

A REVOLUÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR NA MEDICINA

Henrique Douglas M. Coutinho¹

RESUMO

A genética moderna busca desvendar a base molecular dos processos que geram uma doença genética, e melhorar os métodos de diagnóstico e tratamento. Estas descobertas têm contribuído para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem uma análise detalhada dos genes. Avanços técnicos importantes sobre o DNA, o mapeamento gênico, clonagem, citogenética, e em muitas outras áreas da genética, são essenciais para isso. As últimas três décadas testemunharam uma revolução tecnológica, que resolveu os problemas referentes à obtenção de material genético, em quantidade e pureza suficientes, para que possa ser estudado. Essas duas tecnologias complementares são a clonagem molecular e a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Palavras-chave: Biologia molecular. Genética. Clonagem molecular. PCR.

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da genética moderna é desvendar a base molecular das mutações que levam a uma doença genética, e utilizar esse conhecimento para melhorar os métodos de diagnóstico e tratamento (NUSSBAUM *et al.*, 2002). As descobertas em genética molecular têm contribuído muito para o desenvolvimento de novas e revolucionárias tecnologias que permitam a análise detalhada de genes normais e anormais (JORDE *et al.*, 2002). A aplicação dessas técnicas tem aumentado a compreensão dos processos moleculares em todos os níveis, do gene ao organismo por completo, como também apoiado o desenvolvimento de uma vasta gama de procedimentos laboratoriais para a detecção e o diagnóstico das doenças genéticas (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Avanços significativos ocorreram na tecnologia do DNA, no mapeamento gênico, clonagem, citogenética e em muitas outras áreas da genética.

Os geneticistas moleculares enfrentam dois obstáculos fundamentais para desenvolver suas investigações sobre a base molecular das doenças. O primeiro obstáculo é obter uma quantidade suficiente de uma seqüência de DNA ou RNA de interesse, que

¹ Professor da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ e da Universidade Regional do Cariri – URCA.

permita sua análise. O segundo obstáculo é o de purificar a seqüência de interesse dentre todas os outros segmentos de DNA ou moléculas de RNAm (RNA mensageiro) presentes na célula. As últimas três décadas testemunharam uma revolução tecnológica, que resolveu tanto os problemas de quantidade quanto os de purificação. Essas duas tecnologias complementares são a clonagem molecular e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

2 CLONAGEM MOLECULAR

O processo de clonagem molecular envolve a transferência de uma seqüência de DNA de interesse para uma única célula de um microorganismo. O microorganismo é subsequente cultivado, de modo a reproduzir a seqüência de DNA junto com seu próprio complemento de DNA. Grandes quantidades de seqüência de interesse podem ser isoladas em forma pura, para uma análise molecular detalhada (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Um dos principais avanços no desenvolvimento da clonagem molecular foi a descoberta, no início da década de 1970, das endonucleases de restrição bacterianas (enzimas de restrição), enzimas que reconhecem seqüências bifilamentares específicas no DNA, e o clivam no sítio de reconhecimento ou próximo a ele. Hoje, são conhecidas mais de 1000 dessas enzimas, e a maioria tem sítios de reconhecimento que consistem em quatro ou seis pares de bases, embora algumas tenham sítios maiores. Em geral, as seqüências são denominadas palíndromos, pois a seqüência de bases no sítio de reconhecimento age no sentido de 5' para 3' e é a mesma, em ambos os filamentos de DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

A clivagem de uma molécula de DNA com uma determinada enzima de restrição digere o DNA em uma coleção característica e reproduzível de fragmentos, os quais refletem a freqüência e a localização de sítios específicos de clivagem. Esta propriedade das enzimas de restrição tem duas implicações importantes e centrais ao seu papel na tecnologia do DNA recombinante e conseqüentemente à genética médica. A primeira é que a digestão de amostras de DNA genômico com enzimas de restrição permite que se examine uma seqüência particular de nucleotídeos dentre várias outras. A segunda é que todas as moléculas de DNA digeridas por uma determinada enzima de restrição que dão origem a duas novas moléculas de DNA podem ser unidas novamente, *in vitro*, pela interação de suas pontas complementares de bases, que é seguida pelo término das

seqüências fosfodiéster em cada filamento por uma enzima chamada **DNA ligase**. Essa etapa de ligação cria uma molécula de DNA “recombinante”, com uma ponta derivada de uma fonte de DNA e a outra derivada de uma fonte diferente (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

A técnica de DNA recombinante consiste em determinar um organismo para doar o DNA (organismo em estudo) para análise, que é denominado **organismo doador**. O procedimento básico é extrair e cortar o DNA de um genoma doador em fragmentos, contendo de um a vários genes, e permitir que esses fragmentos sejam individualmente inseridos em pequenas moléculas de DNA abertas, de replicação autônoma, tais como os plasmídios bacterianos. Essas pequenas moléculas circulantes atuam como portadoras ou **vetores** dos fragmentos de DNA. As moléculas vetoras, com suas inserções, são chamadas de **DNA recombinante**, porque consistem em novas combinações do DNA do genoma doador (que pode ser de qualquer organismo), com o DNA vetor de uma fonte totalmente diferente (geralmente um plasmídio bacteriano ou um vírus). A mistura do DNA recombinante é, então, usada para transformar células bacterianas. Assim, as células bacterianas são plaqueadas e deixadas crescer em colônias. Uma célula individual transformada com um único vetor recombinante irá se dividir em uma colônia com milhões de células, todas levando o mesmo vetor recombinante. Uma colônia individual contém uma população muito grande de inserções idênticas de DNA, e essa população é chamada de **clone de DNA**. (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

3 VETORES

Plasmídios - São moléculas circulares e bifilamentares de DNA, que se replicam extracromossomicamente em bactérias e leveduras. Os plasmídios especificamente destinados à clonagem molecular em geral são pequenos (vários kb de tamanho), e contêm uma origem de replicação (para se replicar em *Escherichia coli* ou em leveduras), um ou mais marcadores selecionáveis (tais como um gene que confere resistência a antibióticos) e um ou mais sítios de restrição que podem ser cortados e usados para a ligação de moléculas exógenas de DNA. A clonagem em plasmídios é um procedimento padrão para a análise de moléculas pequenas de DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Bacteriófago lambda - É outro vetor muito usado. Vírus bacteriano com uma molécula de DNA bifilamentar relativamente grande (cerca de 45 kb). Cerca de um terço

do genoma de bacteriófago não é essencial (“fragmentos internos”) para o crescimento e a lise, e pode ser substituído por outras seqüências de DNA. Assim, o fago lambda é extremamente adequado à clonagem de trechos de DNA humano de até 20 kb (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Cosmídios - Uma desvantagem dos plasmídios padrão como vetores é que eles são ineficientes para a introdução de moléculas de DNA recombinante nas bactérias, se as inserções forem maiores que cerca de 20 kb. Um método para superar essa ineficiência foi o desenvolvimento de vetores cosmídios. Eles são essencialmente plasmídios que usam a habilidade das partículas infecciosas do bacteriófago lambda, para “embalar” eficientemente grandes pedaços lineares de DNA em capas de proteína, que então se ligam à superfície das bactérias e injetam seus conteúdos de DNA. A limitação do tamanho da inserção do cosmídio é que lambda não é capaz de acomodar seu DNA, haja ou não uma inserção, se o cromossomo do bacteriófago exceder aproximadamente 50 kb de tamanho (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Um típico exemplo da utilização de cosmídios no diagnóstico de doenças genéticas é a detecção de microdeleções causadoras da Síndrome de Rubinstein-Taybi, em que cinco cosmídios (RT100, RT102, RT191, RT203 e RT166) podem ser usados simultaneamente para detectar deleções submicroscópicas (STEVENS, 2003).

Cromossomos artificiais de bactérias - No final da década de 1990, tornou-se disponível a tecnologia para clonar, em bactérias, fragmentos de DNA muito maiores que os cosmídios. Tais plasmídios enormes são chamados de cromossomos artificiais de bactérias (BCAs). Os BCAs podem levar inserções de DNA humano de 100 a 300kb de tamanho (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Cromossomos artificiais de leveduras - Para muitos enfoques de clonagem gênica e mapeamento gênico é vantajoso isolar o maior pedaço possível de DNA humano. O vetor de clonagem com a maior capacidade é o cromossomo artificial de leveduras (YAC). Dois braços, um contendo um telômero de levedura, um centrômero e um marcador selecionável, e outro contendo um telômero e um segundo marcador selecionável, estão ligados às pontas de grandes fragmentos de restrição gerados pela digestão parcial do DNA genômico, criando assim um cromossomo artificial. Esses fragmentos são transferidos para um hospedeiro (*Saccharomyces cerevisiae*), onde se replicam e se segregam como cromossomos normais lineares de levedura. Os YACs permitem a clonagem e o isolamento de fragmentos de DNA de até 1000 a 2000kb de tamanho, bem menores que um

cromossomo humano normal, mas aproximadamente do mesmo tamanho de um cromossomo normal de levedura (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

4 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS

A finalidade da clonagem molecular é isolar um determinado gene ou outra seqüência de DNA, em grandes quantidades, para posterior estudo. Um enfoque comum para gerar grandes quantidades de uma seqüência é construir um conjunto de clones de bactérias ou leveduras que contenham um vetor, no qual os fragmentos de DNA foram inseridos. Tal coleção de clones é chamada de “Biblioteca”, a qual, pelo menos teoricamente, contém todas as seqüências encontradas na fonte original, incluindo sua seqüência de interesse. Temos, então, que identificar o clone ou os clones de interesse na Biblioteca usando métodos sensíveis de triagem que, em alguns casos, são capazes de encontrar até mesmo uma única cópia do clone de interesse em uma coleção de até 10 milhões de clones iniciais (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Outro tipo comum de biblioteca usada para isolar genes é a de DNAc, a qual representa cópias de **DNA complementar** da população de RNAm, presente em um determinado tecido. Tais Bibliotecas de DNAc em geral são preferíveis às genômicas, como uma fonte de genes clonados, pois, como o clone é feito a partir do RNAm, o DNAc não tem as seqüências reguladoras anteriores e posteriores (upstream e downstream), nem os íntrons. Portanto, o DNAc dos eucariontes pode ser traduzido em proteínas funcionais nas bactérias, uma característica importante quando se expressam genes eucarióticos em hospedeiros bacterianos. Um DNAc não fornece nenhuma indicação do tamanho ou do número de éxons ou a seqüência dos pontos de corte em 5' e 3' (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Vários métodos foram desenvolvidos para clonar DNAc, todos eles baseados na enzima **transcriptase reversa**, uma DNA polimerase dependente de RNA, derivada de retrovírus que pode sintetizar um filamento de DNAc, a partir de um molde de RNA. A transcriptase reversa necessita de um *primer* para iniciar a síntese de DNA. Em geral, é usado um oligonucleotídeo contendo timinas (oligo-dT). Esse curto homopolímero liga-se à cauda poliA, na ponta 3' das moléculas de RNAm, e assim inicia a síntese de uma cópia complementar. Esse DNAc unifilamentar é então convertido em uma molécula

bifilamentar por um dos vários métodos disponíveis, e o DNAc bifilamentar pode então ser ligado a um vetor adequado, em geral um plasmídeo ou um bacteriófago, para criar uma biblioteca de DNAc que represente todos os RNAm originalmente transcritos encontrados no tipo de célula ou tecido inicial (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

5 A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A **reação em cadeia da polimerase** (PCR) é uma alternativa à clonagem para gerar, essencialmente, quantidades ilimitadas de uma seqüência de interesse. A PCR pode amplificar seletivamente uma única molécula de DNA ou RNA vários bilhões de vezes em algumas horas, e revolucionou tanto o diagnóstico molecular quanto a análise das doenças genéticas(NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Os enfoques de RFLP e VNTR que foram úteis em muitas aplicações, originalmente dependiam da transferência de Southern e dos procedimentos de clonagem. Essas técnicas apresentam algumas limitações. A clonagem consome muito tempo, em geral precisando de uma semana ou mais de tempo de laboratório. Além disso, o enfoque padrão de transferência de Southern requer quantidades relativamente grandes de DNA purificado, em geral vários microgramas (até 1ml de sangue fresco seria necessário para produzir esse DNA).

Um enfoque mais novo para se fazer cópias de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR), tornou a detecção da variação genética ao nível de DNA muito mais eficiente. O processo da PCR, resumidamente, exige quatro componentes: (1) Dois *primers*, consistindo em 15 a 20 bases de DNA cada. Os *primers* correspondem a seqüências de DNA imediatamente adjacentes à seqüência de interesse (essa seqüência pode conter uma mutação que cause doença, ou pode conter um polimorfismo de repetição de microsatélite); (2) DNA polimerase, uma forma termicamente estável dessa enzima, inicialmente derivada da bactéria *Thermus aquaticus*, efetua o processo vital de replicação de DNA; (3) Um grande número de nucleotídeos livres de DNA e; (4) DNA genômico de uma pessoa. Devido à extrema sensibilidade da PCR, a quantidade desse DNA pode ser muito pequena.(JORDE *et al.*, 2002).

O DNA genômico é inicialmente aquecido a uma temperatura relativamente alta (95°C mais ou menos), de modo que ele se desnatura e fica unifilamentar. Esse DNA é,

então, exposto a grandes quantidades de *primers*, com os quais se hibridiza, ou se helicoidiza, por meio das bases complementares adequadas do DNA genômico, à medida que é esfriado a uma temperatura de helicoidização de aproximadamente 35° a 65°C. O DNA é então aquecido a uma temperatura intermediária (70° a 75°C). Na presença de um grande número de bases livres do DNA, um novo filamento de DNA é sintetizado pela DNA polimerase, a essa temperatura, ampliando a seqüência do *primer*. O DNA recém-sintetizado consiste em um duplo filamento que tem a ponta 5' do *primer* em uma extremidade, seguido das bases adicionadas por meio da ampliação do *primer* pela DNA polimerase. O DNA bifilamentar é, então, aquecido novamente a uma alta temperatura, fazendo com que ele se desnature. O ciclo de aquecimento/resfriamento é repetido. Agora, o DNA recém-sintetizado serve como molde para outras sínteses. À medida que os ciclos de aquecimento/resfriamento são repetidos, o DNA ligado ao *primer* é amplificado geometricamente: o número de cópias dobra a cada ciclo. Daí o processo ser chamado de “reação em cadeia”. Tipicamente, os ciclos são repetidos 20 a 30 vezes, produzindo milhões de cópias do DNA original (JORDE *et al.*, 2002).

Em resumo, a PCR é uma amplificação enzimática de um fragmento de DNA (o alvo) situada entre dois “*primers*” oligonucleotídicos. Esses *primers* são criados de modo que um deles seja complementar a um filamento da molécula de DNA, de um lado da seqüência-alvo e o outro seja complementar ao outro filamento da molécula de DNA, no lado oposto da seqüência-alvo. Como a ponta 3' de cada *primer* oligonucleotídico segue para a seqüência-alvo a ser amplificada, e os *primers* são flanqueadores da seqüência-alvo, os *primers* são amplificados pela síntese, pela DNA polimerase, da seqüência entre eles. Os *primers* são orientados de modo que iniciem dois novos filamentos de DNA, que sejam complementares e formem essencialmente uma segunda cópia da seqüência-alvo original. Ciclos repetidos de desnaturação por aquecimento, hibridização aos *primers* e síntese enzimática de DNA resultam em uma amplificação exponencial da seqüência-alvo de DNA. Com o uso de “máquinas de PCR” especificamente criadas, uma rodada de amplificação leva apenas alguns minutos. Em apenas algumas horas, muitos bilhões de cópias podem ser criadas a partir de uma seqüência inicial (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

A amplificação rápida de seqüências específicas por PCR pode ser usada para facilitar a clonagem de genes específicos, a partir de amostras de genes específicos de amostras de DNA para a análise de mutação. Trechos particulares de um gene (em geral éxons) de um DNA podem ser rapidamente amplificados usando-se *primers* específicos

para o gene normal. O gene mutante pode, então, ser facilmente seqüenciado ou testado pelos métodos de hibridização ASO. O que era um procedimento muito trabalhoso, envolvendo a construção de uma biblioteca genômica ou de DNAc, a partir do DNA ou do RNA dos pacientes, seguido de triagem do gene de interesse, agora pode ser feito em menos de um dia. A PCR facilitou muito o desenvolvimento e a aplicação clínica de muitos testes diagnósticos de DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Reação em cadeia de Polimerase também pode ser aplicada à análise de pequenas amostras de RNA, um procedimento em geral chamado de PCR de transcriptase reversa. Um único filamento de DNAc é sintetizado a partir do RNAm de interesse com a mesma transcriptase reversa, que é usada para preparar bibliotecas clone de DNAc. Os *primers* de PCR são então adicionados, juntamente com a DNA polimerase, como no caso da PCR de DNA. Um dos oligonucleotídeos inicia a síntese do segundo filamento do DNAc, que em sua forma bifilamentar serve como alvo para a amplificação pela PCR. (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

A PCR é uma técnica extremamente sensível. Ela permite a detecção e análise de seqüências gênicas específicas em uma amostra do paciente sem clonagem e sem a necessidade de transferência de Southern ou Northern. As análises podem ser feitas até mesmo em uma única célula obtida de um fio de cabelo, das poucas células bucais presentes em um bochecho, de um único blastômero removido de um embrião no estágio de quatro células, de espermatozóides colhidos de uma amostra vaginal de uma vítima de estupro, ou de uma gota de sangue seco da cena de um crime. No entanto, esta técnica elimina, portanto, a necessidade de preparar grandes quantidades de DNA ou RNA das amostras de tecido. Ela está rapidamente se tornando um método padrão para a análise de amostras de DNA e RNA nos laboratórios de pesquisa, de diagnóstico clínico molecular, nos forenses e de medicina legal. É mais rápida, menos dispendiosa, mais sensível e usa menos amostras do paciente que qualquer outro método de análise de ácidos nucléicos. (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Como técnica revolucionária e moderna, a PCR tem um amplo leque de utilizações, como: (1) Identificação de bactérias (por exemplo, *Mycobacterium tuberculoses*, *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia pestis*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e demais espécies de *Mycoplasma*, *Legionella pneumophila*, *Legionella dumoffi*, *Escherichia coli*, todas as espécies de *Shigella*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*,

Staphylococcus aureus e outras inúmeras mais); (2) Identificação de vírus (por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana, vírus de células linfóides T humanas, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus do Herpes Simplex, vírus Epstein-barr, citomegalovírus, vírus Varicella-Zoster, Parvovírus, vírus da Influenza A e B, Rotavírus, Adenovírus humano, vírus da Rubéola, Enterovírus humanos, Papilomavírus humano e outros inúmeros mais); (3) Identificação de fungos (por exemplo, *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis carinii*, dentre outros inúmeros mais); (4) Identificação de Parasitas (por exemplo, *Trypanosoma cruzi* e tripanossomoses africanas, todas as espécies de *Leishmania* e *Plasmodium*, *Entamoeba histolytica*, *Babesia microti*, *Giardia lamblia* e outros inúmeros mais) (PERSING *et al.*, 1993).

A identificação da demência frontotemporal causada por Parkinsonismo-17 é identificada por testes genéticos moleculares usando a técnica de PCR e a análise “dot blot” reversa para oligonucleotídeos alelo-específicos, é indicado clinicamente para a identificação de mutações genéticas causadoras da doença (SWIETEN e HEUTINK, 2001).

A PCR é a técnica mais eficiente para a detecção de micróbios em espécimes clínicas, pois apresenta procedimentos cuidadosos e consegue detectar, mensurar e identificar espécies. A análise de resultados de PCR é muito importante no diagnóstico, particularmente em doenças inflamatórias crônicas. Uma aplicação clínica extremamente importante da PCR é o monitoramento da presença de bactérias no líquido cerebrospinal, que pode detectar uma série de bactérias, como a *Chlamydia pneumoniae* em doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes, como a esclerose múltipla (YAMAMOTO, 2002).

Para determinar a taxa de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria tenagophila* e em *Biomphalaria straminea* foi utilizada a reação em cadeia da polimerase em baixa stringência (LS-PCR), como técnica complementar ao método de exposição à luz. A LS-PCR foi padronizada em laboratório para detectar o DNA do trematódeo, em *B.glabrata*. A taxa de infecção pelo *S. mansoni* foi maior quando se utilizou a técnica convencional e a LS-PCR. O perfil do DNA do parasita foi detectado após sete dias de exposição a miracídios em ambas as espécies, quando utilizou-se a LS-PCR. Essa técnica possibilita a detecção precoce de focos de transmissão, em áreas endêmicas, antes do início da eliminação das cercarias, demonstrando assim a importância da PCR na prevenção da Esquistossomose.(JANNOTTI-PASSOS e SOUZA, 2002).

Para a análise de deleções em pacientes com distrofinopatias, a técnica de PCR simplifica muito os testes e os torna mais rápidos e com menor custo. São utilizados múltiplos *primers* simultaneamente para amplificar muitos éxons numa mesma reação e, assim, determinar a presença ou não de um determinado éxon por separação dos produtos da PCR por uma eletroforese em gel, em que o DNA é fixado no mesmo (KORF *et al.*, 2000).

A identificação molecular de membros do complexo *Mycobacterium avium* é feita através da técnica de PCR, já que a identificação bioquímica não permite a discriminação de suas espécies. A amplificação por PCR de DT1 e DT6, duas seqüências de cópia única identificadas no genoma de *M. avium* sorotipo 2, da seqüência de inserção IS1245, encontrada consistentemente em cepas de *M. avium* e de um fragmento do gene da proteína de choque térmico hsp65, seguida da análise do polimorfismo de restrição são testes rápidos e acurados para a diferenciação das espécies *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* (SIRCILI *et al.*, 1999).

A técnica de PCR é utilizada para a análise de variabilidade genética de agentes patogênicos em humanos, como, por exemplo, a identificação da variabilidade genética de isolados de HIV-1, em que o estudo da seqüência de nucleotídeos e a análise filogenética do gene *env* 11, isolado do HIV-1, detectaram a presença de um tipo recombinante similar, mas não idêntico, em sua seqüência de nucleotídeos, aos demais mosaicos já descritos (PROIETTI *et al.*, 1999).

Outro exemplo de análise de agentes patogênicos é a identificação do vírus da Dengue tipo 3. O vírus foi isolado em cultura de células C6/36 inoculadas com soro colhido de um paciente. O sorotipo 3 foi identificado por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais tipo-específico, e posteriormente foi confirmado por PCR (ROCCO *et al.*, 2001).

6 DNA POLIMÓRFICOS AMPLIFICADOS ALEATORIAMENTE (RAPD)

Um único *primer* de PCR criado aleatoriamente, em geral amplificará, ao acaso, várias regiões diferentes do genoma. A seqüência única “encontrará” o DNA delimitado por duas cópias invertidas da seqüência *primer*. O resultado será um grupo de bandas de DNA amplificadas com tamanhos diferentes. Em um cruzamento, algumas das bandas

amplificadas podem ser únicas para um genitor e, neste caso, podem ser tratadas como loci heterozigoto (+/-), e usadas como marcadores moleculares na análise de mapeamento. Note, também, que o grupo de fragmentos de DNA amplificados (chamados de **RAPD**) é um outro tipo de *fingerprint* de DNA, que pode ser usado para caracterizar um organismo individual. Tais marcas de identificação podem ser muito úteis na genética rotineira ou em estudos populacionais (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

A técnica RAPD pode ser utilizada para identificar muitas doenças genéticas, doenças causadas por bactérias (a *Borrelia burgdorferi*, por exemplo, e suas demais espécies), doenças causadas por vírus (o Papilomavírus humano, por exemplo), e também pode ser utilizada para detectar muitos outros microorganismos causadores de doenças (fungos, parasitas humanos, etc) (PERSING *et al.*, 1993).

THE REVOLUTION OF MOLECULAR BIOLOGY IN THE MEDICINE

ABSTRACT

The modern genetics search to show the molecular base of the processes that generate a genetic illness and to improve the methods of diagnosis and treatment. These discoveries have contributed for the development of techniques that make possible a detailed analysis of the genes. Important advances technician on the DNA, the genetic mapping, cloning, cytogenetics and in many other areas of the genetics are essential for this. Last the three decades had testified a technological revolution that decided the problems with the obtaining the genetic material in enough amount and pureness so that it can be studied. These two complementary technologies are the molecular cloning and the Polymerase Chain Reaction (PCR).

Key Words: Molecular biology. Genetics. Molecular cloning. PCR.

REFERÊNCIAS

- GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- JANNOTTI-PASSOS, L. K.; SOUZA, C. P. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 42, n. 5, p. 291-294. 2000.

- JORDE, L. B. et al. **Genética médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- KORF, B. R.; DARRAS, B. T.; URION, D. K. **Dystrophinopathies**. Disponível em: <<http://www.genetests.com>>. Acesso em: 07 maio 2005.
- NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R.; WILLARD, H. F. **Thompson e Thompson: genética médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- PERSING, D. H. et al. **Diagnostic molecular microbiology principles and applications**. ASM press. 1993.
- PROIETTI, A. B. F. C. et al. Genetic variability of HIV-1 isolates from Minas Gerais, Brazil. **Rev. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 141-143. 1999.
- ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from na imported case. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57. 2001.
- SIRCILI, M. P.; ROXO, E.; LEÃO, S. C. Discrimination of members of the Mycobacterium avium complex by polymerase chain reaction. **Rev. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 144-148. 1999.
- STEVENS, C. A. **Rubinstein-Taybi Syndrome**. University of Tennessee College of Medicine. Disponível em: <<http://www.genetests.com>>. Acesso em: 07 maio 2005.
- SWIETEN, J. C.; HEUTINK, P. **Frontotemporal Dementia with Parkinsonism-17**. Disponível em: <<http://www.genetests.com>>. Acesso em: 07 de maio 2003.
- YAMAMOTO, Y. P.C.R. Diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 508-514, 2002.