

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**USO DA TÉCNICA DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE –
POLYMERASE CHAIN REACTION (DDRT-PCR) EM ESCLEROSE LATERAL
AMOTRÓFICA (ALS)**

JAQUELINE DAS DORES DIAS CRUZ

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 1999

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**USO DA TÉCNICA DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE –
POLYMERASE CHAIN REACTION (DDRT-PCR) EM ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA (ALS)**

JAQUELINE DAS DORES DIAS CRUZ

LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 1999

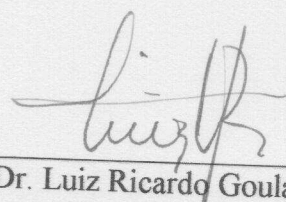
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

USO DA TÉCNICA DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE -
POLYMERASE CHAIN REACTION (DDRT-PCR) EM ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA (ALS)

JAQUELINE DAS DORES DIAS CRUZ

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 23/07/99

Nota 100

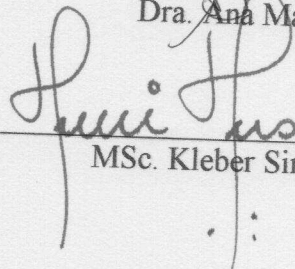


Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Prof.^a Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



Dra. Ana Maria Bonetti



MSc. Kleber Simônio Parreira

Uberlândia 02 de setembro de 1999

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vicente e Maria, por estarem sempre ao meu lado me incentivando, respeitando as minhas decisões e por serem os melhores pais do mundo, amo muito vocês.

Aos meus irmãos, do mais velho à caçula, Ademir, Alcenir, Acir, Cristina e Kássia pelo carinho e amor compartilhados.

Aos meus sobrinhos, Rodrigo, Bárbara, Maria Clara e Jordana, por ocuparem um lugar especial em minha vida.

Aos meus sogros Sr. Pira e D. Mair, por terem me adotado como filha, com muito amor e carinho.

Ao meu noivo Waldesse Jr., pelo seu amor e carinho que me conforta e me realiza. Pela nossa relação de confiança, respeito e amizade, além de um companheiro de laboratório. Amo muito você e quero estar sempre ao seu lado.

Enfim, a toda essa família que me completa e formam a base do meu SER. Amo muito todos vocês !

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a DEUS, por Ter me dado saúde para realizar esse trabalho.
 - Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo, meu orientador, por me aceitar em seu laboratório e transmitindo-me amizade e confiança.
 - À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, por ter me apresentado ao mundo científico.
 - Aos membros da Banca Examinadora, Profa. Dra Ana Maria Bonetti e Mestre Kleber Simônio Parreira, por terem aceito o meu convite e pelas colocações realizadas nesta monografia.
 - Ao grupo PET/Biologia, pela amizade, convivência e respeito adquiridos nesses anos.
 - Aos amigos de turma pelos anos que caminhamos e aprendemos juntos.
 - Ao André S. C., pelo seu incentivo e amizade.
 - Aos amigos do laboratório de Genética Molecular pela amizade e conhecimentos transmitidos.
 - Ao Junior, meu noivo e companheiro, por ter me tolerado nos momentos de angústia e estresse.
 - À CAPES pelo apoio financeiro.
- Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para com este trabalho.

MUITO OBRIGADA !

LISTA DE ABREVIÇÕES

μ l	microlitro(s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
dNTP	dexoxirribonucleotídeo(s) trifosfato
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
M	molar
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
μ M	micromolar
μ g	micrograma
pb	pares de base
pmol	pico-mol
U	unidade(s)
UV	ultra-violeta
V	volts
cm	centímetro(s)
mm	milímetro(s)
DEPC	Dietilpirocarbonato
KCl	Cloreto de potássio
°C	Graus Celsius
Rnases	Ribonucleases
MMLVRT	Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase
X	Veze
DTT	Ditiotreitól

RESUMO

A doença esclerose lateral amiotrófica (ALS – Amyotrophic Lateral Sclerosis), também chamada por Doença de Lou Gehrig, é caracterizada por uma desordem neurológica que causa uma degeneração progressiva dos neurônios motores da medula espinhal e cérebro, a qual resulta em paralisia e morte. A ALS pode ser familiar ou esporádica. Mutações no gene SOD1 (Superóxido Desmutase) foram associadas com muitos casos de ALS familiar. Em 1992, Liang descreveu a técnica Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR), que atualmente é uma das ferramentas mais eficiente para identificar e isolar genes diferencialmente expressos. O presente trabalho objetivou obter uma metodologia eficaz para extração de RNA total de amostras de sangue humano, como também encontrar condições ideais para realização da técnica DDRT-PCR com coloração por nitrato de prata. Também teve como objetivo, verificar a existência de polimorfismos nas amostras de quatro irmãos, sendo um afetado por ALS. O RNA total foi extraído com sucesso das amostras de sangue. Um teste com RNA extraído de sangue fresco e congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ também foi realizado. O cDNA foi sintetizado por uma transcrição reversa e em seguida amplificado combinando “primers” oligo-dT (T_{12}) com oito “primers” arbitrários OPA (10 pb) e a marcação utilizada foi não radioativa por nitrato de prata. Quanto ao teste com sangue fresco e congelado, o padrão de bandas, referente ao RNA do primeiro, foi muito melhor que o padrão encontrado para o RNA de sangue congelado. Os resultados das amostras dos quatro irmãos evidenciaram polimorfismos que variaram para cada combinação de “primers”. Alguns “primers” arbitrários apresentaram melhores padrões de ampliações do que outros (OPAs 16, 17 e 18). Os fragmentos variaram em média de 50 a 600 pb e algumas bandas exclusivas do indivíduo afetado, como por exemplo um fragmento menor que 50 pb para a combinação T_{12} CC e OPA 18, outro de aproximadamente 250 pb para a combinação T_{12} CG e OPA 18, foram destacadas e supostamente estão relacionadas com a esclerose lateral amiotrófica. A técnica foi otimizada para RNA extraído de sangue humano e a coloração por nitrato de prata pode ser uma alternativa à marcação radioativa para realização do DDRT-PCR, mesmo não detectando todos os fragmentos existentes devido à sua baixa sensibilidade.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS).....	01
1.2. Transcrição reversa.....	02
1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	03
1.4. Differential Display Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR).....	04
1.5. Aplicações do DDRT-PCR e refinamento da técnica.....	07
2. OBJETIVOS.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1. Obtenção das amostras de sangue.....	09
3.2. Extração do RNA total.....	09
3.3. Eletroforese e tratamento do RNA total.....	10
3.4. Differential Display Reverse Transcriptase – PCR (DDRT-PCR).....	12
3.4.1. Transcrição reversa.....	13
3.4.2. Amplificação do cDNA.....	14
3.4.3. Eletroforese dos produtos amplificados.....	15
3.4.4. Coloração e visualização dos produtos amplificados.....	15
3.5. Análise do gel.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS)

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS – Amyotrophic Lateral Sclerosis), também chamada de Doença de Charcot ou Doença de Lou Gehrig (DENG *et al.*, 1993) é uma desordem neurológica caracterizada por uma degeneração progressiva das células motoras neuronais na medula espinhal e cérebro, usualmente fatal dentro de cinco anos após o início dos sintomas, e cuja causa ainda é desconhecida (ROSEN *et al.*, 1993).

Esta doença, se apresenta sob duas formas: esporádica (SALS – Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis) e familiar (FALS – Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis). A SALS abrange 90% dos casos relatados e os 10% restantes são do tipo familiar de traço autossômico dominante (DFALS) e também autossômica recessiva (RFALS), que é rara (SIDDIQUE *et al.*, 1996). A ALS familiar é clinicamente similar à ALS esporádica (ROSEN *et al.*, 1993).

As Superóxido Desmutases (SOD) são um grupo de enzimas que catalisam a conversão do ânion superóxido (O_2^-) para peróxido de hidrogênio e oxigênio e, dessa forma, permitem a defesa celular contra O_2^- e seus derivados tóxicos. Existem três isoformas de SOD em humanos: superóxido desmutase

Cu/Zn citossólico (SOD1, Cu/Zn SOD); superóxido desmutase Mn (SOD2, Mn SOD) e superóxido desmutase extracelular (SOD3, ECSOD). Cada isoenzima está codificada por um gene diferente nos cromossomos 21q21, 6q27 e 4p, respectivamente. Nenhuma anormalidade em SOD2 ou SOD3 tem sido relatada em pacientes com FALS (SIDDIQUE *et al.*, 1996).

A SOD1 está presente no citoplasma da maioria das células, incluindo células vermelhas do sangue e é particularmente abundante nos neurônios (SIDDIQUE *et al.*, 1996).

Tem sido mostrado que algumas dessas doenças do tipo estão associadas a um defeito genético no cromossomo 21q e o gene SOD1 tem sido apontado como um responsável pela manifestação da esclerose lateral amiotrófica familiar (ROSEN *et al.*, 1993; DENG *et al.*, 1993). Isso se deve: 1) à proximidade do gene SOD1 do locus mapeado para FALS; 2) à diminuição da atividade SOD no fluido cérebro-espinhal de alguns pacientes ALS; 3) à importante função da SOD na homeostase dos radicais livres e 4) ao aparente papel dos radicais livres na neurodegeneração (DENG *et al.*, 1993).

Quarenta e sete mutações em SOD1 foram identificadas em pacientes com FALS (SIDDIQUE *et al.*, 1996). O DNA genômico de membros de famílias com FALS foram analisados para mutações em SOD1, o DNA é amplificado por PCR e examinado por SSCP (Single-Stranded Conformational Polimorphism) (DENG *et al.*, 1993).

1.2. Transcrição reversa

Denomina-se transcrição reversa o processo onde ocorre síntese de moléculas de DNA (cDNA) a partir de fitas simples de RNA. A primeira descrição dessa técnica ocorreu em 1987 (VERES *et al.*, 1987), onde utilizaram a enzima de retrovírus transcriptase reversa, para catalisar a síntese do cDNA.

1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (“PCR – Polymerase Chain Reaction”) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (INNIS e GELFAND, 1990; MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1985) e desde então revolucionou toda a Genética.

A PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação da PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes “primers” são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que “flanqueiam” a região alvo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Cada ciclo de PCR envolve 3 passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA molde é desnaturada através da elevação da temperatura para 92-95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35-60°C, dependendo essencialmente do tamanho da seqüência do “primer” utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “primer” com as seqüências complementares que “flanqueiam” a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada porção terminal 3’ dos “primers”. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência seja produzida no processo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Vários ciclos repetidos permitem a amplificação do fragmento, cujo tamanho é limitado pelos “primers” (porção 5’) (WHITE *et al.*, 1989).

O passo decisivo para a expansão da técnica de PCR ocorreu quando Saiki *et al.* (1988) isolaram uma DNA polimerase (Taq polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes térmicas e polimerisa a 72°C, mantendo assim a atividade por algumas horas a 95°C (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). As condições iniciais para a amplificação, tais como concentrações de MgCl₂, Taq e de “primers” e a temperatura de hibridização, devem ser definidas para cada par de “primers” (PASSAGLIA e ZAHA., 1996).

O avanço da técnica de PCR, aliada ao crescimento tecnológico, permitiu o desenvolvimento de novas metodologias para o estudo do DNA, como o Differential Display.

1.4. Differential Display Reverse Transcriptase – PCR (DDRT-PCR)

Os organismos superiores contêm cerca de 100.000 genes diferentes, dos quais somente uma pequena fração está expressa em qualquer célula. A escolha de quais genes são expressos é que determina os processos da vida: desenvolvimento, homeostase, resposta a estímulos, regulação celular, idade, etc. Assim, comparações da expressão gênica em diferentes tipos celulares ou tecidos fornecem informações úteis na compreensão dos processos biológicos que controlam nossas vidas (MANNIATIS *et al.*, 1987).

Um problema é encontrar meios de identificar e isolar esses genes que estão expressos diferencialmente nas várias células ou sob condições alteradas. As atividades dos genes são refletidas nos tipos e quantidades de suas espécies de mRNAs e proteínas (LIANG *et al.*, 1995).

Alguns critérios devem ser considerados em uma metodologia que vise caracterizar a expressão gênica: (1) a maioria dos mRNAs deve ser visualizada; (2) a reprodutibilidade deve ser alta; (3) deve permitir a comparação de mRNA de diferentes fontes; (4) as diferenças encontradas devem ser úteis para identificar e isolar os genes correspondentes, tornando-a uma técnica mais

potente que as análises de proteínas em gel, onde há dificuldade em obter proteína suficiente para a caracterização molecular e (5) deve ser rápida e fácil. (LIANG *et al.*, 1995)

A técnica "Differential Display" foi descrita por LIANG e PARDEE (1992) e LIANG *et al.* (1992, 1993) para identificar genes diferencialmente expressos entre as espécies de mRNAs, num par de populações de células mamárias. Posteriormente, foi nomeada DDRT-PCR de acordo com a terminologia da reação de polimerase em cadeia – PCR (BAUER *et al.*, 1993). Esse método é direcionado para a identificação de genes, em duas ou mais situações, detectando espécies individuais de mRNA que são mudadas em diferentes células eucarióticas e também permite recuperar e clonar o seu DNA.

Essa técnica têm sido amplamente utilizada, com sucesso, por vários grupos, para isolar genes expressos diferencialmente em várias situações biológicas, incluindo câncer, diabetes, embriogêneses, desenvolvimento cerebral e outros. Sob condições apropriadas, o padrão de fragmentos derivados de um tipo celular é reproduzível e pode ser comparado com os de outros tipos de células (WARTHOE *et al.*, 1995).

A estratégia do método consiste de três passos básicos e dois opcionais (WARTHOE *et al.* 1995): 1- transcrição reversa usando um grupo de "primers" 3' ancorados T₁₂VN (onde V= A, C ou G e N= A, C, G ou T) que se anelam na porção 3' do mRNA (cauda de poli(A)); 2- amplificação das espécies de cDNA usando um grupo de "primers" 5' arbitrários (20 a 26 diferentes) e "primers" 3' ancorados; 3- separação por eletroforese dos fragmentos resultantes; 4- reamplificação dos fragmentos que são diferentes entre as duas situações em estudo, clonagem e sequenciamento; 5- confirmação da expressão diferencial por uma técnica de análise de RNA (Northern Blotting, Rnase protection e/ou nuclear run-on). O esquema geral do processo está representado na Figura 1.

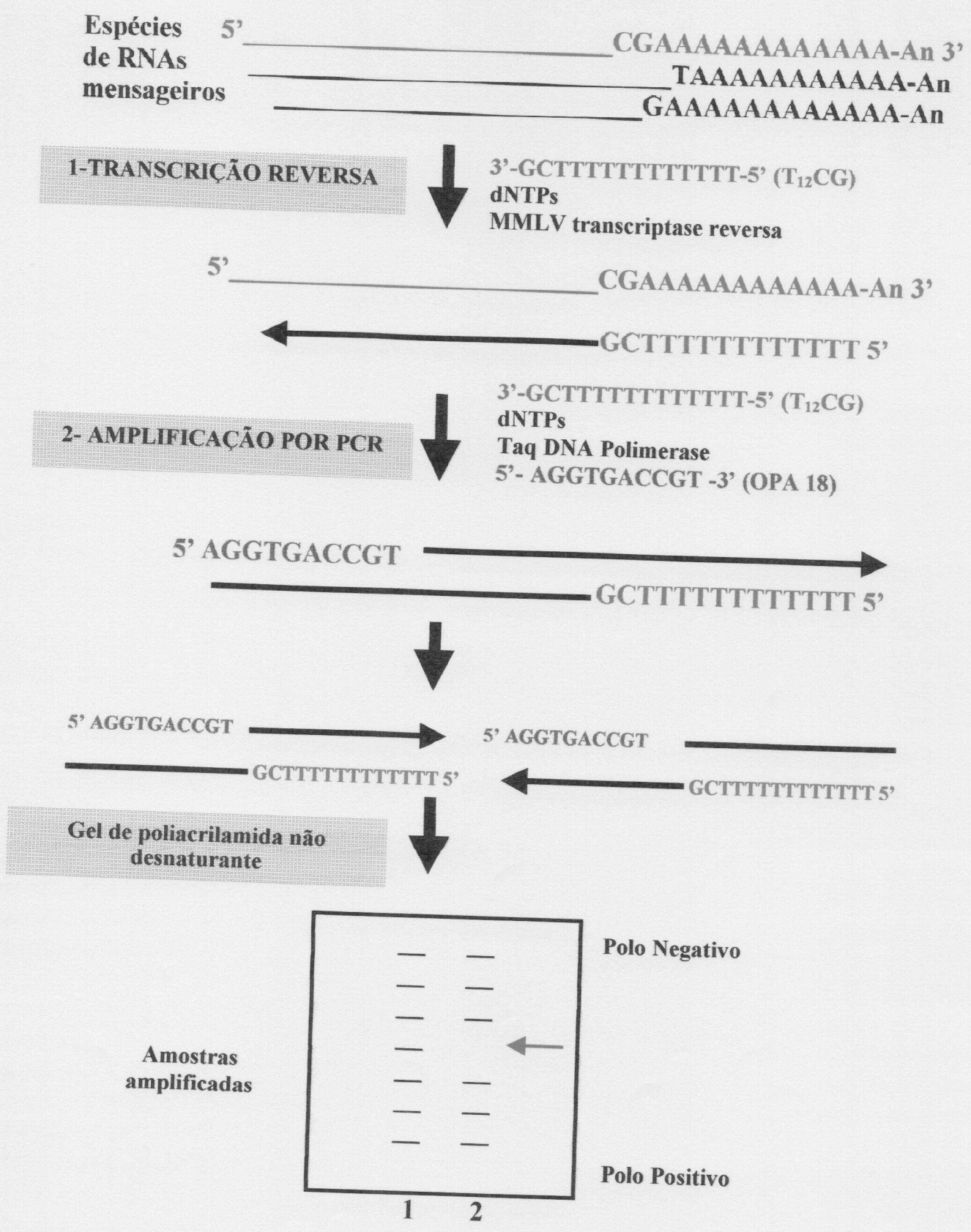


Figura 1: Estratégia básica da técnica do DDRT-PCR.

O DDRT-PCR usa combinações de “primers” arbitrários (extremidade 5') de 10 pb com “primers” ancorados (oligo dT) ao cDNA (extremidade 3') e gera fragmentos que se originam da cauda de poli(A) e estendem cerca de 50-600 nucleotídeos “upstream” (LIANG e PARDEE, 1992; BAUER *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1993). A técnica é útil para gerar um padrão completo de todos os mRNAs expressos numa célula, usando um número razoável de pares de “primers” (BAUER *et al.*, 1993).

Os “primers” arbitrários de 10 pb já haviam sido utilizados por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH e MACCLELLAND (1990) para amplificar polimorfismos no DNA, e mais recentemente, para obter mRNAs alvos de genes diferencialmente expressos (WELSH *et al.*, 1992).

1.5. Aplicações do DDRT-PCR e refinamento da técnica

Atualmente, essa técnica é a ferramenta mais eficaz no isolamento e sequenciamento de genes diferencialmente expressos. Sua aplicação é ampla em estudos de organismos como humanos, suínos, vegetais, microorganismos, e outros.

Em 1992, LIANG *et al.*, utilizaram o DDRT-PCR para comparar mRNAs de células epiteliais mamárias humanas normais e tumorais e descobriram que o gene S1 pode estar relacionado com o controle do crescimento normal dessas células do câncer de mama.

HELPS *et al.* (1995) utilizaram o DDRT-PCR em *Drosophila melanogaster* para caracterizar e isolar o gene homólogo ao gene BRC1 humano, que se expressa diferencialmente em tumor de mama.

CUNNINGHAN *et al.* (1996) estudaram o desenvolvimento de suínos e descobriram, via DDRT-PCR, um aumento na expressão de produtos de PCR

específicos durante a rápida alongação trofoblástica, o que ajudou a esclarecer alguns pontos no desenvolvimento desses animais.

Diversos pontos da relação de parasitismo entre *Anopheles gambiae* e seus hospedeiros foram esclarecidos por DIMOPOULOS *et al.* (1996), que detectaram cDNAs relacionados com maltase, uma subunidade da V-ATPase, uma proteína ligante de GTP, duas lecitinas diferentes. Também em 1996, KNOLL *et al.* descobriram dois novos transcritos específicos do coração e três genes induzidos por estresse em indivíduos portadores de isquemia temporária, com o uso do DDRT-PCR.

BYUN *et al.* (1998) utilizaram o DDRT-PCR para identificar cDNAs de células musculares lisas da aorta que apresentavam relação com a aterosclerose. Encontraram cDNAs com homologia para seqüências da Acetil-CoA sintetase II e proteína LIM-1, ambas já citadas como importantes na definição da aterosclerose.

Um trabalho interessante foi realizado por MALHOTRA *et al.*, em 1999, onde utilizaram o DDRT-PCR para estudar o desenvolvimento de órgãos em fetos humanos. Para isso, utilizaram o tecido hepático, selecionando os cDNAs diferencialmente expressos entre as amostras do feto e de adulto. Como resultado, eles isolaram vários genes que apresentavam-se expressos no feto (ex. fator-2 de crescimento tipo-insulina) e que estavam sem expressão no adulto e vice-versa.

Outros trabalhos foram realizados para melhorar a técnica, tais como os realizados por BAUER *et al.* (1993) que mostraram a eficiência de géis não desnaturantes na análise do DDRT-PCR.

A ampla utilização do DDRT-PCR deve-se a sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade e baixa quantidade de RNA necessária (LIANG *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1993; ZIMMERMANN e SCHULTZ, 1994; XINKANG *et al.*, 1995).

2 - OBJETIVOS

- Obter uma metodologia eficiente para extração de RNA total de amostras de sangue humano.

- Comparar resultados provenientes de amostras de sangue fresco e congelado a -80°C .

- Avaliar as melhores condições para realização da técnica DDRT-PCR em doenças humanas.

- Analisar a eficiência da coloração por nitrato de prata.

- Verificar a existência de polimorfismos, por DDRT-PCR, em uma família acometida por Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.1. Obtenção das amostras de sangue

As amostras de sangue de nove indivíduos de uma família acometida por ALS foram coletadas em tubos, por sistema *Vacutainer*, contendo EDTA para evitar a coagulação, e levadas para o laboratório onde foram mantidas a uma temperatura de -80°C , para evitar a degradação do RNA, para posterior extração.

3.2. Extração do RNA total

Inicialmente, o RNA total foi extraído utilizando-se TRIZOL Reagent (GIBCO – BRL). O protocolo adotado seguia as recomendações do fabricante, entretanto, variou-se a proporção desse reagente com relação ao volume de sangue utilizado (1:1, 2:1, 5:1 e 10:1). Durante o período de otimização, a

extração foi realizada a partir de sangue de indivíduos que não pertenciam à família acometida por esclerose lateral amiotrófica (ALS). Foram também realizados testes com sangue fresco e sangue congelado a -80°C .

Após a otimização do protocolo de extração de RNA total, foram feitas extrações das amostras dos indivíduos da família. Todas as precauções foram tomadas para evitar tanto a contaminação das amostras com RNases, quanto a contaminação pessoal, durante a manipulação de sangue humano.

O protocolo otimizado constou dos seguintes passos: a cada 100 μl de sangue total foi adicionado 1ml de TRIZOL Reagent (GIBCO-BRL). A solução ficou reagindo por 5 minutos em temperatura ambiente e, logo em seguida, adicionou-se 200 μl de clorofórmio. O tubo foi agitado por 15 segundos e deixado por 3 minutos em repouso. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e, então, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde adicionou-se 0,5 ml de isopropanol. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuscitado em, no mínimo, 1 ml de etanol 75%. O material foi centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado à temperatura ambiente para secar o "pellet" e, finalmente, esse foi ressuscitado em água tratada com DEPC 0,1%.

Os materiais de laboratório, como as ponteiras e microtubos eram novos e foram incubados em estufa a 65°C , por no mínimo três dias, para evitar a atuação de RNases que degradariam o RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989) e a água foi devidamente tratada com DEPC para inibir todo tipo de RNases. Todo o material utilizado e que teve contato com sangue humano foi descartado em vasilhames próprios, posteriormente autoclavado e eliminado de acordo com os procedimentos padrões adotados para lixo hospitalar.

3.3. Eletroforese e tratamento do RNA total

Após a extração, a qualidade do RNA foi verificada por eletroforese aplicando-se 3 a 6 µl de RNA total em gel de agarose 2%, tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X conforme SAMBROOK *et al.* (1989) e sob uma corrente constante de 150 V. Antes de ser aplicado no gel, o RNA foi diluído em 3µl de formamida e 3 µl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8,0) (GODING, 1998). A diluição em formamida foi para proteger o RNA de degradação (CHOMCZINSKI, 1992). Foi utilizado o corante brometo de etídio diluído no gel a uma concentração de 0,5 µg/ml de gel. As amostras foram visualizadas em transiluminador UV e fotografado em VDS (Video Documentary System), usando filtro laranja; com tempo de exposição, contraste e fator de correção da câmera variados.

Terminada a eletroforese do RNA total, as amostras que apresentaram DNA contaminante foram tratadas com RNase-free DNase I (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante (1U:100 µg de RNA). Todo o material extraído foi armazenado a -80°C para proteger o RNA de degradação por RNases.

3.4. Differential Display Reverse Transcriptase – PCR (DDRT-PCR)

A técnica do DDRT-PCR foi desenvolvida de acordo com LIANG e PARDEE (1992) e adotando os melhoramentos e refinamentos descritos por LIANG *et al.* (1993 e 1995), BAUER *et al.* (1993) e OLIVEIRA JR.(1999).

3.4.1. Transcrição reversa

Primeiramente, foram realizados experimentos com RNA de outros indivíduos não pertencentes à família de interesse, para otimizar o protocolo correto e assim obter uma transcrição reversa com a maior eficiência possível, uma vez que, esta é uma etapa fundamental no desenvolvimento do DDRT-PCR.

Quanto aos membros da família, apenas 4 foram escolhidos, incluindo o indivíduo afetado. Esses são irmãos com idades próximas e isso diminui a diferença na expressão gênica decorrente da idade. Como os indivíduos são irmãos, há uma maior proximidade genética entre eles quando comparados aos demais membros da família e, conseqüentemente, menor diferença na expressão gênica.

Na otimização variou-se a quantidade de RNA em cada reação (2 μ l, 5 μ l e 8 μ l) e a concentração de dNTPs (20, 50 e 200 μ M).

No decorrer desse trabalho três “primers” oligo d(T) 3’ ancorados foram usados (T₁₂GC, T₁₂CC e T₁₂CG). Assim, após otimização, 5 μ l da amostra de RNA total foram transcritos reversamente na presença de 200 U de transcriptase reversa MMLV-RT, 50 μ M de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 20 pmoles “primer” T₁₂ (GC, CC e CG), 10 mM de DTT, 15 U de Rnasin (GIBCO-BRL), 5 μ l de tampão 5X (Tris-Cl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) e completou-se com água para um volume final de 25 μ l. A reação foi incubada por 10 minutos a 65°C, 60 minutos a 37°C e 5 minutos a 95°C (LIANG *et al.*, 1995). A MMLV-RT foi adicionada após 10 minutos de incubação a 37°C para aumentar a eficiência na síntese do cDNA (LIANG *et al.*, 1995). A temperatura final de 95°C foi utilizada para inativar a transcriptase reversa, pois esta inibe a atuação da Taq DNA polimerase na amplificação do cDNA (SELLNER *et al.*, 1992; FEHLMANN *et al.*, 1993).

3.4.2. Amplificação do cDNA

A amplificação ocorreu via PCR, onde foram feitos diferentes ensaios para otimizar as concentrações de “primers”, dNTPs e cDNA. Após a etapa de otimização, foram selecionados oito “primers” curtos de 10 pb, com seqüências arbitrárias e ricos em G e C (cerca de 50 a 60%), da OPERON Technology (Tabela 1). Em cada reação de amplificação foram utilizados 2 μ M de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmoles de “primer” ancorado T₁₂, 1 U de Taq DNA Polimerase, 5 pmoles de “primer” arbitrário de 10 pb, 2 μ l de tampão 10 X (Tris-Cl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 1,5 mM) e 5,0 μ l de cDNA. O volume final foi completado com água ultrapura até 20 μ l.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-150 MiniCycler™, em 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 30 segundos e uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos, conforme LIANG *et al.* (1995).

Tabela 1. “Primers” selecionados para amplificação e suas respectivas seqüências

“Primer”	Seqüência (5' → 3')
OPA05	AGGGGTCTTG
OPA 08	GTGACGTAGG
OPA 12	TCGGCGATAG
OPA14	TCTGTGCTGG
OPA15	TTCCGAACCC
OPA16	AGCCAGCGAA
OPA17	GACCGCTTGT
OPA18	AGGTGACCGT

3.4.3. Eletroforese dos produtos amplificados

Durante as otimizações e no teste com sangue fresco e congelado, as amostras foram separadas em gel de poliacrilamida (19:1-Bis:Acrilamida) 10%, não desnaturante, de dimensões 15 cm X 15 cm, 0.75 mm de espessura, tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 1X, conforme SAMBROOK *et al.* (1989) e sob uma voltagem constante de 250 V por cerca de 2 horas e 30 minutos.

Após a otimização, os produtos referentes aos quatro membros da família foram separados em gel de poliacrilamida (19:1 Bis:Acrilamida) 6%, não desnaturante, de dimensões 20 cm X 15 cm, 0.50 mm e 0.75 mm de espessura, sob as mesmas condições citadas anteriormente.

Cada amostra era composta de 7 µl de DNA amplificado e 3 µl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61 M, xileno cianol 4,64 M, sacarose 1,17 M e EDTA 0,1 M pH 8).

3.4.4 Coloração e visualização dos produtos amplificados

Logo após o término da eletroforese, o gel foi corado de acordo com BLUM *et al.* (1987), BASSAM *et al.* (1991) e OLIVEIRA JR. (1999). Primeiramente, foi deixado por 30 minutos em ácido acético 10%, lavado 2 vezes com água ultrapura por 2 minutos, corado por 30 minutos em solução composta de 200 mg de nitrato de prata e 150 µl de formaldeído em 100 ml de água. Após corado, o gel foi lavado 1 vez com água por 10-30 segundos e, finalmente, revelado em solução gelada composta de 3 gramas de carbonato de sódio, 150 µl de formaldeído e 20 µl de tiosulfato de sódio em 100 ml de água. O tempo de revelação foi variado pois, assim que as bandas se tornavam visíveis, a reação era interrompida com ácido acético 10%.

3.5. Análise do gel

Após a coloração do gel, esse foi colocado para secar em bastidores de madeira entre papel celofane. Quando seco, o gel foi copiado por “scanner” e, posteriormente, analisado em computador para verificar possíveis polimorfismos entre as amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do RNA total, utilizando a proporção adequada de TRIZOL Reagent (10 partes para cada parte de sangue), permitiu a obtenção de material com qualidade ideal para a realização do DDRT-PCR. Esse protocolo mostrou, ainda, ser rápido e prático, o que é extremamente vantajoso pois o RNA deve ser extraído rapidamente para evitar sua degradação. Na Figura 2, está representado o padrão do RNA obtido a partir deste protocolo, com baixa ou nenhuma contaminação por DNA.

Analisando a Figura 2, é possível verificar que a quantidade de RNA extraído é muito pequena quando comparado com o RNA total extraído de abelhas (OLIVEIRA JR, 1999). Pode acontecer de o RNA nem ser detectado em géis de agarose, o que foi observado em algumas extrações realizadas durante a otimização do DDRT-PCR. Entretanto, quantidades tão baixas quanto 0,02 µg (equivalente ao RNA de 200 células) são suficientes para realização do DDRT-PCR (LIANG *et al.*, 1993). Isso evidencia a enorme eficiência dessa técnica.

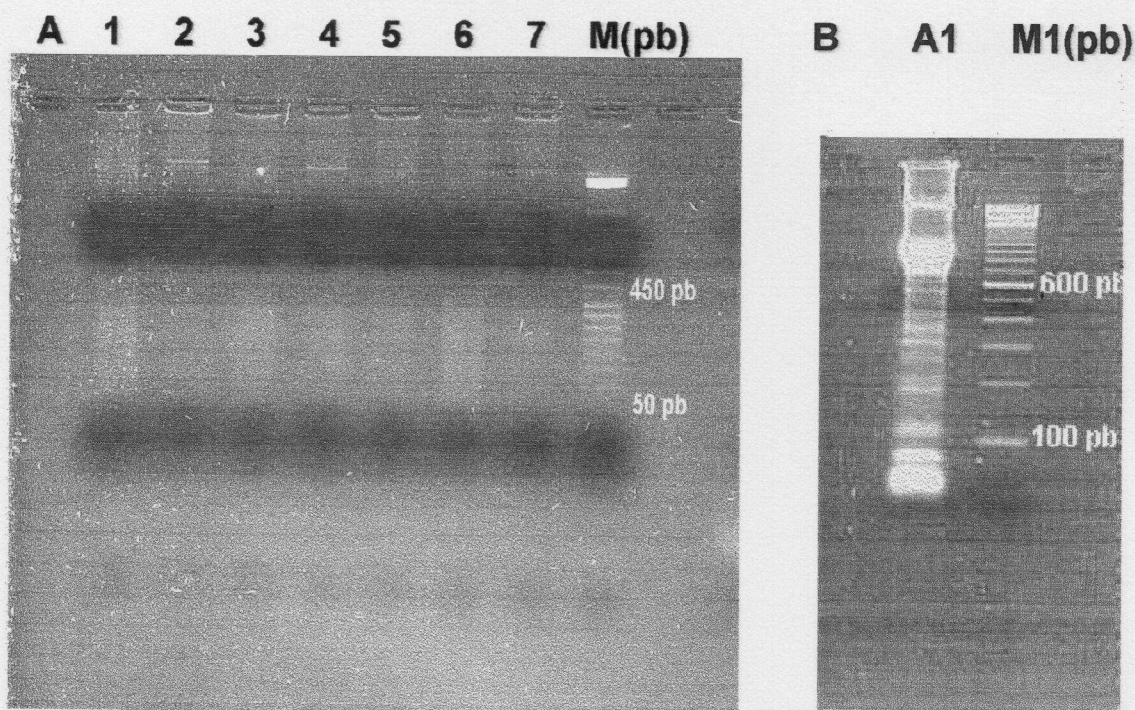


Figura 2: Géis de agarose 2% evidenciando padrões de RNA total extraído com TRIZOL. A- 1-7 representando amostras de alguns membros da família ALS, B- A1= amostra de *Apis mellifera*. M = marcador de 50 pb., M1= marcador 100 pb.

Testes com sangue fresco e congelado a -80°C foram realizados para verificar o padrão de bandas derivado de ambos. A Figura 3 evidencia que o DDRT-PCR realizado a partir de RNA extraído de sangue fresco possui um maior número de bandas por canaleta. Isso demonstra que o RNA está mais íntegro e em maior quantidade no sangue novo. Já o padrão do “display” para sangue congelado evidencia um RNA que sofreu certa degradação, a qual pode ter sido durante o processo de manipulação das alíquotas, realizado antes do congelamento, reforçando a necessidade de uma manipulação rápida do material.

A utilização dos géis de poliacrilamida 10% foi eficiente na detecção de bandas durante a otimização do experimento, além de seu fácil manuseio. Já os géis de poliacrilamida não desnaturante 6% foram escolhidos por apresentar uma melhor definição no padrão de bandas dos produtos amplificados e por ser adequado para se recuperar, reamplificar e sequenciar uma banda de interesse (GOULART FILHO, 1999). Já a espessura desses géis (0, 5 e 0,75 mm) não foi determinante na eficiência da coloração por nitrato de prata.

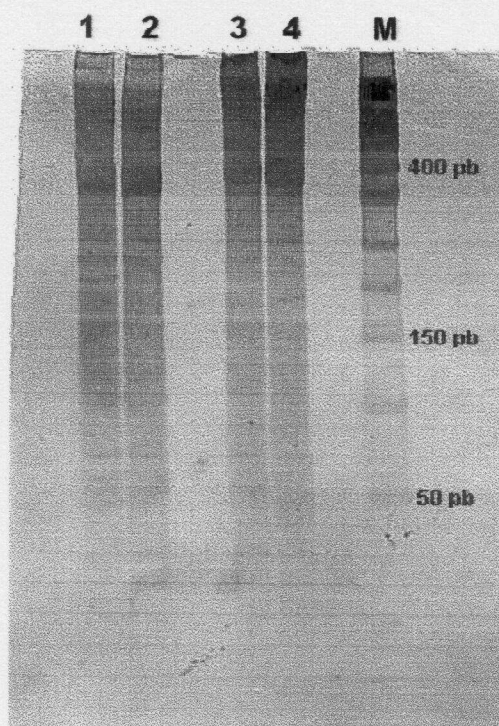


Figura 3: Perfil eletroforético das ampliações em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante comparando os diferentes padrões de bandas entre amostras de sangue fresco (1 e 2) e sangue congelado (3 e 4), utilizando “primer” T₁₂GC combinado com OPA 18. M= marcador de 50 pb.

Quantos aos resultados para as diferentes combinações de “primers”, foram obtidos vários padrões de bandas entre os quatro membros da família ALS (FIGURAS 4, 5, 6 e 7).

As Figuras 4 e 5 representam os padrões de bandas obtidos com os “primers” arbitrários selecionados combinados com o “primer” T₁₂CC.

Ao analisar a Figura 4 nota-se que o padrão encontrado para os referidos “primers” selecionados não apresentou qualidade suficiente para a análise de diferenciações. Entretanto, alguns fragmentos foram detectados (setas), dentre esses um de aproximadamente 150 pb e outro de 300 pb mostraram-se presentes somente nas canaletas 1 e 2. Como esses indivíduos são

do sexo feminino, pode-se supor que trata-se de alguma expressão relacionada com o sexo.

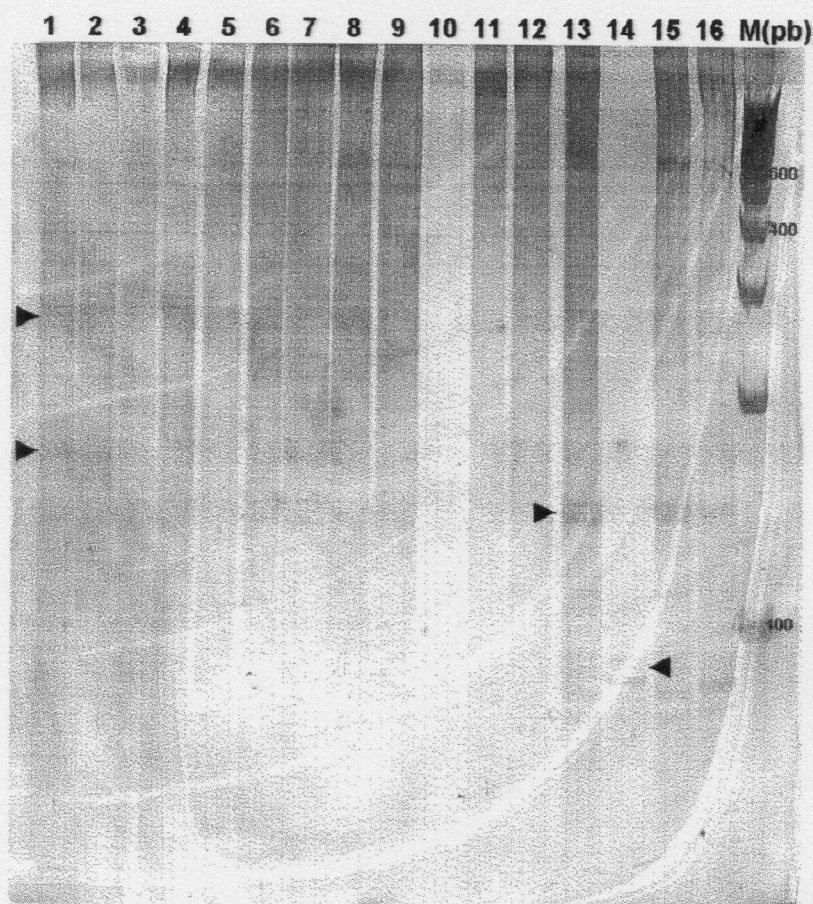


Figura 4: Padrão diferenciado de fragmentos da amplificação em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante utilizando o “primer” T₁₂CC e os “primers” arbitrários OPA 05 (1 a 4), OPA 08 (5 a 8), OPA12 (9 a 12) e OPA 15 (13 a 16). M= marcador de 100pb. Setas indicam bandas diferenciadas

Outros fragmentos, menores que 50 pb foram identificados nas canaletas 13, 14, 15 e 16, porém a amostra da canaleta 14 apresenta dois fragmentos ausentes nas demais. Isso pode sugerir uma expressão relacionada à idade, pois apesar de os indivíduos apresentarem idades próximas, o indivíduo da amostra 14 apresenta a maior diferença com relação aos demais (55, 50, 58 e 56 anos respectivamente).

Já na Figura 5 tem-se as combinações do “primer” T₁₂CC com os arbitrários OPAs 14, 16, 17 e 18, as quais apresentam um bom padrão de bandas e alguns polimorfismos bem evidentes (setas). Para a primeira combinação de “primers” (canaletas 1, 2, 3 e 4) há ausência de um fragmento menor que 50 pb

na canaleta 1, correspondente à amostra do indivíduo afetado, assim, esse fragmento pode estar relacionado à anomalia ALS. Há um outro fragmento também menor que 50 pb que, contrariamente ao anterior, está presente somente na canaleta 1, podendo, também, estar associado à doença que acomete o indivíduo.

A canaleta 6 apresenta vários polimorfismos que estão ausentes nas outras (5, 7 e 8). Os mesmos podem estar relacionados a uma expressão gênica individual, revelando sua diferenciação genética em relação aos demais. O “primer” OPA 16 não apresentou boa amplificação, porém nota-se um fragmento diferenciado na canaleta 10.

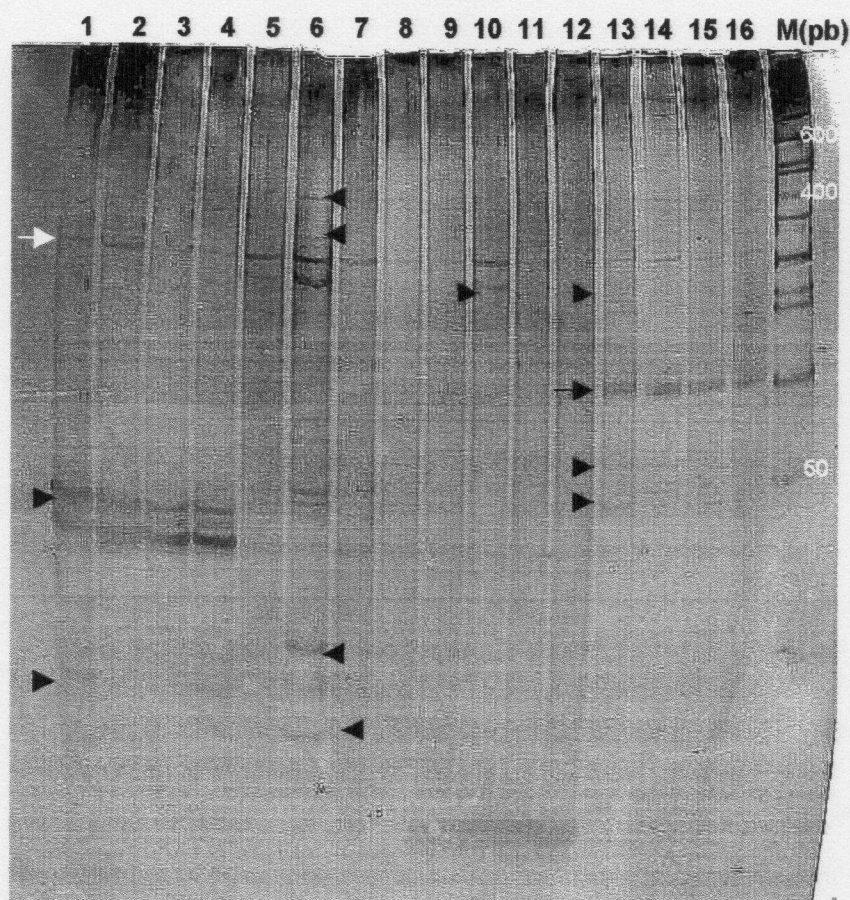


Figura 5: Padrão diferenciado de fragmentos da amplificação em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante utilizando o “primer” T₁₂CC e os “primers” arbitrários OPA 18 (1 a 4), OPA 17 (5 a 8), OPA 16 (9 a 12) e OPA 14 (13 a 16). M= marcador de 50pb. Setas indicam bandas diferenciadas

Outros polimorfismos são evidentes para o “primer” OPA 14, os quais podem ser verificados na canaleta 13, que corresponde às amostras do indivíduo afetado. Três fragmentos estão diferencialmente expressos, um com aproximadamente 200 pb e outros dois com aproximadamente 50 pb. Novamente, pode-se deduzir que os mesmos tenham alguma relação com a esclerose lateral amiotrófica.

Há um padrão presente nos quatro indivíduos (canaletas 13 a 16), cujo tamanho é de 100 pb, podendo significar alguma expressão constitutiva comum a todos.

Numa análise geral do gel, é possível notar que algumas bandas se diferenciam em intensidade como também alguns fragmentos de pesos moleculares iguais que se repetem em todas as canaletas (seta branca), mesmo tratando-se de “primers” arbitrários diferentes. Isso pode ser explicado por haver uma certa degenerância nos “primers” e como são curtos, de apenas 10 pb, e ricos em G e C (40 a 60%), podem se anelar a uma mesma seqüência de DNA, fazendo com que ocorra essa igualdade de fragmentos (LIANG *et al.*, 1995).

As Figuras 6 e 7 representam os padrões de bandas obtidos com os mesmos “primers” arbitrários selecionados, porém combinados com o T₁₂CG.

Ao analisar a Figura 6, os “primers” arbitrários selecionados não foram muito eficientes na amplificação, como ocorreu na Figura 4. Os fragmentos coraram-se fracamente e poucos polimorfismos podem ser verificados. Nas canaletas de 1 a 4 não é notado nenhum fragmento diferenciado, apenas uma diferença de intensidade na canaleta 2. Também aparece fracamente em 5 e 6 um fragmento de aproximadamente 250 pb podendo estar relacionado às diferenciações na expressão referente ao sexo. Outro fragmento com cerca de 150 pb, na canaleta 5, pode estar associado à ALS.

O “primer” OPA 12 amplificou apenas um fragmento para as 4 amostras, podendo ser de caráter constitutivo. Já o “primer” OPA 14, mostra um

polimorfismo, ou seja, um fragmento (300 pb) diferencialmente expresso na canaleta 13 que está ausente nas demais (14, 15 e 16) e pode representar um produto codificado que se encontra em indivíduos acometidos por ALS.

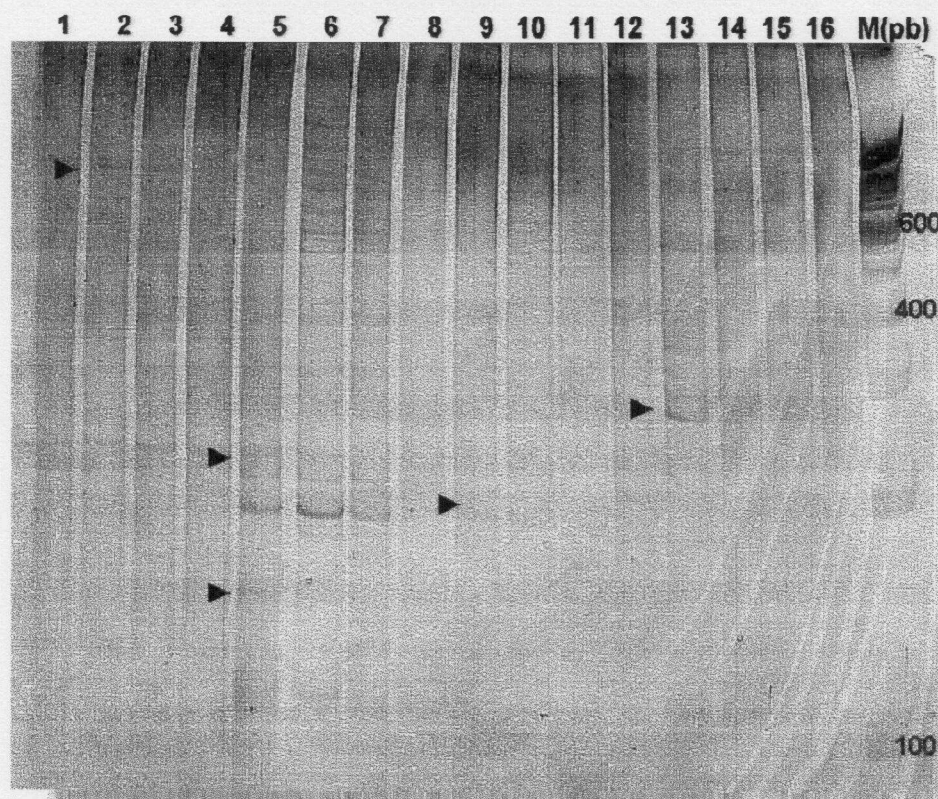


Figura 6: Padrão diferenciado de fragmentos da amplificação em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante utilizando o “primer” T₁₂CG e os “primers” arbitrários OPA 05 (1 a 4), OPA 08 (5 a 8), OPA 12 (9 a 12) e OPA 14 (13 a 16). M= marcador de 100pb. Setas indicam bandas diferenciadas

Na Figura 7 alguns polimorfismos são notados (setas). Nas canaletas 5 e 6 há presença de um fragmento de aproximadamente 75 pb que está ausente nas canaletas 7 e 8. Esse fragmento pode estar relacionada ao sexo, visto que as duas primeiras são referentes a amostras do sexo feminino e as outras duas canaletas referentes a amostras do sexo masculino. Pode-se ainda notar as diferenças na intensidade das bandas, podendo significar uma diferença quantitativa na expressão gênica, como também pode ser verificado em 10 e 11.

O “primer” OPA 18 apresentou um dos melhores padrões de bandas com relação aos outros sete “primers” arbitrários; como já descrito por

OLIVEIRA JR (1999), que utilizou alguns dos “primers” aqui citados e verificou a maior eficiência do OPA 18.

Alguns polimorfismos podem ser destacados, como na canaleta 13, onde um fragmento de aproximadamente 250 pb se expressou diferencialmente e, ainda, pode ser verificado um fragmento (200 pb) mais evidente que se repete em menor intensidade na canaleta 14. Ambos, são referentes a indivíduos de mesmo sexo.

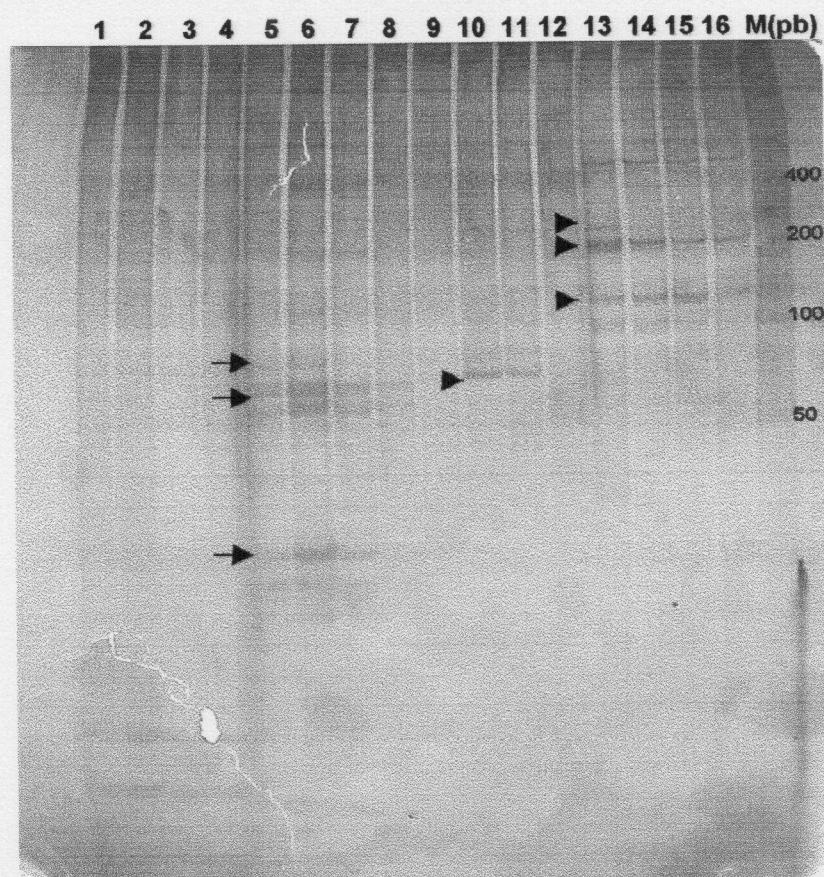


Figura 7: Padrão diferenciado de fragmentos da amplificação em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante utilizando o “primer” T₁₂CG e os “primers” arbitrários OPA 15 (1 a 4), OPA 16 (5 a 8), OPA 17 (9 a 12) e OPA 18 (13 a 16). M= marcador de 50pb. Setas indicam bandas diferenciadas

As bandas que se repetem com os diferentes “primers” podem estar relacionadas a algum produto constitutivo comum às quatro amostras.

Dentre os “primers” OPAs que foram utilizados, alguns apresentaram diversos padrões de amplificação e outros nem amplificaram. Isso reforça a

necessidade de se usar vários “primers” arbitrários em combinação com diferentes oligos(dT), “varrendo” assim toda a expressão gênica numa determinada condição, como foi descrito por LIANG e PARDEE (1992).

Segundo DOSS (1996), para se permitir o uso da coloração por nitrato de prata na detecção de bandas, é usado nas reações de amplificações a concentração de 200 μM de dNTPs ao invés de 2 μM . No entanto, este trabalho foi realizado com a concentração de 2 μM de dNTPs nas amplificações e as bandas foram detectadas.

Esse trabalho confirma os resultados encontrados por AN *et al.* (1996), os quais descreveram que a coloração por nitrato de prata fornece poucas bandas, e que seus resultados são difíceis de controlar e são inconsistentes, pois sua sensibilidade é muito inferior à dos radioisótopos. No entanto, apresenta as vantagens de ser simples, rápida, sem perigos e de custo inferior aos elementos radioativos.

Novos estudos devem ser realizados sempre na tentativa de melhorar a técnica, como também proceder a análise dos fragmentos diferenciados aqui identificados.

5. CONCLUSÕES

- * O protocolo utilizando TRIZOL Reagent para a extração de RNA foi eficiente, apresentando mínima contaminação com DNA, desde que a proporção de 10 partes de TRIZOL:1 parte de sangue seja utilizada.

- * O padrão de bandas encontrado para o RNA de sangue fresco é superior ao encontrado para o RNA de sangue congelado, assim o RNA deve ser preferencialmente extraído logo após coleta do sangue.

- * A baixa sensibilidade da prata não permite visualizar todos os fragmentos presentes, pois os produtos obtidos por DDRT-PCR tratam-se de quantidades mínimas, mas mesmo assim, polimorfismos são identificados.

- * Os fragmentos melhor visualizados com a coloração por prata variaram entre 50 pb e 600 pb.

- * Com quantidades mínimas de RNA total extraído, pode-se realizar a técnica do DDRT-PCR.

- * As bandas exclusivamente detectadas no indivíduo afetado precisam ser recuperadas e melhor analisadas para avaliar se as mesmas estão realmente associadas à doença.

- * A radioatividade mostra-se necessária para a realização do DDRT-PCR e a coloração por nitrato de prata seria utilizada apenas para verificar se as condições de reação estão otimizadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN, G.; LUO, G.; VELTRI, R. W. and O'HARA, S M. (1996). Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. **BioTechniques**, 20(3): 342-346.
- BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOF, P. and STRAUSS, M. (1993). Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Research**, 21(18): 4272-4280.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G. and GRESSHOFF, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 196: 80-83.
- BLUM, H; BEIR, H. and GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99.

- BYUN, S. J.; JANG, M. K.; JEOUNG, N. H.; KIM, J. Y. and PARK, Y. B. (1998). Differentially expressed genes in cultured aortic smooth muscle cell by cholesterol-loading. **Mol. Cells**, **8**(6): 657-662.
- CHOMCZYNSKI, P. (1992). Solubilization in formamide protects RNA from degradation. **Nucleic Acids Research**, **20**: 3791-3792.
- CUNNINGHAN, M. E.; MALAYER, J. R.; YELICH, J. V. and GEISERT, R. D. (1996). Utilization of differential display PCR to identify changes in gene expression in early porcine conceptus development. **Journal of Animal Science**, **74** suppl.1: 73.
- DENG, H-X; HENTATI, A.; TAINER, J. A.; IQBAL, Z.; CAYABYAB, A.; HUNG, W-Y; GETZOFF, E. D.; HU, P.; HERZFELDT, B.; ROOS, R. P.; WARNER, C.; DENG, G.; SORIANO, E.; SMYTH, C.; PARGE, H. E.; AHMED, A.; ROSES, A. D.; HALLEWELL, R. A.; PERICAK-VANCE, M. A. and SIDDIQUE, T. (1993). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Structural Defects in Cu, Zn, Superoxide Dismutase. **Science**, **261**: 1047-1051.
- DIMOPOULOS, G. RICHMAN, A.; TORRE, A. D.; KAFATOS, F. C. and LOUIS, C. (1996). Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Genetics**, **93**: 13066-13071.
- FEHLMANN, C.; KRAPF, R. and SOLIOZ, M. (1993). Reverse transcriptase can block polymerase chain reaction. **Clinical Chemistry**, **39**(2): 111-114.

FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a ed., Brasília, EMBRAPA-CENARGEM: 37-38.

GODING, J. W. (1998). Molecular protocols-Reverse transcriptase polymerase chain reaction. <http://www.Scienceexchange.com/sxprotocols/molbiol/rt.htm>

GOULART FILHO, L. R. (1999). Comunicação pessoal.

HELPS, N. R.; ADAMS, S. M.; BRAMMAR, M. W. J. and VARLEY, J. M. (1995). The *Drosophila melanogaster* homologue of the human BRC1 gene is highly expressed during embryogenesis. **Gene**, **162**(2): 245-248.

INNIS, M. A. and GELFAND, D. H. (1990). Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, Inc., San Diego, Califórnia 92101. Academic Press Limited, 24-28. 3-12p.

KNOLL, R.; ZIMMERMANN, R.; ARRAS, M. and SCHAPER, W. (1996). Characterization of differentially expressed genes following brief cardiac. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **221**(2): 402-407.

LIANG, P. and PARDEE, A. P. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, **257**: 967-971.

- LIANG, P.; AVERBOUKIN, L.; KEYOMARSI K.; SAGER, R. and PARDEE, A. B. (1992). Differential Display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. **Cancer Research**, **52**: 6966-6968.
- LIANG, P.; AVERBOUKH, L. and PARDEE, A. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Research**, **21**(14): 3269-3275.
- LIANG, P.; BAUER, D.; AVERBOUKH, L.; WARTHOF, P.; ROHRWILD, M.; MULLER, H.; STRAUSS, M. and PARDEE, A. B. (1995). Analysis of altered gene expression by differential display. **Methods in Enzymology**, **254**: 305-321.
- MALHOTRA, K.; LUEHRSEN, K. R.; COSTELLO L. L.; RAICH, T. J.; SIM K.; FOLTZ, L.; DAVIDSON, S.; XU, H.; CHEN, A.; YAMANISHI, D. T.; LINDEMANN, G. W.; CAIN, C. A.; MADLANSACAY, M. R.; HASHIMA, S. M.; PHAM, T. L.; MAHONEY, W. and SCHUELER, P. A. (1999). Identification of differentially expressed mRNAs in human fetal liver across gestation. **Nucleic Acids Research**, **27**(3): 839-847.
- MANNIATIS, T; GOODBOURN, S. and FISCHER, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. **Science**, **236**: 1237-1245.
- MULLIS, K. and FALOONA, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, **55**: 335-350.

- OLIVEIRA JR., W. P. de. (1999). **Análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis Mellifera* LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) por DDRT-PCR.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 55p.
- PASSAGLIA, L. M. P. and ZAHA, A. (1996). Técnicas de DNA Recombinante. In: ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica.** Porto Alegre, R.S., Mercado Aberto Ltda.: 324.
- ROSEN, D. R.; SIDDIQUE, T.; PATTERSON, D.; FIGLEWICZ, D. A.; SAPP, P.; HENTATI, A.; DONALDSON, D.; GOTO, J.; O'REGAN, J. P.; DENG, H-X.; RAHMANI, Z.; KRIZUS, A.; McKENNA-YASEK, D.; CAYABYAB, A.; GATSON, S. M.; BERGER, R.; TANZI, R. E.; HALPERIN, J. J.; HERZFELDT, B.; VAN DER BERGH, R.; HUNG, W-Y.; BIRD, T.; DENG, G.; MULDER, D. W.; SMYTH, C.; LAING, N. G.; SORIANO, E.; VANCE-PERICAK, M. A.; HALNES, J.; ROULEAU, G. A.; GUSELLA, J. S.; HORVITZ, H. R. and BROWN JR., R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase genen are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, **362**: 59-62.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. and ERLICH, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALCOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. and ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **230**: 1350-1354.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. and MANIATIS. (1989). **Molecular cloning: A Laboratorial Manual**. 2nd ed., vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York, EUA.
- SELLNER, L. N.; COELEN, R. J. and MACKENZIE, J. S. (1992). Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. **Nucleic Acids Research**, **20**: 1487-1490.
- SIDDIQUE T.; NIJHAWAN, D. and HENTATI, A. (1996). Molecular genetic basis of familial ALS. **Neurology**, **42** (Supl. 2): 27-35.
- VERES, G.; GIBBS, R. A.; SCHERER, S. E. and CASKEY, C. T. (1987). The molecular basis of the sparse for mouse mutation. **Science**, **237**: 415-417.
- WARTHOE, P.; BAUER, D.; ROHDE, M. and STRAUSS, M. (1995). Detection and identification of expressed genes by differential display *in PCR Primer: A laboratorial manual*. DIEFFENBACH, C. W.; DVESKLER, G. S. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA.
- WELSH, J. and MACCLELLAND, M. (1990). Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 7213-7218.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D. and MACCLELLAND, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, **20**: 4965-4970.

- WHITE, T. J.; ARNHEIN, N. and ERLICH, H. A. (1989). The polymerase chain reaction. **Technical Focus** 5(6): 185-188.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535.
- XINKANG, W. and FEUERSTEIN, G. Z. (1995). Direct sequencing of DNA isolated from mRNA Differential Display, **BioTechniques**, 18(3): 448-452.
- ZIMMERMANN, J. W. and SHCULTZ, R. .M. (1994). Analysis of gene expression in the pre-implantation mouse embryo: use of m-RNA differential display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 5456-5460.