

Técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico de doenças genéticas

Com o advento das primeiras tecnologias moleculares de manipulação do DNA, iniciado na década de 1970, foi imediata a tentativa de transferência de praticamente todos os tipos de técnicas de análise do DNA para a identificação dos genes responsáveis por doenças, para o estudo das principais mutações patológicas e para o rastreamento dessas mutações em indivíduos e famílias com casos de doenças hereditárias. Existe um repertório muito diversificado de técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico e identificação de afetados e de portadores normais de mutações em genes responsáveis por doenças genéticas humanas, que seria muito longo descrever individualmente. No entanto, todas essas metodologias têm como princípio algumas técnicas básicas de estudo da molécula de DNA, explicadas a seguir.

Obtenção do DNA para estudo

Os testes diagnósticos baseados em análise de DNA são realizados em crianças e adultos com relativa facilidade, a partir de procedimentos de extração de DNA de sangue periférico. Volumes de 5 a 10 mL de sangue fornecem DNA mais do que suficiente para vários exames moleculares, e a sobra do DNA extraído pode ser armazenada por muitos anos. Se necessário, o DNA pode ser extraído de amostras muito menores de sangue, como 500 μl , ou até mesmo de uma gota de sangue colhida em papel de filtro, caso o objetivo seja estudar o DNA por PCR, técnica explicada em outro capítulo.

Por meio das técnicas de diagnóstico pré-natal, é possível obter amostras de tecido fetal para análises bioquímicas, de DNA ou de cromossomos. A coleta de amostras de vilosidade coriônica, de líquido amniótico, ou mesmo de sangue fetal por cordocentese, permite obter DNA em quantidade suficiente para as análises que descreveremos a seguir. Dentre essas técnicas de coleta, a amostra de vilosidade coriônica é a menos

invasiva e a mais precoce (realizada entre a 8^a e a 12^a semana de gestação). Portanto, ela tem sido a preferida para obtenção de material para estudos de DNA em exames pré-natais.

Técnica de *Southern blotting*

Uma das primeiras grandes inovações no estudo das moléculas de DNA foi o aparecimento da técnica de *Southern blotting*, desenvolvida pelo pesquisador E. Southern, na década de 1970. O processo começa com a extração de DNA de um tecido, por exemplo, o sangue de um indivíduo, e o corte das moléculas de DNA com as chamadas enzimas de restrição. Estas enzimas são extraídas de diversas espécies bacterianas, cada uma com a capacidade de cortar as moléculas de DNA em sequências de bases específicas. Isso significa que uma enzima de restrição deve cortar o DNA obtido de um certo indivíduo sempre nas mesmas posições, ainda que o experimento seja repetido várias vezes em ocasiões diferentes. Os fragmentos do DNA genômico total de um indivíduo, resultantes da clivagem com uma enzima de restrição, são, então, separados por eletroforese. As amostras do DNA clivado são aplicadas em poços de um gel poroso, mais comumente feito de agarose e submetidas a um campo elétrico. Os fragmentos menores migram mais facilmente no gel poroso, deslocando-se mais rapidamente do que os fragmentos maiores. Após a eletroforese, para cada indivíduo corresponderá uma pista onde se deslocaram milhares de fragmentos de seu DNA. No entanto, nessa pista não podem ser identificados quais fragmentos pertencem a um cromossomo ou gene específico. O gel de agarose é posto em contato com uma membrana de náilon, sobre a qual é colocada um pilha de papel absorvente. O gel está sobre um papel de filtro embebido em uma solução tampão. Após algumas horas, o tampão que embebe o gel de agarose é absorvido pela pilha de papel toalha, carregando consigo as moléculas de DNA do gel e transferindo-as para a superfície da membrana de náilon. A membrana de náilon passa a conter os fragmentos de DNA que estavam no gel na mesma posição, e representa, portanto, uma cópia fiel do resultado da eletroforese. Para evidenciar nessa membrana um trecho específico da molécula de DNA, por exemplo, um gene relacionado a uma doença que se deseja investigar, os fragmentos da membrana são hibridados com um segmento específico do DNA. Esse DNA previamente conhecido e isolado no laboratório é chamado de sonda. Para a sonda evidenciar, na membrana, os fragmentos que lhe são correspondentes, precisa estar marcada. Os processos mais utilizados compreendem a marcação da sonda com isótopos radioativos ou substâncias quimioluminescentes. Assim, a sonda previamente marcada é desnaturada (a dupla-hélice do DNA é separada por calor ou tratamento com solução alcalina). O DNA da membrana também é tratado para sofrer desnaturação, e ambos são colocados em contato por algumas horas, a uma temperatura que permita a *hibridação* (reconstrução da dupla-hélice) entre o DNA da sonda e o DNA imobilizado na membrana. Após a hibridação, aplicam-se métodos que permitam identificar o fragmento que hibridou com a sonda. Por exemplo, ao se usarem isótopos radioativos, a membrana é colocada em contato com um filme de raios X, evidenciando, assim, a posição dos fragmentos do DNA da membrana hibridados com a sonda radioativa (Figura 4.1).

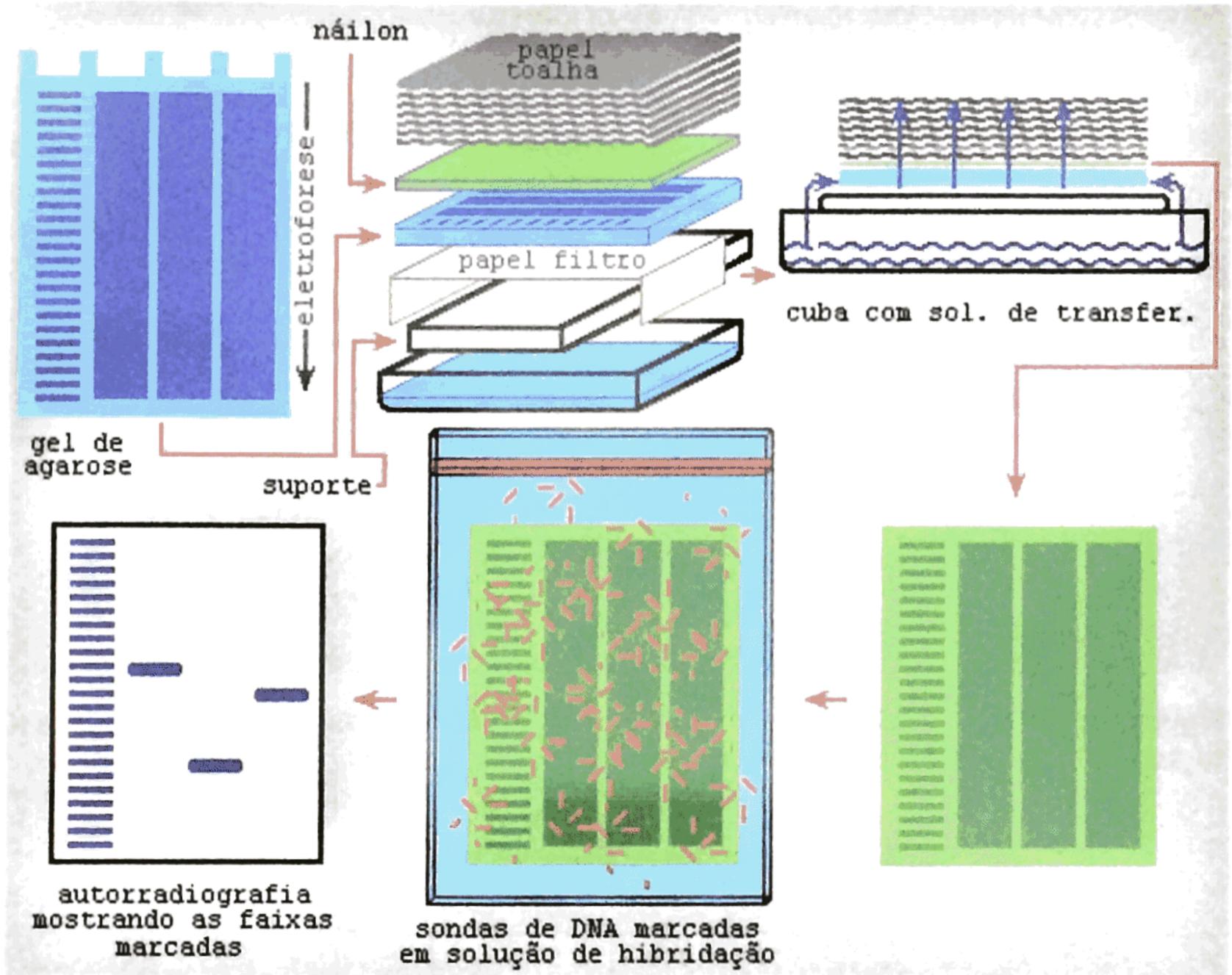


Figura 4.1 – Representação do método de *Southern blotting*.

Se um indivíduo tiver uma mutação gênica, por exemplo, substituição de uma única base nitrogenada na região do DNA correspondente ao gene da beta-globina, ele pode ser portador da mutação que causa a anemia falciforme (essa substituição ocorre exatamente no códon correspondente ao aminoácido ácido glutâmico, que nos afetados é substituído por um resíduo de valina). Essa substituição faz com que o DNA dos portadores deixe de ser cortado pela enzima de restrição *Mst II*. Assim, se o DNA de vários indivíduos for cortado com essa enzima, separado por eletroforese e for realizado o *Southern blotting* seguido de hibridação com sonda específica do gene da betaglobina, padrões diferentes de hibridação serão observados nos homozigotos normais, nos heterozigotos e nos homozigotos afetados pela anemia falciforme, como mostra a Figura 4.2 .

A técnica de *Southern blotting* permite que se detecte, além das alterações de sítios de corte das enzimas de restrição, outras mutações, como as que aumentam o tamanho de um fragmento de DNA (causadas por inserções). Por exemplo, na Figura 4.3 vê-se esquematicamente o resultado de um exame feito por *Southern blotting* para estudar indivíduos com a pré-mutação e a mutação completa da síndrome do cromossomo X frágil.

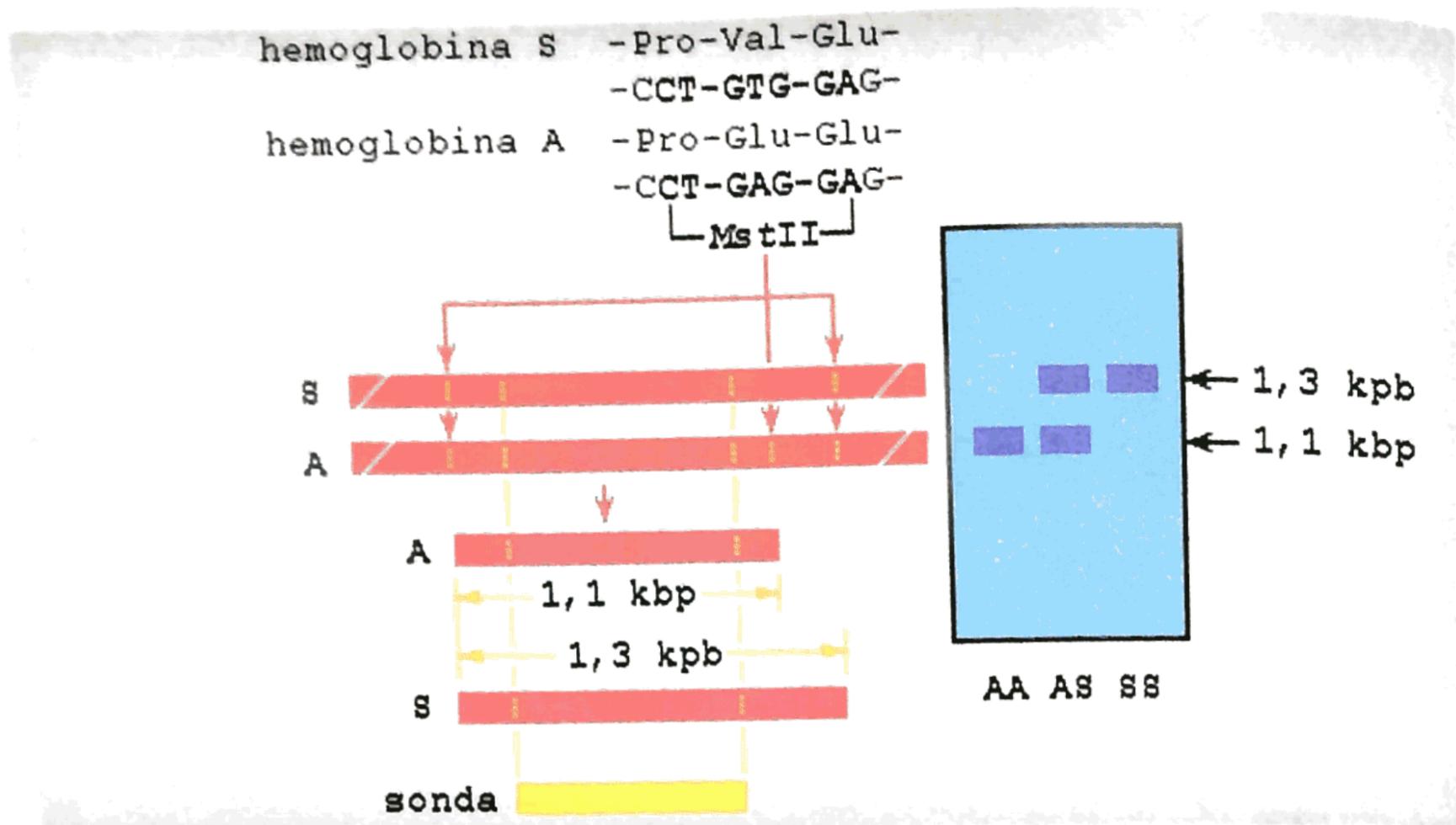


Figura 4.2 - Detecção da mutação no gene da anemia falciforme com uso de enzimas de restrição e da técnica de *Southern blotting*.

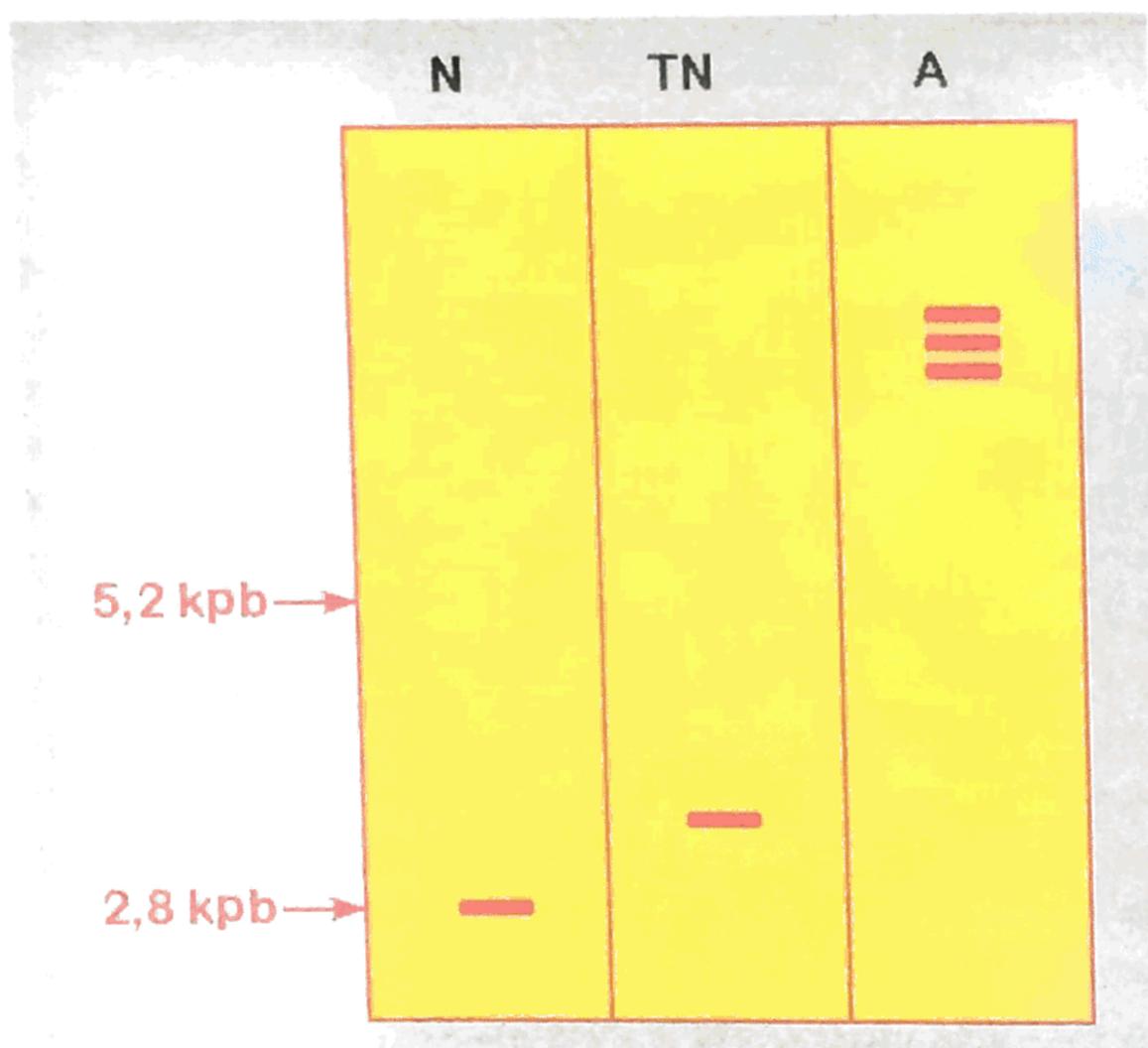


Figura 4.3 - Detecção da mutação do gene *FMR1* que leva à síndrome do cromossomo X frágil. **N** é um homem normal, sem nenhuma expansão de trinucleotídeos no loco *FMR-1*. **TN** é um homem portador de pequena expansão naquele loco, a qual não tem efeitos fenotípicos; nesse caso, diz-se que o indivíduo é portador da pré-mutação. **A** é um homem afetado pela síndrome, apresentando retardo mental; ele é portador de enormes expansões no loco *FMR-1*, ou seja, da mutação completa.

A técnica de *Southern blotting* também permite detectar mutações que diminuem o tamanho de um fragmento de DNA (deleções). Quando não ocorre hibridação alguma com a sonda, isso pode indicar a deleção completa do fragmento que hibrida com a sonda específica. Essa estratégia foi utilizada, por muitos anos, para se estudar as grandes deleções no gene da distrofina (*DMD*). No esquema da Figura 4.4, mostra-se o resultado da transferência de Southern seguida de hibridação com sondas do gene da distrofina, revelando que vários dos indivíduos afetados por distrofia muscular de Duchenne têm deleções de tamanhos diversos nesse gene.

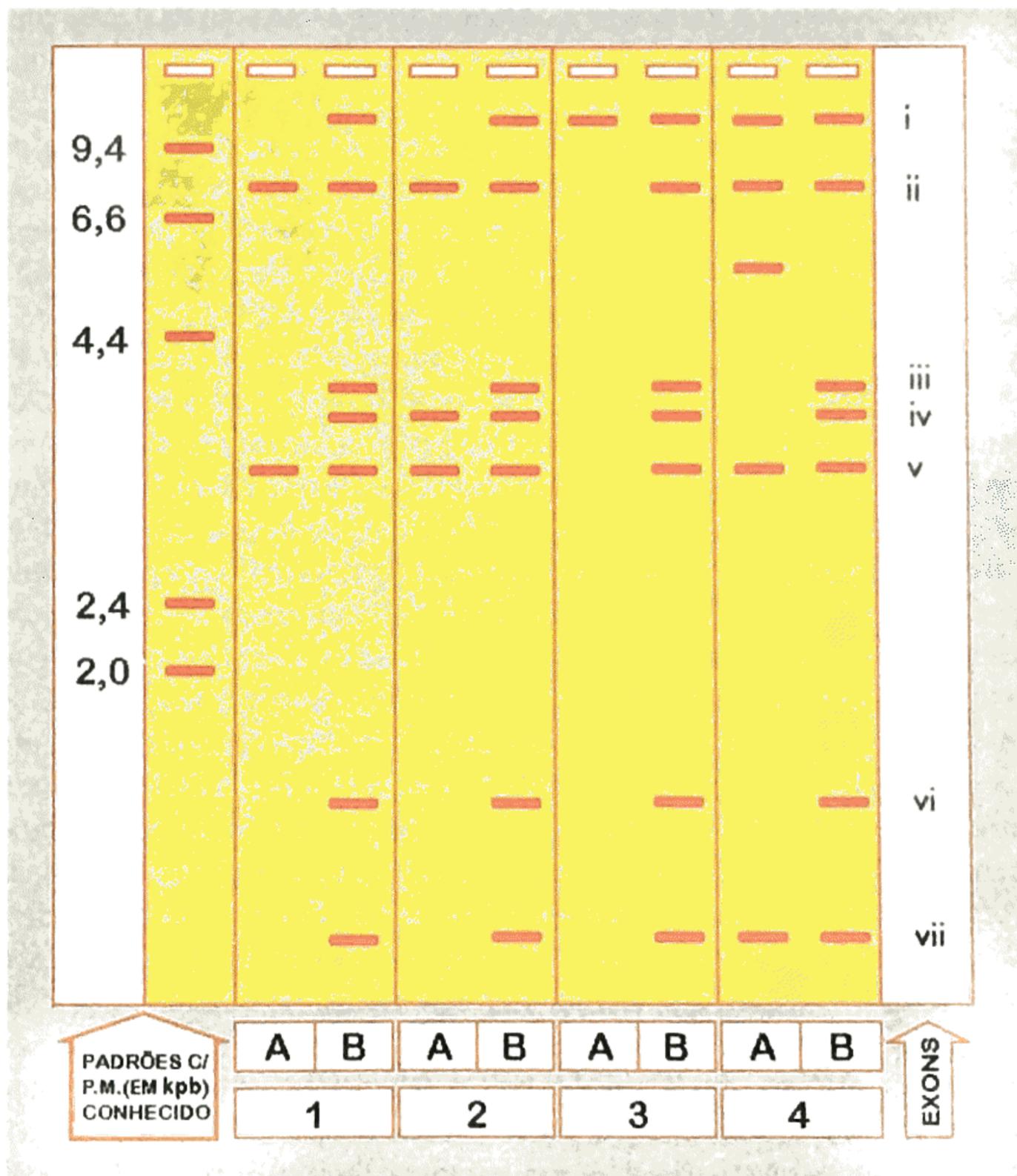


Figura 4.4 – Identificação de deleções na distrofia muscular de Duchenne utilizando sondas do gene *DMD*. O DNA de meninos com DMD (pistas 1A a 4A) e seus irmãos normais (pistas 1B a 4B) foi digerido com a enzima *Taq I* e hibridado com uma sonda de cDNA que detecta sete éxons do gene nos indivíduos normais (i a vii). Os meninos afetados têm diversas deleções, e o paciente 4A apresenta um fragmento de tamanho anormal, além de outros éxons deletados. A primeira pista apresenta os marcadores de peso molecular conhecido, cujos pesos moleculares (em kb) são mostrados à esquerda da figura.

A revolução da reação em cadeia da polimerase

A técnica que acarretou uma verdadeira avalanche de inovações na área da genética molecular foi a chamada PCR (*polymerase chain reaction*), a reação em cadeia da polimerase, desenvolvida na década de 1980. A PCR consiste em uma sucessão de reações de replicação de uma molécula de DNA, feitas em tubo de ensaio. Parte-se de uma amostra de DNA-alvo, por exemplo, uma certa amostra do DNA genômico de um indivíduo. São fornecidos os reagentes necessários à replicação do DNA, que incluem os quatro tipos de nucleotídeos na forma trifosfatada, íons e um par de iniciadores da reação (*primers*), que são oligonucleotídeos com sequências de bases complementares às sequências de bases que flanqueiam o segmento de DNA que se deseja amplificar por PCR. A necessidade de um par de iniciadores da reação decorre de uma peculiaridade do próprio mecanismo de replicação do DNA *in vivo*. As polimerases que replicam o DNA são incapazes de iniciar a síntese de uma nova cadeia a partir da cadeia molde; só são capazes de alongar uma cadeia de ácido nucleico pré-existente, que lhe fornece uma extremidade com carbono 3' livre, onde serão adicionados os novos nucleotídeos trifosfatados. Na célula viva, os iniciadores (*primers*) são adicionados por uma RNA polimerase e são constituídos por ribonucleotídeos que, depois da replicação, são substituídos de desoxirribonucleotídeos. Na reação da PCR, os *primers* são sintetizados artificialmente e se constituem de curtos segmentos de 15 a 30 desoxirribonucleotídeos. As sequências de bases dos *primers* são escolhidas em função de sua complementaridade à sequência de bases que flanqueia o segmento de DNA que se deseja amplificar. Após sucessivos ciclos de desnaturação do DNA (por aquecimento da amostra), hibridação dos *primers* (com o resfriamento da amostra) e extensão dos fragmentos pela DNA polimerase (à temperatura de cerca de 72°C), a alíquota de DNA inicial é amplificada milhares de vezes, como mostra a Figura 4.5.

Nota-se que nem todo o DNA genômico é amplificado nessa reação, mas somente o segmento de DNA compreendido entre o local da hibridação de ambos os *primers*. De maneira análoga ao que ocorre na técnica de *Southern blotting*, a PCR permite evidenciar, dentre uma coleção de fragmentos de DNA do genoma de um indivíduo, apenas um pequeno trecho. As vantagens dessa técnica são inúmeras: pequenas quantidades de DNA podem ser analisadas e o resultado costuma ser obtido muito mais rapidamente do que na técnica de *Southern blotting*. No entanto, o planejamento dos *primers* da PCR requer conhecimento prévio, ao menos parcial, da sequência de bases do DNA-alvo que se deseja amplificar.

A técnica tem algumas propriedades que a tornam extremamente vantajosa em termos de prática laboratorial. Em primeiro lugar, a quantidade de material para a reação é de alguns nanogramas de DNA, em comparação com os 5 a 10 µg necessários quando o DNA é obtido de um paciente que é estudado por meio da técnica de *Southern blotting*. Um pouco de sangue (200 µℓ) e amostras de vilosidade coriônica podem ser facilmente utilizados em procedimentos diagnósticos. Até mesmo a solução obtida após um bochecho com solução salina pode conter células suficientes para análise por PCR. Esta vantagem torna os programas de triagem mais viáveis, em larga escala populacional, de doenças genéticas, além de possibilitar uma série de análises com finalidades forenses.

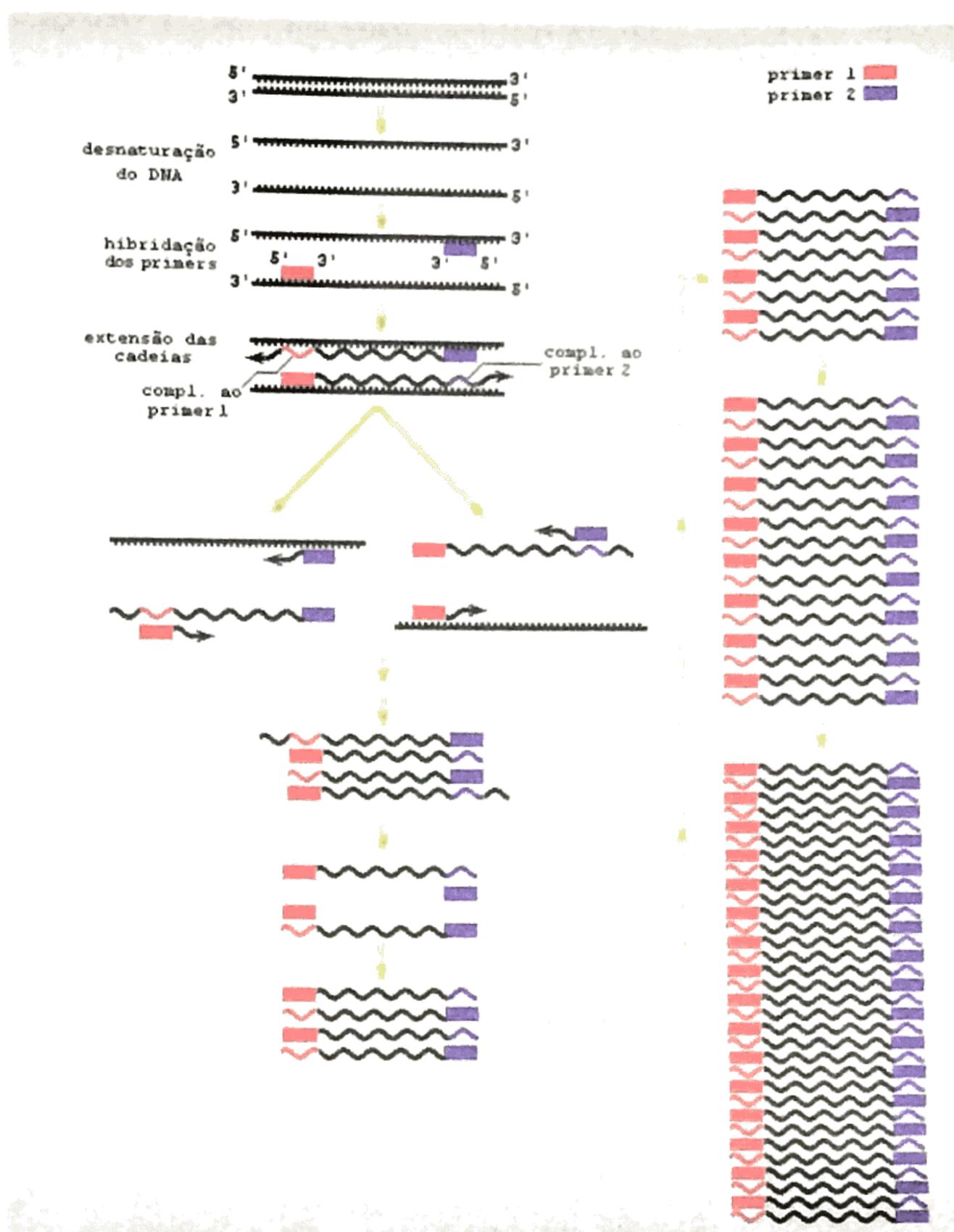


Figura 4.5 – Esquema mostrando como funciona a técnica da reação em cadeia da polimerase.

A segunda vantagem é que a detecção dos produtos da amplificação é muito mais simples do que os procedimentos baseados no *Southern blotting*, pois a análise dos resultados dispensa o uso de sondas. Quando consideramos que muitos dos diagnósticos de doenças são feitos com base em sondas marcadas radioativamente, dispensar a radiação do processo é altamente desejável em termos práticos. Os produtos da amplificação podem ser analisados diretamente, após eletroforese em gel de agarose ou, dependendo do tamanho dos produtos amplificados, depois de eletroforese em gel de acrilamida.

A terceira vantagem reside no tempo gasto pelos exames com base na PCR. Algumas horas de amplificação são seguidas de mais algumas horas de eletroforese e os produtos já são analisados. É possível fornecer um resultado em menos de 48 h, o que é altamente desejável, principalmente em diagnóstico pré-natal. Em contrapartida, um

método fundamentado em *Southern blotting* requer, no mínimo, uma semana até o resultado final.

Em último lugar, a especificidade da reação permite que várias sequências possam ser amplificadas simultaneamente, desde que os produtos tenham tamanhos diferentes e possam ser diferenciados após eletroforese em gel. Essa estratégia é chamada de multiplex.

Por exemplo, se um indivíduo for portador de uma substituição de bases em um certo gene que altera o sítio de corte de uma enzima de restrição, o produto obtido pela PCR de um segmento desse gene pode ser clivado com a enzima. A análise dos fragmentos obtidos pode mostrar essa substituição. De maneira análoga ao *Southern blotting*, o tamanho do fragmento amplificado pode indicar uma deleção ou inserção de bases. A ausência completa de amplificação de um fragmento revela a deleção completa da região do gene que está contida entre os dois *primers*. Uma série de outras técnicas, incluindo o próprio sequenciamento de bases do DNA, têm a PCR como etapa inicial da análise, simplificando muito o estudo de vários genes relacionados a doenças.

Na Figura 4.6, a reação da PCR foi utilizada para amplificar um pequeno fragmento do gene *CFTR*, cujas mutações em homozigose levam à fibrose cística, doença de herança autossômica recessiva (estudada em outro capítulo). O fragmento de tamanho menor corresponde ao alelo com a mutação (uma deleção de três nucleotídeos).

Na Figura 4.7, vê-se como a técnica de PCR em multiplex substituiu a hibridação com sondas nas pesquisas das deleções no gene da distrofina, que causam a distrofia muscular de Duchenne, tornando esse diagnóstico molecular muito mais barato, prático e rápido.

Amostras de DNA de cada paciente são amplificadas na presença dos nove pares de *primers* simultaneamente, e os produtos da PCR são analisados diretamente em gel

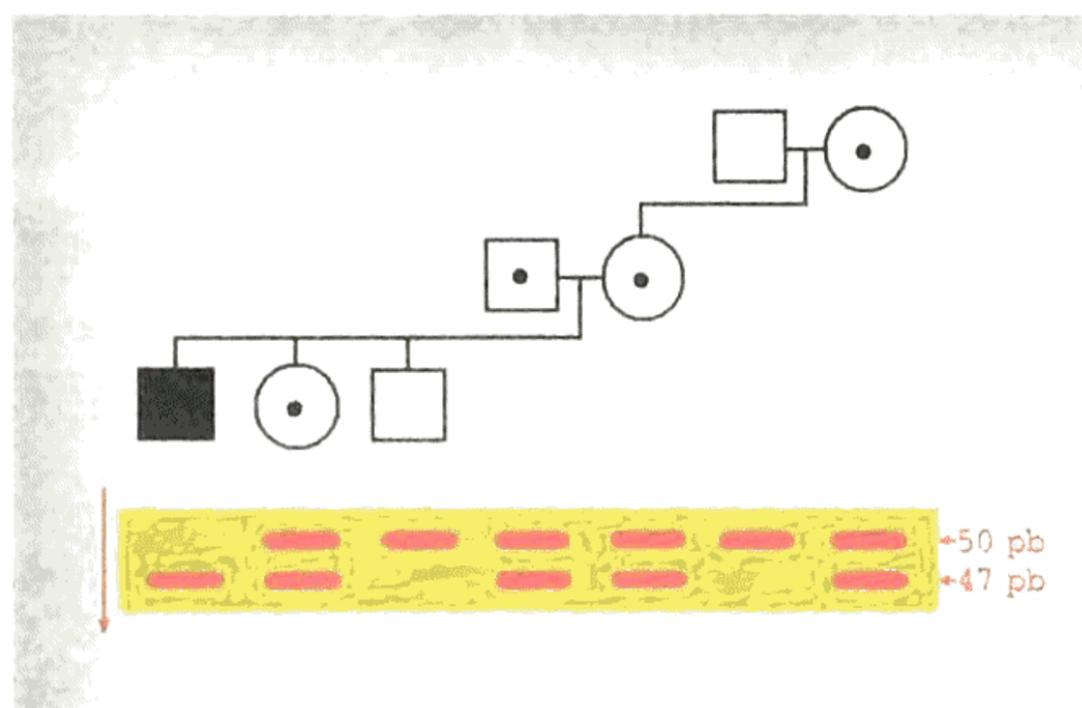


Figura 4.6 – Resultados da reação da PCR, revelando a mutação com uma deleção de três nucleotídeos, o que causa a fibrose cística. O afetado (em preto) é homozigoto para a mutação e apresenta duas bandas de 47 pb; os indivíduos heterozigotos para a mutação, indicados por um ponto preto, apresentam duas bandas de tamanho distinto, 47 e 50 pb. (Figura modificada dos resultados em uma família brasileira atendida no laboratório da Dra. Maria Rita Passos Bueno, da Universidade de São Paulo).

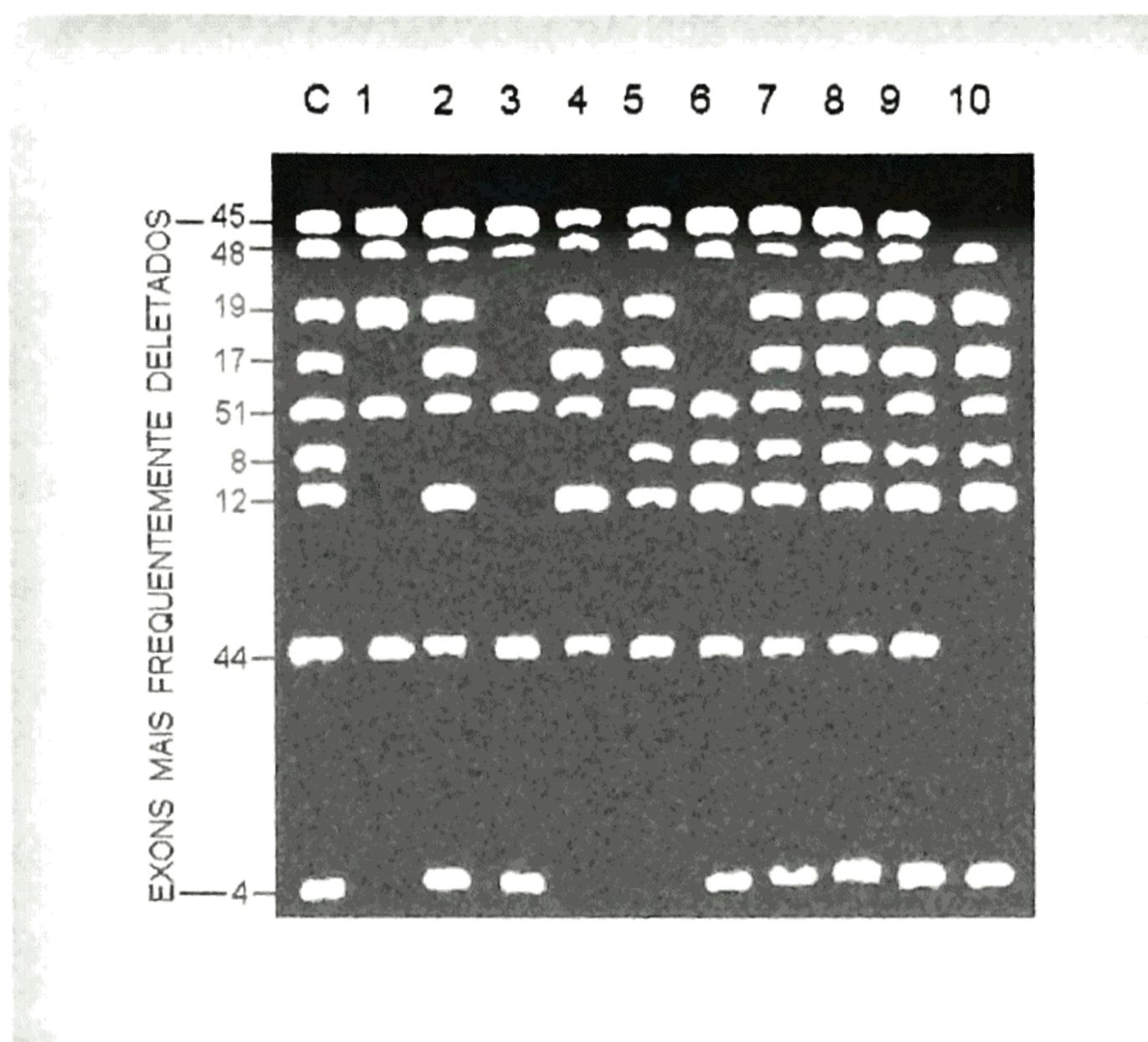


Figura 4.7 – Diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne pela análise de éxons deletados por PCR múltiplo (multiplex). Foram sintetizados pares de *primers* para amplificar as nove regiões do gene da distrofina deletadas com maior frequência nos afetados (padrões normais mostrados na coluna C, à esquerda).

de agarose corado com brometo de etídeo. Os pacientes 1 a 10 apresentam deleções diversas, a maioria delas diferente entre si. A figura foi aproveitada de um resultado de exame realizado no laboratório das Dras. Mayana Zatz e Mariz Vainzof.

Sequenciamento das moléculas de DNA

A técnica que permite estudar de modo mais direto a estrutura de determinado gene é o sequenciamento do DNA. Essa técnica também se baseia no mecanismo de replicação do DNA, e o método mais popular foi desenvolvido por Sanger, em 1974. A uma molécula de DNA que será o alvo do sequenciamento, é hibridado um único *primer*. De modo semelhante ao que ocorre na replicação do DNA, uma polimerase do DNA adiciona trinucleotídeos trifosfatados à extremidade 3' livre do *primer* e promove o alongamento do segmento, sempre obedecendo às regras de complementaridade de bases em relação à cadeia molde. A estratégia, entretanto, é que parte dos nucleotídeos utilizados na reação de polimerização são nucleotídeos que possuem a pentose com a extremidade 3' modificada, desprovida de hidroxila (nucleotídeos didesóxi), que bloqueiam a adição de um novo nucleotídeo na extremidade 3' após sua incorporação.

Assim, as novas cadeias sintetizadas são interrompidas em posições diversas pela adição dos nucleotídeos didesóxi. Os quatro tipos de nucleotídeos didesóxi utilizados na reação de sequenciamento podem ser marcados com substâncias fluorescentes de quatro cores distintas (Figura 4.8).

As cadeias novas sintetizadas são separadas por eletroforese em gel de acrilamida (no método convencional) ou em um dos capilares de um analisador genético, contendo um polímero especial submetido a campo elétrico. A cor dos fragmentos que migram no gel ou no polímero é analisada por um detector a laser presente no analisador genético (também chamado popularmente de sequenciador), que transforma os sinais em gráfico, a partir do qual se deduz a sequência de cores, ou seja, das bases nitrogenadas da cadeia complementar àquela que foi utilizada como molde da reação de sequenciamento. O exemplo do resultado do sequenciamento de um trecho da molécula de DNA é mostrado na Figura 4.9.

Depois da conclusão do projeto do Genoma Humano, a sequência nucleotídica de praticamente todos os genes humanos está disponível em bancos de dados. Isso torna

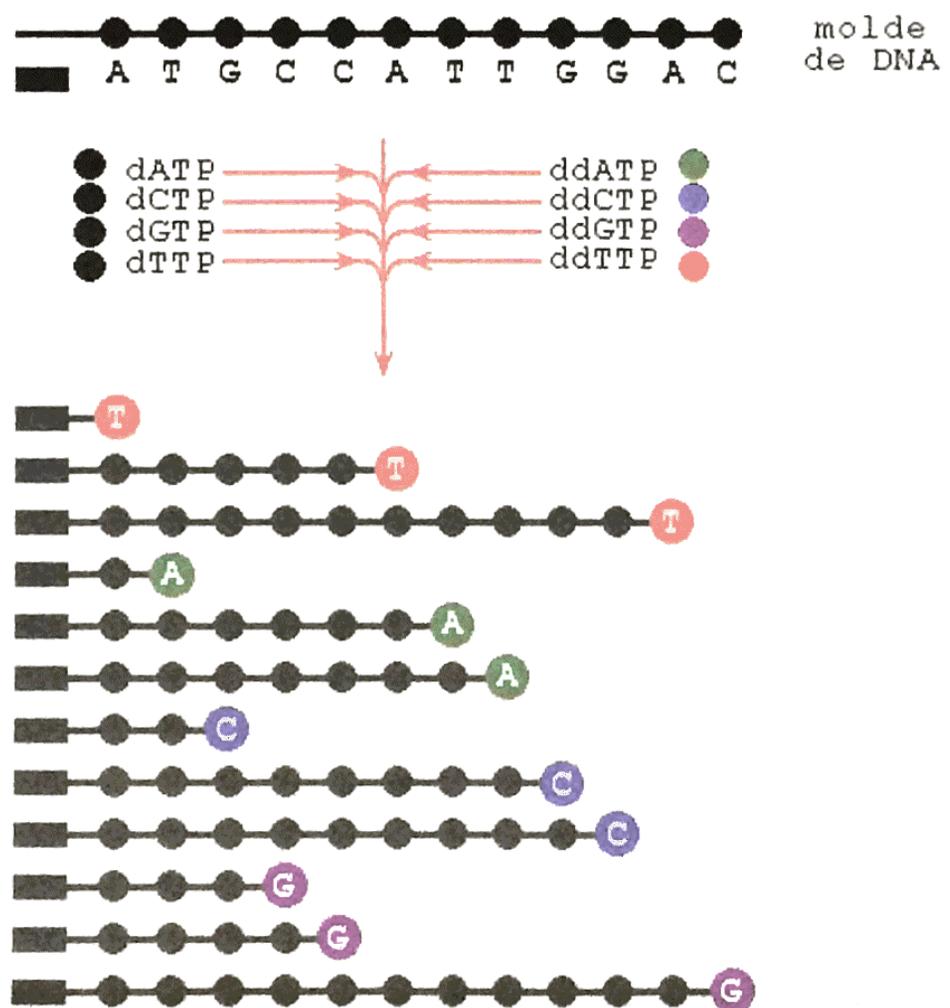


Figura 4.8 – Uso de nucleotídeos modificados didesóxi na técnica do sequenciamento.

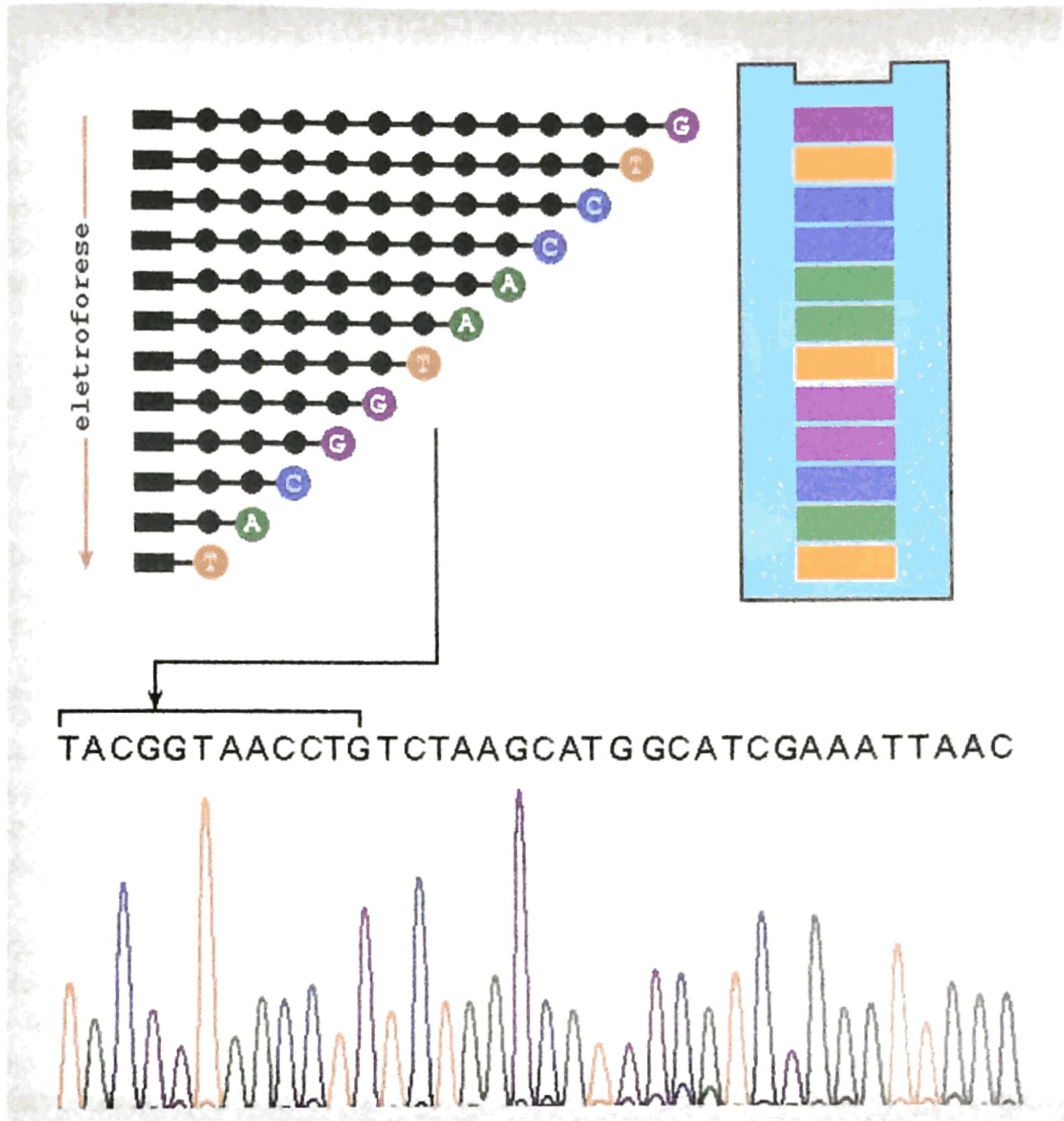


Figura 4.9 – Resultado do sequenciamento de um trecho de DNA.

possível planejar pares de *primers* adequados para amplificar, pela PCR, qualquer trecho do genoma humano e submeter esse mesmo fragmento, amplificado posteriormente, à reação de sequenciamento. Na prática, desde que o gene relacionado a uma doença seja conhecido, é possível sequenciar o gene todo para rastrear mutações em um tempo relativamente curto. Os éxons dos genes são os preferencialmente rastreados em busca de mutações. Pequenas alterações da sequência de nucleotídeos, como substituições, pequenas inserções e deleções são prontamente identificadas por esse método. No entanto, com genes muito grandes, como o gene *NF1*, relacionado à neurofibromatose do tipo I ou o gene *DMD* da distrofina, da distrofia de Duchenne, o rastreamento do gene todo pode ser um processo trabalhoso e caro. Além disso, pode não ser rápido o suficiente se houver uma demanda de diagnóstico pré-natal. Por isso, estratégias indiretas de detecção de alelos mutados podem ser mais eficazes em certas situações.

Detecção indireta de mutações: estudos de ligação

Em muitas doenças hereditárias atualmente em investigação, ainda não foi possível identificar o gene responsável. Em outras, o gene já foi identificado, mas ele é muito grande ou existe uma enorme variedade de tipos de mutações que afetam o mesmo gene, tornando a análise da mutação inviável em curto espaço de tempo. Nesses casos e naqueles das doenças com genes ainda não identificados, é possível usar marcadores genéticos polimórficos, com localização cromossômica conhecida, com indicadores indiretos da segregação de uma mutação patogênica em uma genealogia.

A primeira geração de marcadores genéticos utilizada com esse propósito foram os RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*). Os RFLP correspondem a sítios polimórficos que acarretam diferenças em sítios de restrição entre os indivíduos da população em geral. Essas pequenas variações na sequência de bases do DNA, geralmente substituições de um único nucleotídeo que resultam em RFLP, não acarretam efeitos fenotípicos e não são responsáveis pela doença em si. Contudo, se localizados muito próximos ao gene associado à doença em estudo, servem como indicadores indiretos da segregação da mutação que causa a doença. Portanto, para usar um RFLP em aconselhamento genético, é necessário antes saber que o marcador escolhido se localiza próximo ao gene da doença, existindo uma baixa probabilidade de ocorrer permutação entre eles. Obtém-se tal informação por meio de estudos de mapeamento realizados previamente entre o marcador e o gene relacionado à doença, a partir de várias famílias. Na Figura 4.10, observa-se como um RFLP permite concluir quais são os prováveis indivíduos portadores de um gene mutado na genealogia, em que segrega uma doença de herança ligada ao cromossomo X.

Convém lembrar, porém, que este método não representa um método de detecção direta da mutação e que tem limitações. Primeiramente, devem ser estudados vários indivíduos da mesma família para que se obtenham resultados conclusivos. Ainda, os portadores certos da mutação devem ser informativos, ou seja, heterozigotos em relação aos marcadores selecionados. Se isso não ocorrer, deve-se procurar um outro marcador molecular para o qual a família seja informativa. Leva-se em conta também, no aconselhamento genético, a probabilidade, ainda que pequena, de que ocorra um evento de recombinação entre os marcadores e o gene da doença, levando à interpretação errada dos resultados. Para minimizar esse erro, vários marcadores genéticos devem ser estudados simultaneamente. Mesmo com as limitações, esta metodologia é muito usada e se podem oferecer resultados com confiabilidade superior a 95% às famílias que buscam aconselhamento genético. Também é importante lembrar que, hoje em dia, qualquer variação de um único nucleotídeo (SNP, *single nucleotide polymorphism*), ainda que não acarrete mudanças em sítios de restrição, pode ser genotipada por vários métodos, alguns dos quais automatizados, o que amplia muito a disponibilidade de marcadores para estudos de ligação.

Da mesma forma que os RFLP e os SNP, existem outros tipos de sequências polimórficas dispersas no genoma humano, igualmente úteis para mapeamento de genes alterados que causam doenças e aconselhamento genético. São os chamados VNTR (*variable number of tandem repeats*). Esses polimorfismos consistem em repetições presentes em número variável de cópias nos indivíduos da população. Quando os módulos

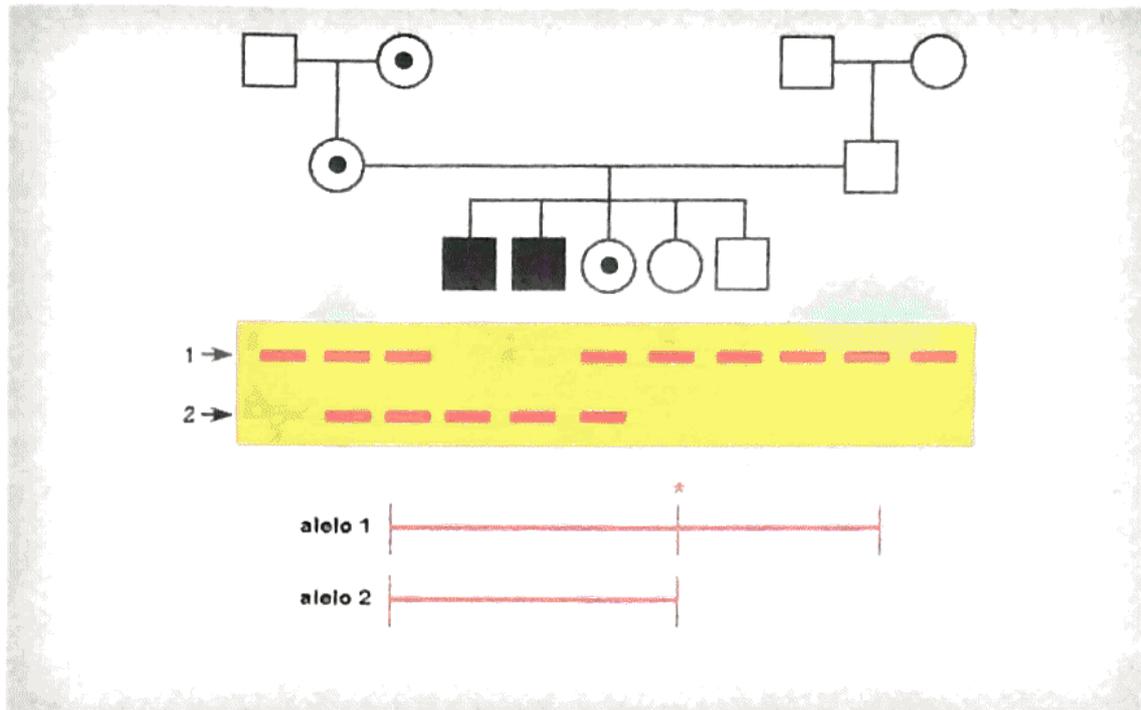


Figura 4.10 – Herança codominante de um RFLP mapeado no cromossomo X humano. Os alelos 1 e 2 diferem pela presença de um sítio de restrição para a enzima *Eco* RI. Note que, nessa família, o alelo 2 segrega com a mutação que causa doença, enquanto o alelo 1 aparece no indivíduo do sexo masculino que não herdou a doença da mãe. Note ainda que a presença do alelo 2 em uma irmã dos afetados permitiu a conclusão de que ela é heterozigota quanto à mutação que causa a doença.

constituintes das repetições são sequências repetitivas de 9 até cerca de 60 pares de bases, esses polimorfismos são chamados de minissatélites. Quando as sequências repetitivas são módulos menores que 9 pb, são denominados microssatélites. São tantos os comprimentos diferentes dos segmentos repetidos (o que os pesquisadores da área chamam de “alelos”) na população que praticamente todas as pessoas são heterozigotas quanto ao número de cópias dessas repetições (no caso dos RFLP, costumam existir somente dois ou poucos “alelos” diferentes na população). A grande vantagem dos VNTR sobre os RFLP reside no maior grau de polimorfismo na população, o que significa maior chance de que uma dada família seja informativa para um marcador.

A diferença de tamanho entre os “alelos” de um minissatélite pode ser detectada se o DNA dos indivíduos for digerido por uma enzima de restrição cujo sítio de corte flanqueie o VNTR, seguido de eletroforese em gel de agarose, *Southern* e da hibridação com sonda específica. Também podem ser analisados diretamente por PCR seguida de separação, por eletroforese, dos segmentos de DNA amplificados.

Quando uma sonda de DNA é complementar a diversos minissatélites, a hibridação resulta em um padrão complexo de bandas denominado *fingerprinting* de DNA, ou impressão digital genética. Dado o alto grau de polimorfismo das bandas na população, é praticamente impossível que dois indivíduos não aparentados tenham os mesmos comprimentos de fragmentos nos vários VNTR estudados simultaneamente. Daí o nome de impressão digital genética (Figura 4.11).

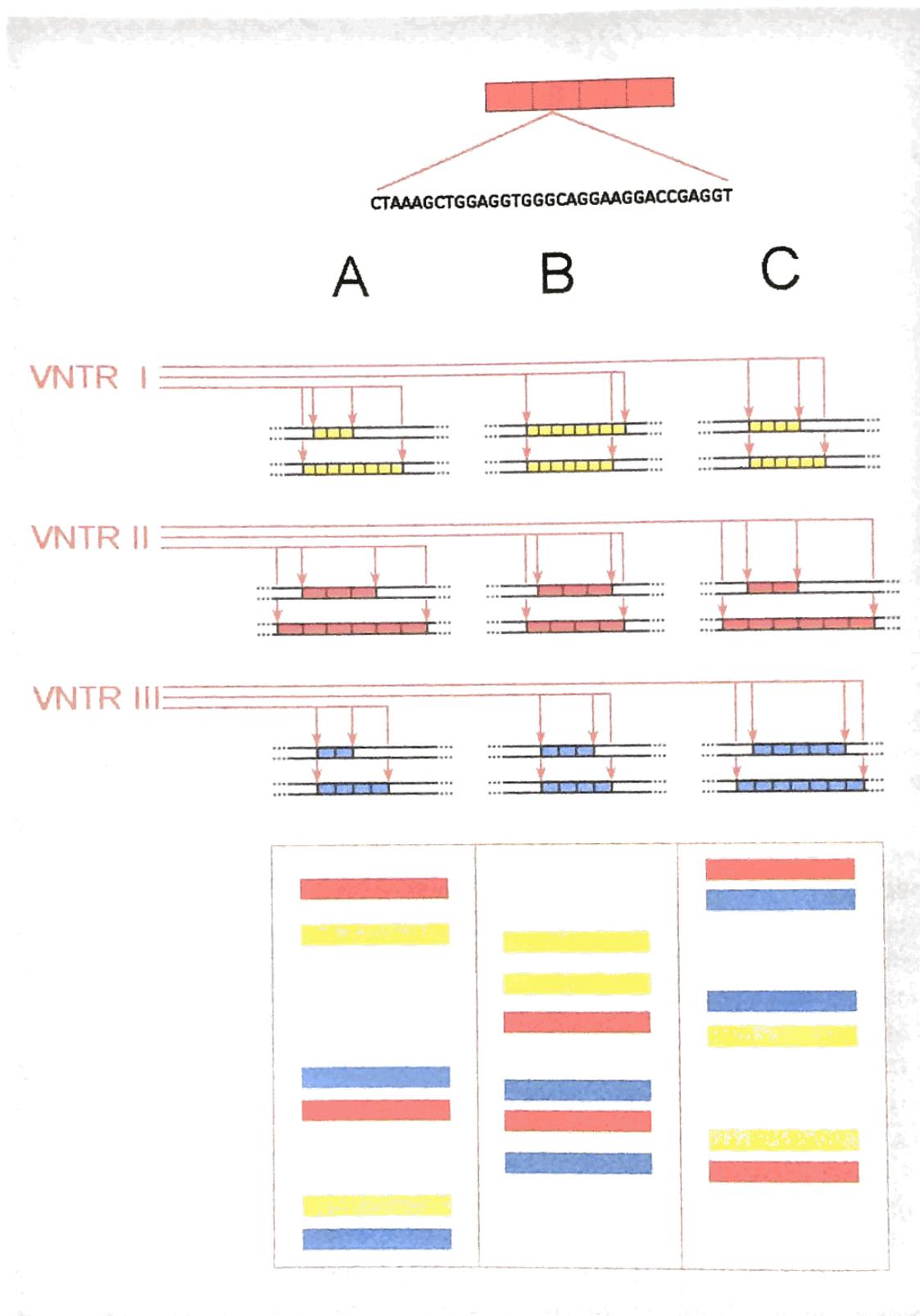


Figura 4.11 – Os locos da VNTR são aqui representados por quatro repetições de uma sequência de 33 pb. A variabilidade em vários locos de VNTR pode gerar diversidade de fragmentos suficiente para identificar os indivíduos. No exemplo, existem duas a oito cópias da VNTR nos três locos diferentes (I a III), que são detectados simultaneamente pela mesma sonda. Embora indivíduos diferentes possam ter alguns alelos em comum, a chance de que dois indivíduos tenham todos os fragmentos em comum é mínima. Os sítios de corte das enzimas de restrição estão indicados por setas.

A Figura 4.12 mostra o resultado de um *fingerprinting* com bandas idênticas obtido de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, de um par de irmãos e de duas pessoas não aparentadas entre si.

O segundo tipo de polimorfismo de VNTR muito usado em estudos de ligação e identificação de indivíduos são os chamados microssatélites. Eles são, em geral, constituídos de sequências repetidas de dinucleotídeos, trinucleotídeos ou tetranucleotídeos. Por exemplo, repetições do dinucleotídeo "AC", de número variável, são constituintes comuns desse tipo de polimorfismo. Como os "alelos" diferem entre si por dois, três ou quatro nucleotídeos apenas, a análise não é possível em géis de agarose comuns. Fragmentos pequenos de DNA contendo as repetições polimórficas são amplificados pela PCR com *primers* específicos. Os produtos da amplificação são separados em géis de acrilamida semelhantes aos usados para sequenciamento do DNA. Por empregar a PCR, este método tem a vantagem de utilizar quantidades muito menores de DNA que um "*blotting*" comum seguido de hibridação, e os resultados são visualizados muito mais rapidamente. Por isso, os microssatélites também são utilizados para identificação de indivíduos ou para questões de paternidade. Mais modernamente, eles também são estudados nos analisadores genéticos automáticos, ou seja, os mesmos equipamentos que analisam o sequenciamento automatizado do DNA, capazes de discriminar os diferentes alelos e determinar o seu tamanho. A possibilidade de automação na análise tornou os microssatélites a ferramenta favorita em estudos de determinação de vínculo biológico, de identificação individual com finalidades forenses, além, é claro, dos estudos de ligação para mapear genes relacionados a doenças e estudar a segregação de mutações nas famílias.

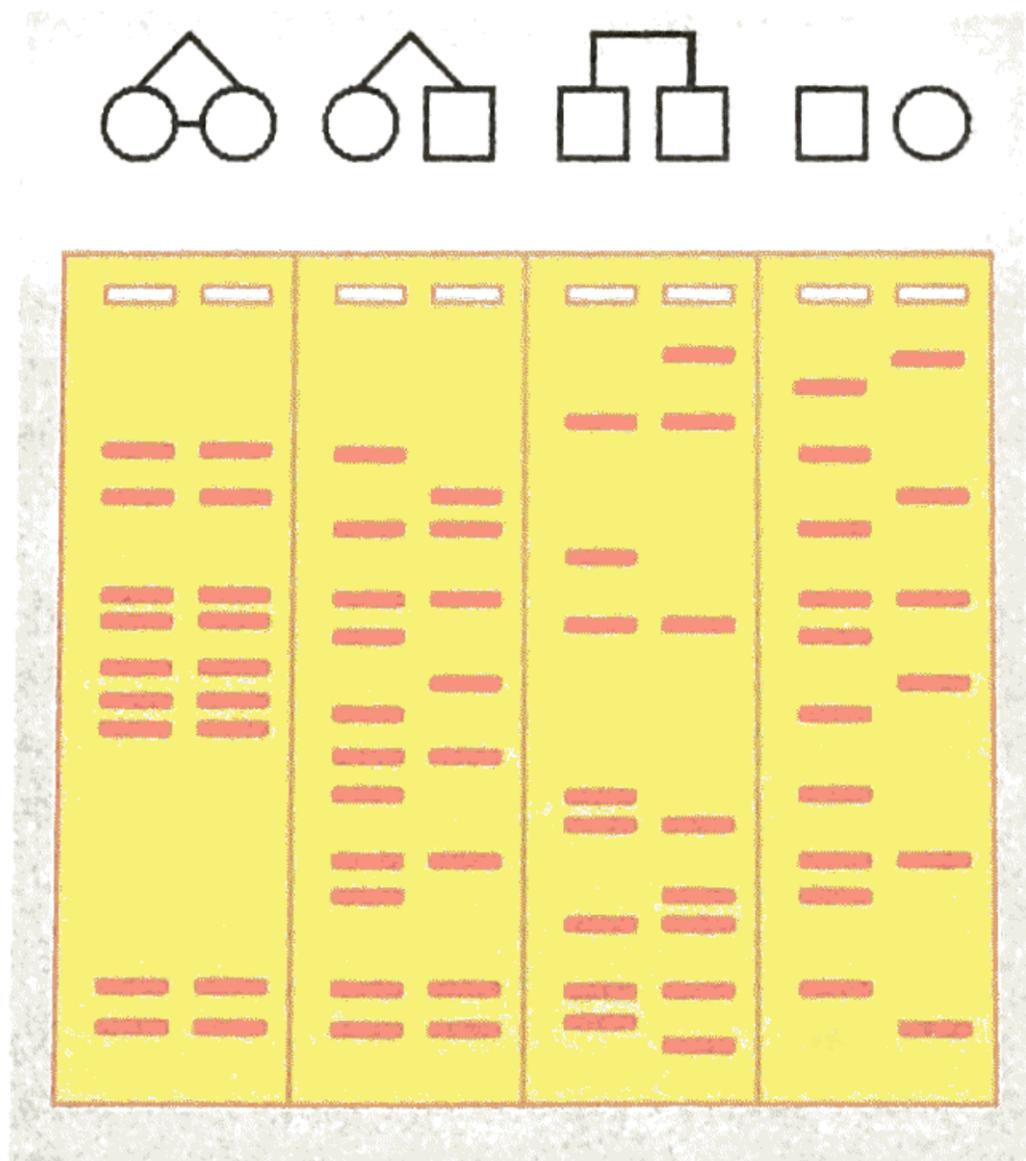


Figura 4.12 – *Fingerprinting* obtido de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, de um par de irmãos e de duas pessoas não aparentadas entre si. Enquanto os gêmeos monozigóticos de um mesmo par apresentam exatamente as mesmas bandas, gêmeos dizigóticos e irmãos vão ter apenas certo número de bandas em comum, e indivíduos não aparentados entre si vão geralmente exibir pouquíssimas bandas em comum.