

Protocolos laboratoriais de análise molecular para investigação de doenças genéticas

Maria L. S. Pereira¹, Sandra Leistner²,
Úrsula Matte²

A aplicação da análise molecular na investigação de doenças genéticas começou a ser utilizada como avaliação rotineira em laboratórios no decorrer da última década. Mais recentemente, a identificação de mutações específicas responsáveis por doenças hereditárias tornou o diagnóstico molecular mais rápido e eficaz, fazendo desta análise uma ótima ferramenta para diagnóstico de muitas destas doenças. Diversas técnicas laboratoriais são utilizadas para a análise molecular de doenças genéticas. Dentre estas destaca-se a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), que foi um marco na "era molecular". Nos últimos anos, os procedimentos vem sendo automatizados gradativamente, o que irá propiciar a realização de maior número de testes num curto espaço de tempo. O uso dos conhecimentos da Biologia Molecular vem sendo aplicado nas mais variadas áreas da Medicina. No campo da genética molecular, os avanços das últimas décadas demonstram um enorme potencial desta tecnologia, que pode ser utilizada não somente no diagnóstico mas também no tratamento e prevenção de doenças hereditárias. As perspectivas para o novo século são bastante promissoras e indicam a possibilidade de grandes avanços no tratamento de doenças. O presente artigo descreve as principais técnicas de análise molecular utilizadas para a investigação de doenças genéticas.

Unitermos: Doenças genéticas; análise molecular; PCR.

Laboratory protocols of molecular analysis for the investigation of genetic diseases

The application of molecular analysis in the investigation of genetic diseases has been used as routine evaluation in laboratories worldwide in the last decade. More recently, the identification of specific mutations responsible for hereditary disorders made molecular diagnosis quicker and more efficient, making this analysis an excellent tool for the diagnosis of many diseases. Several techniques can be used and, among them, the Polymerase Chain Reaction (PCR) was a mark in the "molecular era". In the last few years, the procedures have been automated gradually, which will allow the realization of a greater number of tests in a limited amount of time. The use of knowledge in Molecular Biology Techniques has been applied in many fields of Medicine. The advances

¹ Laboratório de Genética Molecular, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: mpereira@hcpa.ufrgs.br

² Laboratório de Genética Molecular, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

made in the last decade demonstrate a huge potential of these technologies, which can be used not only for diagnosis, but also for treatment and prevention of hereditary disorders. The perspectives for the new century are very promising and indicate the possibility of great advances in the treatment of genetic diseases. The present article describes the main techniques used in the molecular analysis for the investigation of genetic diseases.

Key-words: Genetic diseases; molecular analysis; PCR

Revista HCPA 2001(3):321-328

Introdução

A aplicação da análise molecular na investigação de doenças genéticas começou a ser utilizada como avaliação rotineira em laboratórios no decorrer da última década. Neste período, a utilização da chamada "análise de DNA" tornou-se popular, não apenas no hemisfério norte, mas também em laboratórios localizados nos chamados países em desenvolvimento. Inicialmente, a conhecida "análise de DNA" estava limitada a análises de ligação e detecção de deleções e era utilizada, principalmente, para aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Mais recentemente, a identificação de mutações específicas responsáveis por doenças hereditárias tornou o diagnóstico molecular mais rápido e eficaz, fazendo desta análise uma ótima ferramenta para diagnóstico de muitas destas doenças.

Um marco essencial para a aplicação dos fundamentos de biologia molecular na rotina laboratorial foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), no final dos anos 80, utilizada atualmente para identificação de mutações e/ou polimorfismos presentes nos pacientes. Os protocolos de detecção, inicialmente desenvolvidos para realização manual, vêm sendo automatizados gradativamente, o que poderá agilizar os resultados e oferecer subsídios de suporte ao médico num curto período de tempo.

As doenças genéticas são causadas por alterações (mutações e/ou polimorfismos) no DNA, que podem ser identificadas por protocolos laboratoriais de análise molecular. Abordaremos abaixo os tipos de mutações associadas com doenças genéticas e as técnicas laboratoriais mais freqüentemente utilizadas para detectar

alguma alteração na seqüência normal de um gene.

Mutações

Uma mutação é simplesmente uma mudança na estrutura primária do DNA, que consiste de uma seqüência linear de pares de nucleotídeos, representando a informação química armazenada. O efeito que uma mutação tem no fenótipo de um organismo varia do "trivial" ao "letal", dependendo da propriedade da proteína codificada pelo gene alterado e como aquela alteração afeta o desenvolvimento e a manutenção do nosso corpo.

Muitas mutações produzem efeitos fenotípicos que têm conseqüências tais como cor diferente de cabelo e que são chamadas mutações não causadoras de doença (ou polimorfismos), enquanto outras podem ter conseqüências mais graves tais como aquelas que levam a doenças como Huntington e hemofilia, e que são denominadas mutações causadoras de doença.

As mutações podem ser germinativas, quando ocorrem em células germinais que são aquelas destinadas a se tornarem ovo ou esperma. Estas mutações não afetam as pessoas nas quais ocorrem mas podem ser transmitidas e causar danos em futuras gerações. As mutações somáticas, por outro lado, ocorrem em células do corpo (fígado, pulmão, intestino, etc) e podem afetar o fenótipo do seu portador, mas não são transmitidas para os seus descendentes. Esta classe de mutações são as mais envolvidas no desenvolvimento do câncer.

Sejam germinativas ou somáticas, em nível molecular as alterações genéticas podem ser:

Mutações de ponto ou substituição de bases

1. *Missense* (ou de sentido trocado): aqui existe a troca de um nucleotídeo por outro, ocasionando também a troca de um aminoácido. Cerca de 73% das substituições de base nas regiões codificantes dos genes são mutações *missense*. Pode ocorrer, também, a troca de um nucleotídeo sem alteração do aminoácido. Neste caso, a mutação é chamada silenciosa e não tem consequência fenotípica;

2. *Nonsense* (ou sem sentido): troca de um nucleotídeo por outro, ocasionando a troca de um aminoácido por um códon de parada. Têm o efeito de parar a tradução da proteína prematuramente, produzindo um polipeptídeo mais curto, muitas vezes chamado de proteína truncada. Em torno de 4% das substituições de base são do tipo *nonsense*;

3. *Splicing* (mutações em sítio de processamento de RNA): são mutações de ponto presentes nas junções entre íntron e éxon. Alteram o processamento do RNA de modo que as regiões correspondentes aos íntrons não são retiradas da molécula de maneira apropriada. Na maioria dos casos, ocorre a utilização de um sítio de *splicing* alternativo que pode estar localizado dentro do próprio éxon ou em um íntron anterior ou subsequente;

4. *Inserções*: podem ser pequenas, isto é, inserção de um ou mais pares de base, podendo ser também definidas como mutações *frameshift* ou mutações de mudança do quadro de leitura. Estas não apenas alteram o códon onde ocorrem como também mudam o quadro de leitura (*reading frame*), fazendo com que as unidades codificantes (códon ou conjunto de três letras que formam um aminoácido) sejam modificados daquele ponto em diante. Quando isto ocorre, geralmente há a formação de um códon de parada prematuro, causando um efeito similar ao das mutações *nonsense*. Alternativamente, elas podem não modificar o quadro de leitura, se a inserção for de três pares de bases, ocasionando a introdução de um novo aminoácido na proteína mutante;

5. *Deleções*: também podem ser pequenas ou grandes deleções. As pequenas deleções (um ou mais pares de bases) também podem causar *frameshift* (mutações de mudança do quadro de leitura) ou não alterar o quadro de leitura da proteína (se for uma deleção de três pares de bases). As grandes deleções podem causar a retirada de 1 ou mais éxons ou de todo o gene. Geralmente estão associados a fenótipos mais graves, já que o efeito na proteína é bastante drástico;

6. *Inversões*: são causadas por rearranjos na estrutura do gene, ocasionados por recombinação da seqüência dos nucleotídeos provocada por homologias na ordem destes nucleotídeos dentro da estrutura gênica. Normalmente, provocam uma grande alteração no fenótipo do paciente.

Técnicas Laboratoriais

Muitas técnicas laboratoriais são utilizadas para a análise molecular de doenças genéticas. Nos últimos anos, os procedimentos vêm sendo automatizados gradativamente, o que irá propiciar a realização de maior número de testes em um curto espaço de tempo.

Uma listagem de protocolos disponíveis para diagnóstico molecular de doenças genéticas pode ser encontrada na tabela 1. A escolha do protocolo específico será baseada nas características da doença e/ou do gene envolvido, da experiência e condições do laboratório a ser realizada a análise e no grau de confiabilidade que se deseja atingir ao final da mesma.

Considerações gerais sobre os protocolos mais utilizados para o diagnóstico molecular de doenças genéticas encontram-se abaixo.

Extração de DNA

A extração e purificação do DNA podem ser realizadas por protocolos que utilizam reagentes preparados no próprio laboratório ou através do uso de *kits* comerciais, que simplificam o procedimento mas, em geral, aumentam o custo do exame.

Todos os protocolos se baseiam no rompimento das células nucleadas (a), rompimento da membrana nuclear (b) e separação do DNA das proteínas através de precipitação e posterior solubilização do DNA em solução aquosa (c).

A fonte de obtenção de DNA, assim como a técnica utilizada para extração do mesmo, influenciam diretamente na qualidade e na quantidade do material ao final do processo.

O DNA pode ser obtido a partir de qualquer tecido que contenha células nucleadas. Em genética médica, por razões práticas, a principal fonte de DNA são os glóbulos brancos obtidos a partir de sangue periférico. O sangue pode ser coletado diretamente por punção venosa, utilizando, preferencialmente, EDTA como anticoagulante. A coleta de sangue em heparina não é recomendável, por ser um potencial inibidor da reação de PCR.

Outra forma de coleta de sangue é realizando

Tabela 1: Métodos utilizados na análise molecular

Gene desconhecido	Gene conhecido/ Mutações desconhecidas	Gene conhecido/ Mutações conhecidas
Estudos de ligação com RFLP	Southern blot	PCR + Digestão com enzimas de restrição
	PCR	Hibridização com oligonucleotídeos alelo
	RT-PCR	específicos (mutações de ponto)
	Multiplex-PCR	Amplificação (PCR) com oligonucleotídeos-específicos
	SSCP	Sequenciamento
	DGGE	
	Análise do mismatch químico	
	Análise de heteroduplex	
	Sequenciamento	

RFLP – polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição; RT-PCR – PCR após a transcrição reversa; SSCP – análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples; DGGE – eletroforese em gel com gradiente desnaturante.

impregnação do mesmo em papel filtro, material que poderá ser posteriormente eluído e utilizado para extração de DNA, tanto com o uso de *kits* comerciais ou com protocolos adaptados para este tipo de material. Alternativamente, o papel filtro pode ser utilizado diretamente na reação de PCR. O sangue pode ser armazenado a -20°C por, pelo menos, um ano tempo antes de ser utilizado para extrair DNA e os papéis filtro podem ficar em geladeira por muitos anos, desde que se tome o cuidado de secar o sangue completamente antes do armazenamento. Uma outra alternativa, principalmente quando se trata de crianças pequenas, é a extração a partir de lavado ou raspado bucal. Esses métodos não invasivos apresentam o inconveniente de gerarem um quantidade muito menor de DNA do que a extração a partir de sangue periférico.

Outra fonte comum de DNA, especialmente nos casos de diagnóstico pré-natal, são as vilosidades coriônicas e as células do líquido amniótico. Neste caso, a principal vantagem é que os exames podem ser feitos diretamente no material, sem necessidade de cultivo prévio. Entretanto, é importante tomar cuidado com uma possível contaminação por células de origem materna.

Biópsias de pacientes e células em cultura também são utilizadas como fonte de obtenção de DNA. As biópsias são especialmente úteis em estudos de câncer ou doenças mitocondriais, casos

em que tecidos específicos podem apresentar diferenças na constituição do material genético com relação ao DNA do resto do corpo.

Finalmente, DNA pode ser obtido a partir de material armazenado, como tecidos em blocos de parafina ou de amostras de urina congeladas. Estas fontes são úteis para estudos retrospectivos, nos quais não é possível obter material diretamente dos pacientes.

De um modo geral, a técnica de PCR pode ser realizada com pouca quantidade de DNA e mesmo com um DNA fragmentado. Por outro lado, técnicas de hibridização, como *Southern blot*, necessitam da utilização de grandes quantidades de DNA e em boas condições, isto é, íntegro. Neste caso, o uso de técnicas que utilizam solução de fenol-clorofórmio no procedimento aumenta a qualidade e quantidade do DNA extraído. Por exemplo, a extração de DNA mitocondrial pode ser feita com a mesma técnica utilizada para extração de DNA nuclear de sangue periférico, mas resultados melhores são obtidos utilizando-se extração com fenol-clorofórmio.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada na análise molecular de doenças, desenvolvida por Mullis em 1985 (1). Esta técnica permite a análise de regiões específicas de um gene ou de fragmentos de cDNA. A PCR é um método *in vitro*, simples e rápido, que permite a

síntese enzimática de seqüências específicas de DNA gerando até 10 cópias a partir de uma única molécula alvo. Esta técnica permite a detecção e a análise de seqüências gênicas específicas em uma pequena amostra do paciente.

Uma reação de PCR padrão requer os seguintes componentes:

- DNA alvo: o DNA a ser amplificado;
- Oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*): em geral são dois pequenos oligonucleotídeos sintéticos que hibridizam com as regiões complementares no DNA alvo e adjacentes à região de interesse a ser analisada, servindo como um ponto de partida para a síntese de duas novas fitas de DNA;
- DNA polimerase: enzima que cataliza a formação de DNA a partir da adição de novos nucleotídeos complementares ao DNA alvo;
- Desóxi-ribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs): são os 4 nucleotídeos essenciais para a síntese de novas fitas de DNA pela DNA polimerase;
- Tampão de reação: fornece as condições de pH assim como o cofator para a reação.

A PCR constitui-se de uma série repetida de ciclos (em média de 30 a 35) envolvendo os seguintes passos:

- desnaturação do DNA → aquecimento da reação a 90-95°C para que o DNA alvo se apresente como fita simples)
- anelamento → resfriamento da reação para permitir a hibridização do *primer* com o DNA alvo de fita simples. Neste passo, a temperatura se baseia na T_m (*melting temperature*) dos *primers* que deve ser calculada de acordo com a sua composição em pares de base.
- extensão → a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA, tendo como molde a fita original, que

por sua vez tem como início o sítio de anelamento dos *primers*. Neste passo, a temperatura varia normalmente de 72 a 74°C, dependendo da temperatura ideal de atividade da enzima.

O resultado desta reação, que se completa em algumas horas, é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5' dos *primers*. Um exemplo dos resultados obtidos, após a análise por eletroforese, encontra-se na figura 1.

Variações do protocolo básico da PCR são utilizadas em aplicações específicas e ganham denominações próprias. Algumas delas são:

1. RT-PCR: esta técnica combina a síntese do DNA complementar (cDNA), que é obtida através de RNA por transcriptase reversa, com a amplificação por PCR (Veres *et al*, 1987 (2) não está nas referências). O método é utilizado na detecção e análise de RNA mensageiro (mRNA) em células e tecidos bem como na clonagem de DNA complementar (cDNAs). Brevemente, *primers* constituídos apenas de uma seqüência de nucleotídeos T (oligo dT) são utilizados para hibridizar a terminação poli A do mRNA e assim obter cDNA total, através de uma reação que utiliza a enzima transcriptase reversa. Após obtenção de cDNA total, uma reação de PCR normal com *primers* específicos para o gene escolhido é realizada para obtenção de uma quantidade de material suficiente para análise;

2. PCR Multiplex: é uma variação da técnica normal de PCR, onde são amplificados simultaneamente mais de um fragmento de DNA em um mesmo tubo de reação. Neste caso, são utilizados na reação mais de um par de *primers*, que hibridizam em regiões distintas do DNA. É uma

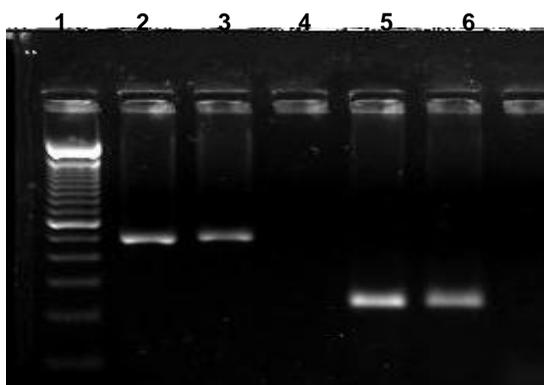


Figura 1. Produto amplificado dos exons 9 e 7 do gene IDS (MPS II). M: marcador de peso molecular; 1 e 2: produto amplificado do exon 9; 3: controle negativo do exon 9; 4 e 5: produto amplificado do exon 7; 6: controle negativo do exon 7.

técnica utilizada rotineiramente para detecção simultânea de várias mutações e/ou para utilizar um controle interno de amplificação;

3. ARMS-PCR: método utilizado para detecção de mutações que não se encontram situadas em um sítio de restrição. Neste caso, utiliza-se um oligonucleotídeo complementar à seqüência normal do gene e um oligonucleotídeo complementar à seqüência mutante, em tubos de reação separados, visando uma amplificação alelo-específica.

A partir da obtenção de um produto amplificado, diversas técnicas podem ser utilizadas para a identificação de possíveis alterações na seqüência de DNA presentes nestes fragmentos, tais como digestão com endonucleases de restrição, SSCP, etc.

Eletroforese

A eletroforese é a técnica usada para separação de fragmentos de DNA, sendo utilizada para análise dos resultados de outros procedimentos laboratoriais, como extração de DNA, PCR, digestão com enzimas de restrição, etc. A mesma consiste na aplicação de uma corrente elétrica por uma fase semi-móvel (suporte), fazendo com que as moléculas migrem de acordo com a sua carga elétrica e peso molecular. A escolha do tipo e da concentração do suporte depende do tamanho dos fragmentos que se deseja separar e da necessidade de resolução dos mesmos, sendo utilizados em geral géis de agarose ou poliacrilamida. A corrente elétrica é conduzida por um tampão salino, em geral TAE (Tris-Acetato-EDTA) ou TBE (Tris-Borato-EDTA). O tempo de corrida também varia com o tamanho do fragmento que se deseja visualizar, utilizando-se, como referência, os chamados "marcadores de peso molecular" para estimativa do tamanho do fragmento visualizado.

Digestão com endonuclease de restrição

São enzimas de clivagem do DNA que reconhecem seqüências curtas de bases e fazem um corte na dupla hélice do DNA. Cada enzima reconhece apenas um tipo de seqüência palindrômica. Algumas cortam a molécula, produzindo pontas retas, enquanto que outras cortam entre as mesmas duas bases mas fora do ponto de simetria, produzindo pontas desiguais. A temperatura de reação varia, assim como a

necessidade de uso de outros adjuvantes como BSA. As enzimas de restrição do tipo coesivas são utilizadas para clonagem, devido à facilidade de ligação dos fragmentos por elas gerados.

Enzimas de restrição são bastante utilizadas para detecção de mutações. Algumas enzimas de restrição reconhecem sítios raros no genoma e são utilizadas, por exemplo, para digestão prévia ao *Southern blot*.

No caso da detecção de mutações de ponto utiliza-se uma enzima que tem seu padrão de corte alterado pela mutação, isto é, um sítio de restrição é criado ou abolido para determinada enzima. É preciso antes conhecer o padrão de restrição no fragmento de PCR e sempre realizar controles positivos para a digestão, além de um controle negativo (se possível) e a corrida no mesmo gel de um PCR não digerido, uma vez que a detecção se baseia na comparação dos tamanhos de fragmentos gerados (figura 2). Eventualmente, fragmentos de tamanhos que não correspondem ao padrão podem ocorrer. Nesses casos deve-se considerar a hipótese de que uma outra mutação tenha ocorrido e alterado outro sítio de restrição para a enzima.

SSCP (*Single-strand conformation polymorphism* ou Análise de conformação de cadeia simples)

Esta técnica permite detectar padrões de bandas alterados no DNA de fita simples após eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, após a coloração com prata, para evitar o uso de radioatividade. Este procedimento se baseia no fato de que duas moléculas de DNA de fita simples que diferem uma da outra por pelo menos um par de base, assumem uma conformação tridimensional diferente e migram em posições diferentes no gel (3). Assim, um fragmento de DNA de fita simples apresentando uma mutação teria uma mobilidade diferente no gel quando comparado com um fragmento de DNA normal. Esta mobilidade depende não só do tamanho do DNA a ser analisado mas também da sua conformação, que é determinada pela sua seqüência e dobramento. O SSCP é ideal para a análise de fragmentos pequenos (até 200 pb) e sua sensibilidade depende ainda de fatores como temperatura, percentagem de acrilamida e força iônica do tampão de eletroforese (3).

Um exemplo dos resultados obtidos podem ser observados na figura 3.

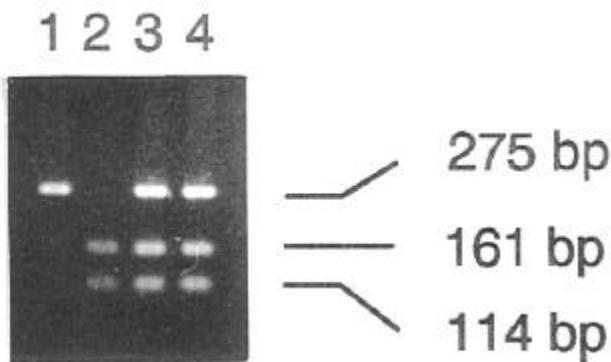


Figura 2. Detecção de uma mutação no gene da Arilsulfatase A através de digestão com endonucleases de restrição. Coluna 1 representa um indivíduo homocigoto para a seqüência normal do gene; coluna 2 representa um indivíduo homocigoto para a seqüência mutante e colunas 3 e 4 indivíduos heterocigotos.

Seqüenciamento

O seqüenciamento direto do DNA é considerado o “padrão ouro” para que se possa definir a seqüência de uma alteração de DNA. Vários métodos foram desenvolvidos para o seqüenciamento manual, sendo um dos mais utilizados o método de Sanger et al. (4), baseado na terminação de cadeia. Neste método, o *primer* utilizado para o seqüenciamento é desenhado de modo a ser complementar a uma das fitas de DNA e adjacente à seqüência de interesse, agindo como o ponto de iniciação da extensão da cadeia. Alternativamente, pode-se utilizar um dos *primers* que foram previamente usados para a PCR. Entre os componentes necessários para uma reação de seqüenciamento estão os dNTPs, que permitem a extensão da fita alvo, e os ddNTPs, análogos aos nucleotídeos mas sem o grupo hidroxila 3', necessário para a formação de uma ligação covalente com o grupo fosfato 5' do dNTP adjacente. Assim, durante a polimerização do DNA, ao ser incorporado um

ddNTP ao invés de um dNTP, o crescimento da cadeia é interrompido.

O seqüenciamento requer a realização de 4 reações que são feitas paralelamente, cada uma contendo o *primer*, o DNA alvo, a *Taq* polimerase e os dNTPs. Entretanto, para cada uma das reações é adicionada uma pequena quantidade de cada ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) separadamente, de maneira que as 4 reações são conduzidas em paralelo. A medida que a cadeia vai sendo estendida (copiada), um dos 4 ddNTPs vai sendo incorporado no lugar dos dNTPs correspondentes num processo que ocorre ao acaso, gerando fragmentos de tamanhos variados que representam uma coleção total de reações para aquela base correspondente. Estas cadeias de DNA de tamanho variado são posteriormente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Este tipo de gel permite a separação de fragmentos que diferem em tamanho em apenas um par de base e a detecção é feita através de autoradiografia pelo uso de um dNTP ou *primer*

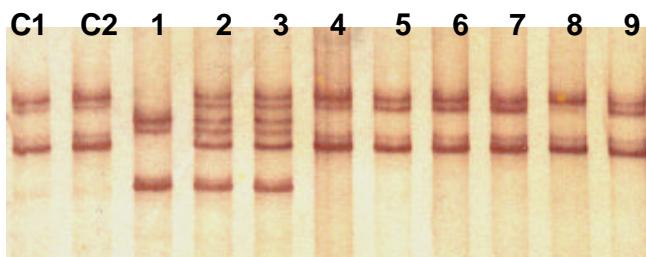


Figura 3. SSCP de um fragmento amplificado do exon 8 do gene ARSB (MPS VI). C1 e C2: Controles; 1: Paciente homocigoto; 2, 3: Irmãos heterocigotos; 4, 5, 6, 7, 8, e 9: Pacientes com padrão normal (figura gentilmente cedida por M. D. Petry)

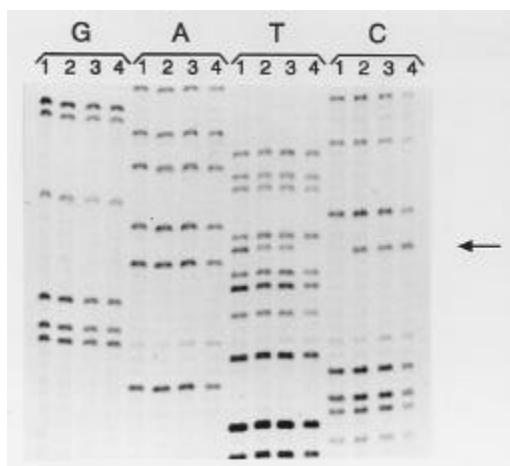


Figura 4. Seqüenciamento direto de um fragmento do gene da Arilsulfatase A. A seta indica o local da alteração T @ C que determina a mutação responsável pela doença. Coluna 1 representa um indivíduo normal; colunas 2 e 3 representam indivíduos heterozigotos; coluna 4 representa um indivíduos homozigoto para a seqüência mutante.

marcado com radioatividade na reação de seqüenciamento (figura 4). De uma maneira geral, este método permite a visualização de seqüências de fragmentos de DNA de 300-500 bases. Este método pode ser modificado pela substituição dos reagentes radioativos por *primers* marcados com fluorescência e pode ser adaptado para ser processado automaticamente.

Considerações finais

O uso dos conhecimentos da Biologia Molecular vem sendo aplicado nas mais variadas área da Medicina. No campo da genética molecular, os avanços das últimas décadas demonstram um enorme potencial desta tecnologia, que pode ser utilizada não somente no diagnóstico mas também no tratamento e prevenção de doenças hereditárias. As perspectivas para o novo século são bastante promissoras e indicam a possibilidade de grandes avanços no tratamento de doenças genéticas.

Referências

1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1998;16:1215.
2. Saiki RD, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science* 1985;230:1350-4.
3. Veres G, Gibbs RS, Scherer SE, Caskey CT. The molecular basis of the sparse fur mutation. *Science* 1987;237:415-7
4. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2766-70.
5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.