

Hibridização de Ácidos Nucleicos: Princípios e Aplicações

7

CONCEITOS PRINCIPAIS

- Na hibridização de ácidos nucleicos, populações conhecidas de ácidos nucleicos ou oligonucleotídeos (*sondas*) são utilizadas para identificar sequências relacionadas em amostras-teste contendo populações complexas, ou pouco conhecidas, de ácidos nucleicos.
- A hibridização de ácidos nucleicos baseia-se na especificidade do pareamento entre as bases. Os ácidos nucleicos presentes em ambas as populações, sonda e amostra-teste, consistem em moléculas fita simples que, ao serem misturadas, poderão formar heterodúplixes entre as sequências das sondas e quaisquer sequências parcial ou totalmente complementares (sequências-alvo) presentes na população da amostra-teste.
- Os heterodúplixes são detectados pela marcação de uma das populações de ácidos nucleicos em solução aquosa, seguida pela incubação e pela hibridização dessa com uma população de ácidos nucleicos não marcada, imobilizada em um suporte sólido. Após a lavagem, para remover ácidos nucleicos marcados e não hibridizados, qualquer marcação que permanece no suporte sólido será devida a um heterodúplix entre sonda e sequência-alvo.
- A estabilidade de um heterodúplix depende do grau de complementaridade entre sonda e sequência-alvo e é afetada por parâmetros como tamanho do segmento pareado, temperatura e natureza iônica do ambiente.
- Sondas de DNA e RNA comumente utilizadas contêm centenas de nucleotídeos de comprimento e são empregadas para identificar sequências-alvo que apresentam um alto grau de similaridade de sequência com a sonda.
- Sondas de oligonucleotídeos pequenas (contendo menos de 20 nucleotídeos) podem ser usadas para a distinção entre sequências-alvo que diferem em um único nucleotídeo.
- A marcação dos ácidos nucleicos se dá pela incorporação de nucleotídeos contendo radioisótopos, ou grupos quimicamente modificados, que podem ser detectados por meio de ensaios específicos.
- Muitos ensaios de hibridização envolvem a ligação de uma população de ácidos nucleicos que contém as sequências-alvo a uma superfície sólida e posteriormente sua exposição a uma solução contendo a sonda marcada. O DNA imobilizado pode ter sido purificado ou então estar presente em células ou cromossomos imobilizados na superfície.
- A hibridização de microarranjos permite realizar muitos ensaios de hibridização simultaneamente. Milhares de sondas não marcadas de DNA, ou de oligonucleotídeos, são fixadas em uma superfície sólida, em formato de grade de alta densidade, sendo utilizadas para fazer a triagem de populações de amostras complexas de DNA ou RNA marcadas em solução.
- As principais aplicações da hibridização em microarranjos são o estudo do perfil de expressão gênica e a análise da variação do DNA.

As moléculas de DNA são muito grandes e quebram-se facilmente quando removidas das células, o que torna difícil o seu estudo. O Capítulo 6 mostrou como a clonagem de DNA, em células ou *in vitro*, permite a replicação seletiva de moléculas de DNA individuais, com a produção de um grande número de cópias. Quando amplificado dessa maneira, o DNA é efetivamente purificado, e a sua clonagem permite o estudo de sequências individuais do DNA genômico, bem como de moléculas de RNA individuais, após sua retrotranscrição em cDNA. Neste capítulo, será considerada uma abordagem totalmente diferente. Em vez de tentar purificar sequências de ácidos nucleicos individuais, o objetivo é rastreá-las de maneira específica em uma população complexa, que representa uma amostra de interesses biológicos ou médicos.

Em pesquisa de nível básico, a hibridização de ácidos nucleicos é frequentemente utilizada para rastrear transcritos de RNA e, assim, obter informações acerca da maneira como os genes são expressos. A hibridização também é utilizada para identificar relações entre sequências de DNA de diferentes fontes. Uma sequência inicial de DNA, por exemplo, pode ser utilizada para identificar outras sequências relacionadas de diferentes organismos, ou de diferentes indivíduos de uma mesma espécie, ou ainda sequências relacionadas presentes no mesmo genoma que a sequência inicial. A hibridização é muitas vezes usada também como uma forma de identificar alelos e transcritos aberrantes associados a doenças.

7.1 PRINCÍPIOS DA HIBRIDIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Na hibridização de ácidos nucleicos, uma população conhecida interroga uma população pouco conhecida

A hibridização de ácidos nucleicos é uma ferramenta fundamental em genética molecular. Ela explora a habilidade que ácidos nucleicos de fita simples, parcial ou totalmente complementares em sequência têm de formar moléculas de dupla-fita pelo pareamento de bases entre elas (**hibridização**). Um glossário de termos relevantes é apresentado no **Quadro 7.1** para auxiliar leitores que porventura não estejam familiarizados com aspectos da terminologia.

QUADRO 7.1 Um glossário para hibridização de ácidos nucleicos

Anelar. Permitir a formação de pontes de hidrogênio entre duas fitas simples. Se dois ácidos nucleicos de fita simples apresentarem *complementaridade de bases* suficiente, eles irão formar um dúplice de ácido nucleico dupla-fita. Anelar tem o significado oposto de *desnaturar*.

RNA antissenso. Uma sequência de RNA que é complementar em sequência a um RNA transcrito, permitindo o pareamento de bases entre as duas sequências.

Complementaridade de bases. O grau com que as sequências de dois ácidos nucleicos de fita simples podem formar um dúplice de dupla-fita por pareamento de bases de Watson-Crick (A liga-se a T ou a U; C liga-se a G).

Desnaturar. Separar as fitas individuais de um dúplice de DNA dupla-fita pela quebra das pontes de hidrogênio entre elas. Isso pode ser obtido por aquecimento ou pela exposição do DNA a solventes alcalinos ou altamente polares, como ureia ou formaldeído. Desnaturar tem o significado oposto de *anelar*.

Chip de DNA. Qualquer arranjo em grade de alta densidade (*microarranjo*) de clones de DNA ou oligonucleotídeos usado em um ensaio de hibridização.

Característica (de um microarranjo de DNA ou de oligonucleotídeos). O grande número idêntico de moléculas de DNA ou de oligonucleotídeo em qualquer uma das posições de um microarranjo.

Heterodúplice. Um ácido nucleico dupla-fita formado pelo pareamento de bases entre dois ácidos nucleicos de fita simples que não se originam do mesmo alelo. Pode haver 100% de complementaridade de bases entre as duas sequências de um heterodúplice, especialmente quando uma das sequências hibridizantes é uma sonda de oligonucleotídeo, ou quando as sequências são de diferentes alelos de um mesmo gene ou apresentam relação evolutiva próxima.

Homodúplice. Uma molécula de DNA dupla-fita formada quando duas sequências de fita simples originadas de um mesmo alelo são reanealadas. Um homodúplice tem 100% de complementaridade de bases e, portanto, é normalmente mais estável que um heterodúplice.

Ensaio de hibridização. Um ensaio no qual uma população bem caracterizada de ácidos nucleicos ou de oligonucleotídeos (a *sonda*) é transformada em fita simples e é utilizada para localizar *sequências-alvo* comple-

mentares em uma população de ácidos nucleicos pouco conhecida por anelamento, formando heterodúplíce.

Estringência de hibridização. O grau com que as condições de hibridização toleram o mau pareamento de bases nos heterodúplíce. Em condições de alta estringência de hibridização, apenas as sequências perfeitamente pareadas podem anelar, mas heterodúplíce com maus pareamentos significativos podem se tornar estáveis se a estringência for diminuída pela redução da temperatura de anelamento ou pelo aumento da concentração de sal.

Hibridização *in situ*. Uma reação de hibridização na qual uma sonda marcada é hibridizada a ácidos nucleicos de modo a permitir a detecção de sua localização morfológica em células ou cromossomos fixados.

Temperatura de desnaturação ou de dissociação (*melting temperature, T_m*). Temperatura correspondente ao ponto médio na transição observada entre as formas de dupla-fita e fita simples dos ácidos nucleicos.

Microarranjo. Uma superfície sólida na qual moléculas de interesse podem ser fixadas em coordenadas específicas de uma grade de alta densidade para usar em algum ensaio. Um microarranjo de DNA ou de oligonucleotídeos possui muitas moléculas de DNA ou oligonucleotídeos não marcadas, afixadas em posições precisas do arranjo, agindo como sondas em um ensaio de hibridização. Cada posição específica apresenta milhares de cópias idênticas de uma determinada molécula de DNA ou de oligonucleotídeo, constituindo uma *característica*.

Sonda. Uma população de ácidos nucleicos ou de oligonucleotídeos conhecida que é utilizada em um ensaio de hibridização para investigar uma população geralmente complexa e não caracterizada de ácidos nucleicos, de modo a identificar *sequências-alvo* relacionadas pela formação de heterodúplíce.

Ribossonda. Uma sonda de RNA.

Similaridade de sequência. O grau com que duas sequências são idênticas em sequência ou em complementaridade de bases.

Sequência-alvo. Sequência de ácido nucleico que apresenta similaridade suficiente de sequência a uma sonda para parear com ela em um ensaio de hibridização, formando um heterodúplice estável.

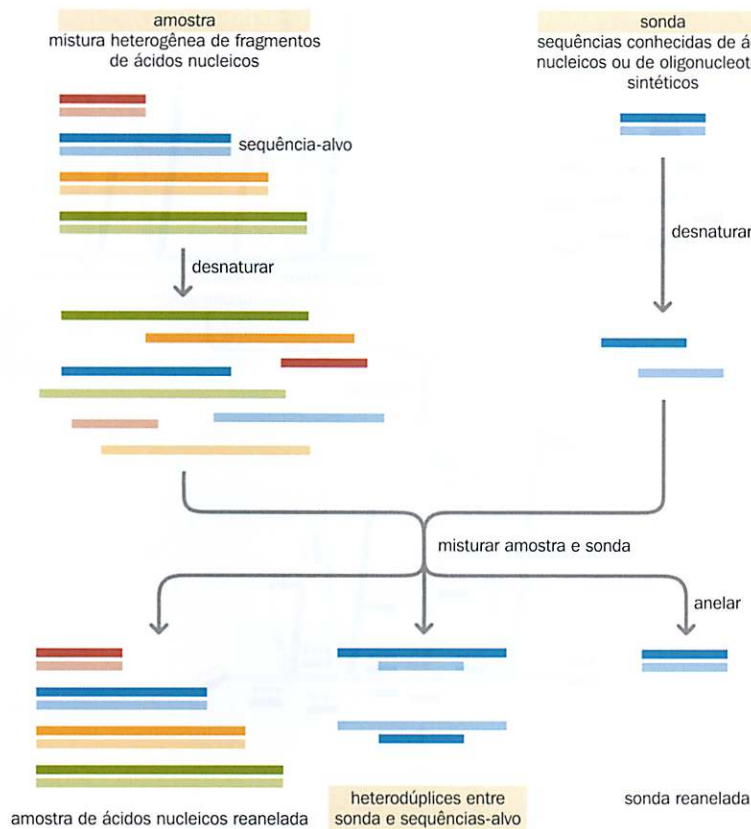


Figura 7.1 Formação de heterodúplexes entre sonda e sequência-alvo em um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos.

Uma amostra-teste, formada por uma mistura complexa de ácidos nucleicos e uma população definida de sondas, composta por sequências conhecidas de ácidos nucleicos ou de oligonucleotídeos, são ambas transformadas em moléculas de fita simples e posteriormente misturadas para permitir seu anelamento. As sequências que haviam previamente pareado nas populações da amostra-teste e de sondas irão reanelar, formando homodúplexes (abaixo, esquerda e direita). Além disso, novos heterodúplexes serão formados entre as sequências-alvo e as sondas que apresentarem sequências parcial ou totalmente complementares (abaixo, centro). As condições de hibridização podem ser ajustadas para favorecer a formação de heterodúplexes. Desta forma, as sondas se ligam seletivamente e identificam ácidos nucleicos relacionados presentes em uma população de ácidos nucleicos complexa.

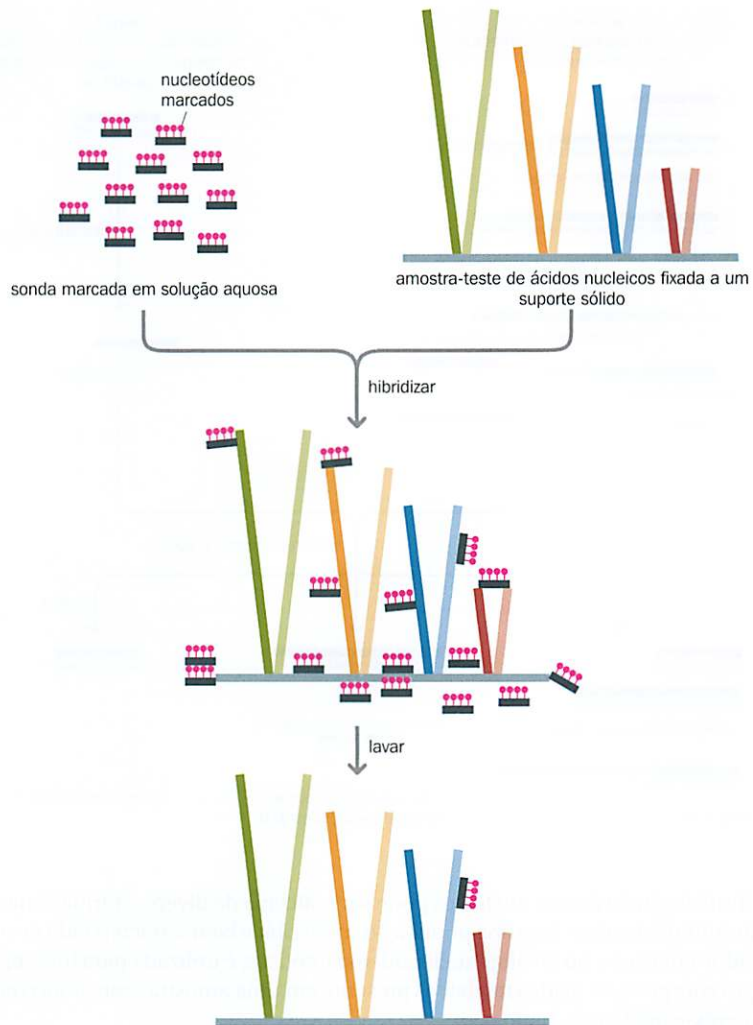
A hibridização de ácidos nucleicos pode ser realizada de diversas formas, mas há um princípio comum a todas elas: uma população *conhecida* e bem-caracterizada de moléculas de ácidos nucleicos, ou de oligonucleotídeos sintéticos, é utilizada para investigar uma população complexa de ácidos nucleicos presente em uma amostra-teste pouco conhecida, de interesse médico ou biológico.

A amostra-teste a ser estudada poderá conter moléculas de DNA, como o DNA total dos leucócitos de um único indivíduo ou de determinado tipo de célula tumoral; ou poderá conter RNA, como o RNA total ou o mRNA produzido por uma linhagem celular ou um tecido específico. Em ambos os casos, as moléculas de ácidos nucleicos presentes na amostra precisam ser transformadas em moléculas de fita simples (**desnaturação**) para participar da hibridização de ácidos nucleicos. O DNA celular é naturalmente dupla-fita, e o RNA apresenta quantidades significativas de regiões internas também em dupla-fita, devido a pontes de hidrogênio intramoleculares. As pontes de hidrogênio inter e intramoleculares podem ser rompidas por vários métodos. A desnaturação inicial geralmente envolve aquecimento ou tratamento com substância alcalina; se necessário, os ácidos nucleicos podem ser expostos a moléculas fortemente polares, tais como formamida ou ureia, para mantê-los no estado de fita simples por longos períodos.

A população conhecida consiste em sequências precisamente definidas de ácidos nucleicos, os quais também precisam ser desnaturados, ou de oligonucleotídeos sintéticos de fita simples. Cada tipo de molécula nessa população atuará como uma **sonda** para localizar ácidos nucleicos parcial ou totalmente complementares (**sequências-alvo**) na amostra-teste. Para tanto, ambas as populações de moléculas de fita simples (amostra-teste e sonda) são misturadas, permitindo o pareamento de bases entre as fitas simples da sonda e as fitas complementares das sequências-alvo (**anelamento**). O objetivo é formar **heterodúplexes** entre sondas e sequências-alvo (**Figura 7.1**); a especificidade da interação entre sonda e sequência-alvo depende do grau de pareamento de bases entre essas duas fitas.

Figura 7.2 Os heterodúplipes formados entre sondas e sequências-alvo são identificados de maneira mais eficiente após sua captura em um suporte sólido

Ensaio de hibridização envolvem, normalmente, a ligação da amostra-teste à superfície de um suporte sólido (como mostrado aqui) ou a fixação da população de sondas a esse suporte. A ligação da população de moléculas ao suporte sólido é feita de maneira a permitir que sequências diferentes sejam fixadas em posições definidas na superfície sólida, mas não necessariamente em apenas uma das extremidades da superfície, como ilustrado aqui. A outra população é marcada e então adicionada à população imobilizada. Aqui, é utilizado o exemplo apresentado na Figura 7.1, no qual a sonda é uma mistura homogênea, e a amostra-teste é uma mistura heterogênea de moléculas de DNA diferentes. Para simplificar, é representada apenas uma das fitas da sonda marcada. Durante a incubação das moléculas marcadas de sonda fita simples com o suporte sólido, elas podem ser capturadas por hibridização a moléculas-alvo complementares, ligadas ao suporte. Após a hibridização, lavagens irão remover qualquer excesso de sonda que tenha permanecido em solução ou que tenha se ligado de maneira inespecífica ao suporte. Desta forma, qualquer marcação que permanecer no suporte sólido deverá representar apenas os heterodúplipes formados entre sondas e sequências-alvo, levando à identificação das mesmas.



Os heterodúplipes formados entre sondas e sequências-alvo são mais facilmente identificados após sua captura em um suporte sólido

A eficiência da identificação dos heterodúplipes em solução é baixa. Para auxiliar na sua identificação, a população de ácidos nucleicos da amostra-teste ou da sonda é imobilizada em um suporte sólido, geralmente uma membrana plástica, uma lâmina de vidro, ou uma pastilha de quartzo. A outra população – sonda ou amostra-teste, respectivamente – é mantida em solução aquosa e é marcada pela incorporação de uma molécula que contenha um radioisótopo, ou um grupo químico, que possa ser posteriormente detectado. A população marcada é colocada em contato com o suporte sólido para permitir a interação entre as duas populações e a formação de heterodúplipes.

Na Figura 7.2, é ilustrada uma dessas possibilidades, na qual a população de sondas é marcada e mantida em solução, enquanto a amostra-teste é imobilizada. Moléculas-alvo de DNA na amostra-teste capturam moléculas marcadas de sonda que possuem uma sequência parcial ou totalmente complementar, formando heterodúplipes genuínos entre sondas e sequências-alvo. Além disso, algumas moléculas marcadas de sonda podem se ligar de maneira inespecífica ao suporte ou a moléculas não relacionadas no suporte. Entretanto, após a hibridização, o suporte sólido é lavado várias vezes para que a única marcação passível de ser detectada no suporte seja devida a heterodúplipes genuínos entre sondas e sequências-alvo. Para maximizar as chances de formação de heterodúplipes, normalmente utiliza-se um excesso de sequências-alvo em relação às sondas.

A possibilidade alternativa – utilizar sondas imobilizadas e marcar os ácidos nucleicos presentes na amostra-teste – será considerada mais adiante neste capítulo, quando for discutida a hibridização em microarranjo.

TABELA 7.1 Equações para calcular T_m

Híbrido	T_m (°C)
DNA-DNA	$81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]^a) + 0,41(\%GC^b) - 500/L^c$
DNA-RNA ou RNA-RNA	$79,8 + 18,5(\log_{10}[\text{Na}^+]^a) + 0,58(\%GC^b) + 11,8(\%GC^b)^2 - 820/L^c$
Oligo-DNA ou oligo-RNA ^d	
Para < 20 nucleotídeos	$2(l_n)$
Para 20-35 nucleotídeos	$22 + 1,46(l_n)$

^aOu para outro cátion monovalente, porém a acurácia é apenas para a faixa entre 0,01 e 0,4 M. ^bAcurácia apenas para %GC de 30% a 75%. ^cL (*length*), tamanho do dúplice em pares de base. ^dOligo, oligonucleotídeo; l_n , tamanho efetivo do primer = $2 \times (\text{n}^\circ \text{ de G} + \text{C}) + (\text{n}^\circ \text{ de A} + \text{T})$. Para cada 1% de formamida, a T_m é reduzida em aproximadamente 0,6°C e na presença de ureia 6 M, a T_m diminui em cerca de 30°C.

A desnaturação e o anelamento são afetados pela temperatura, pelas características químicas do ambiente e pela quantidade de pontes de hidrogênio

Quando sequências de ácidos nucleicos parcial ou totalmente complementares se associam, formando heterodúplices, o número de novas pontes de hidrogênio formadas depende do tamanho do dúplice. Existe um número maior de pontes de hidrogênio em moléculas grandes de ácidos nucleicos e, portanto, uma maior quantidade de energia é necessária para quebrá-las. O aumento na estabilidade do dúplice não é diretamente proporcional ao seu tamanho, e este efeito é particularmente observado em moléculas de tamanho menor. Como será descrito a seguir, o mau pareamento de bases reduz a estabilidade do dúplice.

A composição de bases e o ambiente químico também são fatores importantes para a estabilidade do dúplice. Uma grande porcentagem de pares GC implica grande dificuldade para separar as fitas de um dúplice, pois pares GC possuem três pontes de hidrogênio enquanto pares AT apresentam apenas duas. A presença de cátions monovalentes (p. ex.: Na^+) estabiliza as pontes de hidrogênio em moléculas de dupla-fita, enquanto moléculas fortemente polares (tais como formamida e ureia) promovem o rompimento de pontes de hidrogênio, atuando como substâncias químicas desnaturantes.

Um aumento progressivo na temperatura também promove a desestabilização das pontes de hidrogênio, por fim rompendo-as. A temperatura que corresponde ao ponto médio em que se observa a transição entre os estados de dupla-fita para fita simples é conhecida como **temperatura de desnaturação ou de dissociação (*melting temperature*, T_m)**. Para genomas de mamíferos, cuja composição de bases é cerca de 40% de GC, o DNA desnatura a uma T_m aproximada de 87°C em tampões cujo pH e concentração de sal são semelhantes a condições fisiológicas. A T_m de híbridos perfeitos formados por sondas de DNA, RNA ou oligonucleotídeos pode ser determinada a partir de fórmulas padronizadas (Tabela 7.1).

Condições de hibridização estringentes aumentam a especificidade da formação de dúplice

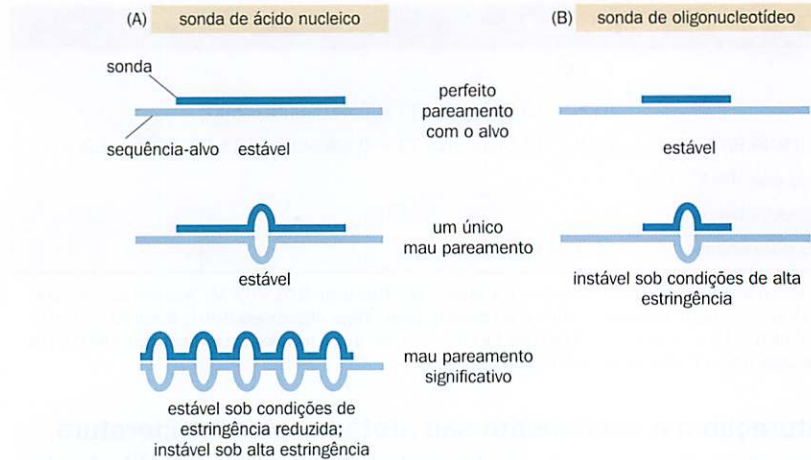
Quando a hibridização de ácidos nucleicos é realizada, as condições de hibridização são geralmente determinadas de maneira a maximizar a formação de heterodúplices, mesmo que isso implique a ocorrência de algum grau de hibridização não específica. A temperatura de hibridização, por exemplo, pode ser determinada em 25°C abaixo da T_m , permitindo que as moléculas de sonda pareiem com moléculas de ácidos nucleicos pouco similares em sequência, além do pareamento com moléculas-alvo de sequências semelhantes, conforme esperado. Nestes casos, a **estringência da hibridização** é considerada baixa.

Após promover a ligação entre sonda e sequências-alvo, lavagens sucessivas são realizadas em condições progressivamente menos tolerantes ao mau pareamento de bases entre os heterodúplices. Tais condições podem ser obtidas pelo aumento progressivo da temperatura, ou pela redução gradual da concentração de NaCl no tampão. O aumento progressivo na stringência da hibridização permite a identificação de diferentes sequências-alvo que apresentam crescente similaridade às moléculas de sonda. A última lavagem corresponde a uma condição de alta stringência de hibridização, garantindo que a formação de heterodúplices seja específica.

Os heterodúplices entre sonda e sequências-alvo são mais estáveis termodinamicamente quando a região de formação do dúplice apresenta pareamento perfeito entre as bases. O mau pareamento entre as duas fitas reduz a T_m , e para sondas de DNA normais,

Figura 7.3 Explorando o mau pareamento entre sonda e sequências-alvo durante a hibridização de ácidos nucleicos

(A) Grandes sondas de ácidos nucleicos (com mais de 100 pb) irão formar heterodúplexes estáveis com sequências-alvo que são semelhantes, porém não idênticas à sonda, se as condições de hibridização forem de estrigência reduzida. Isto permite a análise de espécies diferentes e a identificação de membros de uma família gênica distantemente relacionados. (B) Sondas pequenas de oligonucleotídeos são menos tolerantes ao mau pareamento entre as sequências. Utilizando condições altas de estrigência de hibridização, é possível selecionar apenas dúplexes perfeitamente pareados, permitindo a distinção entre sequências alélicas que diferem em um único nucleotídeo.



cada 1% de mau pareamento diminui a T_m em cerca de 1°C . Todavia, este efeito diminui o tamanho da região pareada. Assim, um grau considerável de mau pareamento pode ser tolerado se a região complementar for grande (maior de 100 pb). Por outro lado, se a região complementar for pequena, como ocorre quando oligonucleotídeos são utilizados (em torno de 15-20 nucleotídeos), as condições de hibridização poderão ser determinadas de maneira que um heterodúplex com um único mau pareamento seja instável (Figura 7.3).

A cinética de reassociação do DNA também depende da concentração de DNA

A velocidade com a qual fitas simples complementares se reassociam para formar uma molécula de DNA dupla-fita depende da concentração inicial de DNA na amostra. Se houver uma grande concentração de sequências complementares de DNA, o tempo que qualquer uma das moléculas de fita simples de DNA levará para encontrar uma molécula complementar e formar um dúplice será reduzida. A cinética de reassociação pode ser medida utilizando-se a concentração inicial (C_0) de uma sequência específica de DNA, em moles por litro, e o tempo de reação (t), em segundos. Entretanto, o valor de C_0t (geralmente conhecido como valor cot) também varia dependendo da temperatura de reassociação e da concentração de cátions monovalentes. Conseqüentemente, é comum utilizar valores de referência fixos: uma temperatura de reassociação de 65°C e uma concentração de 0,3 M de NaCl.

A frequência de sequências-alvo em uma amostra-teste pode variar enormemente. Quando uma sonda homogênea é hibridizada com uma população de ácidos nucleicos heterogênea em uma amostra-teste, a concentração de uma sequência-alvo qualquer pode ser muito baixa e, conseqüentemente, ter uma lenta taxa de reassociação. Por exemplo, se uma sonda do gene da β -globina é hibridizada com uma amostra de DNA genômico humano total, as sequências-alvo estarão presentes em concentração muito baixa (o gene da β -globina corresponde a 0,00005% do DNA genômico humano). Para promover a reação de hibridização, a quantidade de DNA-alvo necessita ser aumentada, e por isso vários microgramas de DNA genômico humano seriam necessários. Por outro lado, sequências que são altamente repetitivas no genoma humano representarão uma proporção maior do DNA inicial e, portanto, irão reassociar de maneira comparativamente mais rápida.

Quando uma sonda marcada é usada, a força do sinal de hibridização também é proporcional ao número de cópias da sequência-alvo: genes de cópia única produzem sinais de hibridização fracos; sequências de DNA altamente repetitivo produzem sinais muito fortes. Se uma determinada sonda é heterogênea e contém uma sequência de cópia única, tal como um gene específico, e ainda uma sequência de DNA altamente repetitiva e abundante, o fraco sinal de hibridização obtido pela sequência de cópia única será completamente mascarado pelo forte sinal do DNA repetitivo. Este efeito pode, no entanto, ser superado pelo passo pré-hibridização, conhecido como *hibridização competitiva*. Esse passo é realizado pela adição de uma população de DNA não marcado, enriquecida com sequências de DNA repetitivas, à sonda marcada. Essa mistura de ácidos nucleicos é desnaturada e, então, incubada para permitir sua reassociação, quando os elementos repetitivos na sonda marcada serão efetivamente removidos. Os elementos repetitivos marcados irão anelar-se a sequências repetitivas complementares não marcadas; as únicas disponíveis para hibridizações subsequentes na população de sondas resultarão em sequências não repetitivas.

7.2 MARCAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS

Na hibridização de ácidos nucleicos, uma população de ácidos nucleicos ou de oligonucleotídeos é marcada e incubada com sequências complementares de outra população, permitindo a hibridização entre elas. Nesta seção, o foco principal serão os princípios e as metodologias de marcação. Estes serão ilustrados com referência à marcação de populações de sondas, as quais geralmente são populações homogêneas de sequências de DNA, RNA ou oligonucleotídeos. Reações de hibridização nas quais os ácidos nucleicos da amostra-teste são marcados envolvem a marcação de uma população complexa e heterogênea de DNA ou RNA; estas reações serão consideradas na Seção 7.4.

Classes diferentes de sondas para hibridização podem ser preparadas a partir de substratos de DNA, RNA ou oligonucleotídeos

Quando ensaios de hibridização utilizam sondas marcadas, o substrato para marcação pode ser DNA, RNA ou oligonucleotídeos sintéticos; estes podem ser obtidos por meio de vários métodos. Conforme necessário, a sonda marcada deverá ser desnaturada por aquecimento para separação de duplas-fitas ou para romper pontes de hidrogênio intramoleculares.

Sondas de DNA convencionais são geralmente isoladas por ensaios de clonagem de DNA baseado em células, ou por amplificação de DNA utilizando PCR. Em ambos os casos, as sondas são inicialmente moléculas de dupla-fita. O DNA clonado em células pode variar em tamanho desde 0,1 kb até centenas de quilobases, mas o DNA clonado por PCR é muitas vezes menor do que algumas quilobases de extensão. As sondas são marcadas pela incorporação de dNTPs (desoxinucleosídeos trifosfato) marcados durante uma reação de síntese de DNA *in vitro*. Como são originadas a partir de DNA dupla-fita, sondas de DNA de fita simples consistem em uma mistura de sequências de ambas as fitas, não sendo ideais para a localização de transcritos específicos de RNA (uma vez que irão identificar simultaneamente os transcritos gerados a partir das fitas senso e antissenso do DNA).

Sondas de RNA são obtidas a partir de moléculas de RNA de fita simples, que geralmente contêm de algumas centenas até várias quilobases de extensão. O RNA é preparado a partir de DNA clonado em um vetor de expressão plasmidial especializado (ver Capítulo 6) que contém uma sequência promotora de fago. A partir deste promotor seletivo, a RNA-polimerase do fago transcreve o inserto de DNA e produz cópias de RNA. À medida que a reação de síntese de RNA é realizada com os quatro rNTPs, em que pelo menos um deles é marcado, transcritos específicos de RNA marcados são gerados a partir do inserto de DNA clonado. Sondas de RNA antissenso de fita simples são úteis para a identificação da complementaridade de transcritos senso-específicos.

Sondas de oligonucleotídeos possuem fitas simples e são muito pequenas (em torno de 15-50 nucleotídeos de comprimento), sendo obtidas por meio de síntese química em vez de clonagem de DNA. A síntese envolve a adição de mononucleotídeos, um de cada vez, a um mononucleotídeo inicial imobilizado a um suporte sólido. Sondas de oligonucleotídeos são geralmente marcadas pela incorporação de um grupo marcado em sua extremidade 5', e podem distinguir entre alelos que diferem em apenas um único nucleotídeo (ver Figura 7.3).

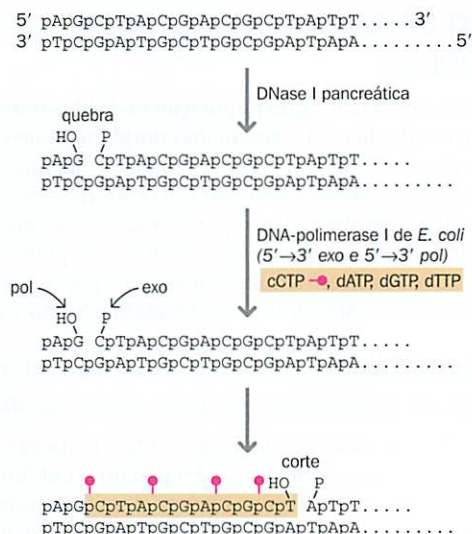
Sondas de ácidos nucleicos extensas são geralmente marcadas pela incorporação de nucleotídeos marcados durante a síntese da cadeia

Para alguns propósitos, os ácidos nucleicos são marcados pela adição de grupos marcados às extremidades das moléculas. Oligonucleotídeos de fita simples são em geral marcados com a utilização de uma cinase, que adiciona um grupo fosfato marcado à sua extremidade de 5'. Fragmentos de DNA maiores também podem ser marcados em suas extremidades por métodos alternativos, como o uso de *primers* modificados contendo um grupo marcado em sua extremidade 5'. À medida que a reação de PCR acontece, o *primer* com sua extremidade 5' marcada é incorporado ao produto de PCR.

A marcação de extremidades implica, contudo, que apenas um ou poucos grupos marcados são inseridos por molécula. Portanto, os grupos marcados geralmente correspondem a uma pequena porcentagem da massa total da sonda, especialmente para sequências longas de nucleotídeos. Consequentemente, o método mais comum para a marcação de DNA e RNA utiliza a marcação de fitas durante sua síntese: uma nova fita de DNA ou RNA é sintetizada *in vitro* e, durante a síntese, nucleotídeos marcados são incorporados em várias posições ao longo da nova fita sintetizada. Com frequência, um DNA ou

Figura 7.4 Marcação de DNA por

nick translation. A DNase I pancreática introduz quebras (*nicks*) de fita simples pela clivagem de pontes fosfodiéster internas (p), gerando uma extremidade 3' hidroxila e um grupo fosfato 5'. Essas quebras fornecem o substrato para a enzima DNA-polimerase I de *E. coli*. Esta proteína possui duas atividades enzimáticas: a atividade de exonuclease 5'→3' (exo) ataca a extremidade 5' exposta de uma quebra e remove sequencialmente os nucleotídeos na direção 5'→3'; e a atividade de DNA-polimerase (pol) adiciona novos nucleotídeos à hidroxila 3', continuando na direção 5'→3' e substituindo os nucleotídeos removidos pela exonuclease, o que causa o deslocamento lateral da quebra. Pelo menos um dos dinucleotídeos trifosfato (dNTPs) é marcado (círculo vermelho em CTP, no exemplo), e, portanto, a marcação é incorporada a cada C adicionado à nova fita sintetizada.



um RNA-polimerase utiliza uma molécula de DNA clonada para produzir cópias de DNA ou RNA, que serão marcados a partir do uso de uma mistura de marcação, na qual pelo menos um dos quatro dNTPs ou rNTPs é marcado.

Marcação de DNA por nick translation

No método *nick translation*, quebras (*nicks*) de fita simples são introduzidas no DNA, deixando extremidades 3' hidroxila e 5' fosfato expostas. A introdução de quebras no DNA pode ser obtida com uso de uma endonuclease, tal como a desoxirribonuclease I (DNase I) pancreática. A quebra exposta serve como um ponto de início para a introdução de novos nucleotídeos pela DNA-polimerase I de *E. coli*, uma enzima com múltiplas subunidades que possui tanto as atividades de DNA-polimerase como as de exonuclease 5'→3'. Ao mesmo tempo em que a atividade de DNA-polimerase adiciona novos nucleotídeos na extremidade 3' hidroxila da quebra, a atividade de exonuclease 5'→3' remove nucleotídeos existentes na outra extremidade da quebra. Portanto, a quebra será movida progressivamente ao longo do DNA, na direção 5'→3' (Figura 7.4). Se a reação for conduzida em uma temperatura relativamente baixa (em torno de 15°C), a reação produzirá não mais do que uma renovação completa da sequência de nucleotídeos existente. Embora não haja síntese líquida de DNA a esta temperatura, a reação de síntese permite a incorporação de nucleotídeos marcados no lugar dos nucleotídeos previamente existentes não marcados.

Marcação de DNA por random priming

O método de marcação do DNA por *random priming* (ligação aleatória) utiliza uma mistura de vários hexanucleotídeos diferentes para ligação aleatória a sequências de hexanucleotídeos complementares em um molde de DNA, fornecendo pontos de início para a síntese de uma nova fita de DNA (Figura 7.5). A síntese de novas fitas complementares é catalizada pela subunidade Klenow da DNA-polimerase I de *E. coli* (que contém a atividade de polimerase, mas não possui a atividade de exonuclease 5'→3' associada).

Marcação baseada na síntese de fitas por PCR

A reação padrão de PCR pode ser modificada para incluir um ou mais nucleotídeos precursores marcados, que serão incorporados ao produto de PCR em toda sua extensão.

Marcação de RNA

Sondas de RNA (*ribossondas*) podem ser obtidas pela transcrição *in vitro* de DNA clonado em um vetor plasmidial de expressão adequado. Vetores de expressão contêm uma sequência promotora imediatamente adjacente ao sítio de inserção para moléculas exógenas de DNA, permitindo que qualquer sequência de DNA inserida seja transcrita. Resistentes promotores de fago são geralmente utilizados, tais como promotores de fagos SP6, T3 e T7, e a polimerase do fago correspondente é fornecida para assegurar a transcrição específica da molécula de DNA clonada. A inclusão de ribonucleotídeos marcados garante que a nova molécula de RNA sintetizada será marcada (Figura 7.6).

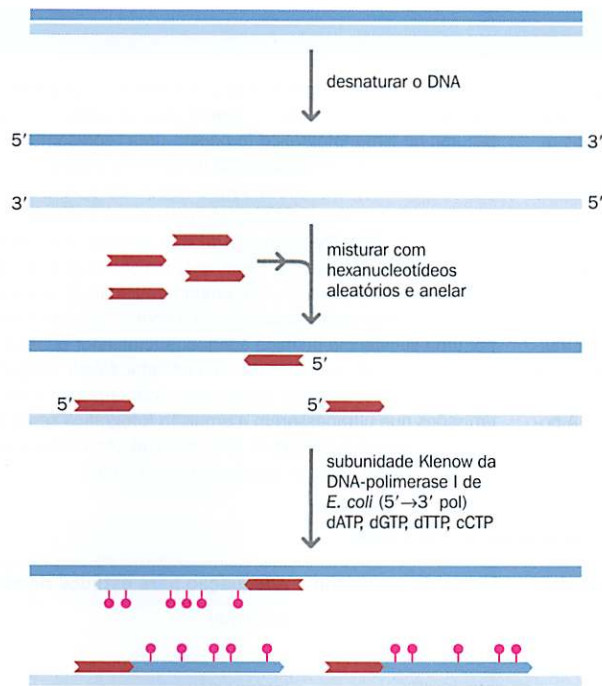


Figura 7.5 Marcação de DNA por *random priming*. O DNA dupla-fita é desnaturado e então misturado a um conjunto de hexanucleotídeos aleatórios. Os hexanucleotídeos irão se ligar a regiões complementares no DNA de fita simples, servindo como iniciadores (*primers*) para a síntese de novas fitas de DNA marcadas. Utiliza-se a subunidade Klenow de *E. coli*, que apresenta atividade de polimerase 5' → 3', mas não possui atividade de exonuclease.

Radioisótopos podem ser usados para marcar ácidos nucleicos, mas apresentam vida média reduzida e podem ser perigosos

Tradicionalmente, os ácidos nucleicos eram marcados pela incorporação de nucleotídeos que continham um radioisótopo passível de ser detectado em solução ou, mais comumente, em um suporte sólido (**autorradiografia** - **Quadro 7.2**). Uma autorradiografia

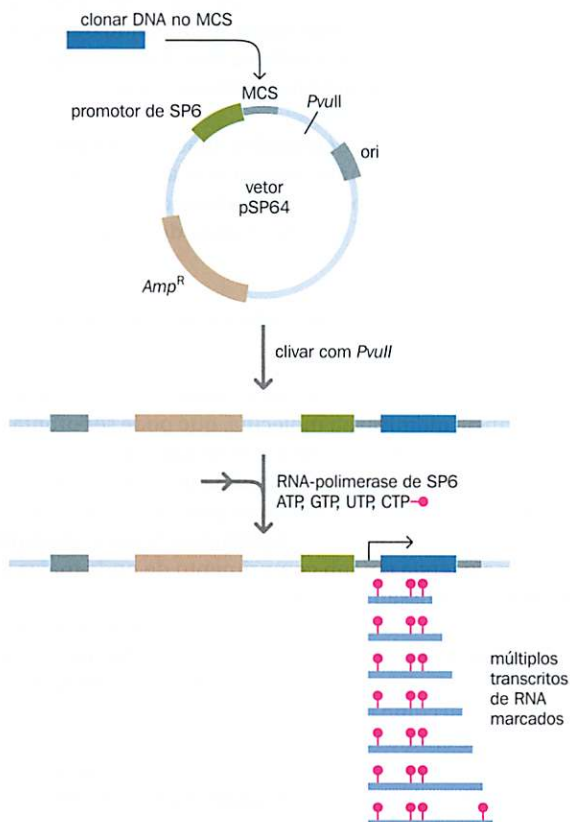


Figura 7.6 Sondas de RNA são geralmente obtidas a partir da transcrição de insertos de DNA clonados, utilizando uma RNA-polimerase de fago. O vetor plasmidial pSP64 contém uma sequência promotora para a RNA-polimerase do fago SP6 ligada ao sítio de policonagem (*multiple cloning site*, MCS), juntamente com uma origem de replicação (*ori*) e um gene de resistência à ampicilina (Amp^R). Um fragmento de DNA adequado é clonado no MCS, e então esta molécula de DNA recombinante é purificada e linearizada utilizando-se a enzima de restrição *PvuII*. RNA-polimerase de SP6 e uma mistura de NTPs (um dos quais é marcado) são adicionados, iniciando a transcrição a partir de um sítio específico no promotor de SP6 e continuando ao longo do inserto de DNA. Vários transcritos marcados de RNA do inserto de DNA serão produzidos. Muitos vetores de expressão semelhantes possuem dois promotores de fago diferentes que flanqueiam o sítio de policonagem, tais como promotores de T3 e T7, e a respectiva RNA-polimerase de fago é utilizada para a geração de ribossondas a partir das duas fitas do DNA.

QUADRO 7.2 Autorradiografia

A autorradiografia grava a posição de um composto marcado radiativamente em uma amostra fixada, produzindo uma imagem em uma emulsão fotográfica. Em aplicações de genética molecular, os compostos radiativamente marcados geralmente correspondem a moléculas de DNA ou proteínas, e a amostra fixada poderá corresponder a espécimes de cromatina ou tecido, imobilizados a lâminas de vidro. Alternativamente, amostras de DNA ou proteína podem ser fixadas em um gel submetido à eletroforese e que posteriormente é desidratado, ou em uma superfície de uma membrana de náilon ou filtro de nitrocelulose.

A amostra fixada no suporte sólido é colocada em contato com um filme de raio X, que corresponde a uma folha plástica coberta por emulsão fotográfica. A emulsão fotográfica consiste em cristais de prata em suspensão, em fase gelatinosa cristalina. A emissão radiativa da amostra atinge a emulsão fotográfica, convertendo íons Ag^+ em átomos Ag. A posição dos cristais de prata alterados pode ser detectada pela revelação, um processo de amplificação no qual o resto dos íons Ag^+ em cristais

alterados é reduzido, produzindo prata metálica. Qualquer cristal de prata não alterado será, então, removido pelo processo de fixação. As áreas escuras no filme fotográfico fornecem uma representação bidimensional da distribuição da radiomarcagem na amostra original.

A autorradiografia direta é mais adequada para a detecção de radio-núcleos que emitem partículas β de baixa a média intensidade (tais como ^3H ou ^{35}S). Partículas β de alta energia (tais como as emitidas pelo ^{32}P) irão atravessar o filme, desperdiçando grande parte da energia (Tabela 1). Para amostras que emitem radiação de alta energia, é necessário fazer uma modificação na qual a energia emitida é convertida em luz por uma substância química adequada (cintilador ou flúor). A autorradiografia indireta utiliza folhas de um cintilador sólido inorgânico como telas intensificadoras, as quais são posicionadas atrás do filme fotográfico. As emissões que ultrapassarem a emulsão fotográfica serão absorvidas pela tela e convertidas em luz, a qual por sua vez reduzirá os íons de Ag^+ , intensificando a imagem autorradiográfica direta.

Tabela 1 Radioisótopos comumente usados para marcação de sondas de DNA e RNA

Isótopo	Meia-vida	Decaimento	Energia de emissão (MeV)	Tempo de exposição	Adequação para estudos de alta resolução
^3H	12,4 anos	β^-	0,019	muito longo	excelente
^{32}P	14,3 dias	β^-	1,710	curto	pouca
^{33}P	25, 5 dias	β^-	0,248	intermediário	intermediária
^{35}S	87, 4 dias	β^-	0,167	intermediário	intermediária

fornece uma representação bidimensional da distribuição da marcação radioativa na amostra original. A intensidade do sinal autorradiográfico depende da energia da radiação emitida e da duração da exposição.

O radioisótopo ^{32}P foi amplamente utilizado em ensaios de hibridização de ácidos nucleicos porque emite partículas β de alta energia, prontamente detectadas. Entretanto, as partículas de alta energia também vão mais longe, espalhando o sinal, e por isso são desvantajosas quando se necessita de resolução física fina. Radioisótopos alternativos, como ^{35}S , são mais úteis para estudos de expressão gênica em células e tecidos que requerem resolução morfológica.

Radioisótopos são prontamente detectados, mas constituem um perigo à saúde. Além disso, a radioatividade decai com o tempo, tornando necessário sintetizar novas sondas antes de cada experimento. Portanto, a marcação não isotópica contendo grupos químicos distintos, que são estáveis e eficientemente detectados, é rotineiramente empregada, atualmente.

Fluoróforos são comumente utilizados na marcação não isotópica de ácidos nucleicos

A marcação não isotópica de ácidos nucleicos envolve a incorporação de nucleotídeos que contêm uma substância química, ou molécula, que pode ser pronta e especificamente detectada. A molécula incorporada pode ser detectada por um ensaio direto, no qual serve diretamente como uma marcação a ser medida pelo ensaio. Neste caso, geralmente utiliza-se um **fluoróforo**, substância química que pode ser prontamente detectada porque absorve energia em um determinado comprimento de onda (**comprimento de onda de excitação**) e reemite a energia em um comprimento de onda maior, porém específico (**comprimento de onda de emissão**) (Quadro 7.3).

Outra alternativa é utilizar um ensaio indireto, no qual a substância química incorporada serve como um **repórter** que é especificamente reconhecido por alguma molécula de afinidade e ligado a ela, como um anticorpo específico. A molécula de afinidade possui um **marcador** ligado a ela, tal como uma molécula ou substância química, que poderá ser detectado em algum tipo de ensaio (Figura 7.7).

Existem dois sistemas de marcação para detecção indireta amplamente utilizados. O sistema biotina-estreptavidina depende da afinidade extremamente alta entre dois ligan-

QUADRO 7.3 Marcação fluorescente de ácidos nucleicos

A marcação fluorescente de ácidos nucleicos foi desenvolvida nos anos 1980 e provou ser extremamente útil em várias aplicações diferentes, incluindo a hibridização cromossômica *in situ*, a hibridização de tecidos *in situ* e o sequenciamento de DNA automático.

Um **fluoróforo** é uma substância química que absorve energia quando exposto a um comprimento de luz específico (excitação) e então reemite essa energia em um comprimento de onda específico, mais longo (Tabela 1 e Figura 1). A marcação direta de ácidos nucleicos com fluoróforos é realizada pela incorporação de nucleotídeos modificados (geralmente, 2'-deoxiridina-5'-trifosfato) contendo um fluoróforo apropriado.

Sistemas de marcação indireta também são utilizados. Nessa técnica, o fluoróforo é usado como um marcador e é ligado a uma molécula de afinidade (como a estreptavidina ou um anticorpo específico para digoxigenina), que se liga especificamente a nucleotídeos modificados contendo uma molécula repórter (como biotina ou digoxigenina) (ver Figura 7.7).

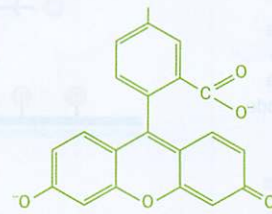
Tabela 1 Fluoróforos para marcação de ácidos nucleicos

Fluoróforo	Máximo de comprimento de onda (nm)	
	Excitação	Emissão
Azul		
AMCA	350	450
DAPI	358	461
Verde		
FITC	492	520
Fluoresceína (ver Figura 1)	494	523
Vermelho		
CY3	550	570
TRITC	554	575
Rodamina (ver Figura 1)	570	590
Texas red	596	620
CY5	650	670

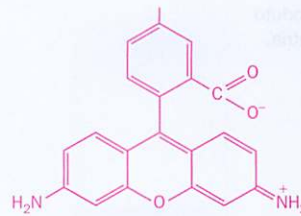
AMCA, aminometilcumarina; DAPI, 4',6'-diamidino-2-fenilindol; FITC, isotiocianato de fluoresceína; CY3, indocarbocianina; TRITC, isotiocianato de tetrametilrodamina; CY5, indocarbocianina.

Detecção de ácidos nucleicos marcados com fluoróforos

Ácidos nucleicos marcados com fluoróforos podem ser detectados por escâners a laser ou por microscopia de fluorescência. Os fluoróforos são detectados pela passagem de um feixe de luz de uma fonte de luz adequada (um laser de argônio é utilizado no sequenciamento automático de DNA, enquanto uma lâmpada de vapor de mercúrio é utilizada na microscopia de fluorescência) através de um filtro colorido apropriado. O filtro é projetado para transmitir a luz no comprimento de onda de excitação desejado. No sistema de microscopia de fluorescência, essa luz reflete na amostra marcada fluorescentemente, fixada em uma lâmina de microscópio, pelo uso de um espelho dicróico que reflete a luz em certos comprimentos de onda, permitindo que a luz de outros comprimentos de onda passe diretamente (Figura 2). A luz, então, excita o fluoróforo, que fluoresce; quando isso ocorre, o fluoróforo emite luz em um comprimento de onda ligeiramente maior, chamado de comprimento



fluoresceína



rodamina

Figura 1 Estrutura de dois fluoróforos comuns. TRITC e uma variedade de outros fluoróforos foram derivados da rodamina.

de onda de emissão. A luz emitida pelo fluoróforo passa diretamente pelo espelho dicróico, através de um filtro de barreira apropriado e pela lente ocular do microscópio. Um outro dispositivo de partição de feixe pode permitir também que a luz seja armazenada em uma câmera CCD (*charge-coupled device*).

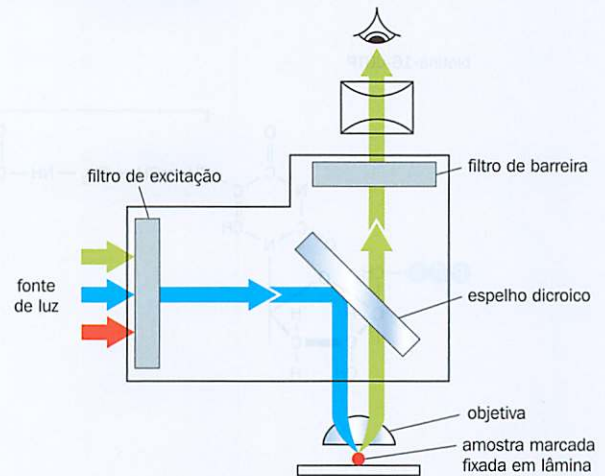
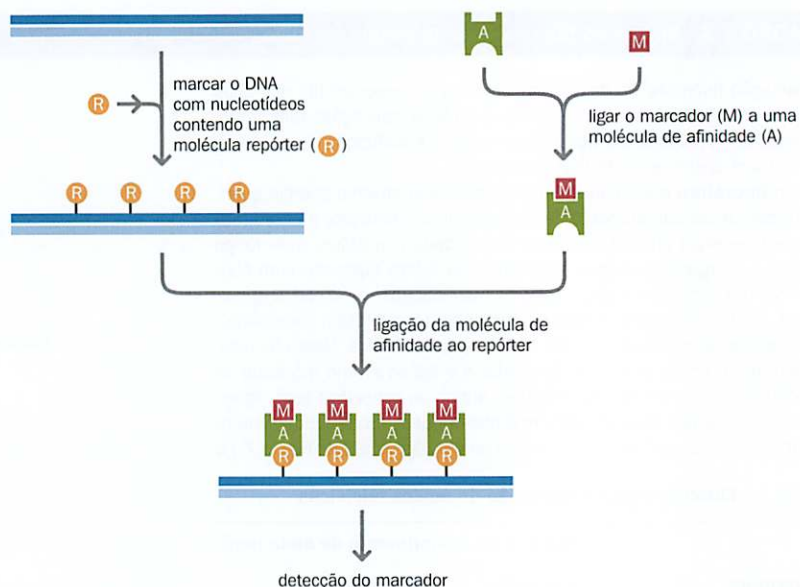


Figura 2 Microscopia de fluorescência. O filtro de excitação permite apenas a passagem de luz de comprimento de onda apropriado. A luz azul transmitida é refletida pelo espelho dicróico (dispositivo de partição de feixe) na amostra marcada, a qual então fluoresce e emite luz em um comprimento de onda mais longo (luz verde, neste caso). A luz verde emitida passa diretamente pelo espelho dicróico e então por uma segunda barreira, um filtro que bloqueia a passagem de sinais fluorescentes indesejados, deixando apenas a emissão fluorescente verde desejada passar através da ocular do microscópio.

tes naturais. A biotina (uma vitamina) age como repórter, ligando-se de maneira específica à proteína bacteriana estreptavidina com uma afinidade constante (também conhecida como constante de dissociação) de 10^{-14} , uma das mais altas conhecidas em biologia. Sondas biotiniladas podem ser facilmente obtidas pela inclusão de um nucleotídeo biotinilado na reação de marcação (Figura 7.8). A estreptavidina serve, então, como uma molécula

Figura 7.7 Detecção indireta de grupos marcados em ácidos nucleicos.

Ácidos nucleicos podem ser marcados com substâncias químicas que não serão detectadas diretamente. Em vez disso, as moléculas incorporadas funcionam como grupos repórter, que são ligados com alta especificidade a uma molécula de afinidade contendo um marcador a ser detectado. Este marcador poderá ser detectado de diversas maneiras. Se possuir um corante fluorescente específico, poderá ser detectado por microscopia de fluorescência. Uma alternativa comum envolve o uso de uma enzima, tal como a fosfatase alcalina, para converter um substrato em um produto com cor, que será medido por colorimetria.



de afinidade. Outro repórter amplamente utilizado é a digoxigenina, um esteroide isolado de plantas *Digitalis* (ver Figura 7.8). Um anticorpo específico produzido contra a digoxigenina age como uma molécula de afinidade, neste caso.

Uma variedade de moléculas marcadoras diferentes pode ser conjugada a moléculas de afinidade, tais como estreptavidina e o anticorpo contra digoxigenina. Estas moléculas

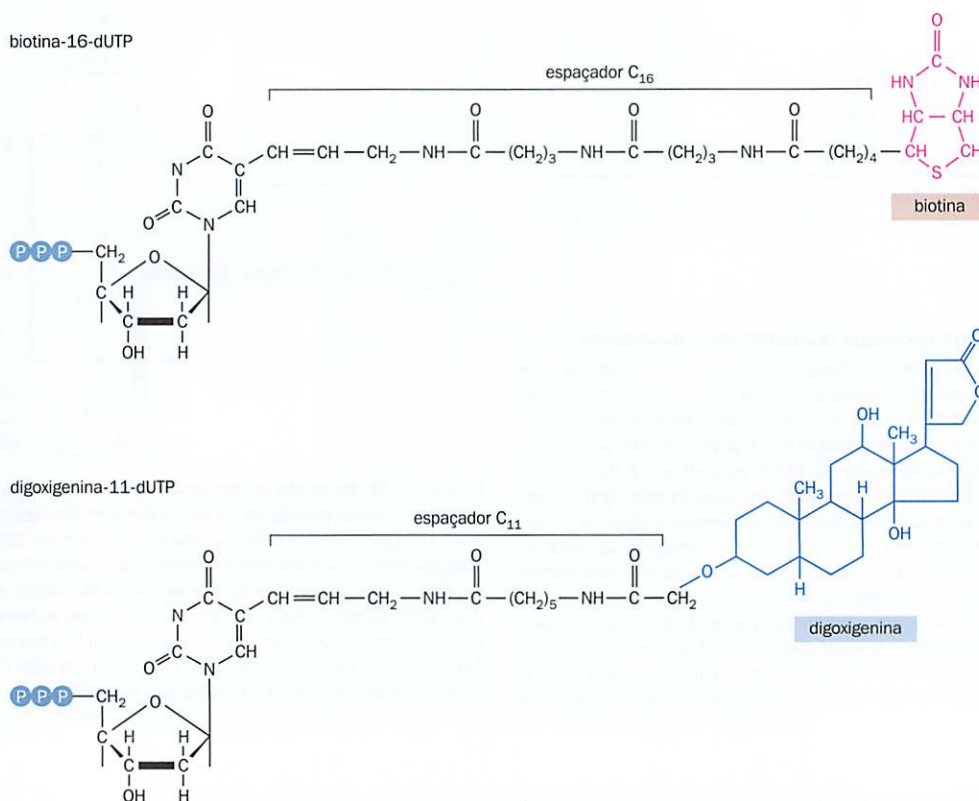


Figura 7.8 Estrutura de nucleotídeos modificados com biotina e digoxigenina. As substâncias repórter biotina e digoxigenina apresentadas aqui são ligadas ao átomo de carbono na posição 5' da uridina do dUTP por moléculas espaçadoras que correspondem, respectivamente, a um total de 16 átomos de carbono (biotina-16-dUTP) ou a 11 átomos de carbono (digoxigenina-11-dUTP). As moléculas espaçadoras são necessárias para assegurar a separação física entre a molécula repórter e o arcabouço do ácido nucleico, de maneira que a molécula repórter se projete suficientemente distante dele para permitir a ligação da molécula de afinidade.

las marcadoras incluem vários fluoróforos que podem ser detectados por microscopia de fluorescência, ou por enzimas como a fosfatase alcalina e a peroxidase, que permitem a detecção por meio de ensaios colorimétricos ou de quimioluminescência.

7.3 HIBRIDIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS IMOBILIZADOS

Vários tipos de hibridização de ácidos nucleicos envolvem a ligação da população-alvo de ácidos nucleicos a um suporte sólido e, posteriormente, à sua exposição a uma solução contendo sondas marcadas. A sonda é homogênea, e o objetivo deste ensaio é identificar sequências-alvo dentro de uma população complexa de ácidos nucleicos, presentes em uma amostra-teste de interesse. A população de ácidos nucleicos na amostra-teste pode ser purificada e diretamente ligada ao suporte sólido, ou pode ser fracionada por tamanho e, então, adicionada ao suporte. Alternativamente, células ou cromossomos podem ser fixados ao suporte sólido e posteriormente tratados, para permitir que seus conteúdos de DNA ou RNA estejam disponíveis para hibridização.

Após a formação de heterodúplixes entre a sonda e as sequências-alvo, moléculas de sonda livres são removidas por lavagens, e o suporte é submetido à secagem. Após este tratamento, qualquer marcação detectada no suporte será derivada de heterodúplixes contendo uma sequência-alvo fixada ao suporte, a qual está ligada por pontes de hidrogênio a uma fita de sonda marcada.

A hibridização de *dot-blot* permite uma triagem rápida e geralmente utiliza sondas de nucleotídeo alelo-específicas

Nos ensaios de *dot-blotting*, a amostra-teste corresponde a uma solução aquosa de DNA ou RNA purificados, tal como o DNA genômico total humano, a qual é simplesmente aplicada em uma membrana de náilon ou nitrocelulose, sendo então submetida à secagem. Uma variação dessa técnica, denominada de *slot-blotting*, envolve a pipetagem do DNA em um poço (*slot*) individual de um suporte adequado. Em ambos os casos, as sequências de DNA serão desnaturadas antes da hibridização com sondas marcadas e desnaturadas.

Uma aplicação útil do *dot-blotting* consiste na distinção entre alelos que diferem em apenas um nucleotídeo. Para isso, sondas de oligonucleotídeo alelo-específicas (*allele-specific oligonucleotides*, ASO) são sintetizadas tendo-se como molde a sequência que contém o nucleotídeo variante. Sondas ASO geralmente possuem 15-20 nucleotídeos, sendo normalmente empregadas em condições de hibridização nas quais o dúplice de DNA entre sonda e sequência-alvo só será estável se houver *perfeita* complementaridade de bases entre elas: um único mau pareamento entre sonda e sequência-alvo será suficiente para tornar o heterodúplix instável.

Frequentemente, duas ASOs são sintetizadas para representar dois alelos, de forma que a diferença de um único nucleotídeo entre os alelos esteja representada no segmento central da sequência de oligonucleotídeos (o que maximizará a instabilidade termodinâmica de um dúplice malpareado). Esta abordagem pode ser empregada em uma variedade de ensaios com propósitos de diagnóstico ou de pesquisa, como na distinção entre os alelos de β -globina normal e falcêmica (Figura 7.9).

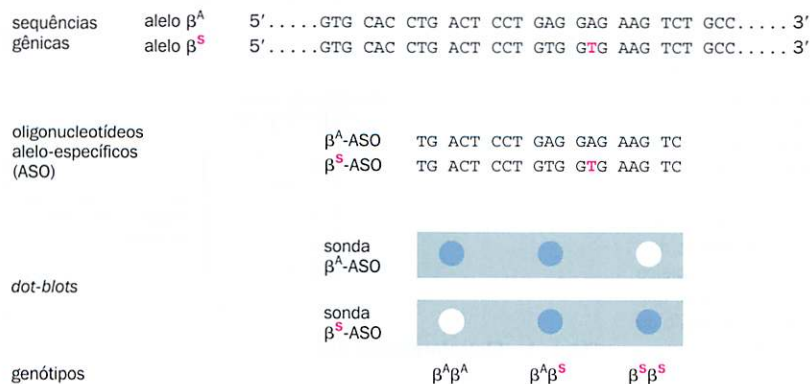


Figura 7.9 Investigação da mutação que causa anemia falciforme por meio de ensaio de hibridização por *dot-blot*. A mutação responsável pela anemia falciforme corresponde à substituição de um único nucleotídeo (A→T) no códon 6 do gene da β -globina, resultando na troca de GAG (Glu) para GTG (Val). Oligonucleotídeos alelo-específicos (ASOs) foram sintetizados para ligar-se à região que flanqueia esta substituição: a sonda β^A -ASO é específica para o alelo normal (β^A), enquanto β^S -ASO reconhece o alelo mutante (β^S). Os *dot-blot*s aqui esquematizados apresentam os resultados de ensaios utilizando estas sondas em condições estritas de hibridização. Utilizando a sonda para o alelo normal (β^A -ASO), os resultados são positivos para indivíduos normais e para heterozigotos, mas negativos para homozigotos para o alelo β^S (círculo vazio). Quando a sonda para o alelo mutante é empregada (β^S -ASO), os resultados são positivos para indivíduos homozigotos e heterozigotos para o alelo β^S , mas negativos para indivíduos normais.

Ensaios de hibridização de *Southern* e *northern blot* detectam moléculas de DNA e RNA fracionadas por tamanho

Hibridização de *Southern blot**

Uma amostra da população de DNA purificado é digerida com uma ou mais endonucleases de restrição, gerando fragmentos que possuem de várias centenas até milhares de pares de base. Esses fragmentos de restrição são separados de acordo com seu tamanho por eletroforese em gel de agarose (Quadro 7.4), desnaturados e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon. Sondas marcadas são hibridizadas ao DNA-alvo imobilizado na membrana, e a posição dos heterodúplexes marcados é revelada por autoradiografia (Figura 7.10).

Uma aplicação importante da hibridização de *Southern blot* é a identificação de sequências-alvo semelhantes, mas não idênticas, ao gene utilizado como sonda. As sequências-alvo podem ser membros de uma família de genes evolutivamente relacionados, ou sequências de DNA de um mesmo genoma, ou ainda um equivalente direto da sonda derivado de um genoma diferente. No último caso, os genomas utilizados como amostra podem ser derivados de diferentes indivíduos de uma mesma espécie, ou podem representar espécies diferentes (constituindo um *zoo blot*). Quando uma nova sonda isolada apresentar relação com outras sequências ainda não caracterizadas, pode-se tentar isolar os outros membros desta família por meio da triagem de bibliotecas de DNA apropriadas.

Hibridização de *Northern blot*

A hibridização de *Northern blot* é uma variação da técnica de *Southern blot*, na qual a amostra contém moléculas de RNA não digeridas, em vez de DNA. Essa metodologia é utilizada principalmente com o objetivo de obter informações a respeito do padrão de expressão de genes específicos. Quando um gene é clonado, ele pode ser utilizado como sonda e hibridizado em um *Northern blot* contendo amostras de RNA isoladas de diversos tecidos (Figura 7.11). Os dados obtidos podem fornecer informação sobre as linhagens celulares nas quais o gene é expresso, bem como sobre a abundância relativa de

* N. de T.: A técnica de *Southern blot* leva o nome do pesquisador que a descreveu, o biólogo britânico Edwin Southern. Por isso, escreve-se em letra maiúscula.

QUADRO 7.4 Eletroforese de ácidos nucleicos

O arcabouço fosfodiéster dos ácidos nucleicos possui numerosos grupos fosfato carregados negativamente, causando a migração destas moléculas na direção de um eletrodo positivo quando submetidas a um campo elétrico. Ao migrar através dos poros de um gel, moléculas de ácido nucleico podem ser separadas por tamanho. Isso acontece porque os poros do gel atuam como uma peneira, facilitando a passagem de moléculas pequenas de ácidos nucleicos através dos poros do gel, enquanto moléculas maiores têm sua migração prejudicada por forças de fricção.

Tradicionalmente, moléculas de ácidos nucleicos pequenas e grandes são separadas utilizando-se géis de agarose, e amostras aplicadas em poços individuais, de modo que diferentes colunas do gel são ocupadas por diferentes amostras durante sua migração (Figura 1). Após a eletroforese, os géis são corados com substâncias químicas, tais como brometo de etídio ou SYBR green, que se ligam aos ácidos nucleicos e fluorescem quando expostas à luz ultravioleta.

Para fragmentos com tamanho entre 0,1 kb e 30 kb, a velocidade de migração depende do comprimento do fragmento, e não da sequência de bases da molécula. Entretanto, a eletroforese convencional em gel de agarose não é adequada para a separação de moléculas de ácidos nucleicos muito pequenas ou muito grandes. A concentração de agarose pode variar para aumentar a resolução do gel – a diminuição da concentração de agarose ajuda a separar fragmentos maiores, enquanto o aumento da concentração torna mais fácil a separação de fragmentos menores. Para obter uma resolução melhor de fragmentos de ácido nucleico menores, no entanto, geralmente utilizam-se géis de poliacrilamida, que são utilizados também no sequenciamento de DNA para a separação de fragmentos que diferem em tamanho por um único nucleotídeo.

Fragmentos de DNA muito grandes não são separados de maneira adequada por eletroforese convencional em gel de agarose. Nestes casos, utiliza-se equipamentos especializados que fornecem um campo elétrico descontínuo. Durante a eletroforese, a direção ou polaridade do campo elétrico é alterada de maneira intermitente. O campo elétrico pode ser pulsado, estabelecendo uma determinada orientação negativa-positiva por um curto período, antes de ser revertido por um curto intervalo. Essa alteração do campo é realizada de maneira recorrente durante toda a eletroforese. Na *eletroforese de gel em campo pulsado*, a alteração intermitente do campo elétrico força o DNA a se reorientar para migrar no novo campo elétrico; o tempo levado para esta reorientação depende do tamanho da molécula. Desta forma, é possível separar fragmentos de DNA contendo várias megabases, por tamanho.

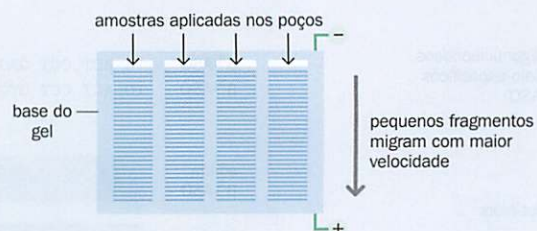


Figura 1 Eletroforese em gel.

Figura 7.10 Hibridização de Southern blot. Uma amostra de DNA complexa é digerida com endonucleases de restrição. Os fragmentos resultantes são aplicados em um gel de agarose e separados por tamanho utilizando eletroforese (ver Quadro 7.4). O gel é tratado com uma substância alcalina – a fim de desnaturar o DNA, para então ser incubado com uma membrana de nitrocelulose ou náilon. O DNA será transferido do gel para a membrana, a qual será submetida a uma solução contendo uma sonda de DNA de fita simples, marcada radiativamente. Após a hibridização, a membrana é lavada para remover o excesso de sonda e, então, é submetida à secagem. A membrana é colocada em contato com um filme de raio X, e a posição da sonda marcada causará uma imagem latente no filme, que poderá ser revelada por autorradiografia (ver Quadro 7.2) como uma banda de hibridização.

seus transcritos, medida pela intensidade relativa da banda de hibridização. Além disso, quando há a identificação de transcritos de diferentes tamanhos, este ensaio pode fornecer evidências para a existência de diferentes isoformas, como aquelas que resultam de promotores alternativos e ainda de sítios alternativos de *splicing* ou de poliadenilação.

Em um ensaio de hibridização *in situ*, uma amostra de DNA ou RNA é imobilizada em uma preparação fixada de cromossomos ou células

Alguns ensaios de hibridização utilizam o princípio da hibridização para detectar ácidos nucleicos presentes em cromossomos ou células fixados em lâminas de microscópio. Como o ácido nucleico está imobilizado em estruturas nativas, neste caso, diz-se que a hibridização ocorre *in situ*.

Hibridização cromossômica *in situ*

Um procedimento simples para o mapeamento de genes e outras sequências de DNA é hibridizar uma sonda apropriada de DNA marcado a um cromossomo que foi desnaturado *in situ*. Para isso, cromossomos metafásicos ou pró-metafásicos, obtidos normalmente a partir de linfócitos de sangue periférico ou de linhagens celulares linfoblastoides, são fixados a lâminas de microscópio. O RNA e as proteínas são removidos da amostra pelo tratamento com RNase e proteinase K, e o DNA cromossômico remanescente é desnaturado por exposição à formamida. O DNA desnaturado é, então, submetido à hibridização *in situ* por incubação com uma solução contendo uma sonda de ácido nucleico marcado e posteriormente coberto com uma laminula.

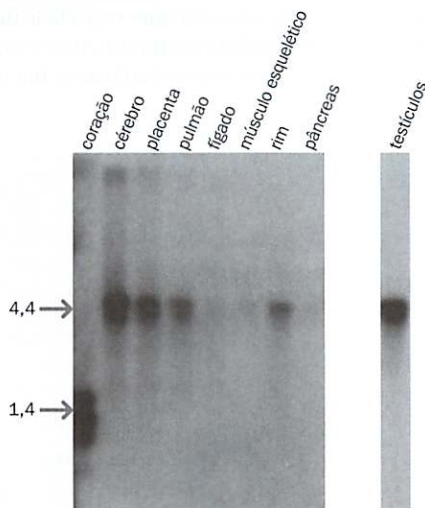
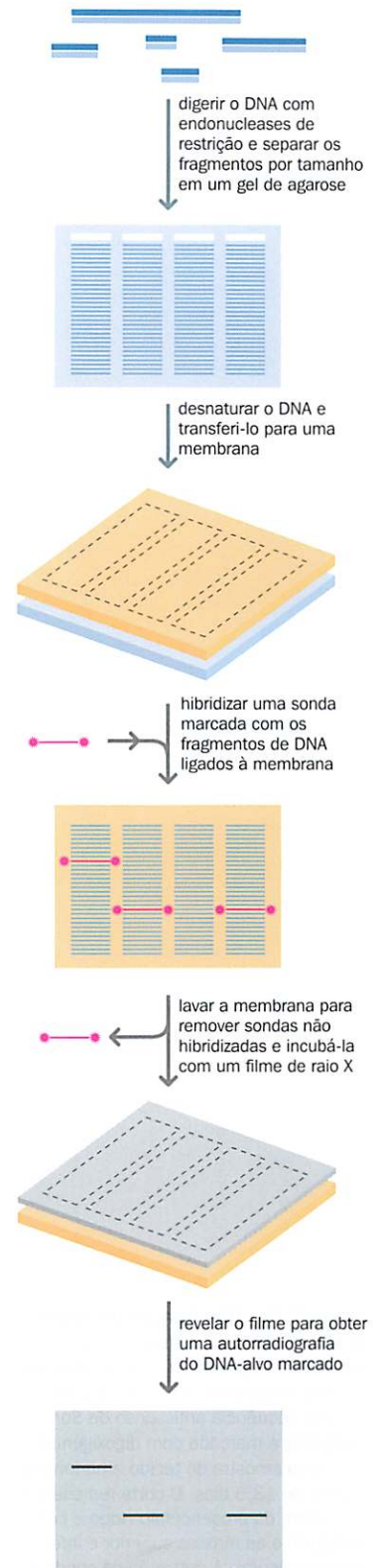


Figura 7.11 Hibridização de northern blot. O método *northern blotting* utiliza amostras de RNA total, ou de mRNA poli(A)⁺, purificado a partir de células ou tecidos de interesse. O RNA é fracionado por tamanho por meio de eletroforese, transferido para uma membrana, e hibridizado com uma sonda de ácido nucleico marcada. No exemplo aqui apresentado, a sonda marcada corresponde a uma molécula de cDNA sintetizada a partir da sequência do gene *FMR1* (responsável pela síndrome do X frágil). Os resultados mostram a comparação da expressão do gene *FMR1* em diferentes tecidos: observou-se maior expressão no cérebro e nos testículos (4,4 kb), redução da expressão na placenta, no pulmão e nos rins, respectivamente, e expressão quase não detectável no fígado, no músculo esquelético e no pâncreas. Embora nenhum transcrito de 4,4 kb tenha sido detectado no coração, transcritos menores (com cerca de 1,4 kb) foram observados, os quais podem ter sido gerados por *splicing* alternativo ou transcrição aberrante. [Reproduzida de Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS et al. (1993) *Nat. Genet.* 3, 36-43. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.]



Dependendo da técnica utilizada, o bandeamento cromossômico da amostra (ver Capítulo 2) pode ser realizado antes ou depois do passo de hibridização. Assim, o sinal obtido após a remoção do excesso de sonda poderá ser correlacionado com o padrão de bandas do cromossomo, permitindo mapear a localização das sequências de DNA identificadas pela sonda. A metodologia de hibridização cromossômica *in situ* foi revolucionada pelo uso de sondas marcadas com fluorescência, em ensaios de hibridização *in situ* com fluorescência (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) (ver Capítulo 2).

Hibridização de tecidos *in situ*

Sondas marcadas também podem ser utilizadas na hibridização de RNA em amostras de tecido. Fatias muito finas de tecido são obtidas com um criostato, a partir de amostras fixadas em blocos de parafina ou congeladas e então aplicadas em lâminas de vidro. Uma solução de hibridização contendo a sonda é aplicada à amostra na lâmina e coberta com uma lamínula.

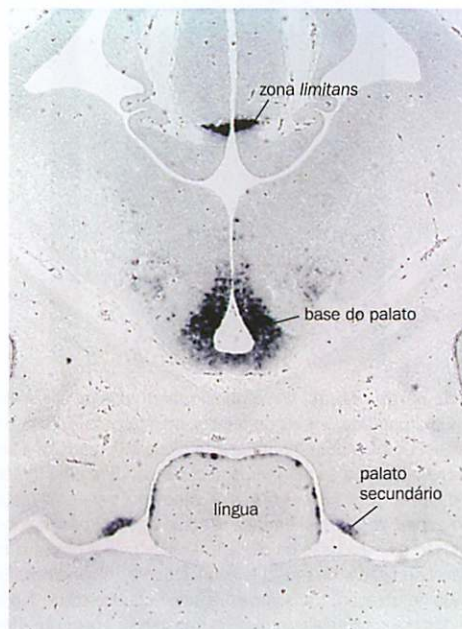
Sondas preparadas a partir de moléculas de RNA complementar de fita simples (cRNA) são preferencialmente utilizadas nesta abordagem. Como devem ser complementares ao mRNA de um gene, ribossondas antissenso são obtidas a partir da clonagem do gene na orientação inversa, em um vetor apropriado, tal como o pSP64 (ver Figura 7.6). Nestes casos, a polimerase do fago irá sintetizar transcritos marcados a partir da fita de DNA oposta à fita que é normalmente transcrita *in vivo*.

As ribossondas podem ser marcadas com um radioisótopo, tais como ^{32}P ou ^{35}S , e as sondas hibridizadas são detectadas por autorradiografia. A localização dos grãos de prata é geralmente detectada por *microscopia de campo escuro*. Neste procedimento, a luz direta não atinge a objetiva; os raios de luz são direcionados lateralmente, de modo que apenas a luz dispersada atinja as lentes do microscópio e o sinal apareça como um objeto iluminado contra um fundo preto. Entretanto, uma melhor detecção do sinal pode ser obtida com a utilização da *microscopia de campo claro*, na qual a imagem é obtida pela transmissão direta de luz através da amostra (Figura 7.12). Uma alternativa consiste na marcação de sondas com fluorescência e, neste caso, a detecção é feita por microscopia de fluorescência (ver Quadro 7.3).

A hibridização pode ser utilizada para a triagem de colônias de bactéria contendo DNA recombinante

Colônias de bactéria contendo DNA recombinante são geralmente submetidas à triagem para identificar quais delas contêm sequências relacionadas a uma sonda de interesse marcada. Para isso, as colônias são cultivadas em uma superfície de ágar e transferidas por contato para uma membrana de nitrocelulose ou náilon, processo denominado de *hibridização de colônia* (Figura 7.13). Uma alternativa é aplicar as bactérias em uma membra-

Figura 7.12 Hibridização de tecido *in situ*. O exemplo apresenta o padrão de expressão produzido pela hibridização de uma ribossonda, produzida a partir de uma sequência antissenso de *Sonic hedgehog* e marcada com digoxigenina, com uma amostra de tecido embrionário murino de 13,5 dias. O corte representa uma parte do prosencéfalo (topo e centro da figura) e as maxilas superior e inferior (base da figura). A detecção da sonda foi realizada por um ensaio colorimétrico (azul) utilizando fosfatase alcalina. Uma alta expressão foi observada em regiões muito específicas do sistema nervoso central em desenvolvimento, conforme indicado, e também no palato secundário. (Cortesia de Mitsushiro Nakatomi & Heiko Peters, Newcastle University).



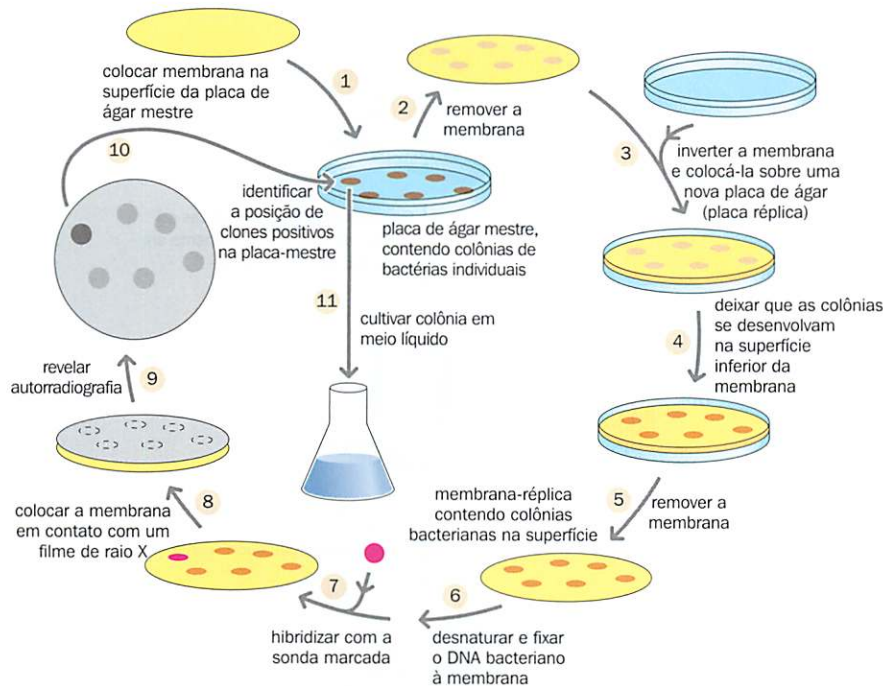


Figura 7.13 Hibridização de colônia. Quando uma membrana de náilon ou um filtro de nitrocelulose é colocado sobre colônias de bactérias em uma placa de ágar, algumas células das colônias aderem à membrana. A membrana é então removida da placa e transferida para uma nova placa de cultivo, permitindo que as células transferidas formem colônias. A membrana-réplica resultante terá a mesma representação física das colônias de bactéria na placa de cultivo original (a placa de ágar mestre). A membrana-réplica é tratada para permitir a desnaturação e a fixação do DNA ligado a ela. A membrana é, então, hibridizada com uma sonda de ácido nucleico marcado. Após uma lavagem para remoção de sondas marcadas não hibridizadas, um filme de raio X é utilizado para produzir uma autorradiografia que revelará a posição de colônias marcadas na membrana-réplica, a qual poderá ser usada para identificar a colônia equivalente na placa-mestre original. As colônias positivas poderão ser cultivadas individualmente em meio de cultivo líquido.

na de nitrocelulose ou náilon, a qual é colocada sobre uma superfície de ágar, permitindo o crescimento de colônias diretamente na superfície da membrana. Em ambas as abordagens, a membrana é então exposta a uma substância alcalina a fim de desnaturar o DNA antes de submetê-lo à hibridização com uma sonda de ácido nucleico marcado.

Após a hibridização, a sonda é removida, e então o filtro é lavado extensivamente, seco e processado para a detecção da sonda marcada ligada. A posição de sinais fortes emitidos pela sonda marcada é relacionada à placa mestre, que contém o padrão original de posicionamento das colônias, permitindo a identificação de colônias que contêm moléculas de DNA relacionadas à sonda. Estas colônias poderão, então, ser individualmente selecionadas e submetidas ao crescimento em meio de cultivo líquido, para obtenção de quantidade suficiente de material para a extração e purificação do DNA recombinante.

A partir do momento em que se tornou possível a criação de bibliotecas de DNA complexo, foi necessário desenvolver métodos automatizados e mais eficientes para a triagem de clones. Hoje, aparelhos robotizados podem ser utilizados para a pipetagem de material obtido a partir de clones arranjados em placas de microtitulação, para coordenadas lineares pré-estabelecidas em uma membrana. Os filtros de clones de alta densidade permitem a triagem de bibliotecas de maneira rápida e eficiente, como descrito no Capítulo 8.

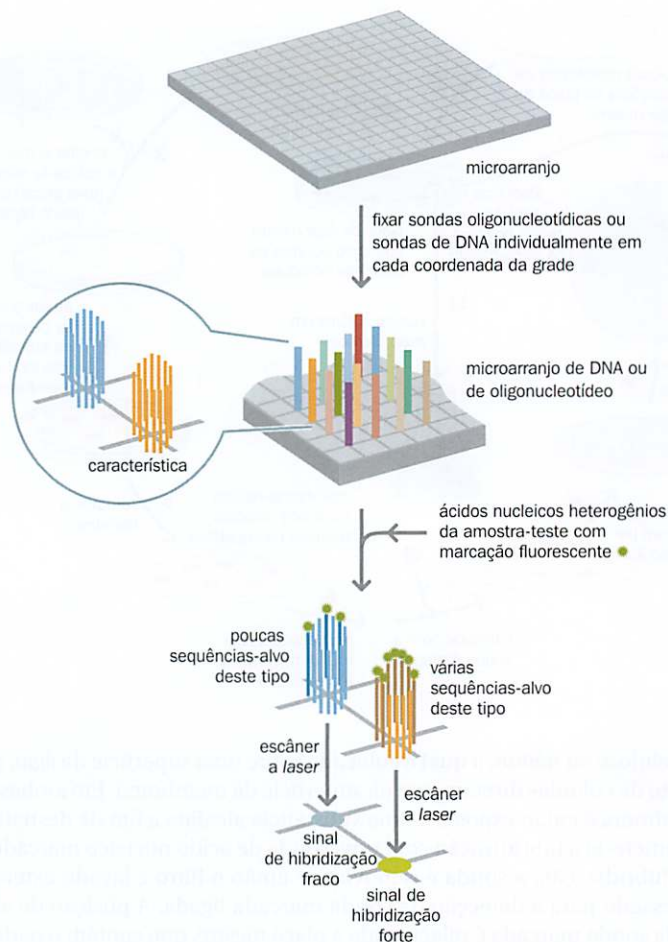
7.4 ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO BASEADOS EM MICROARRANJOS

A hibridização em microarranjos permite a realização de ensaios de hibridização altamente paralelos, utilizando milhares de diferentes sondas imobilizadas

As novas e poderosas tecnologias de hibridização em microarranjo foram desenvolvidas nos anos 1990 para permitir a realização de ensaios paralelos em massa, nos quais milhares de ensaios de hibridização individuais são realizados de maneira simultânea e sob as mesmas condições experimentais. A hibridização em microarranjo foi primeiramente desenvolvida como uma ferramenta para mapeamento de larga escala e para o sequenciamento de DNA. Entretanto, a principal responsável pela evolução desta tecnologia foi a necessidade de analisar simultaneamente a expressão de um grande número de genes. À medida em que as bibliotecas de cDNA foram desenvolvidas e grandes números de clones de cDNA caracterizados se tornaram disponíveis, os pesquisadores começaram a planejar análises genômicas da expressão gênica. Ensaios de hibridização *multiplex* eram necessários para utilizar grandes números de sondas de DNA gene-específicas simultaneamente.

Figura 7.14 Princípios da hibridização em microarranjo.

Um microarranjo é uma superfície sólida na qual moléculas podem ser fixadas em coordenadas específicas em um formato de grade de alta densidade. A hibridização em microarranjos utiliza microarranjos de DNA, ou de oligonucleotídeos, que são preparados pela fixação de milhares de sondas de fita simples sintéticas de oligonucleotídeo, ou de DNA, em posições específicas e predeterminadas na grade. Como demonstrado na figura expandida, cada posição específica terá vários milhares de cópias idênticas de um único tipo de sonda de oligonucleotídeo ou de DNA (uma *característica*). Uma amostra-teste contendo um conjunto heterogêneo de fragmentos de DNA marcados, ou de transcritos de RNA, é adicionada para permitir sua hibridização com as sondas do arranjo. As sequências-alvo ligadas por algumas sondas poderão ser numerosas, resultando em um forte sinal de hibridização; para outras sondas, poderá haver poucas sequências-alvo na amostra-teste, resultando em um fraco sinal de hibridização. Após as etapas de lavagem e secagem, os sinais de hibridização para milhares de sondas diferentes no arranjo serão detectados por um escâner a laser, gerando grandes quantidades de dados a partir de um único experimento.



Subsequentemente, a hibridização em microarranjo foi utilizada para investigar a variação do DNA, bem como para traçar perfis de expressão gênica.

Quando utilizado em um ensaio de hibridização, um **microarranjo** consiste em milhares de sondas de DNA não marcadas ou de sondas de oligonucleotídeos fixadas a uma superfície de vidro ou de outro material adequado, em coordenadas precisamente definidas em uma grade de alta densidade. A amostra-teste, uma solução aquosa contendo uma população complexa de moléculas de DNA desnaturado ou RNA, marcadas com fluorescência, é hibridizada com as moléculas de sonda no microarranjo. Após as etapas de lavagem e secagem, a marcação fluorescente é detectada por um escâner a laser de alta resolução, e o sinal emitido a partir de cada ponto (*spot*) do arranjo é analisado por um *software* de imagem digital que converte o sinal em uma paleta de cores, de acordo com sua intensidade.

Serão abordados exemplos práticos do uso do microarranjo em capítulos subsequentes, como no Capítulo 8, na qual se considerará de que maneira a expressão gênica é analisada. Aqui, o foco são os princípios básicos e a tecnologia em si. O objetivo da hibridização em microarranjo é que cada uma das milhares de sondas diferentes forme heterodúplexes com sequências-alvo presentes na amostra-teste de ácidos nucleicos marcados. Em *uma* posição qualquer do arranjo, várias cópias idênticas de apenas *um* tipo de oligonucleotídeo ou de molécula de DNA estarão disponíveis para hibridização (Figura 7.14).

Sequências-alvo estarão presentes em diferentes quantidades na amostra em estudo. A quantidade de DNA-alvo específico ligado a cada sonda dependerá da frequência daquele alvo específico na amostra-teste. Uma sonda que tem como alvo um ácido nucleico relativamente raro terá menos fluorescência ligada a ela, resultando em um fraco sinal de hibridização, enquanto posições no arranjo que são fortemente fluorescentes após a lavagem indicam sondas cujo alvo era um ácido nucleico abundante. A quantificação da fluorescência ligada em todas as posições do microarranjo gera um grande conjunto de dados que poderá refletir a frequência relativa de um grande número de sequências-alvo presentes na amostra.

Microarranjos de oligonucleotídeos de alta densidade são ferramentas poderosas para a análise de amostras complexas de DNA ou RNA

A construção de microarranjos de DNA de primeira-geração envolvia a distribuição de clones de DNA ou de oligonucleotídeos sintéticos de maneira robotizada em lâminas de microscópio de vidro tratadas quimicamente. Todavia, microarranjos de DNA modernos geralmente utilizam sondas de oligonucleotídeos por conta de sua versatilidade. Oligonucleotídeos podem ser projetados especificamente para apenas um alvo, e sua síntese para estes fins permite que microarranjos de alta densidade sejam produzidos rápida e eficientemente. A confiabilidade dos dados pode ser avaliada de maneira mais eficiente em vários casos; por exemplo, a expressão de um único gene pode ser acompanhada simultaneamente com muitas sondas de oligonucleotídeos, sendo cada um deles específico para aquele gene.

A maioria das aplicações modernas utiliza microarranjos produzidos por tecnologias alternativas desenvolvidas por duas empresas comerciais. A abordagem da Affymetrix foi baseada na manufatura de *chips* de silício, cunhando o termo **chip de DNA** (embora hoje o termo possa se referir a qualquer microarranjo de DNA ou de oligonucleotídeo de alta densidade). A tecnologia da Illumina baseia-se na montagem aleatória de arranjos de esferas em poços.

Microarranjos de oligonucleotídeos da Affymetrix

A tecnologia de *chip* da Affymetrix envolve a síntese de sondas de oligonucleotídeos *in situ* direcionada por luz no microarranjo e pode produzir mais de 6 milhões de oligonucleotídeos diferentes em uma superfície de 1,7 cm². Cada tipo de oligonucleotídeo é montado pela adição sequencial de mononucleotídeos a uma molécula *linker* que termina com uma molécula fotolábil protetora. Uma fotomáscara (fotolitografia) é utilizada para determinar quais posições no microarranjo serão expostas à fonte de luz externa, resultando na degradação das moléculas fotolábeis. Uma reação química é então usada para adicionar um tipo particular de nucleotídeo ao sítio recém-desprotegido. O processo é repetido sequencialmente com máscaras diferentes para cada um dos outros três nucleotídeos, gerando a adição de apenas um nucleotídeo - A, C, G ou T - a cada molécula *linker*. Então o processo é repetido para estender a síntese do oligonucleotídeo por cerca de 24 nucleotídeos. Dependendo da disposição dos furos nas máscaras utilizadas em cada etapa, seqüências específicas e predeterminadas de oligonucleotídeos podem ser montadas em locais específicos do microarranjo (Figura 7.15).

Microarranjos de oligonucleotídeos da Illumina

A tecnologia da Illumina BeadArrayTM é baseada na montagem aleatória de arranjos de esferas em poços. As esferas correspondem a microesferas de sílica de 3 µm de diâmetro e formam os elementos do arranjo. Os oligonucleotídeos são pré-sintetizados para ter mais de 70 nucleotídeos de extensão (consistindo de um código de 25 nucleotídeos e de 50 nucleotídeos gene-específicos). Cada oligonucleotídeo é acoplado a um lote especial de esferas, e esferas individuais carregam mais de 100.000 oligonucleotídeos idênticos. Este mesmo princípio é a base de uma nova tecnologia de sequenciamento produzida pela Illumina, como será descrito no Capítulo 8.

Esferas carregando diferentes oligonucleotídeos são agrupadas e então distribuídas por microarranjos pré-fabricados contendo micropoços regularmente espaçados, projetados para comportar o tamanho da esfera. As esferas são imobilizadas dentro das cavidades, e o código de 25 nucleotídeos é decodificado, permitindo que cada esfera seja identificada. Assim, o arranjo das sondas é aleatório, e as posições são determinadas posteriormente. A hibridização de moléculas-alvo de ácidos nucleicos marcados a oligonucleotídeos complementares no arranjo de esferas pode então ser rastreada pela triagem do arranjo para a presença da marcação.

A hibridização em microarranjo é utilizada principalmente para traçar perfis de transcritos ou para estudos de variação do DNA

Embora a tecnologia para estabelecer os microarranjos de DNA tenha sido desenvolvida apenas recentemente, várias aplicações importantes já foram desenvolvidas, e seu impacto no futuro da pesquisa biomédica e em abordagens diagnósticas deverá ser profundo.

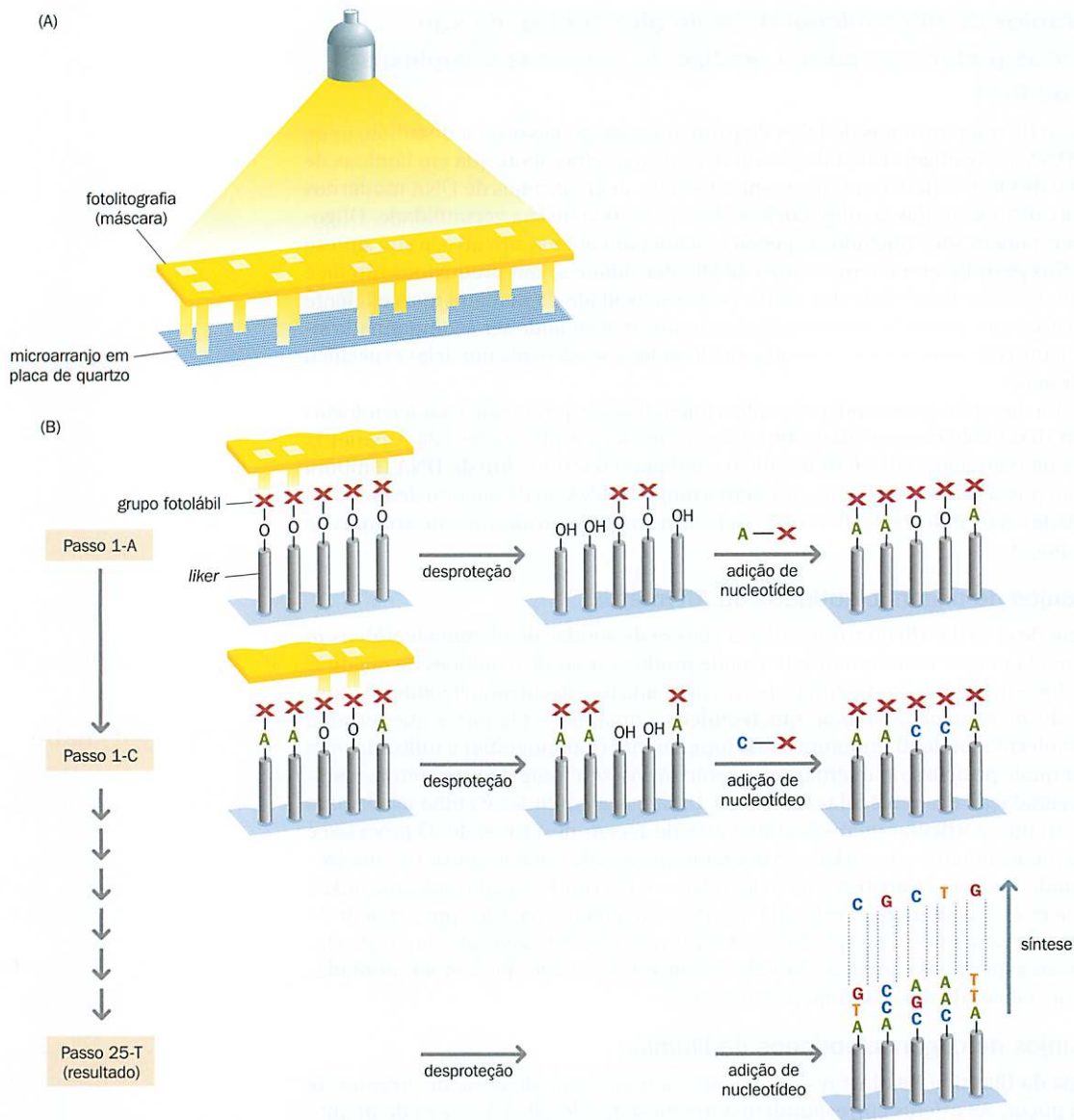


Figura 7.15 Construção de microarranjos de oligonucleotídeos por síntese de oligonucleotídeos *in situ* direcionada por luz. (A) Microarranjos de oligonucleotídeos da Affymetrix são construídos pela síntese de milhares de oligonucleotídeos em posições predeterminadas em uma placa de quartzo, utilizando uma fotolitografia (máscara) para determinar a posição de cada nucleotídeo adicionado. (B) Cada oligonucleotídeo é montado começando pela molécula *linker*, que é fixada ao arranjo e cuja extremidade livre carrega uma molécula fotolábil protetora. Uma máscara com furos feitos em posições específicas é colocada sobre o arranjo, e a luz de uma fonte externa é emitida através dos furos. Nas posições expostas à luz, as moléculas fotolábeis são degradadas (desproteção). Um mononucleotídeo específico, acoplado a uma molécula fotolábil, é adicionado ao arranjo e irá combinar com as fitas desprotegidas. O processo é repetido três vezes com outras três máscaras contendo furos em posições distintas, introduzindo um dos outros três nucleotídeos. O resultado é que cada molécula *linker* terá um único nucleotídeo ligado, sendo ele A, C, G ou T, de uma forma específica e pré-programada. O uso sequencial de quatro máscaras diferentes para permitir o acoplamento dos quatro diferentes nucleotídeos é repetido por mais 24 ciclos. O resultado final é a montagem de oligonucleotídeos contendo 25 nucleotídeos, cada um com uma sequência precisamente determinada, em uma coordenada específica do microarranjo.

A maioria das aplicações envolve o rastreamento de transcritos de genes ou o estudo da variação do DNA.

A primeira aplicação – e ainda uma das mais importantes – foi na avaliação simultânea da abundância de transcritos de múltiplos genes. Inicialmente, pequenos conjuntos de um número total de genes em um genoma complexo, como o genoma humano, foram investigados, mas conjuntos de genes de genoma inteiro agora podem ser estudados. Esta aplicação será melhor explorada no Capítulo 8. O estudo de perfis de transcritos é utilizado em muitas aplicações, especialmente na comparação de perfis de expressão de tipos celulares relacionados, de células que seriam idênticas, mas diferem pela presença ou au-

sência de uma mutação patológica, e de células idênticas que foram expostas a diferentes ambientes, como a presença ou a ausência de uma droga. Outros aspectos da expressão de transcritos também podem ser investigados, tais como o uso de sondas de oligonucleotídeos para estudar variantes geradas por *splicing* alternativo.

É crescente o desenvolvimento de microarranjos específicos para determinadas vias de sinalização, a fim de monitorar os perfis de expressão individuais para conjuntos de genes relacionados que participam da mesma rota biológica. Aplicações diagnósticas também têm se tornado importantes. Por exemplo, os perfis de transcritos de genes-chave fornecem identidade molecular para identificar tumores de diferentes tipos e graus.

Várias aplicações foram planejadas para rastrear a variação do DNA. Além de investigar mutações implicadas em doenças genéticas, esforços vigorosos foram feitos para identificar e catalogar marcadores de **nucleotídeos de polimorfismo único** (*single nucleotide polymorphism*, *SNP*). Como será descrita mais adiante, a análise da variação do DNA em larga escala geralmente utiliza microarranjos que possuem clones de DNA de cromossomos bacterianos artificiais, como as sondas – que têm o objetivo de identificar grandes deleções subcromossômicas e duplicações.

Além da hibridização, deve-se notar que os microarranjos apresentam muitas outras aplicações. Estas incluem o uso de arranjos de proteínas, arranjos que investigam a ligação entre ácidos nucleicos e proteínas e muitos outros.

LEITURAS ADICIONAIS

Geral

Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marcação fluorescente

Invitrogen Molecular Probes—The Handbook: A Guide To Fluorescent Probes And Labeling Technologies. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>

Hibridização *in situ*

Wilkinson D (1998) *In Situ Hybridization: A Practical Approach*, 2nd ed. IRL Press.

Hibridização em microarranjos – princípios e tecnologia básica

Various authors (1999) The Chipping Forecast. *Nat. Genet.* 21 (Suppl.), 1–60.

Various authors (2002) The Chipping Forecast II. *Nat. Genet.* 32 (Suppl.), 465–551.

Tecnologia de microarranjos de Affymetrix e Illumina

Affymetrix GeneChip™. <http://www.affymetrix.com/technology/index.affx>

Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS et al. (2004) Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res.* 14, 870–877.

Illumina BeadArray™. <http://www.illumina.com/pages.ilmn?ID=5>

Aplicações para a hibridização em microarranjos

Falciani F (ed.) (2007) *Microarray Technology Through Applications*. Taylor and Francis.

Hoheisel JD (2006) Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat. Rev. Genet.* 7, 200–210.