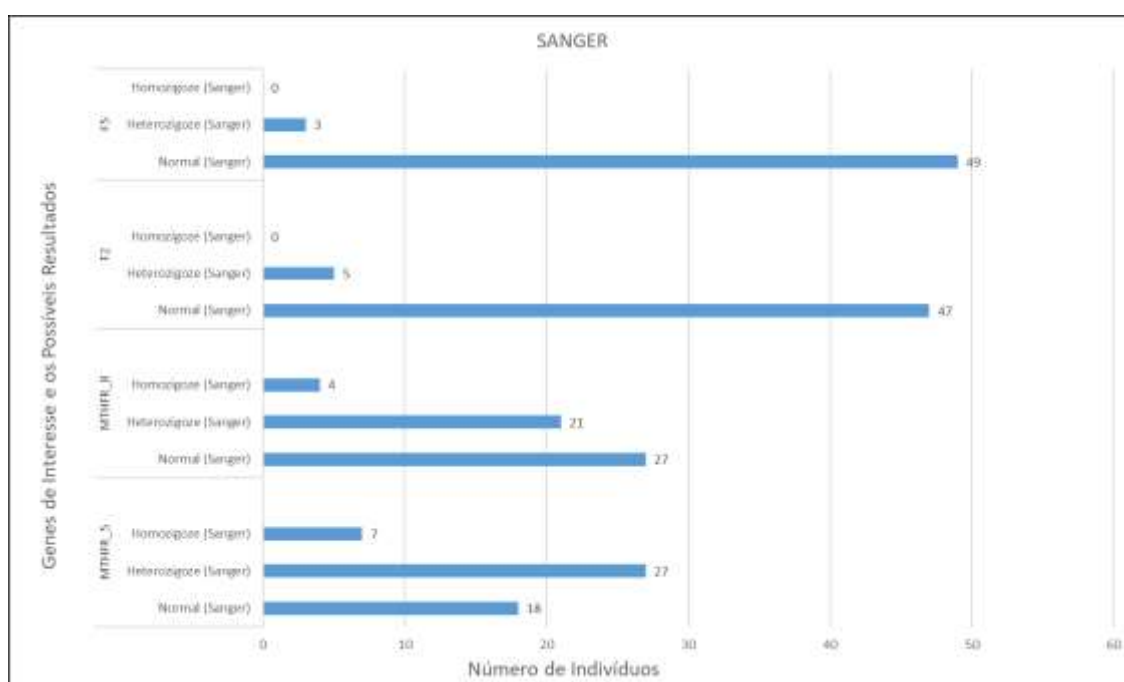


Figura 3: Resultado do Sequenciamento Sanger em relação ao número de indivíduos e seus respectivos resultados em cada uma das variantes em estudo.

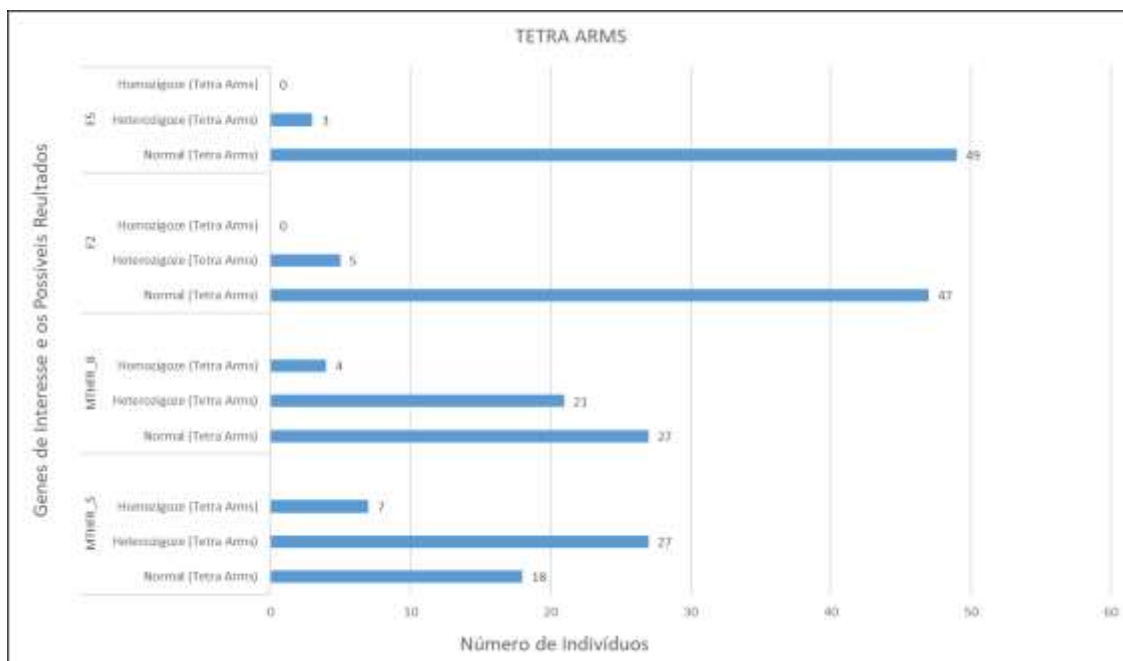


Figura 4: Resultado do Teste PCR TETRA ARMS em relação ao número de amostras e seus respectivos resultados em cada uma das variantes em estudo

As Figuras 6 e 7 evidenciaram os resultados obtidos para as reações de TETRA-ARMS relativas aos genes F5 e F2 (Fig. 5) e MTHFR (Fig. 6). Tais resultados foram analisados após corridas eletroforéticas dos produtos das amplificações dos alelos alvo, para os indivíduos homozigotos e heterozigotos. As concentrações dos géis de eletroforese foram de 2% para as amplificações relativas aos genes MTHFR e F5. Para o gene F2, a concentração desse gel foi igual a 3%, pois os alelos selvagem e mutado desse gene apresentavam pouca diferença entre os fragmentos gerados e necessitaram de condições que permitissem a melhor separação deles. Assim, o aumento na concentração do gel permitiu melhor visualização das bandas e facilitou a identificação da presença do alelo mutado, evitando erros de diagnóstico, como os falsos negativos.

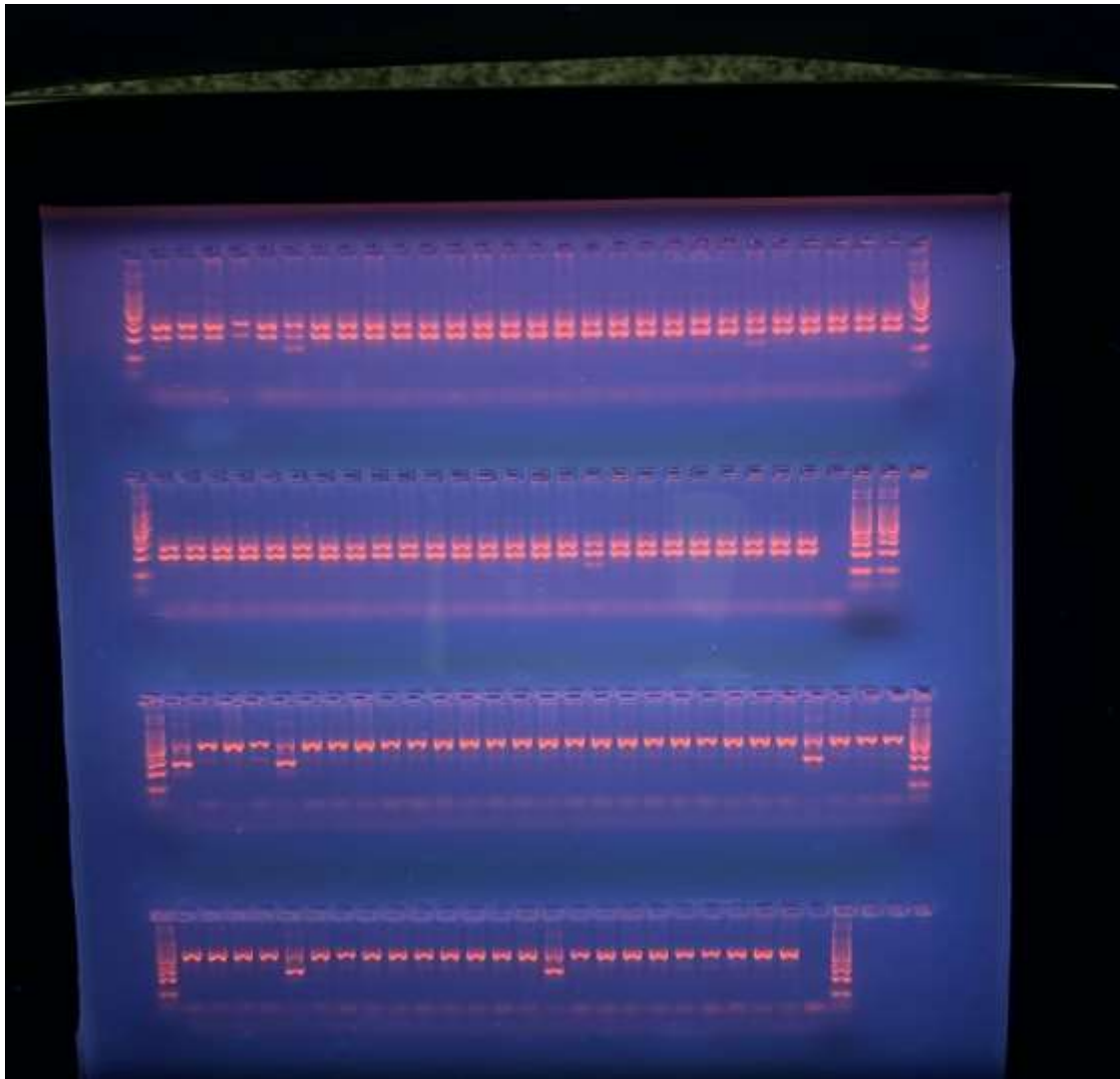


Figura 5: TETRA-ARMS PCR evidenciando bandas para os alelos dos genes F5 (R605Q G>A) – as duas fileiras acima - e F2 (G20210A G>A) – as duas fileiras abaixo.

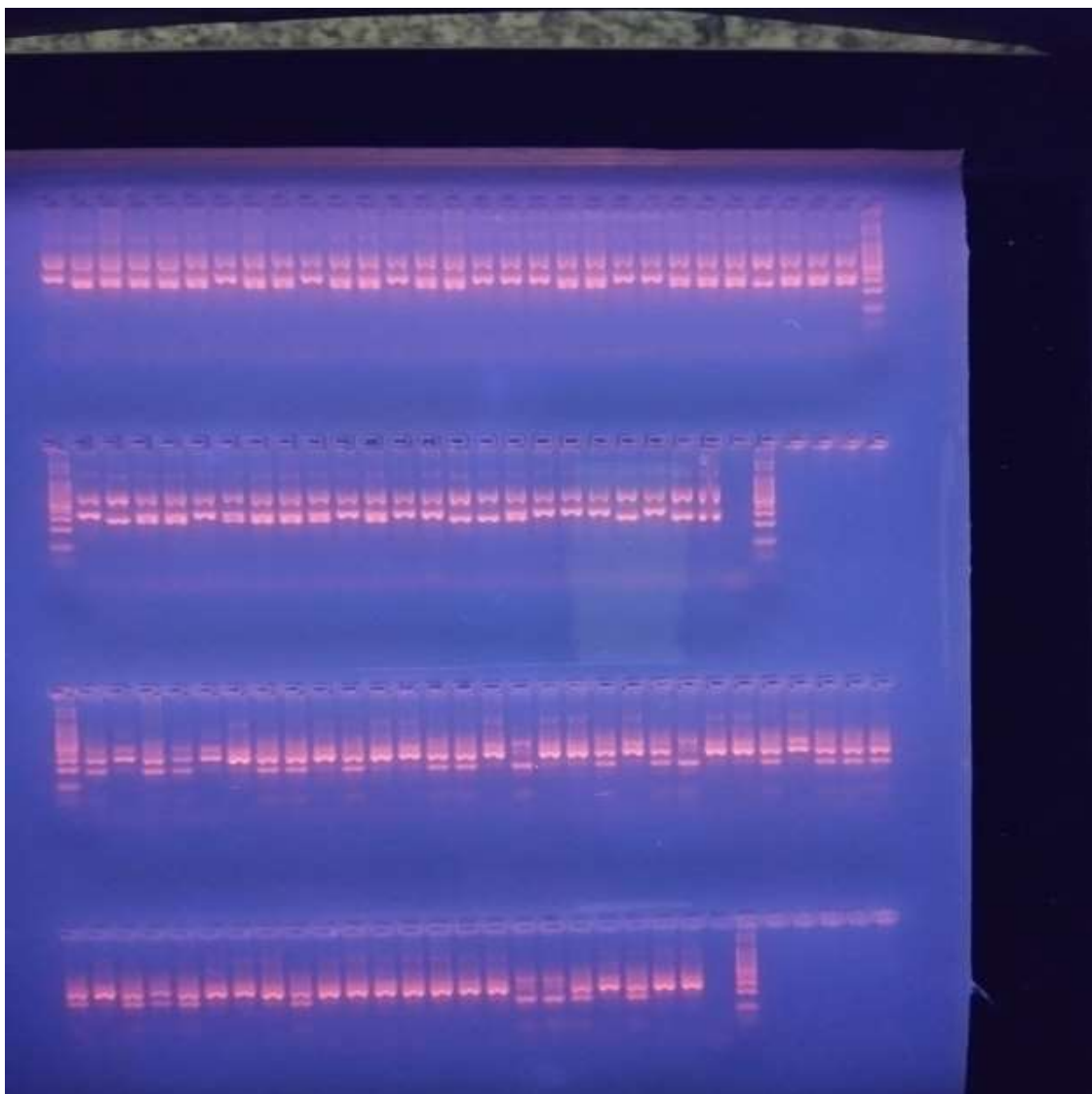


Figura 6: TETRA-ARMS PCR evidenciando bandas para os alelos dos genes MTHFR (c.665 C>T) –as duas fileiras acima - e MTHFR (c.1286 A>C) – as duas fileiras abaixo.

Esses achados confirmam que a metodologia padronizada é altamente sensível, específica e adaptável às condições de rotina laboratorial. A validação cruzada com sequenciamento Sanger não apenas respalda a precisão dos dados, mas também posiciona a PCR TETRA-ARMS como alternativa viável e custo-efetiva para aplicações clínicas e epidemiológicas na triagem genética da trombofilia hereditária.

A análise qualitativa das bandas nos géis reforça a capacidade discriminatória da técnica. A Figura 5 mostra as bandas obtidas para os genes F5 e F2, em que as combinações de primers permitiram a identificação precisa dos genótipos. A necessidade de maior resolução para o gene F2 foi solucionada pelo uso de gel a 3%, permitindo a separação adequada entre fragmentos muito próximos, o que é fundamental para evitar falsos negativos. Já a Figura 6 apresenta os resultados das amplificações para MTHFR, com bandas nítidas e reprodutíveis tanto para alelos selvagens quanto mutados.

Os resultados da genotipagem, comparados ao sequenciamento Sanger, mostraram 100% de concordância, validando a PCR TETRA-ARMS como método

confiável para a identificação dos SNPs estudados. A Figura 3 resume os achados do sequenciamento, evidenciando a distribuição dos genótipos para cada gene. A maioria dos indivíduos apresentou genótipos heterozigotos para MTHFR C677T e A1298C, enquanto as mutações em F5 e F2 foram menos frequentes, com predomínio de genótipos selvagens. Esse padrão foi reproduzido de forma idêntica pela PCR TETRA-ARMS (Figura 4), confirmando a robustez do método.

A amplificação dos fragmentos por PCR TETRA-ARMS foi eficiente em todas as reações, com diferenciação clara entre alelos selvagens, mutados e heterozigotos. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em géis de agarose de diferentes concentrações, ajustadas conforme a necessidade de resolução. A Figura 2 apresenta a fotodocumentação dos testes iniciais de padronização, confirmando a especificidade dos primers e a qualidade das bandas geradas.

A aplicação da técnica PCR TETRA-ARMS permitiu a genotipagem eficiente de 54 amostras de DNA humano, analisando mutações específicas nos genes MTHFR (C677T e A1298C), F5 (R506Q) e F2 (G20210A), conforme detalhado na Tabela 1. A padronização dos primers foi realizada com sucesso, utilizando ferramentas bioinformáticas (Primer1) para o desenho de 25 oligonucleotídeos, dos quais 16 foram selecionados para os ensaios finais, com composição e condições de amplificação específicas descritas nas Tabelas 2 a 5.

DISCUSSÃO

O método de sequenciamento Sanger foi a primeira metodologia desenvolvida para obtenção de sequências nucleotídicas e análises genômicas. Esta técnica sofreu melhorias ao longo do tempo, tornando-a mais automatizada, com o uso de equipamentos e nucleotídeos modificados (dideoxi-nucleotídeos), que quando introduzidos no DNA sintetizado interrompem a síntese e emitem fluorescências específicas para cada base (A, T, C ou G). Esta metodologia apresenta algumas limitações importantes, pois apresenta um alto custo, é trabalhosa, necessita de mão de obra treinada e cada reação detecta somente um polimorfismo de interesse em cada amostra¹².

Apesar da maior facilidade no acesso global aos testes genéticos preditivos, o custo destes testes ainda representa um aspecto que inibe a adesão de um maior número de indivíduos¹³. Especialmente na América do Sul, esses custos acabam se elevando, pois existe a dependência de importação de muitos insumos e equipamentos para a realização de tais testes, principalmente os que envolvem metodologias de sequenciamento, como o Sanger, que, demanda maiores custos. Nesta perspectiva, a aplicação de técnicas alternativas ao sequenciamento favorece a redução dos custos e tornam os testes genéticos mais acessíveis à população em geral. A técnica de PCR-TETRA ARMS validada nesse estudo pode se tornar uma ferramenta importante no diagnóstico precoce da trombofilia hereditária.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram elevada concordância entre a técnica de PCR TETRA-ARMS e o sequenciamento Sanger na identificação de polimorfismos genéticos associados à trombofilia hereditária. A correlação de 100% entre os dois métodos confirma a robustez da PCR TETRA-ARMS, corroborando estudos prévios que apontam sua confiabilidade e acurácia na detecção de SNPs específicos

(5,14). A capacidade de distinguir com clareza indivíduos homozigotos e heterozigotos para as variantes dos genes F5, F2 e MTHFR reforça a utilidade da metodologia como ferramenta de triagem molecular.

A técnica mostrou vantagens operacionais importantes, como menor tempo de execução e custo reduzido em comparação ao sequenciamento tradicional, aspectos também destacados por Medrano e Cols⁵ e Collins e Cols¹³ em seus estudos de padronização da TETRA-ARMS. Em contextos com limitação de recursos ou em laboratórios de menor complexidade, esses fatores representam um diferencial estratégico para a ampliação do acesso ao diagnóstico genético.

A validação do método para mutações clássicas como F5 R506Q (fator V de Leiden) e F2 G20210A é particularmente relevante, dado seu impacto reconhecido no risco trombótico (9,10). Além disso, a inclusão das variantes MTHFR C677T e A1298C, associadas a alterações no metabolismo da homocisteína, reforça a aplicabilidade clínica da técnica, já que essas mutações têm sido implicadas em diversos eventos cardiovasculares e obstétricos¹⁰. Os resultados obtidos neste estudo estão em linha com análises anteriores que apontam para a frequência significativa dessas mutações na população brasileira^{3,9}.

Entre as limitações do presente estudo, destacam-se o número restrito de variantes avaliadas e a amostragem limitada geograficamente, o que pode impactar a extrapolação dos achados para outras populações. No entanto, os resultados apresentados oferecem base sólida para estudos multicêntricos e com painéis genéticos expandidos, que poderão consolidar a PCR TETRA-ARMS como uma alternativa de primeira linha em contextos de medicina personalizada e preventiva. A inclusão de um maior número de amostras e a ampliação para outras mutações genéticas associadas à trombofilia ou a outras condições clínicas poderiam fortalecer a validação externa da técnica.

Em comparação ao sequenciamento Sanger, a PCR TETRA-ARMS mostrou vantagens operacionais relevantes: menor custo, menor tempo de execução e ausência de necessidade de equipamentos sofisticados. Tais características ampliam o acesso ao diagnóstico genético em locais com infraestrutura limitada, além de viabilizarem programas de triagem em larga escala. Estudos como os de Medrano e Oliveira (5) e Collins e Ke (14) já haviam apontado essa perspectiva, agora reforçada pelos dados concretos obtidos nesta investigação.

Os dados obtidos para as variantes dos genes MTHFR (C677T e A1298C), F5 (R506Q) e F2 (G20210A) corroboram a literatura quanto à sua prevalência e associação com risco trombótico^{9,10}. A alta frequência de heterozigotos observada para MTHFR está alinhada a estudos populacionais prévios que indicam ampla distribuição dessas variantes na população brasileira^{3,9}. Já as mutações em F5 e F2, menos prevalentes no estudo, mantêm sua relevância clínica por estarem fortemente implicadas em eventos tromboembólicos, especialmente em pacientes com histórico familiar ou comorbidades associadas.

A capacidade da técnica em diferenciar com clareza os genótipos homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutados, observada tanto nas análises eletroforéticas quanto nos dados de frequência das variantes, confere à metodologia um potencial aplicável à prática diagnóstica. A padronização eficiente dos primers e das condições de reação garantiu especificidade e reprodutibilidade, mesmo diante de

desafios como a proximidade entre os fragmentos amplificados no gene F2, cuja resolução foi otimizada com o uso de géis de alta concentração.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a viabilidade técnica e analítica da PCR TETRA-ARMS como ferramenta eficaz para genotipagem de polimorfismos associados à trombofilia hereditária. A elevada concordância com o sequenciamento Sanger, considerado padrão ouro para identificação de SNPs, reforça a confiabilidade da técnica, como já apontado em estudos anteriores que validaram a PCR TETRA-ARMS em diferentes contextos clínicos e experimentais^{5,14}.

CONCLUSÃO

A técnica de PCR TETRA-ARMS demonstrou elevada confiabilidade na identificação de variantes genéticas associadas à trombofilia hereditária, apresentando total concordância com os resultados obtidos pelo sequenciamento Sanger. Além da acurácia, destacou-se por sua simplicidade operacional, baixo custo e rapidez na execução, características que a tornam especialmente promissora para aplicação em ambientes clínicos com recursos limitados.

O uso da PCR TETRA-ARMS como uma alternativa eficaz para testes genéticos preditivos, contribuindo para o diagnóstico precoce, a estratificação de risco e a individualização de condutas terapêuticas. Perspectivas futuras incluem sua aplicação em painéis genéticos ampliados e em programas de triagem populacional voltados à medicina personalizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, et al. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*; 142(1–2):169–196. doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5.
2. Collins, A. & Ke, X. (2012) Primer 1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal*, 6: 55-58. doi: 10.2174/1875036201206010055.
3. Ferreira, C. M. et al. Thromboprophylaxis and maternal-fetal outcomes of women with serum markers for hereditary thrombophilia and previous obstetric complications. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 17, n. 4, p. 693–698, 2017
4. França, LT, Carrilho, E, Kist, TB. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys*; 35(2):169-200. doi: 10.1017/s0033583502003797.
5. Medrano, RFV & Oliveira, CA. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular Biotechnology*, 56: 599-608. doi: 10.1007/s12033-014-9734-4.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia do SUS (CONITEC). Exames diagnósticos para trombofilia em gestantes. Brasília, 2019. 9p.
7. Morgan, S, Hurley, J, Miller, F, Giacomini, M. 2003. Predictive genetic tests and health system costs. *CMAJ*; 168 (8): 989-991.
8. Nadeem, MA., Nawazb, MA., Shahidc, MQ. et al. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 32 (2): 261–285. doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401.
9. Oliveira, R. G., da Silva, E. G., Gonçalves, L. C., Leão-Cordeiro, J. A. B., Ataídes, F. S., Junior, A. D. S. M., ... & Silva, A. M. T. C. (2021). Polimorfismo C677T do gene *mthfr* na susceptibilidade à hipertensão arterial: evidências baseadas em metanálise. *Brazilian Journal of Development*, 7(5), 44831-44853.
10. Sambrook, J. & Russell, DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
11. Sanger, F., Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.74, n.12, p. 5463–5467. 1977.
12. Shendure, J.; Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. v.26, p.1135- 1145. 2008.

13. Simões, C. F. S. Barros, A. R. B. Junior, D. M. J. Conhecimento de gestantes a respeito de fatores de risco e prevenção de complicações vasculares na gestação. *Iniciação Científica Cesumar* jan./jun. 2016, v. 18, n. 1, p. 55-62.
14. Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*. 2005;142(1-2):169-196.