

# Curso de atualização

## DOENÇAS GENÉTICAS: o que há de novo?

Centro de Estudos do Genoma Humano  
Depto. de Genética e Biologia Evolutiva  
Instituto de Biociências  
Universidade de São Paulo

17 a 21 de julho de 2006

## Índice

|   |     |
|---|-----|
| Apresentação.....   | 3   |
| Cronograma.....   | 5   |
| Introdução às atividades em sala de aula.....                                   | 6   |
| Atividade 1, Resgatando conceitos , Oficina 1.....                              | 7   |
| Atividades 2 e 3.....   | 8   |
| Atividades 4 e 5 .....  | 9   |
| Oficina 2 .....   | 10  |
| Oficina 3.....  | 12  |
| Oficina 4.....  | 16  |
| Atividade 7.....  | 18  |
| Prática 1 . Isolamento de DNA.....  | 19  |
| Prática 2.- Eletroforese.....   | 20  |
| Prática 3 – Interpretação se separação eletroforética de DNA.....               | 21  |
| Exercícios de <i>Southern</i> .....   | 23  |
| Atividade 8 .....   | 25  |
| Estudo de heredogramas .....  | 26  |
| Exercícios – Diagnóstico de doenças genéticas .....                             | 30  |
| O dogma central da Biologia .....   | 33  |
| A transcrição do DNA.....   | 33  |
| O código genético – efeito de mutações .....                                    | 41  |
| A síntese de proteínas .....  | 47  |
| Digestão de ácidos nucleicos .....  | 52  |
| Eletroforese .....  | 52  |
| <i>Southern blotting</i> .....  | 54  |
| A reação em cadeia da polimerase .....  | 56  |
| Conceitos gerais de genética básica aplicáveis à genética humana e médica ..... | 58  |
| Análise de heredogramas .....   | 65  |
| O DNA mitocondrial humano .....   | 73  |
| As bases cromossômicas das doenças genéticas .....                              | 75  |
| Diagnóstico molecular de doenças genéticas .....                                | 84  |
| Aconselhamento genético .....   | 92  |
| Diagnóstico pré-natal .....   | 96  |
| Leituras complementares .....   | 101 |
| Anexo 1 .....   | 102 |
| Anexo 2 .....   | 103 |
| Anexo 3 .....   | 105 |
| Anexo 4.....  | 110 |

## Apresentação

### DIAGNÓSTICO E JUSTIFICATIVA

A sociedade moderna mantém um estreito relacionamento com a Genética, área do conhecimento que apresentou nos últimos anos revolucionários avanços tecnológicos, e que faz parte do cotidiano da grande maioria dos cidadãos. Assim sendo, a compreensão de seus princípios básicos é fundamental para que todos estejam preparados para opinar de modo informado e conseqüente frente às inovações introduzidas por essa ciência na sociedade. Este curso pretende levar os professores de Biologia a relacionar-se com o conteúdo escolar de Genética de maneira lúdica, prazerosa e participativa, propiciando desta forma uma maior apropriação e compreensão dos conceitos e procedimentos envolvidos.

### OBJETIVOS

- Atualizar os conceitos de Genética Humana
- Estudar os padrões de herança trazendo para o concreto as relações entre os diferentes processos da hereditariedade
- Compreender a relação entre genótipo e fenótipo
- Interpretar observações e resultados moleculares de natureza experimental
- Solucionar problemas sobre o emprego da moderna tecnologia da Genética Molecular
- Utilizar o tema "Doenças Genéticas" como eixo para a integração de conceitos clássicos da Genética e seus aspectos moleculares, bem como ponto de referência para a análise e discussões no campo da bioética e do aconselhamento genético.
- Considerar o papel do professor em sala de aula como "Agente disseminador" de temas que permeiam a discussão de valores éticos e sociais e que exigem um posicionamento crítico acerca de situações relacionadas à área de Ciências da Natureza e suas tecnologias.

### ESTRATÉGIAS E RECURSOS TECNOLÓGICOS

No curso serão utilizadas diversas estratégias tais como estudos dirigidos, discussões em grupo, resolução de exercícios, práticas de laboratório, atividades lúdicas presenciais, animações demonstrativas de fenômenos biológicos, aulas dialogadas e expositivas.

### FORMAS DE ACOMPANHAMENTO E DE AVALIAÇÃO DOS PARTICIPANTES

A avaliação será constituída por duas ferramentas:

- Avaliação formativa: elaboração de portfólio diário. O aluno deverá registrar as atividades desenvolvidas durante o dia e o seu envolvimento nas mesmas respondendo diariamente as seguintes questões: (1) O que aprendi hoje? O que as atividades me acrescentaram? (2) O que não foi adequado? Considerar nas respostas: o conteúdo da aula, as atividades e estratégias utilizadas, o relacionamento com o grupo e a própria participação.
- Avaliação final: Cada participante deverá fazer uma breve apresentação individual com relação a : (a) Quais os conteúdos/atividades desenvolvidas durante o curso que poderiam ser levadas para a escola? Por quê? (b) De que maneira isso poderia ser feito?

### RELAÇÃO NOMINAL DOS PROFESORES:

Eliana Maria Beluzzo Dessen  
Regina Célia Mingroni Netto  
Lyria Mori  
Lygia Pereira da Veiga

### MONITORES:

Douglas Silva Domingues  
Sabrina Ribeiro de Paula

## ORGANIZAÇÃO DO CURSO

- Carga horária total
  - 40 horas
  
- a) Sistemática de desenvolvimento de atividades presenciais
  - As atividades desenvolvidas pretendem fornecer a contextualização necessária para retirar o aluno da condição de espectador passivo e facilitar o aprendizado significativo dos princípios da Genética clássica para melhor compreender a Genética Molecular
  - As atividades de laboratório, lúdicas presenciais e discussões serão desenvolvidas em grupos com 4 alunos, distribuídos em duas salas de aula. As atividades serão orientadas por docentes e monitores do curso.
- b) Distribuição da carga horária por tipo de atividade
  - As atividades desenvolvidas durante as 40 horas do curso estão detalhadas no cronograma. Resumidamente o tempo será distribuído como se segue:
    - Aulas de laboratório – 18%
    - Atividades lúdicas presenciais – 30%
    - Discussões – 17%
    - Resolução de exercícios - 5%
    - Avaliação final – 5%

## AVALIAÇÃO

### Formativa

- Elaboração de portfólio: o que aprendi hoje e o que as atividades acrescentaram à minha rede de conhecimento
- Aspectos a serem considerados: conteúdo da aula, atividades e estratégias e relacionamento.

### Avaliação final:

- Breve apresentação individual (tempo 3 minutos): o que levaria para a escola (qual atividade e como faria).

## Cronograma

| <b>Dia</b>          | <b>Horário</b> | <b>Programa</b>   |
|---------------------|----------------|---|
| 17/07/2006<br>manhã | 8:30 às 9:00   | Recepção e recebimento de material  |
|                     | 9:00 às 9:30   | Apresentação do curso   |
|                     | 9:30 às 10:45  | Oficina: Recuperando conceitos: DNA, cromossomo, gene, alelo, organização da cromatina                          |
|                     | 10:45 às 11:10 | Intervalo para café   |
|                     | 11:15 às 12:30 | Reverendo conceitos: DNA, cromossomo, gene, alelo, organização da cromatina                                     |
| 17/07/2006<br>tarde | 13:30 às 15:15 | Estudo dirigido: Reverendo conceitos: a biologia molecular do gene  |
|                     | 15:15 às 15:45 | Intervalo para café   |
|                     | 15:45 às 17:30 | Estudo dirigido: Reverendo conceitos: a biologia molecular do gene. Apanhado geral.                             |
| 18/07/2006<br>manhã | 8:30 às 10:15  | Oficina: A família Silva e seus genes   |
|                     | 10:15 às 10:45 | Intervalo para café   |
|                     | 10:45 às 12:30 | Oficina: A família Silva e seus genes   |
| 18/07/2006<br>tarde | 13:30 às 15:15 | Oficina: A meiose e as leis de Mendel   |
|                     | 15:15 às 15:45 | Intervalo para café   |
|                     | 15:45 às 17:30 | Oficina: A meiose e as leis de Mendel   |
| 19/07/2006<br>manhã | 8:30 às 10:15  | Prática: Extração de DNA, digestão com enzimas de restrição, eletroforese                                       |
|                     | 10:15 às 10:45 | Intervalo para café   |
|                     | 10:45 às 12:30 | Southern blot, PCR  |
| 19/07/2006<br>tarde | 13:30 às 15:15 | Padrões monogênicos de herança: estudo dirigido, estudo de heredogramas   |
|                     | 15:15 às 15:45 | Intervalo para café   |
|                     | 15:45 às 17:30 | Complicações nos padrões genealógicos básicos: penetrância incompleta, expressão variável, manifestação tardia. |
| 20/07/2006<br>manhã | 8:30 às 10:15  | Complicações nos padrões genealógicos básicos: herança mitocondrial, antecipação.                               |
|                     | 10:15 às 10:45 | Intervalo para café   |
|                     | 10:45 às 12:30 | Diagnóstico de doenças genéticas  |
| 20/07/2006<br>tarde | 13:30 às 15:15 | Aconselhamento genético   |
|                     | 15:15 às 15:45 | Intervalo para café   |
|                     | 15:45 às 17:30 | Projeto Genoma Humano   |
| 21/07/2006<br>manhã | 8:30 às 10:15  | Projeto Genoma Humano   |
|                     | 10:15 às 10:45 | Intervalo para café   |
|                     | 10:45 às 12:30 | Problemas éticos atuais relacionados à Genética Humana  |
| 21/07/2006<br>tarde | 13:30 às 14:45 | A problemática do ensino de Biologia nos Ensinos Fundamental e Médio  |
|                     | 14:45 às 15:15 | Intervalo para café   |
|                     | 15:15 às 17:30 | Avaliação   |

# ATIVIDADES

## EM SALA DE AULA

- As atividades em software 1 a 7 e as oficinas 1 e 2 (páginas 7 a 18) têm por objetivo fazer uma revisão dos conceitos básicos de organização e funcionamento do material genético fundamentais para a compreensão dos mecanismos de origem e transmissão das doenças genéticas.
- As práticas 1, 2, 3, os exercícios sobre *Southern* e a atividade 8 (páginas 19 a 25) referem-se à metodologia de manipulação do DNA. Tais técnicas são utilizadas para possibilitar o diagnóstico das alterações moleculares presentes no genoma de portadores de alterações genéticas.
- Exercícios de interpretação de heredogramas (páginas 26 a 29) e de diagnóstico de doenças genéticas (páginas 30 e 31).

**Atividade em software 1:** [http://www.genome.gov/education/on\\_line.htm](http://www.genome.gov/education/on_line.htm)**Questão 1.**

Anote as principais dúvidas que você teve ao assistir esse DVD.

**Resgatando conceitos: DNA, cromossomos, genes, alelos**

1a. Responda as questões distribuídas em classe (anexo 1).

**Oficina 1 - Resgatando conceitos**

1. Represente com massa de modelar, sobre uma folha de papel, um par de cromossomos homólogos no período G1 da interfase (antes da duplicação do DNA).
2. Represente separadamente, o mesmo par de cromossomos no período G2 (após a duplicação do DNA).
3. Represente separadamente, o mesmo par de cromossomos em metáfase mitótica. A seguir, represente um gene em heterozigose, nas três fases anteriores.
4. Qual é a constituição química dos cromossomos?
5. Como está organizado o DNA dos cromossomos em cada uma das fases representadas? Desenhe, esquematicamente, ao lado dos modelos.
6. Desenhe, esquematicamente, ao lado dos modelos, a estrutura molecular de um gene.
7. Desenhe a diferença que pode haver entre os dois alelos do gene representado.
8. Redija um texto relacionando os conceitos envolvidos na atividade: cromossomos, DNA, cromátide, gene e alelo (10 linhas no máximo).
9. Relacione as dúvidas que ainda restaram após a realização da atividade.
10. Lembre-se que toda dúvida é válida, não existem perguntas "bobas".
11. Relacione os conceitos que não estavam claros para algum integrante do grupo e que foram resolvidos durante a discussão.

**Atividade em software 2: Níveis de organização da cromatina**

<http://www.whfreeman.com/biology>

clicar em: Genetics - a conceptual approach. Pierce

clicar em Cap. 11 – Levels of chromatin structure

Assista a animação referente a representação tridimensional do empacotamento do DNA nuclear nos cromossomos.

**Questões 2.** Assista a animação e responda:

- 2.1. Qual é o primeiro nível de empacotamento do DNA? Qual é o grau de empacotamento nesse primeiro nível?
- 2.2. O que é cromatina?
- 2.3. Qual a relação entre cromossomo e cromatina?
- 2.4. Qual é o grau de empacotamento do DNA na interfase?
- 2.5. Como está organizado o DNA no cromossomo?
- 2.6. Quantas moléculas de DNA existem em cada cromossomo?

**Atividade em software 3. Transcrição gênica**

<http://www.whfreeman.com/biology>

clicar em: Genetics - a conceptual approach. Pierce

clicar Capítulo 13: Bacterial transcription

Assista a animação e responda:

**Questões3.**

- 3.1. O que é uma unidade de transcrição?
- 3.2. Quais são os três elementos essenciais numa unidade de transcrição?
- 3.3. O gene pode ser definido como uma unidade de transcrição?
- 3.4. O promotor faz parte do gene?
- 3.5. Como é iniciada a transcrição em um gene procariótico?
- 3.6. O que sinaliza a parada da transcrição?

### **Atividade em software 4. O gene eucariótico. Processamento do RNA mensageiro**

<http://www.whfreman.com/biology>

clicar em: Genetics - a conceptual approach. Pierce

clicar Capítulo 14. Overview of mRNA processing

**Questões 4.** Assista a animação e responda:

- 4.1. Compare a organização de um gene procariótico com a de um gene eucariótico.
- 4.2. Imediatamente após a transcrição dos genes eucarióticos os RNAs transcritos podem ser traduzidos?
- 4.3. O que são íntrons?
- 4.4. O que são éxons?
- 4.5. Qual a consequência de falha no processamento dos íntrons nos RNAs dos eucariotos?
- 4.6. Qual a consequência de falha no encapamento da extremidade 5' nos RNAs dos eucariotos?
- 4.7. Qual a consequência de falha no encapamento da extremidade 3' nos RNAs dos eucariotos?

### **Atividade em software 5. Tradução. Efeitos das mutações nas proteínas codificadas pelo gene**

<http://www.whfreman.com/biology>

clicar em Cap. 11 – The genetic code and translation. Bacterial translation.

**Questões 5.** Assista a animação e responda:

- 5.1. Quais são os principais componentes na tradução de um RNA mensageiro? Qual o papel de cada um desses componentes?
- 5.2. Como é a iniciação da tradução?
- 5.3. Descreva o processo de alongação da cadeia polipeptídica.
- 5.4. Como ocorre a parada da síntese de proteínas?
- 5.5. Verifique qual o efeito da seguinte mutação na região de código do gene:
  - a) deleção de três nucleotídeos
  - b) deleção de um nucleotídeo
  - c) troca de um nucleotídeo (G)
  - d) troca de um nucleotídeo (U)
  - e) inserção de um nucleotídeo (G)
  - f) inserção de dois nucleotídeos (GG)

**Oficina 2: Trabalhando com um modelo para a síntese de proteínas**  
(Amabis e Martho/Editora Moderna)

**Questões da oficina 2:**

12. Desenhe o gene que originou esse RNA mensageiro.
13. O que é proteína?
14. Qual é o efeito da troca do nucleotídeo contendo a base G por um contendo a base C no códon de término?
15. Onde ocorrem as mutações?
16. Comente a afirmação: um gene-um polipeptídeo.
17. Qual é a relação entre a forma da proteína e a função que ela desempenha?
18. Qual a relação entre proteína e fenótipo?

**Atividade em software 6. Do gene ao fenótipo. Interação entre alelos.**

<http://www.whfreeman.com/biology>

Clicar em Cap. 14 – Interaction between alleles at the molecular level

**Questões 6.**

6.1. Assista a animação da interação entre alelos **RR** e responda:

- a) Qual é a característica da proteína codificada pelo alelo **R**?
- b) Qual o fenótipo do indivíduo homocigótico para o alelo **R**?

6.2. Assista a animação da interação entre alelos **rr** e responda:

- a) Qual a característica da proteína codificada pelo alelo **r**?
- b) Qual o fenótipo do indivíduo homocigótico **rr**?
- c) Correlacione o fenótipo do homocigótico **rr** com as enzimas produzidas por esse alelo.

6..3 Assista a animação da interação entre alelos **Rr** e responda:

- a) Qual é o fenótipo do indivíduo heterocigótico **Rr**?
- b) Qual dos alelos, **R** ou **r**, é dominante? Que resultado possibilita chegar a essa conclusão?
- c) Do ponto de vista molecular como é o organismo heterocigótico **Rr**?
- d) O alelo **R** impede de alguma forma o alelo **r** de se manifestar?

### Oficina 3: A família Silva e seus genes.

(Atividade completa no site <http://www.ib.usp.br/microgene/>)

## PROCEDIMENTO

### PARTE 1 Determinação dos fenótipos dos pais

- 1.1. Observar a aparência (fenótipo) do casal que está sobre a mesa do professor(a).
- 1.2. Anotar na Tabela I o fenótipo do homem e da mulher com relação às seguintes características: pigmentação da pele, lóbulo da orelha preso ou solto, dentição normal ou hipodontia, número de dedos nas mãos e calvície precoce.

**Tabela I – Fenótipos e genótipos possíveis dos pais**

| Características                    | Pai      |                     | Mãe      |                     |
|------------------------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|
|                                    | fenótipo | genótipos possíveis | fenótipo | genótipos possíveis |
| Pigmentação da pele (albinismo)    |          |                     |          |                     |
| Lóbulos das orelhas                |          |                     |          |                     |
| Ausência de incisivos (hipodontia) |          |                     |          |                     |
| Número de dedos nas mãos           |          |                     |          |                     |
| Calvície precoce                   |          |                     |          |                     |

- 1.3. Observar, na Tabela II, em anexo, a descrição das características, os genótipos (constituição genética) possíveis para cada uma delas e a maneira como elas são transmitidas para os filhos desse casal.
- 1.4. A partir das informações contidas na Tabela II preencher a Tabela I com os possíveis genótipos do casal.
- 1.5. Considerar que os genótipos dos pais sejam os abaixo relacionados.

| Pai   | Mãe  |
|---|--|
| Heterozigótico para albinismo                     | Heterozigótica para albinismo                |
| Heterozigótico para lóbulo da orelha              | Homozigótica recessiva para lóbulo da orelha |
| Heterozigótico para hipodontia                    | Homozigótica recessiva para hipodontia       |
| Homozigótico dominante para polidactilia          | Heterozigótica para calvície precoce         |
| Homozigótico C <sup>2</sup> para calvície precoce |  |

- 1.6. O saco escrito "PAI" contém a composição alélica do Sr. Silva. Cada ficha colorida representa um alelo relacionado a uma característica específica. As fichas verdes, por exemplo, representam os alelos para a característica "albinismo" (**A** e **a**) e as fichas vermelhas representam o par de cromossomos sexuais (**X** e **Y**) que determinarão a característica "sexo".
- 1.7. O saco escrito "MÃE" contém a composição alélica da Sra. Silva. Cada ficha colorida representa um alelo relacionado a uma característica específica. As fichas amarelas, por exemplo, representam os alelos para a característica "número de dedos nas mãos" (**P** e **p**).

**Tabela II – Características fenotípicas e alelos correspondentes**

| <b>CARACTERÍSTICA FENOTÍPICA<br/>E<br/>PADRÃO DE HERANÇA</b>   | <b>CONSTITUIÇÃO<br/>GENÉTICA<br/>(genótipo)</b>  | <b>APARÊNCIA<br/>FÍSICA<br/>(fenótipo)</b>                                  |
|--|--|---|
| <b>ALBINISMO (PELE SEM PIGMENTAÇÃO)</b><br><i>Essa característica decorre do bloqueio da síntese de melanina. Os indivíduos afetados apresentam a pele, cabelos e íris sem pigmentação. Herança autossômica recessiva.</i> | <b>AA (homozigótico)</b><br><b>Aa (heterozigótico)</b><br><b>aa (homozigótico)</b>   | <b>normal</b><br><b>normal</b><br><b>albino</b>                             |
| <b>LÓBULOS DAS ORELHAS</b><br><i>Nos indivíduos heterozigóticos os lóbulos das orelhas são soltos e nos homozigóticos recessivos, presos. Herança autossômica recessiva.</i>   | <b>LL (homozigótico)</b><br><b>LI (heterozigótico)</b><br><b>II (homozigótico)</b>   | <b>lóbulos soltos</b><br><b>lóbulos soltos</b><br><b>lóbulos presos</b>     |
| <b>AUSÊNCIA DE INCISIVOS (HIPODONTIA)</b><br><i>Indivíduos afetados para hipodontia não possuem os dentes incisivos. Herança autossômica dominante.</i>  | <b>Hh (heterozigótico)</b><br><b>hh (homozigótico)</b>   | <b>incisivos</b><br><b>ausentes</b><br><b>incisivos</b><br><b>presentes</b> |
| <b>NÚMERO DE DEDOS A MAIS (POLIDACTILIA)</b><br><i>Caracteriza-se pela presença de um maior número de dedos. Herança autossômica dominante.</i>  | <b>PP (homozigótico)</b><br><b>Pp (heterozigótico)</b><br><b>pp (homozigótico)</b>   | <b>polidáctilo</b><br><b>polidáctilo</b><br><b>normal</b>                   |
| <b>CALVICIE PRECOCE</b><br><i>Manifesta-se como dominante nos homens e recessiva nas mulheres. Herança autossômica</i>   | <b>C<sup>1</sup>C<sup>1</sup> (homozigótico)</b><br><b>C<sup>1</sup>C<sup>2</sup> (heterozigótico)</b><br><b>C<sup>2</sup>C<sup>2</sup> (homozigótico)</b> | <b>♀ e ♂ calvos</b><br><b>♂ calvo ♀ normal</b><br><b>♂ e ♀ normais</b>      |

## PARTE 2 - Formação dos gametas (espermatozóide e óvulo) dos pais

- 2.1. A partir dos alelos presentes em um indivíduo, a composição alélica de um gameta é determinada **ao acaso**. Na formação dos gametas, os alelos relacionados com cada uma das características (Tabela II) **comportam-se de maneira independente**. Por essa razão, para cada uma das características o alelo que fará parte de um determinado gameta pode ser sorteado de modo independente.
- 2.2. Considerando a composição genética do pai, e utilizando as fichas do saco "PAI" construir um gameta paterno (espermatozóide) como indicado a seguir:
  - 2.2.a. Determinar, inicialmente, se o gameta será portador do cromossomo Y ou de um cromossomo X. Retirar do saquinho "sexo" uma ficha e colocá-la, no círculo vermelho da estrutura que representa o espermatozóide.
  - 2.2.b. Repetir esse procedimento para cada uma das características, usando as fichas dos saquinhos correspondentes.
- 2.3. Considerando a composição genética da mãe e utilizando as fichas do saco "MÃE" construir um gameta materno (óvulo). Retirar do saquinho "sexo" uma ficha e colocá-la, no círculo vermelho da estrutura que representa o óvulo. Para as demais características repetir o procedimento do item 2.2b.

## PARTE 3 - Formação do zigoto e do fenótipo do(a) filho(a)

- 3.1. A união entre o óvulo e o espermatozóide corresponde à fecundação e origina o zigoto. Simulando a fecundação: colocar o espermatozóide dentro da estrutura que representa o óvulo para que, assim, forme-se o zigoto.
- 3.2. Considerando a constituição genética do zigoto e utilizando as peças da cartela das características, construir, usando um boneco, o fenótipo do filho(a) do casal

## PARTE 4 - Análise dos resultados

- 4.1. Comparar o descendente produzido pelo seu grupo com os descendentes construídos pelos demais grupos da classe.
  - a) Anotar a proporção de descendentes masculinos e femininos obtidos.
  - b) Anotar, para cada uma das demais características, a proporção de aparecimento dos respectivos fenótipos.
  - c) Verificar se houve diferenças entre as proporções dos fenótipos nas diferentes características. Em caso afirmativo, formular hipóteses que expliquem essas diferenças.
- 4.2. Verificar que outros tipos de gametas podem ser formados a partir da constituição genética do casal.
- 4.3. A partir da constituição genética do casal, calcular a probabilidade de aparecimento na descendência de:
  - a) uma criança albina.
  - b) um menino calvo.
  - c) uma menina com os lóbulos da orelha presos.
  - d) um menino albino com os lóbulos da orelha presos.

**PARTE 5 - Correlacionando conceitos**

1. A parte 2 dessa atividade refere-se à formação dos gametas, óvulos e espermatozoides. As fichas representam os alelos, ou seja, as formas alternativas de um gene (**A** ou **a**, **P** ou **p**, etc). Na célula:
  - a) onde estão localizados os alelos?
  - b) qual é a composição química dos alelos?
  - c) que tipo de informação está contida num alelo?
  - d) que tipo de diferença você imagina que haja entre um alelo e outro?
2. O que ocorre com o número de cromossomos no processo de formação dos gametas?
3. A parte 3 dessa atividade refere-se à formação do zigoto. O que ocorre com o número de cromossomos no processo de fecundação?
4. Na célula, qual é o processo responsável pela redução do número de cromossomos na formação dos gametas?
5. Quantas formas alélicas de um gene existem em cada uma das células somáticas de um ser humano? E em seus gametas?
6. A informação genética está contida no DNA. Na célula, onde está localizado o DNA?
7. A informação genética está contida no DNA. Em que linguagem química essa informação está escrita?

## Oficina 4. Meiose e as leis de Mendel

(atividade completa no site <http://www.ib.usp.br/microgene/>)

### PROCEDIMENTO

#### PARTE I - Célula com um par de cromossomos, heterozigótica para um gene (Aa)

1. Desenhar um círculo em um papel, representando os limites da célula que irá sofrer meiose. Lembre-se de que a membrana do núcleo se desfaz quando a célula entra em divisão.
2. Fazer dois rolinhos de massa de modelar, de cores diferentes, com cerca de 10 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro representando o cromossomo de origem materna e o cromossomo de origem paterna.
3. Aplicar nos bastões de massa os pinos de plástico marcados com as letras **A** e **a**, representando os alelos do gene em questão.
4. Duplicar cada cromossomo, materno e paterno, fazendo, com a massa de modelar, dois novos rolinhos em massa da cor correspondente.
5. Unir os rolinhos da mesma cor pelos centrômeros.
6. Colocar o alelo correspondente nas novas cromátides formadas.
7. Com os bastões de massa representando os cromossomos duplicados, simular:
  - a) o emparelhamento dos cromossomos homólogos,
  - b) a primeira divisão da meiose,
  - c) a segunda divisão da meiose.

#### PARTE II - Célula com dois pares de cromossomos, heterozigótica para dois genes localizados em cromossomos diferentes (AaBb)

1. Utilizar quatro bastões de massa de modelar para representar dois pares de cromossomos homólogos. Usar cores diferentes para os cromossomos de origem paterna e materna e para os diferentes pares de cromossomos homólogos. A célula a ser considerada tem número diplóide de cromossomos igual a quatro ( $2n = 4$  cromossomos).
2. Moldar um par de cromossomos metacêntricos (centrômero no meio) e um par de cromossomos acrocêntricos (centrômero na extremidade).
3. Aplicar nos bastões de massa que representam os cromossomos metacêntricos, os pinos de plástico marcados com as letras **A** e **a**. Nos bastões de massa que representam os cromossomos acrocêntricos aplique os pinos com as letras **B** e **b**.
4. Duplicar cada cromossomo, materno e paterno, fazendo, com a massa de modelar, quatro novos rolinhos da cor correspondente.
5. Unir os rolinhos da mesma cor pelos centrômeros.
6. Colocar o alelo correspondente nas novas cromátides formadas.
7. Com os bastões de massa representando os cromossomos duplicados simular:
  - a) o emparelhamento dos cromossomos homólogos, sem permutação entre os cromossomos homólogos
  - b) a primeira divisão da meiose,
  - c) a segunda divisão da meiose

### ENTENDENDO A ATIVIDADE

1. Na seção I.2, o que representa cada um dos rolinhos de massa de modelar? Quantas moléculas de DNA formam o cromossomo nessa fase? Explique.
2. Na sua simulação identifique:
  - a) os cromossomos homólogos,
  - b) as cromátides irmãs.

3. Quando o alelo presente em uma cromátide é **A** na cromátide-irmã também está o alelo **A**. Por que?
4. Quantas possibilidades de posicionamento são possíveis quando dois pares de cromossomos homólogos emparelhados estão na metáfase da primeira divisão da meiose?
5. Compare o comportamento dos cromossomos na meiose com a segregação dos alelos:
  - a) na primeira divisão meiótica.
  - b) na segunda divisão meiótica.
6. Quantos e quais tipos de gametas foram formados na meiose de uma célula duplo-heterozigótica (**AaBb**)?
7. Segundo a lei da segregação independente (2ª lei de Mendel), quantos e quais tipos de gametas são produzidos por um indivíduo duplo-heterozigótico **AaBb**?
8. Simule uma permutação entre o par de alelos **A** e **a** e o centrômero. Quantos e quais tipos de gametas foram formados?
9. É possível afirmar que a 1ª lei de Mendel é resultado direto da separação do par de cromossomos homólogos para células opostas na 1ª divisão meiótica? Justifique.
10. É possível afirmar que a 2ª lei de Mendel resulta do comportamento independente de um par de cromossomos homólogos em relação a outro par de homólogos na 1ª divisão da meiose? Justifique.

### PROBLEMAS

- 1) O que herdamos, biologicamente, de nossos pais?
- 2) Explique como o número de cromossomos é mantido constante nas espécies com reprodução sexuada.
- 3) É possível ocorrer meiose em uma célula haplóide? E a mitose é possível? Justifique a sua resposta.
- 4) A síndrome de Down é o tipo mais comum e viável das anomalias cromossômicas humanas e ocorre em 0,15% das crianças nascidas vivas, crianças cujos pais são cromossomicamente normais e sem qualquer histórico da síndrome na família. A causa mais freqüente da síndrome de Down é a trissomia (três cromossomos) do cromossomo 21. Proponha uma hipótese para explicar a possível origem desta trissomia.
- 5) A autofecundação é um tipo de reprodução sexuada? Justifique a sua resposta.
- 6) Por que a descendência originada de reprodução sexuada é tão variada? Quais são os fatores responsáveis por esta variabilidade?
- 7) Uma espécie de verme tem um número diplóide de cromossomos igual a 10. Quantas combinações cromossômicas diferentes são possíveis durante o processo de meiose para a formação dos gametas?
- 8) É possível afirmar que as 1ª e 2ª leis de Mendel resultam do comportamento dos cromossomos durante a meiose? Justifique a sua resposta.

## Atividade em software 7. Meiose. Efeitos causados por erros na divisão celular

<http://www.whfreeman.com.br>

clicar em Cap. 2 - Meiose

### Questões 7.

Assista a animação “Miose” e responda:

- 6.1. Em que momento ocorre a duplicação dos cromossomos nas células que vão se dividir por meiose?
- 6.2. Qual é o produto da primeira divisão da meiose?
- 6.3. O que caracteriza a segunda divisão da meiose?
- 6.4. Qual a diferença chave entre mitose e meiose?
- 6.5. Qual é a consequência de falha na separação dos cromossomos homólogos?
- 6.6. Qual é a consequência de falha no emparelhamento dos cromossomos homólogos?
- 6.7. O que ocorre se o emparelhamento dos cromossomos homólogos for incorreto?
- 6.8. Quantas possibilidades de posicionamento dos cromossomos são possíveis quando dois pares de cromossomos homólogos estão emparelhados estão na metáfase da primeira divisão da meiose? E no caso de três pares de cromossomos?
- 6.9. Quantos e quais tipos de gametas são formados na meiose de **uma célula** duplo-heterozigótica (**AaBb**)?
- 6.10. Quantos e quais tipos de gametas são formados por um indivíduo duplo-heterozigótico (**AaBb**)?

## Prática 1 - Receita caseira para isolar DNA de tomate

### Procedimento

1. Pique um tomate grande em pequenos pedaços
2. Num recipiente misture 150 ml de água, uma colher de sopa de detergente e uma colher de chá de sal de cozinha. Mexa bem.
3. Junte a solução descrita no item anterior com o tomate picado
4. Coloque em banho-maria a 65°C por 30 minutos (caso não haja um banho-maria disponível incube à temperatura ambiente por 30 minutos)
5. Resfrie rapidamente a mistura colocando o recipiente em uma bacia de gelo. Mexa bem
6. Coe a mistura em uma peneira e em seguida coe a solução aquosa em um filtro para café. Coloque o líquido resultante em um copo ou outro recipiente transparente.
7. Despeje delicadamente sobre a solução dois volumes de álcool comum. O DNA começa a precipitar na interfase.

### Questões da prática 1

Os protocolos para extração de DNA, apesar de apresentarem pequenas diferenças dependendo do material biológico do qual ele será extraído, consistem basicamente de duas etapas. Na primeira etapa, provoca-se o rompimento das membranas celulares, o que permite a liberação do DNA. Na segunda, realizam-se um ou mais tratamentos enzimáticos ou químicos para purificar a preparação de contaminantes.

1. O rompimento das membranas das células do tomate ocorre em que passo do protocolo? Explique.
2. Na segunda etapa de um protocolo de extração de DNA podem ser realizados tratamentos para purificar a preparação de contaminantes. Que tipo de contaminantes uma preparação de DNA apresenta?
3. Qual a função do álcool nesse protocolo de extração?
4. Considerando os procedimentos de extração do DNA genômico você espera obtê-lo sem quebras mecânicas e/ou químicas?

### Respostas comentadas

1. No passo 3. Os agentes mais empregados para a lise ou solubilização das membranas são os detergentes. Diferentes detergentes extraem diferentes tipos e quantidades de lipídeos da membrana, juntamente com proteínas. Os detergentes solubilizam ou dispersam material insolúvel em água por meio da formação de agregados microscópicos (micelas).
2. Os contaminantes são RNA, proteínas e outras macromoléculas. O RNA pode ser eliminado por digestão com RNase. As proteínas, principalmente as mais estreitamente ligadas ao DNA (histonas), podem ser digeridas por enzimas, como a proteinase K, por exemplo. O agente desproteinizante mais largamente utilizado é o fenol, um eficiente desnaturador de proteínas. O clorofórmio também é um agente desproteinizante muito empregado. Após tratamento com esses agentes, a mistura deve ser centrifugada para separação das fases fenólica e aquosa. Na interface entre essas duas fases deposita-se uma camada de proteínas desnaturadas. Observação: No protocolo caseiro o passo de purificação foi omitido.
3. O DNA contido na fase aquosa está dissolvido em água. Na presença de concentrações relativamente altas de cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$ ), o etanol induz uma mudança estrutural transitória na molécula dos ácidos nucleicos ocasionando sua agregação e precipitação. Em outras palavras, o DNA sai de solução e precipita.
4. Como o DNA genômico é formado por moléculas muito longas (lembre-se que cada cromossomo é formado por uma única molécula de DNA) inúmeras quebras mecânicas são originadas nos procedimentos de extração. As maiores moléculas apresentam tamanho de cerca de 30 kb. Por outro lado, como as drogas utilizadas na extração não eram puras (detergente com corantes, por exemplo) elas ocasionam quebras adicionais nas moléculas de DNA.

## Prática 2 – Eletroforese de corantes de alimentos

### PROCEDIMENTO

#### Eletroforese de corantes de alimentos

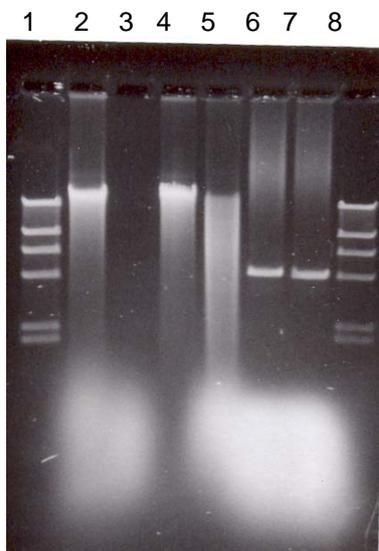
- Misture 0,1 g de agarose, 10 ml de água, 0,1  $\mu$ l de sal de cozinha
- Aqueça em forno microondas até a fervura
- Despeje a solução em uma bandeja de plástico contendo um mini pente
- Aguarde a solidificação e retire, cuidadosamente, o pente.
- Coloque o gel na câmara de corrida e complete com uma solução de água e sal até que o gel fique submerso
- Aplique, com a ajuda de uma seringa de 1ml, os corantes A, B e C em poços separados do gel
- Conecte a câmara de corrida à uma fonte de corrente contínua.

#### Questões da prática 2:

- 2.1. Qual a carga dos corantes analisados? Como você chegou a essa conclusão?
- 2.2. Explique o aparecimento de mais de uma cor após a corrida eletroforética.

### Prática 3 – Interpretação de separação eletroforética de DNA

Analise o gel da figura abaixo:



**Figura 14.** Raia 1 – DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição *Hind* III. Esses fragmentos são utilizados como marcadores de peso molecular; Raia 2 – DNA genômico de *Drosophila melanogaster*, sem digerir; Raia 3 – preparação de DNA genômico de *Drosophila* digerida com Dnase; Raia 4 – preparação de DNA genômico de *Drosophila* digerida com Rnase; Raia 5 – DNA genômico de *Drosophila* digerido com a enzima *Eco* RI; Raia 6 – DNA do plasmídeo pBr322 digerido com *Eco* RI; Raia 7 – DNA do plasmídeo pBr322 digerido com *Hind* III; DNA do fago lambda digerido com *Hind* III

#### Questões:

1. O que caracteriza uma banda nesse gel de agarose?
2. Estime os tamanhos dos fragmentos de cada amostra.
3. Sabendo-se que o genoma de *Drosophila* tem  $4 \times 10^8$  pb, distribuídos em quatro longas moléculas de DNA (os 4 cromossomos), como explicar o padrão observado após o fracionamento por meio de eletroforese? Para responder essa questão leve em consideração a integridade das moléculas de DNA após o procedimento de extração.
4. A análise do gel permite concluir a respeito da nuvem de moléculas de baixo peso molecular que se coram com brometo de etídeo?
5. Comparando os padrões apresentados pelas amostras de DNA das raias 2 e 5 você pode apresentar uma hipótese para o “arrasto” visualizado abaixo da banda de alto peso molecular do DNA na raia 2.

#### Respostas comentadas:

1. Em um gel de eletroforese uma banda contém moléculas (lineares) de mesmo tamanho.
2. Valores aproximados para:
  - Raia 1 – 22.000; 9.400; 6.500; 4.300; 2.300; 2.000 pares de bases
  - Raia 2 – 30.000 pb + um gradiente de moléculas com peso molecular inferior a 30.000 pb
  - Raia 3 – o DNA foi digerido pela DNase, restando apenas o RNA.
  - Raia 4 - 30.000 pb + um gradiente de moléculas com peso molecular inferior
  - Raia 5 – não há bandas definidas na preparação. Uma coleção de fragmentos com peso molecular entre 25.000 e 500 pares de bases foram originados pela digestão.
  - Raias 6 e 7 – 4.300 pb

3. As longas moléculas que compõem os cromossomos de *Drosophila* sofrem quebras mecânicas e químicas durante a extração. A maioria desses fragmentos possui cerca de 30.000 pb. Um gradiente de moléculas com tamanho entre 30.000 e 1000 pb evidencia que as quebras produzem também fragmentos de menor tamanho.
4. As nuvens são formadas por moléculas de RNA. Essa conclusão é possível observando-se o resultado da digestão da preparação de DNA genômico com RNase: a nuvem desapareceu.
5. Considerando-se que a distribuição dos sítios de corte para uma as enzimas de restrição são ao acaso, fragmentos dos mais variados tamanhos são originados. Assim sendo, um gradiente de tamanho pode ser observado como produto da digestão.
6. A digestão com *Eco* RI cortou as moléculas com cerca de 30.000 pb majoritariamente presentes numa preparação de DNA genômico, originando fragmentos de tamanhos variados e que são visualizados como um arrasto.

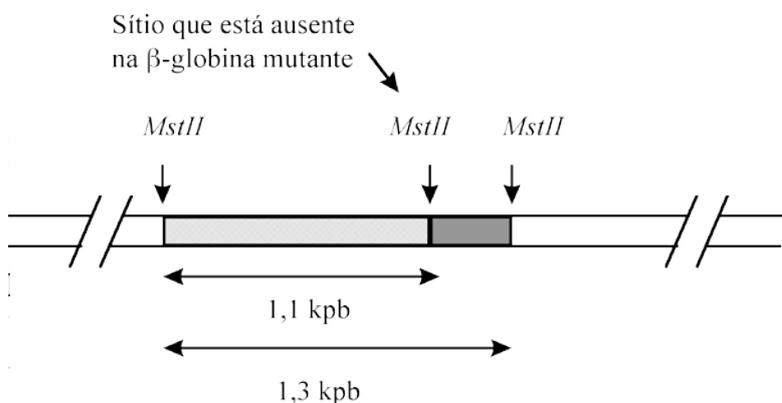
## Exercícios sobre Southern blot

1. O segmento de DNA apresentado no esquema abaixo codifica para uma proteína e foi mapeado com enzimas de restrição. Uma sonda homóloga à região indicada na figura será utilizada para estudar o gene em experimentos de *Southern blotting*. Nesses experimentos, o DNA genômico de um indivíduo normal para o gene foi digerido separadamente com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III. Após a digestão, o DNA foi fracionado em gel de agarose, transferido para uma membrana de náilon e hibridado com a sonda abaixo indicada, marcada com radioatividade. Após a hibridação, a membrana foi coberta com filme de raio-X, exposta durante um período adequado de tempo e o filme foi revelado. Considerando o mapa de restrição abaixo, esquematize no filme de raio-X.

- a) o padrão de bandas obtido no caso do DNA genômico ter sido digerido por *Eco* RI.
- b) O padrão de bandas obtido no caso do DNA genômico ser digerido por *Hind* III.
- c) O padrão de bandas obtido no caso do DNA genômico ser proveniente de um indivíduo em que o sítio *Hind* III marcado com asterisco foi destruído através de uma mutação de ponto (suponha digestões simples do DNA com *Eco* RI e *Hind* III).
- d) O padrão de bandas obtido no caso do DNA ser proveniente de um indivíduo com a deleção representada no esquema II (suponha digestões simples com *Eco* RI e *Hind* III).

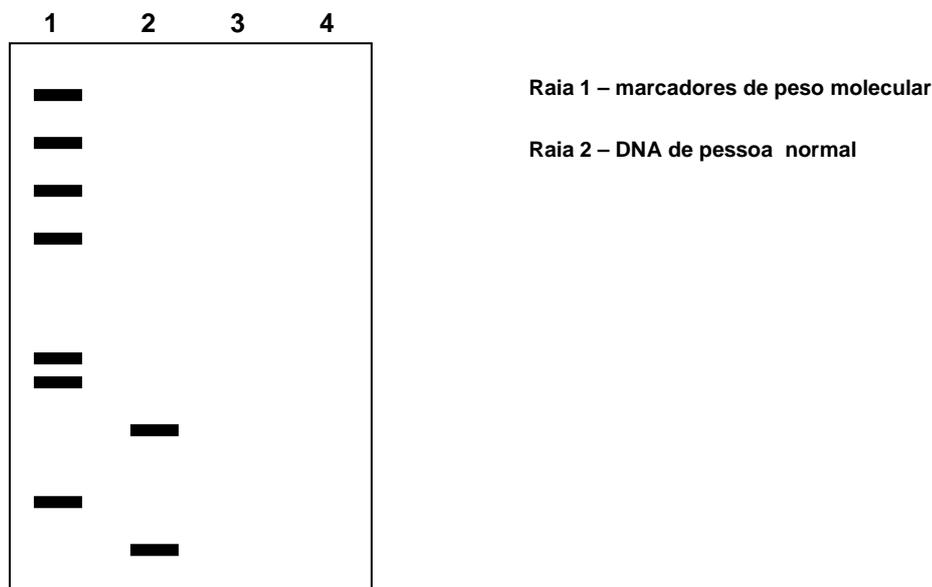
Obs.: A barra preta indica a região genômica utilizada como sonda.

2. A anemia falciforme está associada a existência de uma mutação de ponto A - T, no gene da  $\beta$ -globina que ocasiona, na proteína, a troca do aminoácido Glu por Val. Esta mutação elimina um sítio reconhecido pela enzima de restrição *Mst* II. O desenho abaixo representa um esquema dos genes selvagem e mutante.



O DNA de uma pessoa normal foi extraído, digerido com a enzima *Mst* II, fracionado por eletroforese e submetido a "Southern blot". A sonda utilizada na hibridação foi o segmento de 1,3 kb indicado na figura abaixo.

a) Planeje um teste utilizando a técnica de "Southern blot" para o diagnóstico pré-natal desta doença. Faça o esquema do resultado esperado considerando um feto normal e de um portador da doença cujos pais são heterozigóticos.



b) Complete na figura o padrão de bandas esperado para o DNA de:

- pessoa homozigótica para a mutação de ponto que causa a anemia falciforme.
- Pessoa heterozigótica para a mutação

**Atividade em software 8: Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

<http://bcs.whfreeman.com/>

clicar Cap 15

clicar PCR

**Questões 8:**

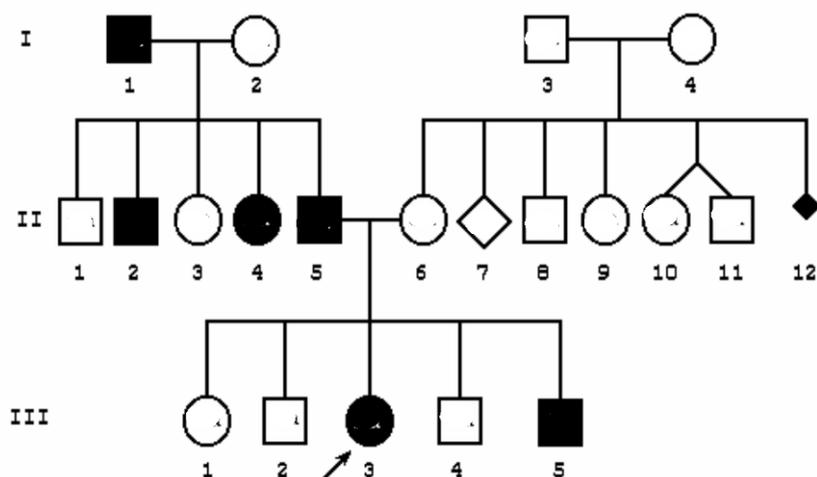
- 8.1. Comente a afirmação: a reação em cadeia da polimerase é uma reação de replicação *in vitro*.
- 8.2. Qual a função dos *primers* na técnica da PCR?
- 8.3. É necessário conhecer a seqüência de bases do DNA do segmento que se deseja amplificar? E a seqüência dos segmentos adjacentes ao fragmento que se deseja amplificar?
- 8.4. Cite pelo menos três aplicações da técnica da PCR

## Discussão em grupo: Estudo de heredogramas

1. Verifique os principais símbolos usados na confecção dos heredogramas na figura abaixo:

2. Analise, em grupo, os heredogramas A a F segundo o roteiro de perguntas que acompanha cada um deles.

### HEREDOGRAMA A



#### Questões A:

Discuta com seu grupo as seguintes questões:

A1. Há afetados em todas as gerações?

A2. Há homens e mulheres afetados?

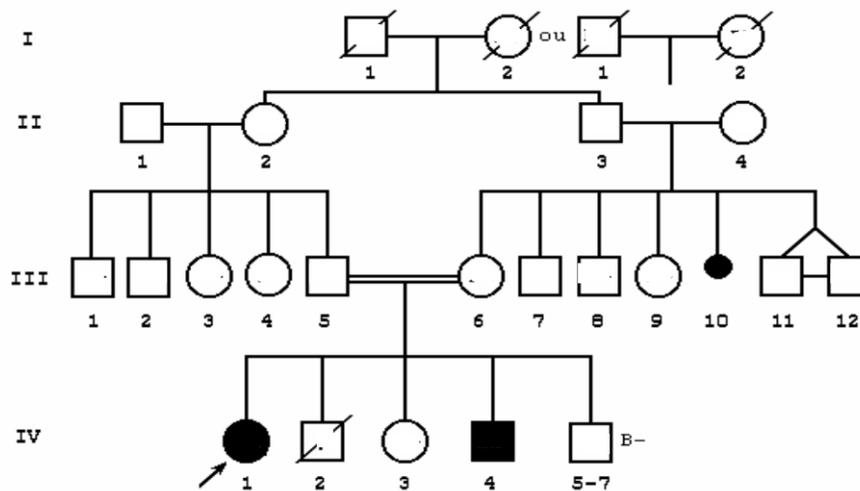
A3. Os homens afetados tiveram descendentes afetados? De eu sexo?

A4. As mulheres afetadas tiveram descendentes afetados?

A5. Qual o mais provável mecanismo de herança dessa condição?

A6. Coloque os genótipos mais prováveis nos indivíduos dessa genealogia.

## HEREDOGRAMA B



### Questões B:

Discuta com seu grupo as seguintes questões:

B1. Há afetados em todas as gerações?

A2. Há homens e mulheres afetados?

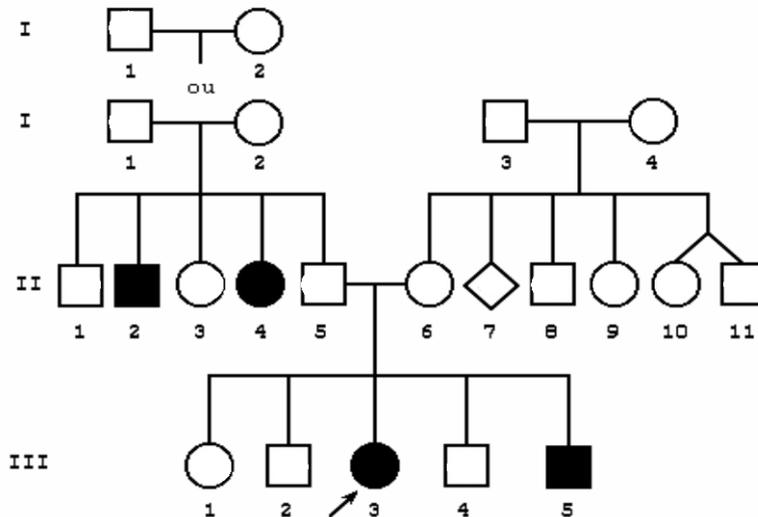
A3. Os afetados têm genitores afetados?

A4. Qual o mecanismo de herança mais provável dessa condição na família?

A5. Coloque os genótipos mais prováveis nos indivíduos dessa família.

A6. O casamento consanguíneo aumenta a chance de um casal ter crianças afetadas por doenças genéticas?

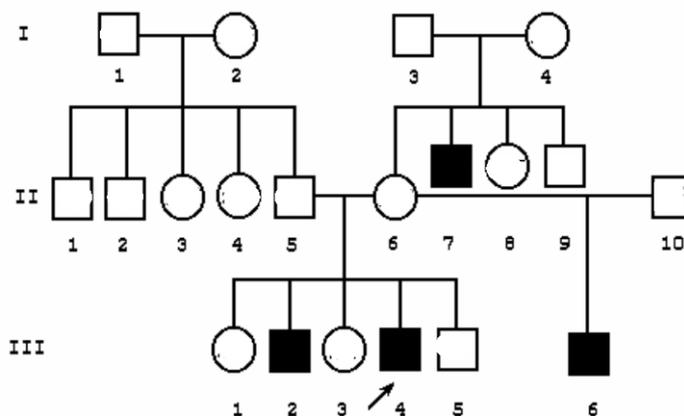
### HEREDOGRAMA C



#### Questões C:

- C1. Há afetados em todas as gerações?
- C2. Há homens e mulheres afetados em todas as gerações?
- C3. Os afetados têm genitores afetados?
- C4. Qual o mecanismo de herança mais provável nessa família?
- C5. Coloque os genótipos mais prováveis nos indivíduos dessa família.
- C6. Por que o mecanismo de herança autossômico recessivo é pouco provável nessa família?

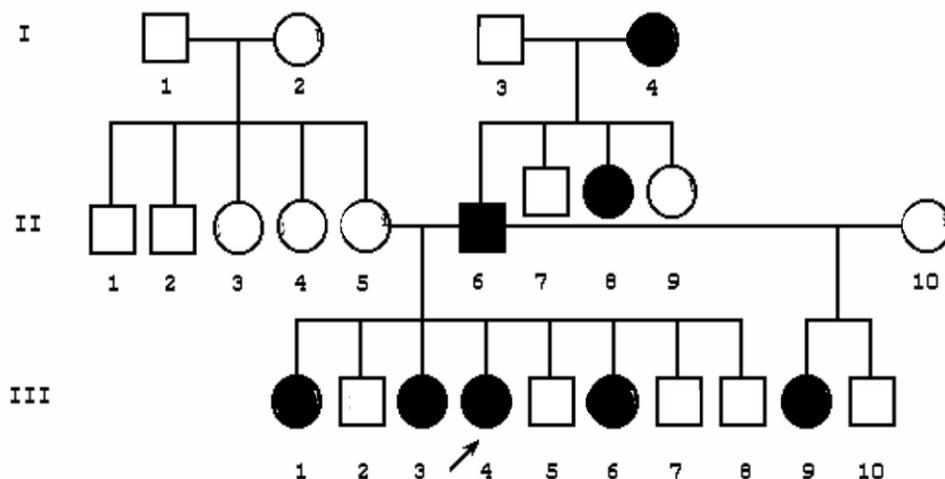
### HEREDOGRAMA D



#### Questões D:

- D1. Há afetados em todas as gerações?
- D2. Há homens e mulheres afetados?
- D3. Os afetados têm genitores afetados?
- D4. O gene mutado foi transmitido por homens?
- D5. O gene mutado foi transmitido por mulheres?
- D6. Qual o mecanismo de herança mais provável nessa família?
- D7. Coloque os genótipos mais prováveis nos indivíduos dessa família.

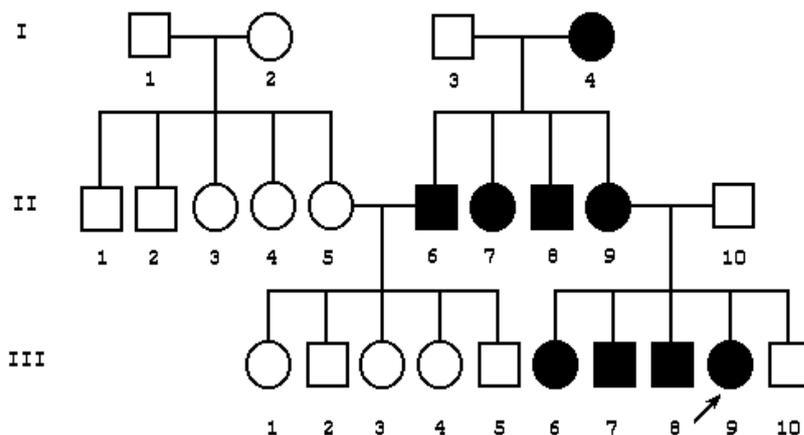
### HEREDOGRAMA E



#### Questões E:

- E1. Há afetados em todas as gerações?
- E2. Há homens e mulheres afetados?
- E3. Os afetados têm genitores afetados?
- E4. O gene mutado foi transmitido por homens? Para filhos e filhas?
- E5. O gene mutado foi transmitido por mulheres? Para filhos e filhas?
- E6. Qual o mecanismo de herança mais provável nessa família?
- E7. Coloque os genótipos mais prováveis nos indivíduos dessa família.

### HEREDOGRAMA F



#### Questões F:

- F1. Há afetados em todas as gerações?
- F2. Há homens e mulheres afetados?
- F3. Os afetados têm genitores afetados?
- F4. O gene mutado foi transmitido por homens afetados?
- F5. O gene mutado foi transmitido por mulheres afetadas?
- F6. Qual o mecanismo de herança mais provável dessa condição nessa família?

## Exercícios: Diagnóstico de doenças genéticas

1. A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva causada por substituição de ácido glutâmico (codificado por GAG) por valina (codificado por GTG) na posição 6 da cadeia beta da hemoglobina. A substituição elimina o sítio da enzima de restrição *Mst* II. Essa enzima corta o DNA de pessoas normais originando um fragmento de 1,1 kb; nas pessoas com a mutação a enzima gera um fragmento de 1,3 kb.

- a) Faça um esquema desta região do gene indicando sítios de restrição nas pessoas normais e nas com a mutação.
- b) Faça um esquema do resultado de uma hibridação com uma sonda específica do gene na seguinte família: 1) pai heterozigoto; 2) mãe heterozigota; 3) filho afetado; 4) filha afetada; 5) filha heterozigota; 6) filho heterozigoto; 7) filho homozigoto normal.

2. Esquematize um teste baseado na PCR que permita identificar o número de cópias de uma seqüência de trinucleotídeos em indivíduos portadores de uma doença causada por uma expansão de trinucleotídeos.

3. Um zoológico adquiriu uma fêmea de tigre para seu programa de reprodução em cativeiro. Apesar da identidade da mãe dessa fêmea ser conhecida, havia dúvida sobre sua paternidade e alguns dos machos potenciais para serem usados no cruzamento poderiam ser muito aparentados a ela. Foi realizado, então, o exame do DNA dessa fêmea de tigre, de sua mãe e de três machos, com o objetivo de se evitar excessiva consangüinidade no cruzamento.

Os resultados da análise usando uma sonda de minisatélite estão mostrados na figura abaixo, onde M = mãe; T = tigresa; M1-3 = machos potenciais de serem usados no cruzamento. Qual dos três machos seria o mais adequado para ser cruzado com a tigresa? Justifique sua resposta.

4. Quatro pares de gêmeos, nascidos no espaço de uma hora, foram trocados em uma maternidade.

Você foi chamado para resolver o problema. Como um primeiro passo, você deseja identificar os pares de gêmeos. Para isso analisou o sangue de cada criança usando uma sonda que identifica polimorfismos de VNTR. Com base nos resultados mostrados na figura, responda quais crianças são irmãs e como você irá identificar os pais corretos.

5. A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa com padrão de herança autossômica dominante. O início dos sintomas ocorre geralmente após a quarta década de vida. O gene da doença foi identificado em 1992. Mas, antes disso, para as famílias que desejassem, era feito o aconselhamento genético com RFLPs mapeados próximos ao gene da doença. Uma das sondas utilizadas é chamada G8 e revela um polimorfismo de sítios de restrição *Hind* III representado no esquema a seguir. A genealogia representada na próxima página é de uma família estudada na Venezuela e nela estão indicados os resultados do estudo com a sonda G8. Com base nessas informações responda as questões de a-d:

- a) Esquematize o provável resultado das hibridações após *Southern blotting* para cada um dos indivíduos identificados pelas letras correspondentes ao tipo de quando este é digerido com *Hind* III. São todos diferentes?
- b) Que associação com o RFLP você pode observar na genealogia?
- c) Existe algum indivíduo excepcional quanto ao padrão de segregação da doença?
- d) Imagine que o indivíduo VI-11 da genealogia não seja afetado pela doença. O que você diria a ele sobre a possibilidade de manifestar a doença, considerando que ele tem somente 20 anos de idade?

## **Textos de apoio às atividades realizadas**

## O DOGMA CENTRAL DA BIOLOGIA

*Regina Célila Mingroni Netto, Eliana Maria Beluzzo Dessen, José Mariano Amabis*

No final de 1953, os pesquisadores adotaram como hipótese de trabalho a idéia de que o DNA atuaria como molde para a síntese do RNA, cujas moléculas migrariam para o citoplasma onde iriam determinar o arranjo dos aminoácidos nas proteínas. Este esquema para o fluxo de informação genética, abaixo esquematizado, foi denominado **dogma central** da Biologia, por Francis Crick em 1956.

A informação é perpetuada através da replicação do DNA.  
A informação é expressa em um processo de dois estágios:

1. a transcrição origina um RNA de fita simples, idêntico em seqüência de bases a uma das fitas do DNA;
2. a tradução converte a seqüência de bases do RNA na seqüência de aminoácidos da proteína.

Assim, o dogma central define o paradigma da Biologia Molecular, ou seja, que os genes são perpetuados como seqüências de ácido nucléico e se expressam por meio da síntese de proteínas.

### A TRANSCRIÇÃO DO DNA

A transcrição do DNA em moléculas de RNA é um processo altamente seletivo, pois apenas uma pequena porção das seqüências de DNA é copiada em RNA. Na maioria das células de mamíferos, por exemplo, apenas 1% das seqüências de nucleotídeos é copiada em seqüências funcionais de RNA. Essa seletividade é de importância fundamental, uma vez que a transcrição é o primeiro estágio da expressão gênica e o passo principal em que ela é controlada. O passo inicial na regulação de um gene, e às vezes o único, é a decisão se ele será transcrito ou não.

A síntese de RNA ocorre dentro da chamada bolha de transcrição, uma estrutura na qual cerca de 18 pares de bases do DNA são temporariamente separados e uma das fitas da dupla hélice serve como molde para o RNA que está se formando. À medida que a polimerase do RNA se move, a bolha de transcrição move-se com ela, e a cadeia de RNA aumenta em tamanho. Após a passagem da polimerase, a cadeia de RNA se solta de seu molde e as duas cadeias do DNA voltam a se emparelhar, restabelecendo as pontes de hidrogênio rompidas durante a transcrição.

O processo de transcrição tem início quando a polimerase do RNA liga-se a uma seqüência especial de DNA, denominada **promotor**, localizada no início de um gene. Nessa seqüência de bases existe uma região especial, denominada **sítio de iniciação**, que corresponde a primeira base do DNA a ser transcrita em RNA. A partir desse ponto, a polimerase do RNA move-se ao longo do molde, sintetizando RNA, até alcançar a **seqüência de terminalização**.

A seqüência de DNA transcrita em uma única molécula de RNA, que teve início no promotor e término na região terminalizadora, constitui uma **unidade de transcrição**. Nos eucariontes uma unidade de transcrição é, em geral, composta por um único gene. Já nos procariontes, uma unidade de transcrição contém, em geral, instrução para a síntese de

diversas cadeias polipeptídicas, ou seja, contém vários cistrons. O RNA codificado por tal unidade de transcrição é denominado **policistrônico**.

### **Etapas da transcrição**

#### *Reconhecimento do molde de DNA*

As moléculas livres de polimerases do RNA colidem ao acaso com o DNA podendo ligar-se a ele, porém muito fracamente. A polimerase do RNA liga-se fortemente ao DNA apenas quando ela contata uma região promotora. Nesse caso, a enzima liga-se fortemente ao promotor causando o desemparelhamento da dupla hélice (Figura 1).

**Figura 1.** À direita, representação esquemática do processo de transcrição do DNA. À medida que a polimerase se desloca sobre o DNA, uma das cadeias serve de molde para a molécula de RNA. Acima, representação esquemática da organização do DNA na bolha de transcrição.

Toda região promotora contém uma seqüência de bases específica que marca o local de início de síntese do RNA. No genoma das bactérias, a seqüência mínima com capacidade de sinalizar o local de início de transcrição tem 12 pares de bases.

O seqüenciamento de bases de diferentes promotores mostrou que há uma seqüência básica que está presente em todos eles. Por essa razão, ela é chamada de **seqüência consenso**. Essas seqüências, no entanto, não possuem todas as bases iguais, havendo alguma variação entre elas. Assim, pode-se perguntar como as seqüências devem ser analisadas para se determinar se elas são suficientemente semelhantes pra constituir um sinal reconhecível?

As seqüências de DNA sinalizadoras podem ser definidas em termos de uma seqüência ideal que representa cada uma das bases que estão presentes com maior freqüência em cada uma das posições. Todas as seqüências conhecidas são então alinhadas para maximizar a homologia entre elas. Para que uma seqüência seja aceita como consenso, cada base particular deve ser predominante em sua posição e a maioria dos exemplos conhecidos devem relacionar-se com o consenso possuindo apenas poucas substituições, não mais do que uma ou duas

Em um promotor bacteriano há quatro características conservadas: (1) o **sítio de início de transcrição**, que em geral é uma purina; (2) o **TATA box**, que é uma região de seis pares de bases ao redor do sítio -10, e seqüência consenso é TATAAT ; (3) uma seqüência consenso TTGACA, localizada ao redor do sítio -35; (4) a distância entre os sítios -10 e -35, correspondente a 16 - 18 pares de bases e que é crítica para a ligação da polimerase do RNA.

A conservação de curtas seqüências consenso em sítios reguladores do gene é uma característica tanto de procariontes quanto de eucariontes.

### **Início da transcrição**

A transcrição tem início quando um primeiro nucleotídeo trifosfatado é posicionado sobre a cadeia molde de DNA, por ação da polimerase do RNA.

A polimerase do RNA permanece ligada à região promotora enquanto são adicionados os primeiros nove nucleotídeos da cadeia de RNA sendo sintetizada. Essa fase pode ser prolongada pela ocorrência de eventos abortivos, nos quais a enzima sintetiza transcritos de tamanho inferior a nove nucleotídeos. Essa fase inicial, chamada **fase de iniciação**, termina quando a polimerase consegue estender a síntese além desse tamanho.

### **Fase de alongação**

Após a síntese de cerca de nove nucleotídeos da molécula de RNA, a subunidade sigma da polimerase do RNA dissocia-se e diversos **fatores de alongação** se associam à polimerase, que passa a se deslocar ao longo do DNA, alongando a molécula de RNA em processo de síntese. Essa é a **fase de alongação**.

À medida que a polimerase do RNA se move ao longo do DNA, ela desenrola a hélice, expondo um novo segmento da cadeia molde. Os nucleotídeos vão sendo covalentemente unidos à extremidade 3' da cadeia em crescimento, formando um híbrido DNA/RNA na região desenrolada do DNA. Imediatamente atrás do local onde está ocorrendo a síntese, a região do DNA já copiada volta a se emparelhar, refazendo a dupla hélice. O RNA, que vai se soltando do DNA, emerge como uma fita simples e livre.

A etapa final da transcrição, chamada **fase de término**, envolve o reconhecimento de uma seqüência sinalizadora, a partir da qual nenhuma base deve ser incorporada ao RNA. Quando a última base é adicionada ao RNA, a bolha de transcrição colapsa e o híbrido DNA/RNA é desfeito, as duas cadeias do DNA emparelham-se completamente e o RNA e a enzima se soltam.

A seqüência de DNA que sinaliza o término da transcrição é chamada **região terminalizadora**.

### **O término da transcrição**

Na bactéria *E. coli* há dois mecanismos básicos de término de transcrição. No primeiro deles, a terminação é direta e a seqüência de DNA que sinaliza o término da transcrição contém cerca de 40 bases, sendo que na extremidade 3' existe um segmento rico em C e G, seguido por 6 ou mais timinas. No RNA transcrito, a seqüência rica em C e G fica arranjada de modo a que a molécula de RNA possa formar, nessa região, uma alça em forma de grampo de cabelo (*hairpin*). Na molécula de RNA, essa alça é seguida por uma série de Us que correspondem aos resíduos de adenina da cadeia molde de DNA. A estrutura em forma de grampo, juntamente com a seqüência de Us, provoca a parada e o desprendimento da polimerase do RNA com conseqüente término da transcrição.

O segundo mecanismo de término depende da participação de uma proteína que se acredita liga-se à molécula de RNA nascente em algum ponto antes da seqüência que sinaliza o término da transcrição.

## **O RNA MENSAGEIRO**

Os transcritos de RNA que contêm a informação para a síntese de proteínas são denominados **RNA mensageiros (RNAm)**. Há importantes diferenças nos detalhes da síntese e da estrutura dos RNA mensageiros de pro e eucariontes. Nas bactérias, o RNAm é transcrito e traduzido no único compartimento celular e os dois processos ocorrem acopladamente. Na célula eucarionte, a síntese e a maturação dos RNAm ocorrem exclusivamente no núcleo. Apenas quando o RNAm está maduro é que ele é exportado para o citoplasma e traduzido.

Diferenças significativas na tradução dos RNAm de bactérias e de eucariontes são devidas a suas características estruturais e estabilidade. A diferença estrutural é que o RNAm de bactérias freqüentemente codifica para várias proteínas, sendo chamado de **policistrônico**, enquanto o RNAm de eucariontes na maioria dos casos codifica para apenas uma cadeia polipeptídica, sendo chamado de **monocistrônico** (Fig. 10). A diferença funcional é que o RNAm de bactérias geralmente é instável, e é por isso traduzido em proteínas durante um

período de tempo muito curto, tipicamente poucos minutos. O RNAm dos eucariontes é mais estável e pode continuar a ser traduzido por várias horas ou mesmo dias.

Vários passos são necessários para produzir o RNA mensageiro maduro dos eucariontes. As moléculas mensageiras recém-sintetizadas pela polimerase II são denominadas **transcritos primários**. A população de tais transcritos no núcleo foi originalmente denominada **RNA heterogêneo nuclear (RNAhn)**, por causa da grande variação em tamanho que apresentava, contrastando com os RNAs mais uniformes e de menor tamanho realmente necessários para codificar uma proteína. Muita dessa variação em tamanho no RNA recém-sintetizado é devida à presença de longas seqüências de nucleotídeos que serão retiradas do transcrito primário em um processo denominado *splicing*.

### **Íntrons são removidos do pré-RNAm**

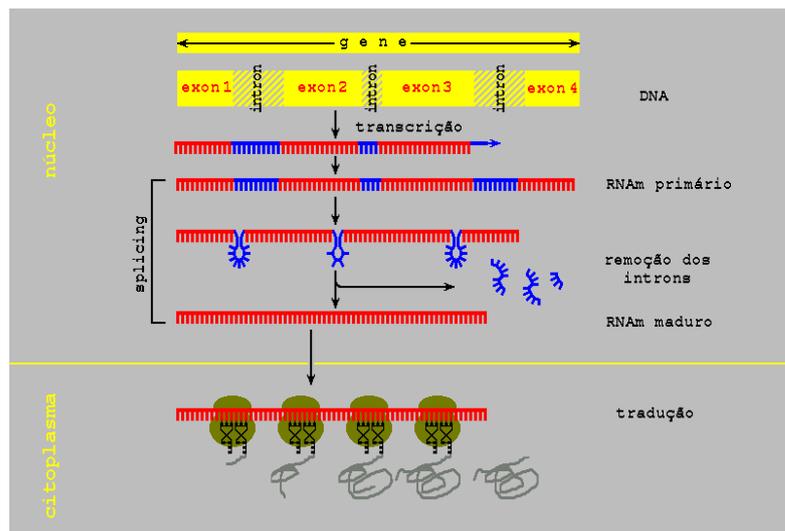
Para a produção de um RNA mensageiro em células eucarióticas, o segmento inteiro do gene, incluindo íntrons e éxons, é primeiramente transcrito em uma longa molécula de RNA, o transcrito primário. Antes que o RNA deixe o núcleo, todas as seqüências de íntrons são retiradas e os éxons são unidos entre si. O resultado é uma molécula mais curta de RNA, que agora contém uma seqüência codificadora ininterrupta. Quando esse passo, denominado *splicing* do RNA, é completado, o RNA é uma molécula de RNAm funcional que pode deixar o núcleo e ser traduzida em proteínas.

Como a célula determina quais as partes do transcrito primário devem ser removidas? Diferentemente da seqüência de código de um éxon, a seqüência exata de nucleotídeos da maioria dos íntrons parece não ser importante para a célula. Embora haja pouca semelhança entre as seqüências de nucleotídeos de íntrons diferentes, cada íntron contém uma curta seqüência de nucleotídeos que atua como uma marca para sua remoção (Fig. 2).

Os íntrons são removidos do RNA por enzimas que, ao contrário de muitas outras enzimas, são compostas por um complexo de RNA e proteína. Essas partículas encarregadas do *splicing* do RNA são denominadas snRNPs ou *snurps* (do inglês - *small nuclear ribonucleoprotein particles*). Em cada íntron, um grupo de snRNPs se associa ao RNA, excisa (ou corta) o íntron, e o reúne à cadeia de RNA liberando o íntron excisado como um laço (Fig. 2 e 3). Um dos papéis do RNA presente nos snRNPs (*snurps*) é reconhecer e – por complementaridade de bases – emparelhar com a seqüência de nucleotídeos que marcam o início e o ponto de ramificação de cada íntron (veja Fig. 3). Desse modo, os *snurps* aproximam as duas extremidades do íntron permitindo a ocorrência do *splicing*. Embora os *snurps* tenham um papel central na reação de *splicing*, outras proteínas são também necessárias.

**Figura 2.** Seqüência de nucleotídeos que sinaliza o início e o final de um íntron. As três seqüências de nucleotídeos mostradas são necessárias para remover um íntron. As outras posições de um íntron podem ser ocupadas por qualquer nucleotídeo. As seqüências especiais são reconhecidas por snRNPs, que clivam o RNA nos limites íntron-éxon e ligam covalentemente os éxons. A adenina (A) apontada pela seta forma o ponto de ramificação do laço produzido na reação de *splicing* (Figura 12) e está tipicamente localizado cerca de 30 nucleotídeos da extremidade 3' do íntron.

**Figura 3.** – Mecanismo de síntese de cadeias polipeptídicas nos organismos eucariontes, mostrando como são removidas as regiões não codificadoras (íntrons) do RNAm.



O *splicing* do RNA em eucariotos permite uma vantagem adicional. O transcrito primário de vários genes eucarióticos podem sofrer *splicing* de diferentes maneiras para produzir diferentes RNAm, dependendo do tipo de célula no qual o gene está sendo expresso, ou do estágio de desenvolvimento do organismo. Isso garante que diferentes proteínas sejam produzidas a partir do mesmo gene (Fig.4).

Em conclusão, ao invés de ser um processo que acarreta desperdício, o *splicing* do RNA dos eucariotos permite o aumento do já enorme potencial de código de seus genomas.

**Figura 4.** *Splicing* alternativo do gene da  $\alpha$ -tropomiosina de rato.  $\alpha$ -tropomiosina é uma proteína que regula a contração das células musculares. Seu papel em outras células não é bem conhecido. Uma vez que o transcrito primário é feito, ele pode sofrer *splicing* de diferentes modos, e produzir RNAs distintos que originam proteínas variantes. Alguns dos padrões de *splicing* são específicos para certos tipos de células. Por exemplo, a  $\alpha$ -tropomiosina feita em musculatura estriada é diferente da feita na musculatura lisa. As cabeças de seta na parte superior da figura representam sítios onde podem ocorrer clivagem e adição da cauda de poli (A).

### Os RNAm sofrem outras modificações

Os RNAs sintetizados pela polimerase II também são modificados em ambas as extremidades, ficando bastante diferentes dos transcritos produzidos por outras polimerases. Essas modificações serão utilizadas posteriormente, no citoplasma, como sinais de que esses RNAs devem ser traduzidos em proteínas.

A extremidade 5' da molécula de RNA é "encapada" (do inglês *capped*) pela adição de um nucleotídeo contendo G metilado. O encapamento ocorre no início da transcrição, quando o transcrito ainda é pequeno com apenas 30 nucleotídeos de comprimento. Essa reação se dá pela ligação de uma molécula de 7-metilguanosina à extremidade 5' do transcrito. A extremidade 5' *cap* tem um importante papel nos passos iniciais da tradução do RNAm, além de proteger o RNA nascente de degradação.

A extremidade 3' do transcrito também é modificada. O transcrito é clivado em um sítio específico da molécula e uma cadeia de nucleotídeos com base adenina (**cauda de poli-A**) é adicionada, na extremidade clivada, por ação de uma polimerase específica.

## O RNA TRANSPORTADOR

A primeira hipótese para explicar a atuação do RNA como intermediário na síntese de proteínas partia do princípio que as moléculas de RNAm se dobrariam de modo a formar concavidades nas quais os diferentes aminoácidos pudessem se encaixar. Esse dobramento do RNA seria específico para cada um dos 20 aminoácidos existentes na célula e, desse modo, o RNA forneceria a instrução para a ordenação dos aminoácidos durante a síntese de proteína.

Essa hipótese foi descartada por Francis Crick em 1956; seu argumento foi que não havia uma fundamentação química para a interação entre o RNA dobrado e um aminoácido. Mesmo que o dobramento proposto ocorresse, não haveria condições para a discriminação precisa entre os aminoácidos, sabidamente muito semelhantes entre si, como por exemplo, glicina e alanina ou valina e isoleucina, que diferem apenas pela presença de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ). Crick propôs, então, que antes de serem incorporados em proteínas, os aminoácidos deveriam ligar-se a moléculas adaptadoras específicas, e essas poderiam ligar-se especificamente às bases de um RNA que teria sido sintetizado tendo o DNA como molde. Hoje se sabe que o papel de molécula adaptadora é desempenhado pelos **RNAs transportadores (RNAt)**.

Os RNAt foram intensamente estudados e hoje se sabe que eles estão envolvidos em uma multiplicidade de reações. Para desempenhar certas reações é necessário que todos os tipos de RNAt possuam algumas características em comum mas, por outro lado, eles possuem pequenas diferenças que permitem a distinção entre os diferentes tipos de moléculas.

Todos os RNAt devem ser capazes de interagir com sítios específicos dos ribossomos durante o processo de síntese de proteína. Além disso, em uma de suas extremidades, eles devem se associar ao RNAm, através da interação entre bases complementares, na outra extremidade eles devem transportar um aminoácido. Para cumprir essas funções, todos os tipos de RNAt devem obedecer a uma regra geral e uniforme quanto à sua forma e tamanho.

Os RNAt consistem de um conjunto de pequenas moléculas de RNA, cada uma delas com cerca de 80 nucleotídeos. Diferentemente dos demais ácidos nucléicos, eles apresentam diversas **bases não-usuais**, ou seja, diferentes de A, G, C ou U. Essas bases originam-se por modificações de bases usuais após sua incorporação na molécula de RNAt (Fig. 5).

**Figura 5.** Alguns exemplos de bases não usuais presentes em RNAt

As bases das moléculas precursoras dos RNAt sofrem uma vasta gama de modificações, desde simples metilações até reestruturação do anel purínico. Tais modificações aumentam a versatilidade dos RNAt, o que é muito importante para as várias funções que desempenham. O efeito mais evidente da modificação de bases dos RNAt é a alteração em sua capacidade de emparelhamento com o RNAm. Nesse caso a modificação ocorre em bases da trinca (**anticódon**), por meio das quais o RNAt se emparelha com o RNA mensageiro durante a síntese de proteína, ou nas vizinhanças delas.

O seqüenciamento de bases de centenas de RNAt de bactérias e eucariontes mostrou que todos têm a mesma estrutura secundária, uma forma de folha de trevo mantida por emparelhamento de bases entre pequenas regiões de complementaridade (Fig. 6).

**Figura 6.** Ao lado, estrutura em forma de folha de trevo da molécula de RNAt no plano. Abaixo, duas visões da conformação tridimensional do RNAt determinada por difração de raios X.

Os quatro braços principais presentes na estrutura em forma de trevo receberam denominações relacionadas à sua estrutura ou à função que desempenham. O **braço acceptor** termina com uma seqüência de bases não emparelhadas, cujos grupos hidroxila livres 2' ou 3' têm a capacidade de se ligar a aminoácidos; o **braço ou alça T** é assim denominado porque contém timina; o **braço ou alça anticódon** contém a trinca do anticódon; o **braço ou alça D** contém a base dihidrouridina. Como mostrado na figura 17, a estrutura secundária do RNAt se dobra, originando uma estrutura terciária mais compacta, em forma de L, com o anticódon em uma das extremidades e o braço acceptor na outra. A estrutura terciária é mantida por meio de pontes de hidrogênio entre bases que se encontram desemparelhadas na estrutura secundária.

## O RNA RIBOSSÔMICO

Os ribossomos são estruturas ribonucleoprotéicas, presentes no citoplasma de células pro e eucariontes, que atuam na síntese de proteínas. Os ribossomos são compostos por duas subunidades de tamanhos diferentes, que se encaixam uma na outra formando um complexo com massa de vários milhões de daltons. Mais da metade dessa massa corresponde a uma classe especial de RNA, o chamado **RNA ribossômico (RNAr)**. Existem evidências de que esse RNA tem atividade catalítica na síntese de proteínas.

As subunidades dos ribossomos, assim como as moléculas de RNAr, são designadas pelo seu coeficiente de sedimentação, expresso em unidades Svdeberg (**S**).

Atualmente, há evidências de que o RNAr interage com o RNAm ou RNAt em cada um dos estágios da tradução, e que, de fato, diversas proteínas são necessárias.

**Figura 7.** Representação esquemática de ribossomos. À esquerda, modelos tridimensionais das subunidades de um ribossomo bacteriano observadas de dois ângulos diferentes: (a) subunidade menor, (b) subunidade maior, e (c) subunidades reunidas. À direita, modelo ampliado mostrando a posição do RNAm e da cadeia polipeptídica sendo sintetizada.

## O CÓDIGO GENÉTICO

*Regina Célila Mingroni Netto, Eliana Maria Beluzzo Dessen, José Mariano Amabis*

### Sistema de codificação genética

**Código genético** é o conjunto de regras que governa a relação entre a seqüência de nucleotídeos no DNA e a ordem dos aminoácidos nas proteínas. É nessa relação que reside a essência da expressão gênica e a decifração do código genético foi realmente um importante marco na história da Biologia.

Código é definido como "um sistema de símbolos (letras, números ou palavras) usado para representar um certo significado pré-estabelecido, às vezes secreto". Por exemplo, o código Morse internacional é constituído por pontos, barras e espaços. Para quem não conhece o código, os pontos e barras não têm o menor significado, mas conhecendo-se as regras do código, os pontos e barras podem ser facilmente convertidos em frases.

O código genético permite à célula converter seqüências de bases do DNA em cadeias polipeptídicas.

### A unidade do código genético

Existem 20 diferentes aminoácidos que devem ser especificados durante o processo de síntese de proteínas por algum tipo de combinação das quatro diferentes bases existentes no DNA. Quantas bases devem ser utilizadas para construir um código que permita que os 20 aminoácidos diferentes sejam especificados?

Se as palavras desse código tivessem uma base, apenas quatro aminoácidos seriam especificados. Um código baseado em conjuntos de duas bases permitiria 16 combinações diferentes. Já um código baseado em trincas de bases permitiria 64 combinações distintas de bases, o que seria suficiente para determinar os 20 aminoácidos. Como os sistemas celulares são geralmente econômicos, um código baseado em quatro letras seria muito improvável, pois permitiria 256 combinações diferentes. Assim, um código baseado em trincas seria a situação mais razoável. Contudo, ainda fica a seguinte pergunta: Como são lidas essas trincas? Uma após a outra ou uma mesma base pode fazer parte de três trincas adjacentes? Nesta segunda opção diríamos que o código é sobreposto. (Fig.8)

Em um código sobreposto, cada base do DNA participaria da codificação de dois ou três aminoácidos. Este tipo de código imporá severas restrições sobre as seqüências de aminoácidos das proteínas. Assim, por exemplo, um aminoácido cujo código fosse CAG não poderia ser seguido por um outro cujo código tivesse como primeira base um T ou um C

**Figura 8.** Comparação entre códigos de três letras sobreposto e não-sobreposto. No código não-sobreposto, a proteína é traduzida por códons que não compartilham nenhum nucleotídeo. Já no código sobreposto, cada códon compartilha um ou mais nucleotídeos, dependendo do grau de sobreposição, com os códons vizinhos.

porque, por definição, a primeira base do próximo aminoácido teria que ser A ou G, dependendo da extensão da sobreposição.

Brenner, na década de 60, foi o primeiro a propor que o código não era sobreposto, isto é, que cada base participaria na codificação de um único aminoácido.

Também devemos considerar que se o código fosse sobreposto, toda vez que uma base fosse alterada na molécula do DNA, um, dois ou três aminoácidos seriam alterados na proteína mutante. A evidência genética, contudo, não falava a favor dessa hipótese. Em estudos sobre mutações no vírus do mosaico do tabaco (TMV), a substituição de um único nucleotídeo no genoma viral resultava geralmente na alteração de um único aminoácido na cápsula protéica do vírus, e não na alteração simultaneamente de três aminoácidos, como seria esperado se o nucleotídeo alterado fizesse parte de três códons ao mesmo tempo.

### A Natureza tríplice do código

Quando Benzer estava trabalhando no sistema rII do fago T4, ele verificou que os indivíduos com mutação de ponto revertiam muito freqüentemente para o tipo selvagem. Ele poderia ter pensado que este fato seria devido à reversão da mutação original que resultaria novamente na seqüência de bases do tipo selvagem. Isso é verdadeiro para a maioria das reversões, no entanto, mutações reversas não constituem a única maneira pela qual indivíduos com mutações de ponto no loco rII podem reverter ao tipo selvagem. Foi verificado que, em alguns casos, os revertidos carregavam uma segunda mutação ocorrida nas proximidades da mutação original. As duas mutações juntas eram responsáveis pela produção de um fenótipo selvagem, isto é, a segunda mutação suprimia o efeito da primeira e foi, por este fato, denominada **mutação supressora**.

Crick e Brenner, em 1961, aproveitaram essas mutações supressoras para provar que o código genético era realmente composto por trincas, oito anos após a idéia ter sido proposta. Eles foram capazes também de demonstrar que a seqüência de bases do DNA era lida a partir de um determinado ponto, trinca por trinca, de maneira não sobreposta. Isto significava que cada mensagem genética tinha uma estrutura de leitura fixa que poderia ser alterada pela adição ou remoção de uma única base. O polipeptídeo especificado pela mensagem conteria aminoácidos incorretos a partir do ponto em que a base foi adicionada ou removida. Um aspecto que deve ser ressaltado é o fato destas mutações terem sido induzidas por corantes do tipo acridina, que causam inserção ou deficiência de bases na seqüência de nucleotídios do DNA.

Crick e Brenner assumiram que se uma mutação fosse uma inserção de apenas uma base no DNA da região rII (representada por um sinal +), a sua supressora deveria ser uma deleção (representada por sinal -). Assim, se a seqüência de bases do DNA estivesse sendo lida trinca por trinca (da esquerda para a direita), começando de um ponto determinado, a inserção de uma base determina que todas as trincas à direita da mutação fossem lidas de maneira diferente do original; esta seria, portanto, uma mutação do tipo **mudança do quadro de leitura**. Geralmente, isto resultaria num polipeptídeo não funcional. Para compreender melhor os efeitos de uma mutação que afeta o quadro de leitura, observe esta frase em inglês constituída por palavras de apenas três letras:

THE FAT CAT ATE THE BIG RAT

Deletando C                    C

THE FAT    ATA TET HEB IGR AT

Inserindo A:                    A

THE FAT ATA ATE THE BIG RAT

A inserção suprime o efeito da deleção pois restaura a fase de leitura. Mas sozinha, uma inserção também perturbaria completamente o sentido da frase:

Inserindo A: **A**

THE FAT CAT **A**AT ETH EBI GRAT

Assim, a leitura correta das trincas seria interrompida após uma mutação (+), sendo, entretanto, restabelecida após uma mutação (-). Se a região alterada entre as duas mutações não for crítica, o polipeptídeo pode ser funcional.

Mutações supressoras estão sempre próximas das mutações que elas suprimem, uma vez que é pouco provável que um polipeptídeo contendo grande número de aminoácidos alterados permaneça funcional. Caso tivéssemos uma segunda mutação de sinal (+) ela não teria suprimido a mutação (-) e não haveria reversão para o tipo selvagem.

Considere a seguinte seqüência de bases:

CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT C...

a. Note como a inserção de uma base altera a seqüência:

Inserção de um G:

**G**  
CAT C**G** TCA TCA TCA TCA TCA TC...

b. Note como a inserção de uma segunda base qualquer mantém a seqüência alterada:

Inserção de um A:

**A**  
CAT CAG TCA T**A**C ATC ATC ATC ATC...

A natureza tríplice do código somente foi demonstrada quando foram obtidos mutantes contendo três mutações do tipo inserções ou três deficiências, pois esses mutantes triplos tinham o fenótipo selvagem. Este resultado só seria possível se o código fosse lido em trincas, pois somente neste caso a ordem correta da leitura seria restabelecida após três alterações de mesmo sinal.

c. Note como a inserção de uma terceira base qualquer restabelece a seqüência original:

Inserção de um T:

**T**  
CAT CAG TCA TAC T**T**AT CAT CAT CAT C...

Os experimentos revelaram também a impossibilidade de apenas 20 dos 64 códons possíveis serem usados para especificar aminoácidos. Neste caso, 44 códons não teriam sentido, isto é, não corresponderiam a aminoácidos. Se isso fosse verdadeiro, um destes códons sem sentido deveria muito provavelmente aparecer entre uma inserção e sua deficiência supressora, determinando a terminação da cadeia polipeptídica antes que a leitura correta fosse restabelecida. Em outras palavras, estes estudos já sugeriam que, como veremos em breve, o código genético era **degenerado**.

Dizer que o código genético é degenerado significa que mais de um tipo de trinca de bases pode determinar o mesmo aminoácido na cadeia polipeptídica.

|                        |   | segunda base do códon |         |         |         |   |   |
|------------------------|---|-----------------------|---------|---------|---------|---|---|
|                        |   | U                     | C       | A       | G       |   |   |
| primeira base do códon | U | UUU phe               | UCU ser | UAU tyr | UGU cys | U | c<br>t<br>e<br>r<br>m<br>i<br>n<br>a<br>d<br>o<br>r<br>e<br>s |
|                        |   | UUC phe               | UCC ser | UAC tyr | UGC cys | C |   |
|                        |   | UUA leu               | UCA ser | UAA *   | UGA *   | A |   |
|                        |   | UUG leu               | UCG ser | UAG *   | UGG trp | G |   |
|                        | C | CUU leu               | CCU pro | CAU his | CGU arg | U |   |
|                        |   | CUC leu               | CCC pro | CAC his | CGC arg | C |   |
|                        |   | CUA leu               | CCA pro | CAA gln | CGA arg | A |   |
|                        |   | CUG leu               | CCG pro | CAG gln | CGG arg | G |   |
|                        | A | AUU ile               | ACU thr | AAU asn | AGU ser | U |   |
|                        |   | AUC ile               | ACC thr | AAC asn | AGC ser | C |   |
|                        |   | AUA ile               | ACA thr | AAA lys | AGA arg | A |   |
|                        |   | AUG met               | ACG thr | AAG lys | AGG arg | G |   |
|                        | G | GUU val               | GCU ala | GAU asp | GGU gly | U |   |
|                        |   | GUC val               | GCC ala | GAC asp | GGC gly | C |   |
|                        |   | GUA val               | GCA ala | GAA glu | GGA gly | A |   |
|                        |   | GUG val               | GCG ala | GAG glu | GGG gly | G |   |

**Tabela 1.** Código genético: correspondência de trios 5' - 3' de RNAm (códon) e resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. O asterisco indica códon de parada de leitura ou terminadores.

## O CÓDIGO "IN VIVO"

Os detalhes do código que foram demonstrados pelos experimentos *in vitro* são verdadeiros *in vivo*? Eles se aplicam aos organismos superiores, já que todos os trabalhos foram realizados com bactérias e fagos?

Hoje está largamente demonstrado que o código genético é universal. Na verdade, a universalidade do código pode ser considerada em diversos níveis. Assim, estudos sobre a seqüência de bases do fago R17 mostraram que AUG é realmente o códon inicial desse vírus e que isso também é verdadeiro para leveduras e mamíferos. As observações sobre substituição de aminoácidos em mutantes de organismos tão diferentes como vírus do mosaico do tabaco, levedura e homem são compatíveis com o código estabelecido para *E. coli*.

Em extratos de *E. coli* contendo todo o material necessário para a transcrição e tradução, pôde ser sintetizada *in vitro* a proteína do vírus da póliomielite. RNA mensageiro para hemoglobina de coelho, pôde ser traduzido em células de sapo, originando hemoglobina de coelho.

A universalidade do código genético sugere que ele deve ter sido estabelecido muito cedo na evolução.

As exceções à universalidade do código são raras e geralmente envolvem códon de parada. Por exemplo, em micoplasma, UGA codifica para triptofano e em certas espécies de ciliados UAA e UAG codificam para glutamina. As principais alterações do código ocorreram nos DNAs mitocondriais. Isto deve ter sido possível porque a mitocôndria é um sistema relativamente fechado, responsável pela síntese de poucas proteínas. A maioria das alterações envolve os códon de parada, mas trocas no significado de alguns aminoácidos são também observadas, como podemos observar na tabela a seguir.

## OS EFEITOS DAS MUTAÇÕES

Muitas mutações acarretam mudanças na seqüência de nucleotídeos que não afetam o funcionamento do material genético dos organismos. Isso ocorre porque são mutações silenciosas que ocorrem no DNA intergênico e nos componentes não codificantes dos genes como, por exemplo, nos íntrons. Em outras palavras, a maior parte dos genomas pode sofrer

mutações sem qualquer efeito significativo no seu funcionamento. Já as mutações em regiões codificantes dos genes têm maior importância. As consequências das mutações de ponto que afetam a seqüência de um códon podem ser:

a) A mutação pode ser sinônima, isto é, o novo códon especifica o mesmo aminoácido do códon não mutado. A mutação sinônima é uma mutação silenciosa porque o gene mutado codifica para a mesma proteína codificada pelo gene não mutado, por causa da degeneração do código genético.

b) A mutação pode ser não sinônima, isto é, ela gera um novo códon que especifica um aminoácido diferente. A proteína codificada pelo gene mutado terá, portanto, um aminoácido diferente. Frequentemente, isto não afeta a atividade biológica da proteína porque estas são capazes de tolerar certas mudanças em sua estrutura sem perda de sua função. Contudo, alterações de aminoácidos no sítio ativo de uma enzima têm um impacto maior e podem levar à perda de função da proteína. Uma alteração não sinônima é também chamada de mutação de sentido errado (*missense*).

c) A mutação pode converter o códon que especifica um aminoácido em um códon de parada (*nonsense*). Essa mutação sem sentido produz uma proteína menor porque a tradução interrompe-se no codon mutado. (do RNA mensageiro). O efeito desta mutação sobre a proteína dependerá do que foi perdido. Em geral, mutações desse tipo resultam em uma proteína não funcional.

d) A mutação pode converter um códon de término de tradução em um códon que especifica um aminoácido. Isto resultará em uma proteína com aminoácidos adicionais. As proteínas poderiam tolerar estas mudanças sem o comprometimento de sua atividade biológica. No entanto, dependendo do número de aminoácidos adicionais, isto pode afetar a estrutura tridimensional da proteína, afetando sua função.

Como já estudamos, inserções e deleções também podem afetar os genes. Se o número de nucleotídeos perdidos ou inseridos for três (ou múltiplo de três) um (ou mais códons) é perdido ou adicionado produzindo efeitos variados sobre a estrutura da proteína codificada pelo gene. Se o número de nucleotídeos perdidos ou inseridos não for três ou múltiplo de três, haverá mudança no quadro de leitura. Isto significa que todos os códons a jusante (a 3') da mutação terão um quadro de leitura diferente daquele do gene não mutado. Isto resulta em alteração significativa na estrutura da proteína, já que parte do polipeptídeo codificado pelo gene mutado terá uma seqüência de aminoácidos diferente do polipeptídeo codificado pelo gene normal.

Os efeitos de mutações que ocorrem em regiões não codificantes do genoma são mais difíceis de serem previstos. Sítios no DNA de ligação a proteínas são susceptíveis a mutações de ponto, inserções e deleções que podem alterar a seqüência de nucleotídeos envolvidos em interações DNA-proteína. Estas mutações poderiam inativar promotores ou seqüências reguladoras da expressão gênica. Origens de replicação também poderiam perder a função se as mutações afetassem sítios relevantes para a ligação a outras proteínas envolvidas em complexos protéicos que participam da replicação do DNA.

Mutações também podem ocorrer em introns ou nos limites entre introns e exons. Nestas regiões, mutações serão importantes se afetarem nucleotídeos envolvidos em interações RNA-RNA ou RNA-proteína que ocorrem no processo de *splicing*. Um resultado possível destas mutações é o de que o intron não seja removido do pré-RNA mensageiro. Conseqüentemente, isto equivaleria à inserção de novos códons, modificando o polipeptídeo traduzido.

### **Efeitos das mutações em microorganismos**

Os efeitos das mutações em microorganismos podem ser descritos com base nas propriedades de crescimento dos mutantes em diferentes meios de cultura. Assim, eles podem ser enquadrados nas seguintes categorias:

**a) Mutantes auxotróficos** crescem apenas quando suplementados com um nutriente que não é necessário para a célula não mutada (prototrófica). Por exemplo, *E. coli* sintetiza normalmente seu próprio triptofano, graças às enzimas codificadas por cinco genes pertencentes ao operon triptofano. Bactérias que apresentem mutações nestes genes que levem à falta do aminoácido serão mutantes auxotróficos. Neste caso, o mutante não sobrevive em um meio de cultura não suplementado com triptofano.

**b) Mutantes letais-condicionais** são mutantes que não resistem a determinadas condições de crescimento. Quando crescidos em condições normais (permissivas), eles parecem normais. Entretanto, se transferidos a condições restritivas, seu fenótipo anormal se manifesta. Mutantes sensíveis à temperatura são exemplos típicos de mutantes letais-condicionais. Eles crescem como células selvagens sob temperatura normal mas crescem mal, ou não crescem, quando a temperatura sobe acima de um limiar que pode variar para cada mutante.

**c) Mutantes resistentes a inibidores** podem resistir aos efeitos tóxicos de um antibiótico ou de outro inibidor. Em alguns casos, a mutação modifica a estrutura da proteína que interage com o inibidor. Neste caso, o inibidor perde sua função porque já não pode interagir com a proteína alvo. Em outros casos, a mutação altera a proteína responsável pelo transporte do inibidor ao interior da célula.

**d) Mutantes de regulação** possuem promotores ou outras seqüências reguladoras alteradas. Nesta categoria estão os mutantes constitutivos, aqueles que expressam continuamente genes que, normalmente, estão ativos apenas em certas condições. Esses mutantes serão estudados posteriormente.

### Os efeitos das mutações nos organismos pluricelulares

O primeiro ponto a ser considerado neste caso refere-se à importância de uma mutação para uma célula somática e para um gameta. Como a célula somática não transmitirá a cópia de seu material genético para a próxima geração, uma mutação em uma célula somática é importante para o organismo apenas no momento em que ela ocorre, isto é, ela não tem impacto nas demais gerações. Na verdade, a maioria das mutações somáticas não é significativa mesmo que elas produzam a morte celular porque haverá um número enorme de células idênticas no mesmo tecido. Uma exceção seria quando uma mutação afeta uma célula que, por sua vez, traz dano ao organismo ao induzir, por exemplo, a formação de um tumor.

Mutações nas células que originam os gametas são mais importantes, pois elas serão transmitidas aos organismos da geração seguinte e, portanto, estarão presentes em todas as células dos organismos que herdaram a mutação. A maioria das mutações nos gametas sejam as silenciosas ou as que ocorrem em regiões codificantes, não alterará significativamente o fenótipo dos organismos portadores das mesmas. Aquelas que o fazem podem ser divididas em duas categorias:

**a) Mutações de perda de função** que reduzem ou anulam a atividade protéica: A maioria dessas mutações que levam à perda de função são recessivas, já que o heterozigoto portará uma versão não mutada do gene que codifica para uma proteína funcional. Desta forma, a versão normal do gene compensa o efeito da mutação. Existem, no entanto, exceções nas quais a mutação de perda de função pode agir como dominante se o produto do gene for realmente necessário em dose dupla.

**b) Mutações de ganho de função** são menos comuns: Elas podem residir em regiões reguladoras do gene e não necessariamente em regiões codificantes. Neste caso, a mutação poderia levar à expressão de um ou mais genes em tecidos onde eles normalmente não se expressam. Alternativamente, a mutação poderia levar à expressão exagerada de um gene, ou ainda à expressão de um produto gênico com funções distintas do produto original.

## A SÍNTESE DE PROTEÍNAS

*Regina Célia Mingroni Netto, Eliana Maria Beluzzo Dessen, José Mariano Amabis  
(apostila disciplina Bio-211 Biologia Molecular)*

### O RNA e a síntese de proteínas

As proteínas constituem mais da metade da massa seca total de uma célula e sua síntese tem uma importância fundamental para a manutenção e o crescimento celulares. A síntese de proteínas ocorre nos ribossomos e envolve vários tipos de moléculas de RNA que atuam nas diversas etapas do processo. Inicialmente, uma molécula de RNA mensageiro deve ser sintetizada a partir de uma das cadeias do DNA que codifica para a proteína. No citoplasma, moléculas de cada um dos 20 aminoácidos que entram na composição das proteínas devem se unir a seus respectivos RNA transportadores. As subunidades ribossômicas que promoverão a síntese devem se associar com proteínas auxiliaadoras no processo.

A síntese de proteínas tem início quando todos os componentes mencionados acima, ou seja, um RNA mensageiro, um dos RNA transportadores e as subunidades de um ribossomo se reúnem para formar um ribossomo funcional. Cada ribossomo percorre, então, a molécula de RNAm traduzindo a seqüência de códons em uma seqüência de aminoácidos. Vejamos agora, em detalhe, cada uma dessas etapas.

### O papel do RNAt

As moléculas de RNAt atuam como adaptadores no processo de síntese de proteínas, uma vez que elas definem a posição dos aminoácidos de acordo com a seqüência de bases do RNA mensageiro. Essa característica dos RNAt se deve ao fato deles terem duas regiões de ligação em sua molécula, uma onde se liga covalentemente um aminoácido específico e outra, o **anticódon**, por meio da qual se ligam ao códon do RNAm, por meio de pontes de hidrogênio.

A ligação de um RNAt com seu aminoácido específico é catalisada por uma enzima chamada **sintetase do aminoacil-RNAt**. A atuação dessa enzima se dá em duas etapas. Primeiramente, os aminoácidos reagem com ATP para formar um aminoacil-adenilato. A energia para essa reação é fornecida pela clivagem da ligação altamente energética do ATP, com liberação de pirofosfato. Essa etapa é conhecida como **ativação do aminoácido**. Em uma segunda etapa, o aminoácido ativado reage com o RNAt, liberando uma molécula de AMP. A ligação do aminoácido com o RNAt se dá entre o grupo carboxila do aminoácido e um carbono 2' ou 3' da ribose do último ribonucleotídeo da extremidade 3' do RNAt, o qual contém sempre a base adenina (Fig. 9).

Existem pelo menos vinte tipos diferentes de aminoacil-sintetases, uma para cada tipo de aminoácido. Cada uma reconhece um único aminoácido e catalisa sua união a um dos RNAts correspondente a esse aminoácido. Lembre-se que pode existir mais de um tipo de RNAt para um mesmo aminoácido.

Um RNAt é denominado de acordo com o aminoácido ao qual ele se liga. Por exemplo, o RNAt que se liga ao aminoácido alanina é chamado RNAt<sup>Ala</sup>. Um aminoacil-RNAt carregando um aminoácido específico é designado pela abreviatura do aminoácido colocada antes de sua sigla; por exemplo, o RNAt<sup>Ala</sup> ligado a seu aminoácido é chamado Ala-RNAt.

**Figura 9.** Representação esquemática das reações de ativação de um aminoácido e de sua ligação ao RNA t, as quais são catalisadas por enzimas denominadas sintetase do aminoacil-RNA.

### O papel do RNAm e dos ribossomos

O processo da síntese de proteínas é comparável a uma linha de montagem, na qual o ribossomo vai deslizando sobre o RNA mensageiro e os aminoácidos, trazidos pelos RNAt, vão sendo encaixados em seus respectivos lugares, de acordo com a seqüência de bases do RNAm.

O ribossomo é um pacote complexo de moléculas de proteína e de RNA, as quais formam sítios catalíticos com funções especializadas. Vários fatores acessórios participam, juntamente com o ribossomo, da síntese de proteínas e a energia para a movimentação do ribossomo é fornecida pela hidrólise de GTP.

Um ribossomo possui um sítio para a ligação do RNA mensageiro e três sítios para a ligação de RNA transportadores. Os sítios onde se ligam os RNA transportadores são denominados: **sítio P**, **sítio A** e **sítio E** (Fig. 10).

**Figura 10.** Representação esquemática dos sítios de ligação dos RNAs no ribossomo. As setas indicam que os RNAts e o RNAm se movem através do ribossomo em um mesmo sentido.

O sítio P, ou sítio de ligação do peptidil-RNAt, é onde se associa a molécula de RNAt ligada à extremidade do polipeptídeo em crescimento. O sítio A, ou sítio de entrada do aminoacil-RNAt, é onde se associa o RNAt recém-chegado ao ribossomo e que trás o aminoácido a ser incorporado na cadeia polipeptídica em crescimento. O sítio E (do inglês *exit*), ou sítio de saída, é ocupado transitoriamente pelo RNAt livre de aminoácido que acabou de sair do sítio P e que está, portanto, saindo do ribossomo. Enquanto o sítio E está ocupado, a afinidade do sítio A fica muito reduzida, impedindo assim que um novo aminoacil-RNAt entre no ribossomo antes que ele esteja pronto para recebê-lo. Assim, o caminho do RNAt no ribossomo se dá na seguinte seqüência: ele entra no sítio A, passa para o sítio P e finalmente deixa o ribossomo pelo sítio E.

Cada ribossomo apresenta um segmento da cadeia polipeptídica em processo de síntese, com comprimento correspondente ao segmento de RNAm já traduzido por ele. Essa cadeia polipeptídica em formação costuma ser chamada de **proteína nascente**.

Em geral, sobre uma molécula de RNA mensageiro, são encontrados vários ribossomos, cada um deles com um fragmento de proteína nascente. Se olhássemos da extremidade 5' para a 3' do RNA mensageiro, veríamos os ribossomos a ele associados apresentando proteínas nascentes progressivamente maiores, pois os ribossomos mais próximos da extremidade 3' estariam mais próximos do fim da síntese do polipeptídeo. A esta estrutura formada por uma molécula de RNA mensageiro associada a vários ribossomos dá-se o nome de **polissomo**.

O tamanho de um polissomo depende tanto do comprimento do RNAm quanto da eficiência com o que o ribossomo é capaz de se ligar ao mensageiro para iniciar a tradução. Em bactérias, os polissomos contêm, em geral, dezenas de ribossomos e podem ser encontrados associados ao DNA. Isso ocorre porque em bactérias, a tradução e a transcrição são acopladas, ou seja, os RNAm começam a ser traduzidos antes do término de sua síntese.

Nos eucariontes, os polissomos apresentam em média 8 ribossomos e são encontrados no citoplasma, livres no citossol ou presos às paredes do retículo endoplasmático.

Podemos ter uma idéia da atividade de síntese de proteína em uma célula examinando o número de alguns elementos envolvidos nesse processo em uma bactéria, por exemplo. A célula de *Escherichia coli* possui cerca de 20 mil ribossomos, que constituem um quarto da massa total da célula, cerca de 3 mil cópias de cada tipo de RNAt e por volta de 1500 moléculas de RNAm.

O processo de síntese de proteínas costuma ser dividido em três etapas: **iniciação**, **elongação** e **terminação**.

A **iniciação** consiste nas reações que precedem o início da formação do peptídeo, portanto, é a etapa que ocorre antes da união dos primeiros aminoácidos. Ela consiste na ligação do ribossomo ao RNAm formando um complexo de iniciação que contém o primeiro aminoacil-RNAt (o da N-formilmetionina em bactérias). A iniciação é uma etapa demorada e pode ser decisiva na determinação da freqüência com que um mensageiro será traduzido.

A **elongação** compreende todas as reações que ocorrem desde a formação da primeira ligação peptídica até a incorporação do último aminoácido do peptídeo, sendo a etapa mais rápida da síntese de proteínas. Em bactérias, são adicionados cerca de 15 aminoácidos por segundo à cadeia polipeptídica em crescimento, de modo que a síntese de um polipeptídeo com 300 aminoácidos leva cerca de 20 segundos. Em eucariontes, a velocidade é menor, são adicionados cerca de 2 aminoácidos por segundo.

A **terminação** compreende os processos necessários à liberação do polipeptídeo pronto. Nesta etapa, o ribossomo se dissocia do RNAm.

## ETAPAS DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Apesar de muito semelhante nos aspectos gerais, a síntese de proteínas difere entre células procarióticas e células eucarióticas. As principais diferenças são observadas na etapa de iniciação do processo.

## A iniciação da tradução em procariontes

Em *E. coli*, o processo de iniciação da tradução requer a presença de uma subunidade menor do ribossomo (30S), um RNAt especial iniciador da tradução, uma molécula de RNAm e três fatores protéicos de iniciação.

Inicialmente uma subunidade ribossomal 30S livre associa-se a um RNA mensageiro. A formação desse complexo depende da interação de bases entre uma seqüência do RNAr 16S e uma região especial do RNAm, conhecida como seqüência de **Shine-Dalgarno**. Essa seqüência corresponde a um consenso de 6 bases localizado sete nucleotídeos acima do códon de iniciação AUG. A região do RNAm que compreende a seqüência de Shine-Dalgarno e que interage com o ribossomo no processo de iniciação é denominada **sítio de ligação do ribossomo** e compreende cerca de 40 nucleotídeos.

Em seguida, um RNAt especial, o RNAt<sup>fMet</sup> (da N-formilmetionina, associado a um fator de tradução, combina-se ao complexo formado pela subunidade do ribossomo 30S e pelo RNAm. O passo final da iniciação é a associação da subunidade maior do ribossomo para construir um ribossomo completo.

A adição da subunidade maior do ribossomo posiciona o RNAt<sup>fMet</sup> no sítio P do ribossomo completo. Este é o único RNAt bacteriano capaz de entrar no sítio P diretamente, sem ter que passar pelo sítio A, como acontece com os demais RNA transportadores. Com o RNAt iniciador no sítio P, o sítio A fica posicionado no segundo códon do mensageiro e irá determinar qual aminoacil-RNAt será incorporado nessa posição.

## A iniciação da tradução em eucariontes

A iniciação da tradução em eucariontes é mais complexa que nos procariontes e envolve diversos fatores de iniciação e não será tratada aqui.

## A elongação da cadeia polipeptídica

O processo da elongação da cadeia polipeptídica é basicamente o mesmo em procariontes e eucariontes. A adição de um aminoácido novo à cadeia em crescimento ocorre em três etapas: (1) ligação de um aminoacil-RNAt ao sítio A do ribossomo; (2) transferência da cadeia polipeptídica em crescimento do sítio P para o sítio A através da ligação peptídica com o aminoácido recém-chegado e (3) translocação do ribossomo ao longo do RNAm, transferindo o novo peptidil-RNAt do sítio A para o sítio P, com posicionamento do próximo códon a ser traduzido no sítio A. Durante a terceira etapa, o RNAt descarregado é translocado para o sítio E. Esses três passos são repetidos de maneira cíclica e vários fatores são importantes nesses processos.

Na primeira etapa, o aminoacil RNAt se liga ao sítio A e sua especificidade é determinada pelo códon do RNAm ali posicionado. Os três nucleotídeos do anticódon devem emparelhar com os três nucleotídeos do códon.

A formação de uma ligação peptídica no ribossomo consome pelo menos 3 ligações fosfato de alta energia: uma para carregar o RNAt com seu aminoácido específico (aminoacil-sintetase), outra para ligar o aminoacil-RNAt ao sítio A do ribossomo na primeira etapa e a terceira é gasta no movimentos de translocação do ribossomo.

O processo de elongação de um peptídeo é muito rápido. Na *E. coli*, as três etapas que culminam com a adição de um único aminoácido leva cerca de 0,05 segundos. Logo, a síntese de um peptídeo contendo 300 aminoácidos leva apenas 15 segundos. Considerando a sua complexidade e especificidade, a rapidez do processo de tradução é surpreendente.

## O término da tradução

Como já vimos, existem três códons do código genético que não codificam aminoácidos (UAG, UAA e UGA), sendo usados como sinais de término da síntese da cadeia polipeptídica. Em bactérias, o códon UAA é o códon de terminação mais utilizado, e UGA é mais usado que UAG.

Nenhum dos códons de terminação tem um RNAt correspondente, eles são reconhecidos diretamente por fatores protéicos. Em *E. coli*, os fatores que catalisam a terminação são denominados **RFs** (do inglês *release factors*). RF-1 reconhece o códon UAA e

UAG, e RF-2 reconhece os códons UGA e UAA. Esses fatores entram no sítio A do ribossomo, quando este sítio se posiciona sobre um códon de terminação. Eles também requerem a presença de um peptídiil-RNAt no sítio P para agir. Nos eucariontes, existe apenas um fator de terminação, o chamado eRF. Para o eRF se ligar ao ribossomo é necessário GTP, que provavelmente é clivado após a conclusão da etapa de terminação. A reação de terminação consiste na liberação do polipeptídeo pronto do RNAt, expulsão do último RNAt do ribossomo e dissociação do ribossomo do RNAm.

## QUADROS DE LEITURA DO RNA MENSAGEIRO

Dada uma seqüência de bases do DNA ela pode ser lida teoricamente em três quadros de leitura, um começando na primeira base, outro na segunda base e outro na terceira base; uma leitura a partir da quarta base repete o primeiro quadro e assim por diante.

Um quadro de leitura formado exclusivamente por trincas que significam aminoácidos é chamado de quadro de leitura aberto ou ORF (do inglês *open reading frame*). Um quadro de leitura que não pode ser traduzido, porque é interrompido por um códon de terminação, é dito bloqueado. Se uma certa seqüência de DNA está bloqueada nos seus três quadros de leitura possíveis, ela não pode ter função de codificar proteína.

Uma seqüência que é traduzida em proteína tem um quadro de leitura que começa sempre com um códon de iniciação e se estende por uma série de códons sucessivos que significam aminoácidos, até atingir um códon de terminação.

A identificação de um quadro de leitura aberto em uma seqüência de DNA não significa obrigatoriamente que tal seqüência seja traduzida em proteína até que tal fato seja efetivamente demonstrado pela identificação do seu produto protéico (Fig. 11).

**Figura 11.** Resumo da organização da informação genética na molécula de DNA. Uma molécula de DNA é uma dupla hélice formada por duas cadeias polinucleotídicas. A informação encontra-se na seqüência de bases ao longo de uma das cadeias (cadeia com sentido). A expressão de um gene se dá pela transcrição de uma seqüência de bases do DNA em uma molécula de RNAm.

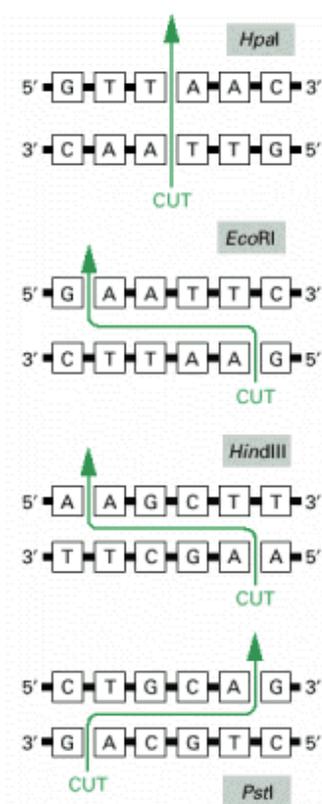
A transcrição da informação genética em RNA e a tradução em proteínas são reguladas por seqüências especiais de bases presentes no DNA e no RNA. Uma dessas seqüências no DNA forma o sítio de ligação da polimerase do RNA. Esse sítio de ligação localiza-se antes do sítio de início de tradução presente no RNAm. No DNA localiza-se também o sítio de término da transcrição, o qual fica além do sítio de término da tradução localizado no RNAm.

## TÉCNICAS QUE PERMITEM A MANIPULAÇÃO DO DNA

Bio-211 Biologia Molecular – Apostila Prática

### DIGESTÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Existem várias enzimas que atuam sobre os ácidos nucleicos, algumas sem especificidade em relação às bases, como a DNase que degrada moléculas de DNA e a RNase que degrada moléculas de RNA. Há também enzimas, como as enzimas de restrição, que atuam de modo específico, isto é, cortam as moléculas de DNA em locais com seqüências de bases específicas. Essas enzimas diferem entre si quanto à seqüência de bases do DNA que reconhecem e cortam. As seqüências de reconhecimento são em geral palíndromicas, isto é, possuem a mesma seqüência de 4 ou mais nucleotídeos, quando lida na direção 5'-3', em ambas as fitas. As enzimas de restrição cortam ambas as fitas do DNA sempre entre o mesmo par de nucleotídeos (Figura 12).



**Figura 12.** Exemplos de seqüências de nucleotídeos que são reconhecidas e cortadas por enzimas de restrição. As seqüências são palíndromicas, isto é, a seqüência de nucleotídeos é a mesma se a hélice for girada 180 graus ao redor do centro do segmento. As enzimas cortam as duas fitas do DNA dentro do sítio de reconhecimento. Para algumas enzimas como *HpaI*, o corte produz extremidade em fundo cego, para outras, como *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*, o corte produz extremidade assimétricas e que são coesivas, ou seja, podem ser reunidas novamente e recompor a dupla-hélice por ação da enzima ligase.

Os fragmentos gerados pela digestão de uma amostra de DNA com uma determinada enzima de restrição podem ser separados e identificados por eletroforese.

### ELETROFORESE

Eletroforese é um termo geral que se refere à técnica de separação ou caracterização de moléculas carregadas eletricamente com base em suas taxas específicas de migração em um campo elétrico. O processo é geralmente realizado em uma matriz porosa de modo que as macromoléculas possam migrar diferencialmente de acordo com suas propriedades físicas.

A matriz comumente usada na separação de moléculas de DNA com tamanhos variando entre 100 e 30.000 pares de bases é o gel de agarose, uma forma de agar altamente purificada. A matriz porosa do gel de agarose serve como uma peneira molecular através da qual as moléculas movem-se com velocidades diferentes, inversamente proporcionais ao seu tamanho. Assim, quanto menor for a molécula, maior será a distância que ela percorre em um determinado período de tempo.

Os fragmentos de DNA migram em direção ao pólo positivo, uma vez que têm carga elétrica negativa, conferida pela ionização dos seus grupos fosfatos. Após a migração eletroforética, todas as moléculas de DNA de mesmo tamanho ficam agrupadas em uma determinada região do gel e são visualizadas como uma banda.

Podemos dividir o procedimento de eletroforese em quatro etapas: preparação do gel de agarose, aplicação das amostras, eletroforese e análise dos fragmentos separados.

A concentração da agarose no preparo do gel é escolhida em função do tamanho dos fragmentos que se deseja separar. Uma certa quantidade de agarose é colocada em um volume adequado de solução tampão, de modo a se obter a concentração desejada. A mistura é aquecida para derreter a agarose e em seguida é despejada em uma bandeja. Sobre a solução ainda quente na bandeja coloca-se um pente plástico que forma cavidades ou poços no gel quando a agarose se solidifica. Ao esfriar, a agarose constituirá um gel solidificado, formado por uma densa rede de moléculas interligadas.

As amostras de DNA são então aplicadas e a cuba contendo o gel submerso em solução tampão é conectada a uma fonte de corrente contínua. A corrente elétrica gerada pela fonte se transmite através da solução tampão e faz com que as moléculas migrem em direção ao pólo positivo, saindo do poço e penetrando no gel.

Após algum tempo, quando os corantes atingem uma distância adequada dos poços, a corrente é desligada e o gel é transferido para uma solução contendo o corante brometo de etídeo, específico para ácido nucléico. Os corantes aplicados juntamente com a amostra de DNA auxiliam no monitoramento do tempo de corrida.

O gel é então imerso em uma cuba contendo o tampão de corrida da eletroforese e o pente é cuidadosamente removido do gel, deixando uma série de poços para a aplicação das amostras. Antes da aplicação, as amostras de DNA são misturadas a uma solução densa, contendo sacarose ou glicerol, a qual contem também um ou dois corantes que auxiliam a monitorar o deslocamento das moléculas no gel.

O primeiro sinal de que a corrente elétrica realmente está passando pela cuba é a visualização dos produtos da eletrólise da água, ou seja, bolhas de hidrogênio se formam no eletrodo negativo e o gás oxigênio surge a partir do eletrodo positivo. Minutos depois é possível verificar que os corantes aplicados juntamente com o DNA já estão migrando através do gel, em direção ao pólo positivo. A banda que se move mais rapidamente é a do corante azul de bromofenol, de cor mais azulada. Ela migra do mesmo modo que um fragmento de DNA com cerca de 500 pares de bases.

A visualização dos géis de agarose depende da transiluminação com luz ultravioleta, que faz o brometo de etídeo fluorescer com a cor laranja. Uma luz ultravioleta de comprimento de onda entre 260-360nm emite luz na amplitude ótima para iluminar os géis corados com brometo de etídeo.

As fotografias obtidas a partir dos géis de agarose são muito importantes como registro dos experimentos realizados e indispensáveis para a interpretação posterior dos mesmos. Uma câmara Polaroid é utilizada para fotografar os géis colocados sobre um transiluminador de ultravioleta.

Moléculas lineares de DNA migram em matrizes porosas (géis) submetidas a eletroforese, em taxas que são inversamente proporcionais ao  $\log_{10}$  de seus pesos moleculares. O tamanho de um fragmento de interesse pode então ser determinado comparando sua mobilidade com moléculas padrões de tamanho conhecido. Assim sendo, entre as amostras aplicadas em um gel, pelo menos uma das raias deve conter uma série de fragmentos de tamanho conhecido de modo a permitir a construção de uma curva padrão que permitirá a estimativa de tamanhos de fragmentos desconhecidos. O marcador mais amplamente utilizado é o DNA do fago lambda ( $\lambda$ ) digerido com a enzima *Hind* III, pois fornece uma gama de fragmentos que variam entre 23.130 e 564 pares de bases (Veja raias 1 e 8 da figura apresentada na Prática 3).

## SOUTHERN BLOT

A hibridação de DNA pela técnica de “Southern” permite a visualização de fragmentos específicos de DNA entre todos os fragmentos que compõem um genoma complexo. Nessa técnica, o DNA genômico é digerido por uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes são separados por eletroforese. O DNA presente nas amostras é desnaturado por imersão do gel em uma solução com pH superior a 10,5 e, em seguida, os fragmentos de DNA são então transferidos do gel para uma membrana. Em seguida a membrana é exposta a uma solução contendo uma sonda, ou seja, uma molécula de ácido nucléico de fita simples, que tenha seqüência complementar ao fragmento que se tem interesse em detectar. Uma sonda pode ser um oligonucleotídeo sintético, um plasmídeo onde foi clonada uma seqüência de interesse ou ainda um RNA (Figura 13).

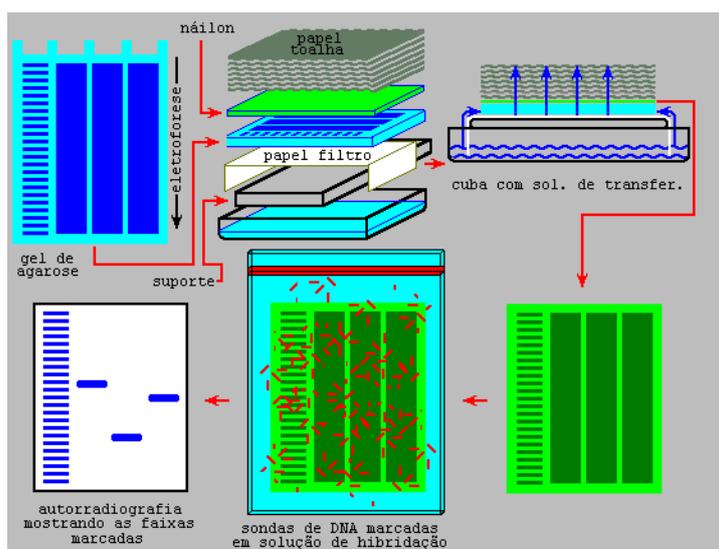


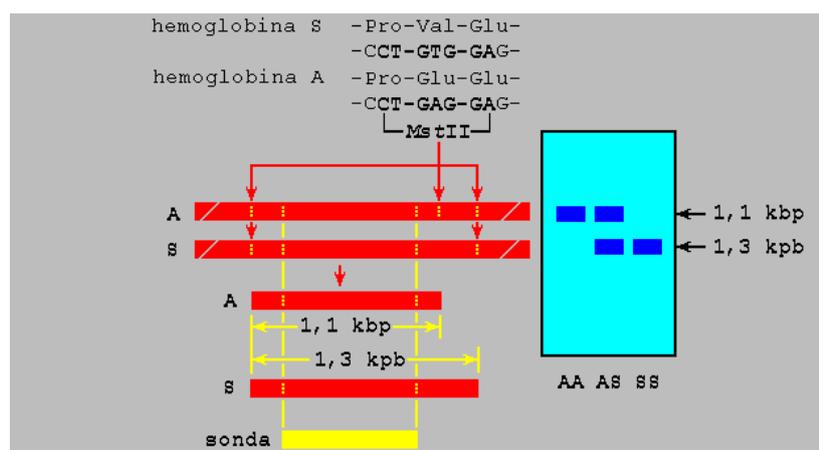
Figura 13. Representação do método de *Southern blotting*.

A dupla hélice da molécula de DNA é mantida através de pontes de hidrogênio formadas entre os pares de bases complementares adenina-timina e guanina-citosina. A temperaturas acima de 90°C ou a pHs superiores a 10,5 essas pontes de hidrogênio são rompidas, separando as fitas complementares, o que corresponde à desnaturação da molécula de DNA. Em condições adequadas de sal, temperatura e pH, as fitas complementares podem restaurar-se, recompondo assim a molécula de DNA original. Esse processo onde fitas simples alinham-se e formam moléculas em dupla fita é conhecido como hibridação.

Como mencionado anteriormente, pode-se empregar uma sonda de DNA fita simples para reconhecer e hibridar com sua seqüência complementar em uma amostra de DNA genômico (ou outros alvos). Para que isso seja possível, a sonda deve ser marcada por radioatividade, cor ou quimiluminescência com o objetivo de permitir a sua visualização. Sob condições restritivas de reação, moléculas de DNA de fita dupla estáveis serão formadas apenas quando houver um perfeito emparelhamento de bases ao longo de todo o segmento que hibrida, ou seja, entre a sonda e o DNA alvo.

Após o processo de hibridação do DNA preso ao gel com a sonda marcada são realizados procedimentos para a visualização do local de hibridação. Quando a sonda foi marcada com isótopos radioativos a membrana é coberta com um filme de raio X que, após algum tempo de exposição, é revelado. A hibridação aparece como grãos de prata depositados no filme. No caso de sonda marcada com digoxigenina, por exemplo, após a hibridação a membrana é incubada com um anticorpo anti-digoxigenina. Esse anticorpo liga-se à digoxigenina incorporada na sonda durante o processo de marcação. O imunocomplexo resultante pode ser detectado por uma reação colorida iniciada pela enzima fosfatase alcalina, que está ligada ao anticorpo. Um precipitado de cor marrom-púrpura indicará as áreas da membrana onde houve ligação da sonda com os fragmentos de restrição contendo as seqüências de DNA complementares (Figura 14)

**Figura 14.** Esquema de utilização de uma sonda de DNA marcada com digoxigenina para a detecção de fragmentos complementares. A digoxigenina incorporada na sonda é reconhecida por um anticorpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatase alcalina.



**Figura 15.** Detecção da mutação no gene da anemia falciforme mediante o uso de enzimas de restrição e da técnica de *Southern blotting*.

## A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Paulo A Otto, Regina Célia Mingroni, Ângela Maria Vianna Morgante 2006 – *Princípios de Genética Humana e Médica*. Em: Tratado de Clínica Médica, Amato Carlos Lopes Editor. Editora Roca Ltda.

Uma técnica cuja introdução acarretou uma avalanche de inovações na área da genética molecular foi a chamada reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida na década de 1980. A PCR consiste em uma sucessão de reações de replicação de uma molécula de DNA, realizada em tubo de ensaio. Parte-se de uma amostra de DNA-alvo, por exemplo, uma certa amostra de DNAs genômico de um indivíduo. São fornecidos os reagentes necessários à replicação do DNA, que incluem os quatro tipos de nucleotídeos na forma trifosfatada, íons e um par de iniciadores de reação (*primers*), que são oligonucleotídeos cujas seqüências de bases são complementares às seqüências de bases que flanqueiam o segmento de DNA que se deseja amplificar por meio da PCR. A necessidade de um par de iniciadores da reação decorre de uma peculiaridade do próprio mecanismo de replicação do DNA in vivo: as polimerases que replicam o DNA são incapazes de iniciar a síntese de uma nova cadeia a partir da cadeia molde; só são capazes de alongar uma cadeia de ácido nucléico pré-existente, que lhe fornece uma extremidade 3' livre na qual serão adicionados os novos nucleotídeos trifosfatados. Na célula viva, os iniciadores (*primers*) são adicionados, nucleotídeo a nucleotídeo, por uma RNA polimerase e constituídos por ribonucleotídeos. Na reação da PCR, os *primers* são sintetizados artificialmente e se constituem de curtos segmentos de 15 a 23 desoxirribonucleotídeos. As seqüências de bases dos *primers* são definidas em função de sua complementaridade com a seqüência de bases que flanqueia o segmento de DNA que se deseja amplificar. Após sucessivos ciclos de desnaturação do DNA (por aquecimento da amostra), hibridação dos *primers* (com o resfriamento da amostra) e extensão dos fragmentos pela DNA polimerase (a temperatura de cerca de 72°C, a alíquota de DNA inicial é amplificada milhares de vezes, como mostrado na Figura 16).

Nem todo o DNA genômico é amplificado, mas apenas o segmento de DNA compreendido entre o local de hibridação de ambos os *primers* é amplificado. De maneira análoga ao que ocorre na técnica de *Southern blotting*, a PCR permite evidenciar, dentre uma coleção de fragmentos de DNA do genoma de um indivíduo, apenas um pequeno trecho. As vantagens dessa técnica são numerosas: pequenas quantidades de DNA podem ser analisadas e o resultado costuma ser obtido muito mais rapidamente do que na técnica de *Southern*. No entanto, o planejamento dos *primers* da PCR requer prévio da seqüência de bases do DNA-alvo que se deseja amplificar. A PCR, sem dúvida, revolucionou os diagnósticos laboratoriais com base no estudo do DNA e permitiu avançar muito também no que diz respeito ao diagnóstico pré-natal e à identificação individual, com ênfase em questões forenses.

Se um indivíduo for portador de uma substituição de bases em um certo gene que altera o local de corte de uma enzima de restrição, o produto obtido pela PCR de um segmento desse gene pode ser clivado com a enzima. A análise dos fragmentos obtidos pode mostrar a presença dessa substituição. De maneira análoga ao *blotting*, o tamanho do fragmento amplificado pode indicar uma deleção ou uma inserção de bases. A ausência completa de amplificação de um fragmento revela a deleção completa da região do gene que está contida entre os dois *primers*.

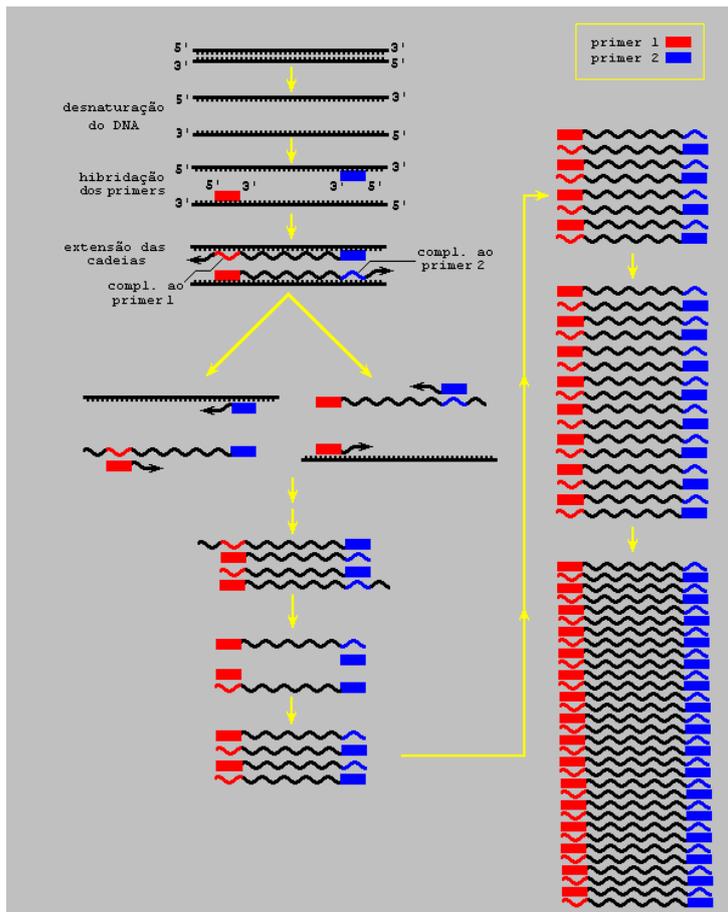


Figura 16. Esquema mostrando como funciona a técnica da PCR.

## CONCEITOS GERAIS DE GENÉTICA BÁSICA APLICÁVEIS À GENÉTICA HUMANA E MÉDICA

Paulo A Otto, Regina Célia Mingroni, Ângela Maria Vianna Morgante 2006 – *Princípios de Genética Humana e Médica*. Em: *Tratado de Clínica Médica*, Amato Carlos Lopes Editor. Editora Roca Ltda.

Como cada pessoa se origina de um zigoto que recebe um complemento simples ou haplóide de cromossomos de cada genitor, os cromossomos de cada célula estão representados por pares de cromossomos ditos homólogos, um lote de origem materna e outro de origem paterna. Dos 23 pares de cromossomos encontrados no núcleo de uma célula humana diplóide qualquer, 22 pares são comuns a indivíduos de ambos os sexos e recebem o nome de autossomos. O vigésimo-terceiro par é formado por dois cromossomos X (nesse caso, também homólogos) nas mulheres e por um par exibindo heteromorfismo em indivíduos de sexo masculino (um cromossomo X e um cromossomo Y). Diz-se, portanto, que a mulher tem 23 pares de cromossomos homólogos (incluindo os dois cromossomos X) e os homens 22 pares de cromossomos homólogos e um par de cromossomos heterólogos (um X e um Y). Através de um processo de divisão especial denominado meiose, as células da linhagem germinativa originam os gametas masculinos e femininos, cada um deles (espermatozóides e óvulos) contendo um lote haplóide de 23 cromossomos. Enquanto todos os óvulos possuem 22 autossomos e um cromossomo X, existem dois tipos de espermatozóides, uns contendo o cromossomo X e outros contendo o cromossomo Y. No momento da fecundação, dependendo do cromossomo sexual contido no espermatozóide, originar-se-á um zigoto destinado ao sexo masculino ou ao sexo feminino, se o cromossomo sexual for o Y ou o X, respectivamente. Como metade dos espermatozóides carregam o cromossomo X e a outra metade o Y, espera-se que recém nascidos de sexo feminino e masculino ocorram em proporções aproximadamente iguais (diz-se então que a razão sexual ao nascimento é cerca de 1).

Nos cromossomos, os genes estão situados em posições específicas que recebem o nome de locos, que são ditos homólogos em relação a todos os autossomos e ao par de cromossomos X em mulheres. Em indivíduos de sexo masculino, os cromossomos sexuais X e Y apresentam apenas alguns poucos locos em comum. A maior parte dos genes do Y estão ligados à determinação genética do sexo do embrião e da fertilidade masculina; fora isso, o cromossomo Y é relativamente pobre em genes que codificam proteínas; portanto, a maioria dos genes do cromossomo X ocorrem em dose única em machos.

Os genes situados em um mesmo loco são ditos **alelos** e todos os alelos de um mesmo gene presentes nos indivíduos da população originam-se por mutação de alelos pré-existentes. Assim, os alelos resultam de diferenças nas seqüências de bases nucleotídicas do DNA em um gene. Estudos recentes de biologia molecular têm mostrado que o número de alelos albergados em qualquer loco é geralmente muito grande, o que confere às populações um alto grau de variabilidade genética, mostrando, portanto que a plasticidade evolutiva dos seres humanos e de todos os organismos de uma maneira geral é enorme.

Normalmente designamos os alelos de um loco usando uma mesma letra ou abreviatura para indicar que pertencem a um mesmo loco e índices para diferenciá-los entre si (por exemplo,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  etc). Os indivíduos que possuem num mesmo loco autossômico duas cópias iguais de um mesmo alelo (por exemplo,  $a_1a_1$ ) são ditos homozigotos (no caso, quanto ao gene  $a_1$ ); quando o loco estiver ocupado por dois alelos diferentes (por exemplo,  $a_1a_2$  ou  $a_2a_3$ ) o seu portador é dito heterozigoto. As constituições genéticas exemplificadas acima ( $a_1a_1$ ,  $a_1a_2$ ,  $a_2a_3$ ) são denominadas genótipos. Em relação a locos do X em indivíduos de sexo masculino, os genótipos corresponderão simplesmente aos alelos (por exemplo,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  etc) possíveis e costuma-se referir a esses indivíduos como hemizigotos (respectivamente quanto aos alelos  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  etc).

O genótipo do indivíduo pode determinar uma característica física ou fisiológica qualquer, comumente referida como fenótipo. Os alelos que compõem o genótipo interagem de várias maneiras, originando os vários fenótipos.

Quando o fenótipo correspondente a um dos homozigotos é semelhante ao dos heterozigotos, diz-se que a característica que se expressou no heterozigoto é a dominante. A que não se expressa no heterozigoto é dita recessiva. Por exemplo, em relação aos grupos sanguíneos do sistema ABO, os alelos A e B são ambos dominantes em relação ao alelo O, que é recessivo. Assim, indivíduos de grupo sanguíneo "A", que possuem apenas antígenos A

recobrando suas hemácias, podem ter genótipo AA ou AO; de maneira semelhante, indivíduos "B" podem ter genótipo BB ou BO, mas a indivíduos "O" corresponde apenas o genótipo OO, que indica a ausência dos dois antígenos.

No entanto, existem situações em que a cada genótipo corresponde um fenótipo distinto: fala-se então de semidominância ou dominância incompleta quando o fenótipo do heterozigoto é intermediário em relação aos fenótipos dos dois tipos de homozigotos, e de codominância quando cada um dos dois produtos típicos dos homozigotos está presente no heterozigoto. Um exemplo clássico de codominância é dado pelo sistema de grupos sanguíneos MN, no qual os indivíduos homozigotos MM ou NN apresentam na superfície de suas hemácias apenas antígenos M ou N, enquanto heterozigotos MN apresentam os dois tipos de antígenos. Esse também é o caso dos alelos A e B, no sistema ABO, em que o indivíduo com o genótipo AB possui os dois tipos de antígenos nas hemácias.

A designação herança intermediária é mais apropriada para características quantitativas, que discutiremos mais adiante, como tamanho ou pigmentação, em que indivíduos Aa, por exemplo, apresentam um fenótipo que é aproximadamente a média dos fenótipos apresentados por AA e aa.

As regras de transmissão das características biológicas determinadas geneticamente são extremamente simples se considerarmos um loco autossômico com dois alelos, com ou sem dominância, como mostra a Tabela 2 abaixo, que reúne os resultados dos cruzamentos que podem ocorrer numa população qualquer:

Tabela 2 - Resultados possíveis em casamentos envolvendo locos autossômicos bialélicos, com e sem dominância (D = fenótipo dominante, correspondente ao genótipo A- = AA ou Aa; r = fenótipo recessivo, equivalendo ao genótipo aa)

**Tabela 2** – Resultados possíveis em casamentos envolvendo locos autossômicos bialélicos, com e sem dominância.

É importante ter-se em conta que as percentagens esperadas na prole de cada tipo de cruzamento parental correspondem a probabilidades que somente irão corresponder a valores observados em um número de amostragens enorme. Como os resultados genotípicos na prole independem de resultados que já ocorreram, a chance de nascer uma criança aa de um casal de heterozigotos Aa x Aa, por exemplo, é sempre 1/4, quaisquer que sejam os genótipos dos filhos que já nasceram. No campo das anedotas de genética médica, é muito conhecida aquela do casal de heterozigotos Aa quanto a cor de olho que perguntou ao seu médico o que seria preciso fazer para nascer uma criança de olhos claros (aa). A resposta que recebeu foi que era muito simples, pois bastava que o casal tivesse quatro filhos: três iriam nascer com olhos castanhos e um com olhos azuis!

Em se tratando de locos bialélicos ligados ao cromossomo X, no caso de codominância existirão três fenótipos possíveis femininos, cada um equivalente a um genótipo diferente (por exemplo  $X^B X^B$ ,  $X^B X^b$  e  $X^b X^b$ ), e dois masculinos (com ou sem dominância, os fenótipos masculinos corresponderão sempre aos genótipos  $X^B$  e  $X^b$ ). No caso de dominância entre os alelos  $X^B$  e  $X^b$ , existirão dois fenótipos (dominante e recessivo) tanto em fêmeas como em machos, porém correspondendo respectivamente aos genótipos  $X^B X^- = X^B X^B$  ou  $X^B X^b$  e  $X^b X^b$ , ou  $X^B$  e  $X^b$ .

A Tabela 3 mostra os casamentos possíveis com as freqüências esperadas dos diversos tipos nas respectivas proles em relação a essas duas situações.

**Tabela 3** – Resultados possíveis em casamentos envolvendo locos ligados ao X bialélicos, com e sem dominância.

No caso de genes do cromossomo X é importante lembrar-se que, dos dois cromossomos X de uma célula diplóide de uma mulher qualquer, apenas um está geneticamente ativo, com todos os seus genes funcionando normalmente; o outro encontra-se inativado, com apenas uns poucos locos ativos. Essa inativação do cromossomo X em células femininas tem início nas primeiras fases de segmentação do embrião, completando-se entre a segunda e a terceira semanas da vida embrionária em humanos (fase em que o blastocisto está se aninhando na mucosa uterina, ocasião em que conta com cerca de 1000 a 2000 células). Um dos dois cromossomos X da mulher (o de origem materna ou o de origem paterna), ao acaso, sofre um processo de condensação numa célula que até então apresentava os dois cromossomos X com todos os seus locos ativos; todas as células descendentes dessa célula, no entanto, terão sempre o mesmo X inativado. Esse processo ("teoria de Lyon") recebe o nome de lyonização em homenagem à sua descobridora, a cientista inglesa Mary Lyon. O resultado disso é um fenômeno conhecido como compensação de dose: inativando aleatoriamente um dos cromossomos X nas células femininas, em média a quantidade de produto do gene de cada loco do X será a mesmo tanto em machos como em fêmeas. Outra consequência disso é que, devido a pequenos desvios naturais da taxa esperada de inativação ao acaso (segundo a qual se espera que cerca de metade dos X inativados sejam os de origem materna), as mulheres apresentam uma maior variabilidade que os homens na expressão fenotípica dos genes ligados ao X.

Na herança dita quantitativa, o fenótipo do indivíduo vai depender da interação de diversos pares de genes situados em locos que segregam independentemente nos diversos cromossomos. Existem vários modelos de herança quantitativa; no mais comumente citado, a característica depende da interação de um número relativamente grande de genes distribuídos nos vários cromossomos e cada um deles tendo efeito aditivo relativamente pequeno; num outro modelo, o fenótipo resultaria de interações complexas entre genes de efeito marcante localizados num número restrito de locos. Existem provavelmente ainda sistemas que se comportam como híbridos desses dois, albergando ao mesmo tempo genes de pequeno efeito aditivo, situados em vários locos, ao lado de outros (em quantidade restrita) com efeito mais marcante ("genes principais"). Todos os três modelos admitem, ainda, a intervenção de fatores ambientais na expressão fenotípica das características quantitativas, tanto assim que esses modelos comumente são referidos como multifatoriais, resultando da ação conjunto de sistemas poligênicos e de fatores ambientais (entendendo-se como tal todos os fatores que não são genéticos). A intervenção destes últimos em características como o peso e a altura é óbvia. Vários autores ainda se preocuparam em elaborar índices que medem a participação relativa de fatores ambientais e genéticos na determinação dessas características. Um desses índices é a taxa de herdabilidade, que tenta determinar a proporção de variabilidade fenotípica

de uma característica atribuível a fatores genéticos.

Na verdade, a influência não se limita às características multifatoriais discutidas acima. Nosso fenótipo, de uma maneira geral, resulta da interação entre o genótipo e o ambiente. Isso é claramente exemplificado no caso da fenilcetonúria: para apresentar a doença, um indivíduo precisa, além do genótipo recessivo, ingerir fenilalanina em sua dieta.

A maioria dos conceitos acima são diretamente aplicáveis a características fenotípicas normais, freqüentes na população.

Quando essas características são condições patológicas (defeitos isolados, doenças, síndromes, seqüências, associações ou complexos malformativos), o primeiro problema que tem lugar é que elas são extremamente raras na população, tipicamente cada uma delas ocorrendo com freqüências da ordem de 1/10.000 ou menos; as exceções são dadas geralmente por uma ou outra condição excepcionalmente mais freqüente em alguns grupos étnicos, como é o caso da fibrose cística em populações de extração nórdica, da doença de Tay-Sachs em judeus de extração asquenazi e da anemia falciforme entre indivíduos de origem africana. Essa raridade é explicada pelo fato de que qualquer característica genética só pode ser difundido na população através de mutações, que ocorrem espontaneamente com freqüências insolitamente baixas, ou através de portadores do gene mutante, que o transmitem a seus descendentes; como a característica é patológica, reduz direta ou indiretamente a diminuição da probabilidade de reprodução de seus portadores, de modo que se não fosse pelas mutações (que são capazes de manterem os genes mutantes patológicos apenas em freqüências muito baixas) os genes patológicos desapareceriam totalmente das populações, uma vez que os portadores de alelos normais desses genes possuem uma eficiência reprodutiva maior que os afetados, então submetidos aos efeitos da seleção natural. Apenas os genes autossômicos alterados que são totalmente recessivos podem se acumular na população em heterozigotos assintomáticos, que vão se tornando cada vez mais freqüentes; com isso, acaba ficando provável a formação de um casal de heterozigotos. Um filho homozigoto recessivo desses casais (que nasce com probabilidade de 25%) vai ser afetado e portanto objeto de seleção natural, o que vai impedir que o gene continue a aumentar de freqüência na população.

### Principais características das doenças condicionadas por mecanismo autossômico dominante

Em relação a doenças condicionadas por genes autossômicos dominantes, os afetados são heterozigotos; apenas em duas (das cerca de três mil com esse mecanismo confirmado ou provável) dessas doenças conhece-se o fenótipo dos homozigotos quanto ao alelo que causa a doença, os quais ocorreram devido a circunstâncias excepcionais: na acondroplasia, onde o fenótipo (nanismo) favoreceu a formação de casais de afetados heterozigotos, e na hipercolesterolemia familiar, onde afetados heterozigotos (tipicamente com história de acidentes vasculares na terceira ou quarta décadas de vida) ocorrem com frequência relativamente alta na população (da ordem de 1/500); do casamento ao acaso entre alguns desses heterozigotos (com chance de  $1/500 \times 1/500 = 1/250.000$ ) nasceram alguns afetados homozigotos (com 1/4 da chance anterior, ou seja 1/1.000.000), portadores de quadros gravíssimos de aterosclerose generalizada e acidentes vasculares ocorrendo em média já antes da puberdade. De certa forma, é como se a forma grave fosse determinada por mecanismo autossômico recessivo, se se considerar que os afetados heterozigotos estão praticamente isentos de seleção natural, uma vez que a doença neles se manifesta tardiamente.

Fora essas exceções, no entanto, não se conhece o fenótipo correspondente aos homozigotos e a dominância foi definida condicionalmente ("dominância condicional"), baseada no fato de que os heterozigotos Aa manifestam uma doença e no fato de que de casamentos entre pessoas afetadas e normais em média nascem crianças normais e afetadas em proporções aproximadamente iguais, o que coincide com o esperado teórico de cruzamentos  $Aa \times aa = 1/2 Aa: 1/2 aa$ . No entanto é provável, como foi verificado nos casos da acondroplasia e da hipercolesterolemia familiar, que o fenótipo correspondente aos homozigotos seja sempre diferente e muito mais grave (provavelmente letal) que o dos heterozigotos.

Quatro fenômenos importantes observados na herança autossômica dominante de caracteres patológicos são a ocorrência natural de casos devidos a mutação nova, a penetrância incompleta, a expressividade variável e a antecipação clínica.

Devido ao fato de ocorrerem na população com frequência insolitamente baixa (geralmente da ordem de 1/10.000 ou menos) freqüentemente os casos de doença autossômica dominante são isolados, resultando de mutações novas (quando se tiver certeza de que isso realmente ocorreu, o termo mais adequado para tais casos é o de esporádicos). Por isso não causa estranheza o fato de uma parte considerável dos casos dessas doenças serem esporádicos e o fato de, mesmo entre casos familiares, geralmente se poder localizar o primeiro afetado resultante de mutação nova.

Outra característica freqüente nas características patológicas autossômicas dominantes é a **penetrância incompleta**: tipicamente uma fração dos heterozigotos quanto a esses genes não apresenta manifestações fenotípicas detectáveis. Quando isso acontece, diz-se que a característica não penetrou. Entendendo-se por taxa de penetrância a probabilidade de um genótipo manifestar-se fenotipicamente. Em muitas doenças autossômicas dominantes a taxa de penetrância é alta, porém incompleta. Isso significa na prática que apenas uma percentagem dos heterozigotos (representada pela taxa de penetrância K) manifesta sinais e sintomas característicos da doença ou defeito. Por exemplo, no retinoblastoma bilateral, onde o genótipo dos afetados é Rr, a probabilidade de um indivíduo que herdou o gene mutante apresentar o tumor da retina entre o nascimento e no máximo seis anos de idade (cerca de 80 a 90%) depende de haver acontecido um segundo evento mutacional inativando o alelo normal r, um gene supressor de tumor, em pelo menos um dos cerca de um milhão de retinoblastos do embrião. Nesse caso, a falta de penetrância tem lugar quando não ocorre esse segundo evento mutacional em estágio embrionário, o que acontece com probabilidade de 10 a 20%.

Outro conceito importante em genética médica é a **expressividade**, que pode ser definida no caso das doenças autossômicas dominantes como o grau de manifestação fenotípica determinado pelo genótipo heterozigoto. A expressividade é tipicamente muito variável na maioria das doenças determinadas por mecanismo autossômico dominante. Isso explica porque o diagnóstico clínico de patologias desse grupo é geralmente difícil, pois alguns afetados apresentam com certa frequência sinais e sintomas insuficientes (às vezes ausentes,

como no caso de falta de penetrância de genes com penetrância incompleta) para se fechar um diagnóstico de certeza. Em casos familiares da doença, no entanto, a ocorrência de afetados típicos parentes próximos de um afetado atípico permite fechar o diagnóstico de certeza neste último.

O fenômeno da **antecipação** refere-se à observação, num conjunto de casos familiares da doença, de casos conspicuamente mais graves e completos nos indivíduos mais jovens, pertencentes às gerações mais recentes. Antigamente explicava-se o fenômeno exclusivamente na base de uma tendenciosidade de averiguação: entre os afetados pertencentes às gerações mais antigas de um heredograma com casos familiares estão presentes indivíduos que conseguiram se reproduzir, conseqüentemente menos afetados, enquanto as gerações mais recentes contêm uma amostra aleatória de indivíduos com quadros diversos, geralmente bem mais graves que os apresentados em média pelos indivíduos das gerações anteriores. Mais recentemente, no entanto, descobriu-se um certo número de doenças decorrentes de um novo mecanismo de mutação, uma expansão patológica de seqüências altamente repetitivas de trinucleotídeos que flanqueiam ou estão inseridas nos genes correspondentes. Cada vez que o gene é transmitido, pode ocorrer aumento no número de cópias dessas seqüências, número esse que, a partir de um determinado limiar, impede o funcionamento do gene ou altera o seu produto de modo a desencadear a patologia. Assim, nessas doenças, o fenômeno da antecipação tem bases moleculares, pois os indivíduos das gerações mais jovens têm geralmente expansões maiores do que os das gerações mais antigas. Estão nesse caso a síndrome do X frágil, que é a síndrome de retardo mental herdado mais freqüente, a distrofia miotônica de Steinert e várias doenças neurológicas, como diversos tipos de ataxias cerebelares e a doença de Huntington.

### **Principais características das doenças condicionadas por mecanismo autossômico recessivo**

Numa população onde os cruzamentos ocorrem ao acaso em relação ao fenótipo e ao grau de parentesco entre os indivíduos, é como se os indivíduos da geração filial resultassem da combinação ao acaso entre os gametas (espermatozóides e óvulos) produzidos por todos os indivíduos da população. Em relação a um loco autossômico qualquer (por exemplo, o que pode abrigar os alelos A e a), espermatozóides contendo os alelos A e a ocorrerão nas freqüências gênicas p e q respectivamente, o mesmo acontecendo com os óvulos. Combinando-se esses gametas ao acaso, verifica-se que a probabilidade de formação de homocigotos AA na geração filial é o produto  $p \times p = p^2$ , da mesma maneira que homocigotos aa ocorrerão com probabilidade  $q \times q = q^2$ . Como heterocigotos vão resultar de fecundações tanto de óvulos A por espermatozóides a como de óvulos a por espermatozóides A, eles irão ocorrer com probabilidade  $p \times q + q \times p = 2pq$ . Em relação a doenças determinadas por padrão autossômico recessivo, a freqüência de heterocigotos não afetados na população é  $2pq = 2\%$  aproximadamente para doenças com incidência ao nascimento da ordem de  $q^2 = 1/10.000$ , correspondentes a genes deletérios com freqüência  $q = 1\% = 1/100$ . Como a chance de formação casual de um casal de heterocigotos é  $2pq \times 2pq = 2\% \times 2\% = 1/50 \times 1/50 = 1/2.500$  e como a chance de nascimento de um afetado na prole de casal de heterocigotos é  $1/4$ , chega-se à probabilidade de na população ocorrer um homocigoto filho de dois heterocigotos, que é o produto  $1/2.500 \times 1/4 = 1/10.000$ , que é a própria freqüência da doença ao nascimento.

O importante a guardar disso tudo é que basta nascer uma criança afetada por uma doença recessiva qualquer para se ficar sabendo que o gene causador do defeito está presente em heterocigose nos genitores. A não ser nos casos em que ocorram casamentos consanguíneos ou nos casos em que o alelo recessivo responsável esteja em freqüência elevada em certos grupos populacionais, a doença em geral ficará restrita tipicamente a apenas uma irmandade, ao contrário do que pode ser observado nos outros mecanismos de herança.

Um fenômeno freqüentemente associado a doenças causadas por esse tipo de mecanismo é a consanguinidade parental, que se encontra aumentada praticamente em todas as doenças autossômicas recessivas conhecidas. Quanto mais raro for o gene, maior será a taxa de consanguinidade parental: por exemplo, no caso da fenilcetonúria (freqüência populacional da ordem de  $1/10.000$ ) cerca de 10-20% dos casais parentais são primos em primeiro grau; na aquiropidia (uma amputação congênita extremamente rara de membros registrada apenas no Nordeste do Brasil) todos os afetados resultaram de uniões consanguíneas. No capítulo sobre cálculo de riscos, que poderá ser consultado pelos

interessados em detalhes de dedução, mostramos que, enquanto na prole de casais não-consangüíneos a probabilidade de uma criança qualquer nascer afetada é  $q^2$ , essa mesma probabilidade toma o valor literal  $q^2 + pq/16$  na prole de primos em primeiro grau. Se dividirmos essa última probabilidade por  $q^2$  obtemos quantas vezes é mais provável ocorrer um caso da doença na prole de primos do que na de casais não aparentados:  $RR = [q^2 + q(1-q)/16]/q^2 = 1 + (1-q)/16q$ . Para um valor de  $q = 1\%$  essa expressão toma o valor  $1 + 99/16 = 7,1$ , o que significa, por exemplo, que a chance de ocorrer uma criança afetada por fenilcetonúria na prole de primos em primeiro grau é sete vezes maior que a chance correspondente à prole de casais não consangüíneos.

### **Principais características das doenças condicionadas por mecanismo recessivo ligado ao cromossomo X**

Em relação a doenças determinadas por mecanismo recessivo ligado ao cromossomo X, os afetados são homens hemizigotos que recebem o gene de mães heterozigotas ou que resultam de mutações novas. São descritos raríssimos casos de mulheres afetadas. Algumas são homozigotas (nesse caso, todas resultantes de casamentos entre afetados e mulheres deles aparentadas); outras excepcionalmente são heterozigotas com desvio muito acentuado da inativação ao acaso de um dos cromossomos X, de tal modo que a grande maioria dos cromossomos X inativados é os que albergam o alelo normal, o que favorece a manifestação do fenótipo.

### **Principais características das doenças condicionadas por mecanismo dominante ligado ao cromossomo X**

Em relação a doenças determinadas por mecanismo dominante ligado ao X, as afetadas são geralmente mulheres heterozigotas, que via de regra, possuem quadros clínicos bem mais brandos que os apresentados por homens hemizigotos quanto ao gene. Isso ocorre por efeito da lyonização, devido ao fato de que as mulheres são um mosaico quanto a esses genes, possuindo em média apenas esses genes funcionando em metade de suas células - na outra metade vai estar funcionando o alelo normal. É comum a ocorrência de fenótipos letais em machos, muitos desses fenótipos sendo desconhecidos por determinarem a eliminação do concepto em fases precoces do desenvolvimento. Devido a isso, observa-se comumente a transmissão da característica dentro das famílias apenas através de mulheres afetadas.

### **Principais características das doenças condicionadas por mutações no DNA mitocondrial**

As mitocôndrias são as únicas organelas nas células animais que contêm DNA próprio, chamado de DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>). Pode haver centenas ou milhares de mitocôndrias por células e cada uma pode conter várias moléculas de DNA. O DNAm<sub>t</sub> humano é uma molécula de DNA circular, com mais de 16.000 pares de bases de comprimento distribuídos em 37 genes mitocondriais que contêm a informação necessária para codificar 13 polipeptídeos, 22 tipos de RNA transportador e dois tipos de RNA ribossômico. No entanto, uma mitocôndria humana é incapaz de funcionar adequadamente de maneira independente do genoma nuclear, pois os demais polipeptídeos e moléculas de RNA que atuam nas mitocôndrias são codificados por genes localizados nos cromossomos situados no núcleo.

Estudos de grandes genealogias documentaram a clara herança materna das doenças causadas por mutações do DNA mitocondrial. Nesse mecanismo de herança, todas as mulheres afetadas pela doença podem ter descendentes afetados. No entanto, homens afetados nunca têm filhos ou filhas afetados. Isso ocorre porque as mitocôndrias de um indivíduo são herdadas de sua mãe, ou seja, as mitocôndrias de um indivíduo resultam da multiplicação das mitocôndrias originadas de sua mãe, presentes no ovócito por ocasião da fecundação. Em geral, os humanos não herdam o DNA mitocondrial presente nos espermatozoides, pois as mitocôndrias de origem paterna são destruídas após a fecundação.

Quando ocorrem mutações no DNA mitocondrial das células da linhagem germinativa de um indivíduo, pode se instalar uma doença de herança mitocondrial na sua descendência.

De maneira geral, os sintomas presentes nas doenças de herança mitocondrial compreendem alterações de diversos tecidos, as principais sendo as seguintes: miopatia,

alterações neurológicas, atrofia óptica, diabetes e surdez. Acredita-se que esses sinais e sintomas ocorram nas doenças de herança mitocondrial porque a maioria das mutações já descrita afeta a eficácia do mecanismo de fosforilação oxidativa e, portanto, a produção de ATP. Tecidos com elevadas demandas de ATP ou que são submetidos a alterações muito rápidas da demanda de ATP seriam os primordialmente afetados pelas mutações que alteram o DNA mitocondrial.

O fenômeno da expressividade variável dos quadros clínicos é notável nas genealogias onde segregam as mutações mitocondriais. Geralmente, o grau de variabilidade dessa expressividade é muito maior do que o observado em distúrbios semelhantes de herança autossômica dominante. Por exemplo, a surdez hereditária de herança mitocondrial tem um grau de expressividade clínica variável muito maior do que a surdez de herança autossômica dominante.

Parte da expressividade variável observada nas doenças de herança mitocondrial tem sido explicada pela observação de, no mesmo indivíduo, e às vezes até mesmo dentro de um mesmo tecido, poderem ocorrer moléculas de DNA mitocondrial com alelos normais apenas, coexistindo com moléculas de DNA mitocondrial mutadas. Esse fenômeno, chamado de heteroplasmia, é freqüente na herança mitocondrial e explica em parte porque órgãos, tecidos, ou mesmo indivíduos da mesma família podem exibir graus da afecção tão distintos.

No entanto, mesmo nas famílias onde segregam doenças mitocondriais para as quais a heteroplasmia é rara ou excepcional, ocorre também expressividade variável dos sinais e sintomas. Fatores ambientais, como por exemplo, a história de estresse oxidativo, o uso de medicamentos e o estilo de vida do indivíduo podem influenciar a gravidade das manifestações. Outro fator também capaz de influenciar o quadro clínico seria a variabilidade genética presente em diversos outros locos do genoma nuclear, cuja função também é codificar produtos gênicos que atuam nas mitocôndrias.

### **Principais características das doenças condicionadas por mecanismo multifatorial**

No mecanismo conhecido como multifatorial, o fenótipo dos indivíduos resulta da ação integrada de genes situados em vários locos espalhados pelos diversos cromossomos (mecanismo poligênico) e de sua interação com fatores não-genéticos comumente referidos como ambientais.

A maioria dos defeitos e malformações presentes ao nascimento é determinada por esse tipo de mecanismo. São exemplos típicos o lábio leporino (com ou sem palato fendido), os defeitos de fechamento de tubo neural (as espinhas bífidas, as meningomielocelos e a anencefalias), os diversos tipos de pé torto congênito, a estenose hipertrófica do piloro e a luxação congênita do quadril. Apenas esses defeitos contribuem com um total de afetados ao nascimento de quase 1%. Também são condicionadas por esse tipo de mecanismo doenças comuns na população, geralmente nos grupos etários um pouco mais avançados, como a úlcera péptica gastro-duodenal, a epilepsia, a hipertensão arterial, muitos casos de diabetes mellitus do adulto e os transtornos do humor. Contrariamente aos defeitos determinados por mecanismo monogênico, que tipicamente são raros na população e possuem risco de repetição elevado quando de ocorrência familiar, os defeitos multifatoriais são relativamente freqüentes na população (taxas da ordem de 1/1000 ou mais) e possuem risco de repetição pequeno ou desprezível (tipicamente da ordem de 5% ou menos).

Outra diferença sutil é o limiar de manifestação, aqui representado por uma carga de alelos deletérios no sistema poligênico, como mostrado no esquema da Figura 9, que mostra a distribuição hipotética, numa população, de todos os genótipos possíveis quanto ao sistema poligênico associado a um determinado defeito multifatorial. A freqüência populacional da doença está indicada pela área escurecida: se essa área corresponder, por exemplo, a 1/1000 da área total da função distribuição dos genótipos, isso significa que a freqüência do defeito é 1/1000.

## **ANÁLISE DE HEREDOGRAMAS**

Os heredogramas representados nas Figuras 17, 18, 19, 21 e 22 são típicos dos quatro possíveis mecanismos de herança monogênica: autossômico dominante (com penetrância completa ou incompleta), autossômico recessivo, ligado ao X recessivo ou dominante. Na

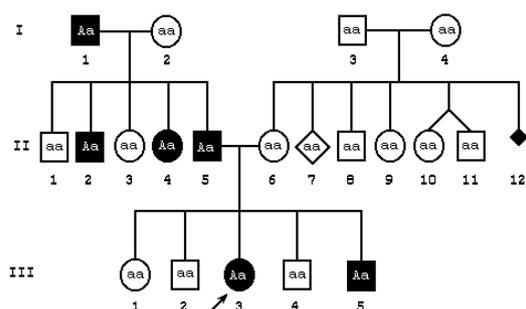
figura 16, apresentamos o mecanismo de herança mitocondrial. Em todos esses heredogramas, os símbolos escurecidos representam indivíduos afetados por uma doença hereditária; a exceção é dada pelos símbolos escurecidos de tamanho menor, que indicam insucessos reprodutivos (abortos ou óbitos fetais). Os quadrados representam indivíduos de sexo masculino e os círculos indivíduos de sexo feminino; indivíduos com sexo desconhecido ou não pertinente ao problema são representados por losangos. As gerações são denotadas por algarismos romanos (I, II, III, IV etc., da mais antiga à mais recente) e os indivíduos de cada geração por algarismos arábicos. Com finalidade apenas de facilitar a leitura do texto, inserimos nos símbolos que representam os diferentes indivíduos os genótipos a eles correspondentes.

É preciso ter sempre presente o fato de que as doenças hereditárias, com raras exceções, ocorrem na população com freqüências insolitamente baixas, geralmente da ordem de grandeza de 1/10.000 ou menos. Disso resulta que os afetados por doenças autossômicas dominantes são via de regra heterozigotos.

No caso de doenças ligadas ao cromossomo X, tanto recessivas quanto dominantes, as mulheres que transmitem o gene são sempre heterozigotas; os poucos casos de mulheres homozigotas quanto a genes recessivos deletérios ligados ao cromossomo X surgiram de casamentos consangüíneos entre heterozigotas e primos afetados hemizigotos, tendo ambos recebido o gene responsável pelo defeito de sua avó comum heterozigota.

No caso de doenças autossômicas recessivas os afetados são homozigotos com genitores heterozigotos; apesar de a freqüência de heterozigotos para esses genes ser relativamente alta na população (freqüência de 2% no caso de doenças que ocorrem na população na freqüência de 1/10.000), para nascer um afetado é preciso que os dois genitores sejam heterozigotos (probabilidade  $2\% \times 2\% = 4/10.000$ ) e que ambos transmitam o gene deletério para a prole (probabilidade  $1/2 \times 1/2 = 1/4$ ), o que resulta na freqüência populacional de afetados  $4/10.000 \times 1/4 = 1/10.000$ ; vê-se assim que numa família qualquer com afetados deve ocorrer somente um casamento entre dois heterozigotos (os genitores do afetado) e que dificilmente ocorrerão heterozigotos fora do ramo da família que contém os afetados (que também, pelo raciocínio desenvolvido mais acima, ocorrerão em apenas uma irmandade); violações a essas regras somente são encontradas em casos de famílias com casamentos consangüíneos (que tipicamente são encontrados com maior freqüência entre os progenitores de afetados, por favorecerem o encontro de duas pessoas heterozigotas quanto a um mesmo gene patológico herdado de um ascendente comum delas) ou no caso de algumas doenças sabidamente freqüentes em alguns grupos populacionais, como é o caso da anemia falciforme na África equatorial e da fibrose cística entre nórdicos.

### Heredograma 1: herança autossômica dominante



**Figura 17** - Heredograma típico de uma doença, rara na população, determinada por mecanismo autossômico dominante com penetrância completa.

No heredograma da Figura 17, I-1 é afetado e casado com I-2. Os filhos do casal são cinco (II-1 a II-5), sendo que II-2, II-4 e II-5 são afetados. II-5 (afetado) casou-se com II-6 (pertencente a uma irmandade de 6 indivíduos, dois dos quais constituem um par de gêmeos dizigóticos (II-10 e II-11)); nessa irmandade uma gestação terminou em aborto de sexo não determinado (provavelmente porque foi muito precoce, de cerca de dois meses de idade gestacional). Do casal II-5/II-6 nasceram cinco crianças, duas das quais (III-3 e III-5) são afetadas. A menina III-3 é a propósita (ou caso índice); o propósito é o primeiro indivíduo estudado da família, geralmente afetado, que motiva o levantamento do heredograma; sempre é assinalado por uma seta.

O padrão de transmissão da doença nessa família representada na figura é claramente autossômico dominante, pois existem afetados em todas as gerações e os afetados pertencem aos dois sexos. Fica claro também, como detalharemos mais abaixo, que os afetados são heterozigotos, pois aqueles que se reproduziram tiveram crianças normais e afetadas.

O mecanismo de herança ligado ao X é excluído com certeza absoluta devido ao fato de ocorrerem duas transmissões da doença de pai afetado para filho de sexo masculino.

A herança autossômica recessiva é afastada, pois as mulheres **I-2** e **II-6**, nessa hipótese, precisariam ser ambas heterozigotas; não sendo aparentadas biologicamente de seus maridos (homozigotos recessivos na hipótese de herança autossômica recessiva), a chance disso ocorrer é muito baixa, uma vez que todas as doenças aqui apresentadas são raras na população.

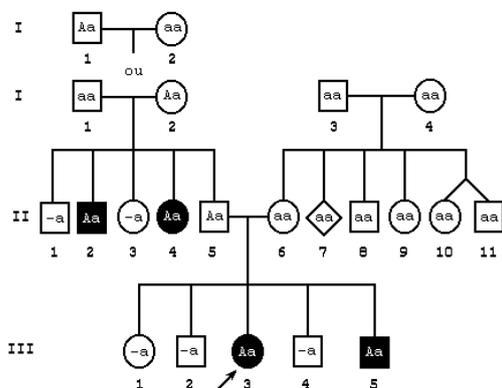
Todos os indivíduos representados por símbolos escurecidos são heterozigotos **Aa** (em que **A** é o gene que determina a doença e **a** o seu alelo normal), pois homozigotos **AA** ocorrem em situações muito excepcionais: por exemplo, na acondroplasia, resultantes de casamentos entre dois heterozigotos afetados; conhecem-se menos de 10 casos de prole afetada **AA** desses casamentos e os defeitos ósseos são gravíssimos, com a maioria dos afetados falecendo durante os dois ou três primeiros anos de vida; em outras doenças a chance do casamento dependeria do encontro casual de dois afetados, cada um deles ocorrendo numa freqüência da ordem de 1/10.000 ou menos. Se se trata de doença determinada por gene autossômico dominante de penetrância completa (indicando que todos os seus portadores apresentam o fenótipo completo ou incompleto que caracteriza a doença), todos os indivíduos da genealogia representados por símbolos claros são **aa**.

Em heredogramas como esse, típicos de doença autossômica dominante, é comum a doença aparecer pela primeira vez num indivíduo que é filho de genitores normais, por efeito de mutação nova. No heredograma que estamos analisando, por exemplo, o indivíduo **I-1** tinha genitores normais e é com probabilidade alta (com certeza caso a penetrância seja completa) o primeiro indivíduo portador do gene mutante **A** na família.

O risco de repetição da doença numa criança que tanto o casal **I-1/I-2** como o casal **II-5/II-6** venham a ter é estimado em 50% ou 1/2, pois para a doença se manifestar num indivíduo qualquer, basta que ele receba de seu progenitor afetado heterozigoto o gene **A**. Este também será o risco de recorrência da doença na prole dos afetados **II-2**, **II-4**, **II-5**, **III-3** e **III-5**, caso eles venham a se casar (como acontece geralmente) com pessoas normais não aparentadas. O risco para a prole de todos os indivíduos normais da genealogia (incluindo o casal já constituído **I-3/I-4**) é desprezível, da ordem de grandeza de zero.

### Heredograma 2: herança autossômica dominante com penetrância

O heredograma da figura 18 abaixo mostra a segregação de uma doença autossômica dominante de penetrância incompleta, pois um dos membros do casal **I-1/I-2** e o indivíduo **II-5**, todos fenotipicamente normais, são na verdade heterozigotos **Aa**, uma vez que tiveram filhos normais e afetados.

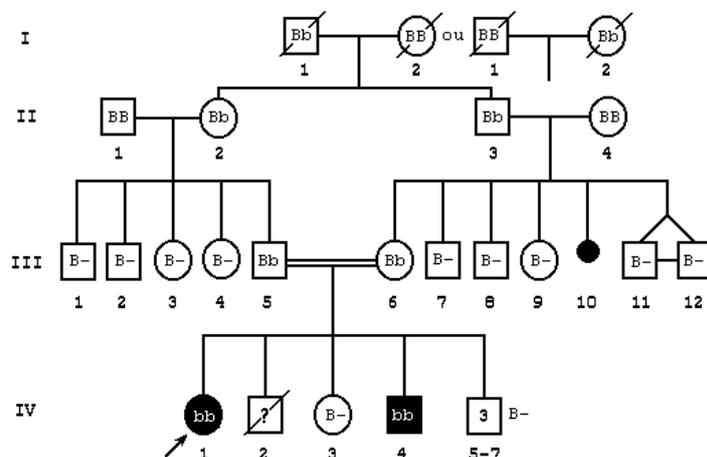


**Figura 18** - Heredograma típico de uma doença, rara na população, determinada por mecanismo autossômico dominante com penetrância incompleta.

O casal **I-3/I-4** e todos os seus filhos são **aa**, da mesma maneira que um dos membros do casal **I-1/I-2**; todos os filhos normais dos casais **I-1/I-2** e **II-5/II-6**, no entanto, podem ser **aa** ou **Aa** não penetrantes.

A configuração genealógica observada poderia também ser explicada, à primeira vista, por uma doença de herança autossômica recessiva, mas diante da raridade das doenças genéticas em geral na população, é muito pouco provável que a mulher II-6 fosse também heterozigota quanto ao gene que está segregando na família biológica de seu marido II-5.

### Heredograma 3: herança autossômica recessiva

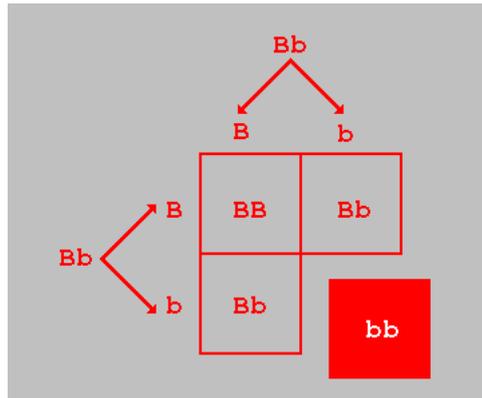


**Figura 19** - Heredograma típico de uma doença, rara na população, determinada por mecanismo autossômico recessivo

O heredograma da figura 19, além de ilustrar o mecanismo da herança autossômica recessiva, introduz mais alguns símbolos usados nos heredogramas. Assim, a união entre os indivíduos III-5 e III-6 indica consangüinidade e está representada por uma linha dupla, que substitui a simples usada para assinalar os casamentos entre indivíduos não aparentados entre si. O conceito III-10 é um aborto ou óbito fetal de sexo feminino. Os indivíduos III-11 e III-12 são gêmeos monozigóticos. A linha inclinada sobre os símbolos I-1, I-2 e IV-2 indicam que eles já faleceram. O ponto de interrogação no interior de IV-2 indica que não se sabe se ele era afetado ou não (por exemplo, morreu jovem antes da idade média de manifestação dos primeiros sinais e sintomas da doença). O número 3 dentro do símbolo mais à direita da última geração representa três indivíduos normais de sexo masculino (IV-5, IV-6 e IV-7).

O mecanismo ligado ao X pode ser afastado devido à ocorrência de afetada de sexo feminino (IV-1) filha de genitores normais. A hipótese de herança autossômica dominante com penetrância incompleta é uma possibilidade, mas no presente caso ela fica enfraquecida pela ocorrência do casamento consangüíneo entre III-5 e III-6.

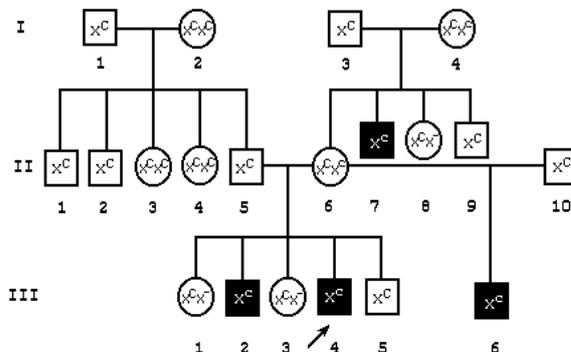
Tipicamente, no mecanismo de herança autossômico recessivo, os afetados costumam concentrar-se numa única irmandade. Fortemente indicativo desse mecanismo é a ocorrência de consangüinidade parental, como aconteceu no heredograma aqui representado (III-5 e III-6 são filhos de dois irmãos, portanto primos em primeiro grau). O genótipo dos afetados IV-1 e IV-4 é **bb**, em que **b** é um gene recessivo que em homozigose determina a doença. Devido a isso, os genitores primos em primeiro grau são ambos heterozigotos **Bb** e é mais provável, nesse caso, que os genes presentes em homozigose nos dois afetados tenham origem comum num único alelo patológico **b** presente em dose única em I-1 ou em I-2, os ascendentes comuns do casal de primos. Seguindo esse raciocínio, II-2 e II-3 também são heterozigotos, casados cada um deles com um homozigoto normal **BB** (II-1 e II-4). Cada um dos irmãos de III-5 (III-1 a III-4) tem portanto chances iguais (50%) de ser homozigoto **BB** ou heterozigoto **Bb**, o mesmo acontecendo com os irmãos de III-6 (III-7 a III-12). Finalmente, cada um dos irmãos normais dos afetados (IV-3, IV-5, IV-6 e IV-7) possui chance de ser heterozigoto igual a  $(1/2)/(1/4+1/2) = 2/3$ , uma vez que sendo normal e filho de heterozigotos só pode ser heterozigoto **Bb** ou homozigoto **BB** com probabilidades que estão entre si assim como  $1/2 : 1/4$  ou  $2 : 1$  ou  $2/3 : 1/3$ . Isso tudo fica claro se considerarmos o esquema mostrado na Figura 13 abaixo, que mostra a distribuição esperada dos genótipos possíveis na prole de um casal de heterozigotos, excluindo-se a possibilidade de a criança ser **bb**, uma vez que apresenta o fenótipo dominante: vê-se imediatamente que em duas das três eventualidades que correspondem ao fenótipo **B-** a criança é **Bb**.



**Figura 20** - Genótipos possíveis na prole normal de um casal de heterozigotos, ficando claro que a probabilidade de uma criança normal ser heterozigota é  $2/3$ .

O risco de recorrência do defeito ou doença na prole do casal **III-5/III-6** é obviamente  $1/4$  ou  $25\%$ , uma vez que tanto **III-5** como **III-6** são heterozigotos **Bb** e para que uma próxima criança que venham a ter nasça afetada é preciso apenas que cada um deles transmita-lhe o gene **b**, o que vai ocorrer com probabilidade  $R = 1/2 \times 1/2 = 1/4$  ou  $25\%$ . O risco de ocorrência de prole afetada nos casais já constituídos **I-1/I-2**, **II-1/II-2** e **II-3/II-4**, todos do tipo **BB x Bb**, é desprezível, da ordem de grandeza de zero. Quanto aos indivíduos **III-1** a **III-4**, **III-7** a **III-9** e **III-11** e **III-12**, cada um dos quais tem chance de heterozigose **Bb** igual a  $1/2$  ou  $50\%$ , o risco de afecção em sua prole dependerá de o futuro cônjuge (por hipótese não aparentado) ser também heterozigoto e de ambos lhe transmitirem o alelo **b** patológico. Para genes recessivos patológicos que ocorrem na população com freqüências da ordem de  $1\%$  aproximadamente, como é o caso dos genes do albinismo e da fenilcetonúria, a freqüência de afetados ao nascimento é da ordem de  $1/10.000$  mas a freqüência de heterozigotos fixa-se em cerca de  $1/50$  ou  $2\%$ . Isso significa que o risco de prole afetada para cada um desses indivíduos (**III-1** a **III-4**, **III-7** a **III-9** e **III-11** e **III-12**) será  $R = 1/2 \times 1/50 \times 1/4 = 1/400$  ou  $0,25\%$ , risco esse de ordem de grandeza desprezível. Se um desses indivíduos casar-se com um parente, no entanto, o risco será muito maior. Suponhamos por exemplo que o indivíduo **III-1** venha a se unir com **III-9**, sua prima em primeiro grau. Cada um possui uma chance a favor de ser heterozigoto da ordem de  $1/2$ , de modo que o risco para a sua prole é estimado em  $R = 1/2 \times 1/2 \times 1/4 = 1/16 = 6,25\%$ . Apesar de esse risco ainda ser relativamente baixo, ele está aumentado  $6,25/0,25 = 25$  vezes em relação ao risco existente na hipótese de qualquer um dos cônjuges se casar com uma pessoa não aparentada. Resta-nos agora calcular os riscos de prole afetada para os filhos do casal **III-5/III-6**. O risco para a prole de **IV-1** ou **IV-4** (afetados) é  $R = 1 \times 1/50 \times 1/2 = 1\%$ ; para a prole de **IV-3**, **IV-5**, **IV-6** e **IV-7** o risco correspondente é calculado segundo  $R = 2/3 \times 1/50 \times 1/4 = 1/300$  ou cerca de  $0,3\%$ . Concluímos, portanto que o risco de prole afetada só está aumentado significativamente ( $R = 25\%$ ) para o casal **III-5/III-6**.

#### Heredograma 4: herança recessiva ligada ao cromossomo X



**Figura 21** - Heredograma típico de uma doença, rara na população, determinada por mecanismo recessivo ligado ao cromossomo X

O heredograma ilustra um caso típico de herança recessiva ligada ao cromossomo X, como é o caso da distrofia muscular progressiva tipo Duchenne.

O mecanismo autossômico recessivo pode ser afastado usando-se a mesma argumentação do caso da primeira genealogia. A herança dominante com penetrância incompleta não pode ser afastada, mas é muito pouco provável, pois para explicar-se a configuração da genealogia baseando-se nesse mecanismo seria preciso que os dois heterozigotos não penetrantes fossem mulheres (**I-4 e II-6**) e que os quatro afetados fossem homens; a chance combinada disso vale  $(1-K)^2 \cdot (1/2)^6 < 1/1.000$  para um valor da taxa de penetrância  $K = 0,8$ . Como na hipótese de mecanismo recessivo ligado ao cromossomo X a probabilidade da configuração é 1 (ou seja, tem que acontecer exatamente o que aconteceu, ou seja, os quatro afetados têm que ser homens e todos eles aparentados entre si através das duas mulheres heterozigotas), chega-se a conclusão que o mecanismo recessivo ligado ao X é pelo menos 1.000 vezes mais provável que o autossômico dominante com penetrância incompleta.

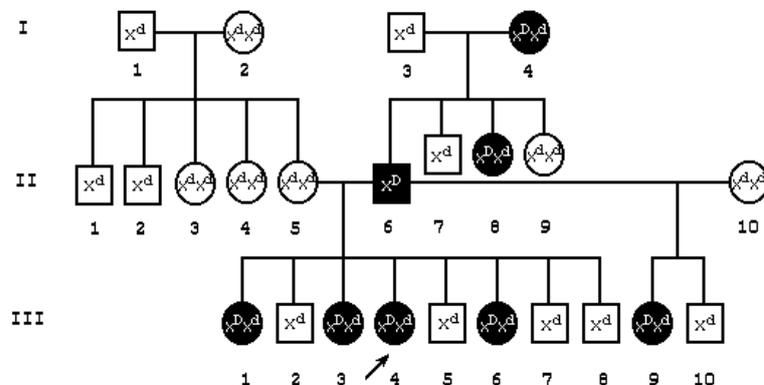
Como se nota da análise do heredograma, apenas indivíduos de sexo masculino são afetados. Excepcionalmente, mulheres heterozigotas podem apresentar manifestações da doença, geralmente sob forma bem mais branda que a apresentada em média pelos homens hemizigotos afetados, como já se observou inúmeras vezes na hemofilia por deficiência do fator VIII ou mais raramente na própria distrofia muscular de Duchenne. Evidentemente isso é possível desde que exista um desvio significativo no processo de Lyonização e a mulher tenha inativado na maioria de suas células o cromossomo X contendo o alelo normal. A análise do heredograma mostra ainda que todos os afetados são aparentados entre si através das mulheres **I-4 e II-6**, que são heterozigotas obrigatórias quanto ao gene que produz a doença. Outro detalhe interessante notado na genealogia e que não deixa dúvidas quanto ao mecanismo de transmissão do traço patológico é o fato de que a mulher **II-6** casou-se em duas ocasiões com indivíduos não aparentados, e de ambos os casamentos originaram-se afetados. Outra característica importante, que não se aplica ao caso da distrofia muscular de Duchenne e a outras condições letais ligadas ao cromossomo X, em que os afetados não conseguem reproduzir-se, é que a prole dos afetados é normal. Um ponto importante a se considerar é que se ocorrer transmissão de homem afetado para filho de sexo masculino afetado, fica excluída a possibilidade do mecanismo ligado ao X, tanto dominante como recessivo.

Chamando-se  $X^C$  o gene que em hemizigose determina a doença recessiva ligada ao X, vem que o genótipo dos afetados **II-7, III-2, III-4 e III-6** é  $X^C$ . O casal **I-1/I-2** e todos os seus filhos (**II-1 a II-5**) são hemizigotos  $X^C$  (se homens) ou homozigotas  $X^C X^C$  (se mulheres). As mulheres heterozigotas certas (genótipo  $X^C X^C$ ) são, conforme já mencionado, **I-4 e II-6**. A afirmação quanto a esta última não deixa dúvidas e no caso de **I-4**, apesar de ela ter tido apenas um filho afetado, teve, através de **II-6**, três netos igualmente acometidos. As demais mulheres que ocorrem na genealogia (**II-8, III-1 e III-3**) são heterozigotas prováveis, uma vez que são todas filhas de heterozigotas certas, cada uma com probabilidade de 50% favorecendo a hipótese de heterozigose. Todos os homens assinalados por símbolos claros, sejam parentes em primeiro grau de afetados ou não, são hemizigotos quanto ao gene normal (genótipo  $X^C$ ).

Da mesma maneira que na situação anterior, calcularemos em seguida o risco de repetição da doença na prole de todos os indivíduos da genealogia representada na Figura 14. Os riscos de criança afetada na prole dos casais **I-3/I-4, II-5/II-6 e II-6/II-10** são de 25% ou 1/4, uma vez que nessas situações as genitoras são heterozigotas e para nascer uma criança afetada é preciso que herde o cromossomo Y do pai (probabilidade 1/2) e o cromossomo X com o alelo responsável pela doença da genitora heterozigota (também com probabilidade 1/2). O risco final é obtido multiplicando-se essas duas probabilidades:  $R = 1/2 \times 1/2 = 1/4$  ou 25%. O risco de criança afetada na prole de todos os afetados, desde que eles não venham a se casar com mulheres aparentadas ou pertencentes a famílias com casos da mesma doença, é da ordem de grandeza de zero (ou seja, para nascer um menino afetado seria necessário que ocorresse mutação nova no cromossomo X recebido da mãe). É importante lembrar que, embora o afetado não transmita o gene deletério a nenhum dos filhos homens que tiver, todas as suas filhas serão heterozigotas certas, com risco de afecção para a sua futura prole estimado em 1/4 ou 25%. O risco de descendência afetada é nulo para o casal **I-1/I-2**, para os seus filhos **II-1 a II-4** e para todos os demais indivíduos de sexo masculino assinalados por símbolos claros ainda não mencionados (**II-9 e III-5**). Quanto ao risco de prole afetada para as mulheres heterozigotas prováveis **II-8, III-1 e III-3**, é estimado em  $R = 1/2 \times 1/4 = 1/8$  ou 12,5%,

uma vez que cada uma delas tem probabilidade de ser heterozigota igual a 1/2 ou 50%.

### Heredograma 5: herança dominante ligada ao cromossomo X



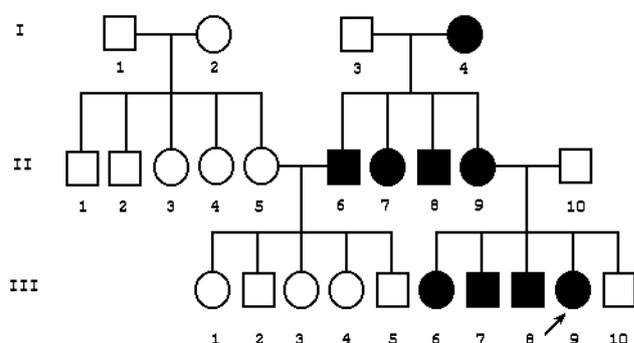
**Figura22** - Heredograma típico de uma doença, rara na população, determinada por mecanismo dominante ligado ao cromossomo X.

A figura 22 ilustra um caso típico de transmissão de uma doença dominante ligada ao X, mecanismo relativamente raro no conjunto das doenças genéticas monogênicas. Como no modo de transmissão autossômico correspondente, ocorrem afetados em todas as gerações. Nota-se que mulheres heterozigotas  $X^D x^d$  afetadas têm filhos  $X^D$  e filhas  $X^D x^d$  afetados com probabilidades iguais (25%), enquanto os homens hemizigotos afetados  $X^D$  não transmitem o defeito para nenhum de seus filhos, enquanto todas as suas filhas são necessariamente heterozigotas  $X^D x^d$  afetadas. Nota-se também que a configuração do heredograma poderia acontecer sob hipótese de doença autossômica dominante. Sob essa hipótese, a probabilidade de ocorrência de 5 afetados de sexo feminino e de 5 meninos normais na prole de II-6, na ordem mostrada, toma valor  $(1/2)^{10} = 1/1024$ ; sob hipótese de mecanismo ligado ao X dominante, no entanto, essa ocorrência seria a única possível (com probabilidade 1). A probabilidade favorecendo esta última hipótese é, portanto, no caso, cerca de 1.000 vezes maior que a outra. Inversamente, caso tivesse sido observado apenas um caso de transmissão do defeito de pai para filho ou se pelo menos uma das filhas do afetado fosse normal, a hipótese de mecanismo dominante ligado ao X seria afastada.

Determinemos agora os genótipos de todas as pessoas representadas no heredograma, sob a hipótese de herança dominante ligada ao X, agora bem fundamentada. Todos os indivíduos representados por símbolos claros são hemizigotos  $x^d$  ou homozigotas  $x^d x^d$  normais, enquanto os hemizigotos afetados (símbolos escurecidos) possuem genótipo  $X^D$  e as heterozigotas afetadas (representadas por círculos negros) são  $X^D x^d$ .

Os riscos para a prole dos indivíduos II-1 a II-4 do casal I-1/I-2 e de todos os indivíduos normais das proles de I-3/I-4, II-5/II-6 e II-6/II-10 são desprezíveis, da ordem de grandeza de zero. O risco de doença na prole de I-3/I-4 (homem  $x^d$  x mulher  $X^D x^d$ ) é de 1/2 ou 50%, pois esse casal pode ter quatro tipos diferentes de filhos, cada um deles com probabilidade de 25%:  $X^D$ ,  $x^d$ ,  $x^d x^d$ ,  $X^D x^d$ . O risco para as proles de II-5/II-6 e II-6/II-10 também é de 1/2 ou 50%, com a diferença que agora todas as meninas (que vão ocorrer com probabilidade de 50%) serão heterozigotas afetadas  $X^D x^d$  enquanto todos os meninos (que também ocorrerão com probabilidade de 50%) serão hemizigotos  $x^d$  normais, uma vez que o cruzamento parental é do tipo homem  $X^D$  x mulher  $x^d x^d$ .

### Heredograma 6: herança mitocondrial



**Figur23** - Heredograma típico de uma doença, rara na população, determinada por gene mutante localizado no DNA das mitocôndrias.

Nesse mecanismo, exemplificado através do heredograma mostrado na Figura 23, o defeito é condicionado por gene mutante localizado no DNA das mitocôndrias, organelas que provêm do óvulo, sendo portanto transmitidas às crianças de ambos os sexos pela mãe. A inspeção do heredograma mostra claramente que as crianças (meninos e meninas) de mulheres afetadas são igualmente afetadas, contrariamente ao que acontece com a prole de homens afetados, que é sempre normal. A situação é complicada geralmente pela penetrância incompleta e expressividade muito variável do gene que determina a doença ou defeito na prole de mulheres portadoras do DNA mitocondrial mutante, geralmente afetadas. Desse modo, nem todas as crianças dessas mulheres são necessariamente afetadas, como é o caso do indivíduo III-10 da genealogia acima; a distinção importante em relação à herança autossômica dominante é que não ocorrem crianças afetadas na prole de homens afetados. A heteroplasmia (presença de cópias de DNA mutante mitocondrial ao lado de cópias normais, em proporções variadas nos diferentes indivíduos) contribui para a expressividade do quadro clínico, que costuma ser muito mais variável do que na herança autossômica dominante. Esse tipo de transmissão vem ganhando importância crescente em genética médica desde que se descobriu que uma fração considerável dos casos de surdez não síndrômica são devidas a mutações de DNA mitocondrial. Outras doenças e síndromes com manifestações metabólicas, neurológicas, musculares e visuais também podem ser causadas por mutações no DNA mitocondrial.

## O DNA MITOCONDRIAL HUMANO

*Regina Célia Mingroni*

Embora a maior parte do DNA na maioria dos organismos eucariontes esteja presente no núcleo, uma parte do DNA celular está presente nas mitocôndrias dos animais, das plantas e dos fungos e também nos cloroplastos das plantas. Essas organelas são importantes para as células do ponto de vista energético, pois nas mitocôndrias ocorre a síntese de ATP e nos cloroplastos ocorre a fotossíntese.

### O DNA mitocondrial humano

O DNA mitocondrial humano é uma molécula de DNA circular de dupla-fita cuja seqüência completa de nucleotídeos foi estabelecida em 1991. Tem 16569 pb de comprimento. As duas fitas do DNA têm composição de bases diferente e por isso receberam diferentes nomes: a cadeia H (de heavy ou pesada) é rica em guaninas e a cadeia L (de light ou leve) é mais rica em citosinas. Embora o DNA mitocondrial humano seja predominantemente de dupla-fita, em um pequeno segmento ocorre DNA com tripla-fita, estrutura que resulta da síntese adicional de um pequeno segmento do DNA mitocondrial, na região que chamamos de hipervariável. Células humanas contêm geralmente milhares de cópias do DNA mitocondrial. O DNA mitocondrial humano corresponde a cerca de 0,5% do DNA total de uma célula somática.

Na figura 17 está representado o DNA mitocondrial humano que contém 37 genes: 28 são presentes na cadeia pesada e nove na cadeia leve. Um total de 13 dos 37 genes que codificam polipeptídeos e são traduzidos nos ribossomos mitocondriais. Eles codificam alguns elementos dos complexos respiratórios, enzimas relacionadas à fosforilação oxidativa. Todas as demais proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear e são traduzidas pelos ribossomos do citoplasma celular antes de serem importadas pela mitocôndria. Os demais 24 genes mitocondriais codificam 22 tipos de RNAs transportadores e dois tipos de moléculas de RNA ribossômico, que constituem parte do aparato de síntese protéica mitocondrial. Outros componentes são codificados exclusivamente pelo genoma nuclear. Esses genes ocupam a maior parte da extensão do DNA mitocondrial. No entanto, existe uma região não codificadora de aproximadamente 1200 nucleotídeos que é conhecida por nomes diferentes: alça D (*D loop*), região de controle ou região hipervariável. O termo região de controle se refere ao fato de que essa região contém os sinais que controlam a replicação do DNA e a transcrição do RNA. O termo *D-loop* se refere ao início da replicação do DNA, quando a cadeia de DNA recém-sintetizada desloca uma das cadeias parentais, formando uma espécie de bolha no local. A seqüência do DNA nessa região é chamada de hipervariável porque, sendo uma região que não codifica um produto, ela pode acumular mutações de ponto em uma taxa de 10 a 25 vezes superior às taxas de mutação encontradas no DNA nuclear. Por isso, essa região é a mais estudada em pesquisas evolutivas e de genética de populações.

### Mutações no DNA mitocondrial causam várias doenças genéticas nos humanos

A gravidade de uma doença causada por uma mutação no DNA mitocondrial depende do tipo de mutação e da proporção entre as moléculas de DNAm<sub>t</sub> mutado e não mutado em um certo tipo celular. Muitas vezes quando são detectadas mutações no DNA mitocondrial, as células podem conter uma mistura de moléculas de DNAm<sub>t</sub> selvagem ou mutado, caracterizando a condição chamada de heteroplasmia. Cada vez que uma célula de mamífero se divide, moléculas de DNAm<sub>t</sub> selvagens ou mutadas vão segregar ao acaso para as células filhas. Assim, o genótipo em relação ao DNAm<sub>t</sub> pode se modificar entre uma divisão celular e outra, e entre uma geração e outra. O acaso pode fazer com que se estabeleçam linhagens predominantemente portadoras de DNA mutado ou predominantemente selvagens. Uma vez que todas as enzimas necessárias para a replicação do DNA mitocondrial são codificadas pelo DNA nuclear, mutações no DNA mitocondrial em teoria não afetam sua capacidade de replicação. Ao contrário, foram descritos casos em que grandes deleções do DNA mitocondrial acarretaram vantagem replicativa.

Todas as células contêm mitocôndrias, mas, curiosamente, as mutações mitocondriais afetam preferencialmente certos tecidos. Aqueles que são os mais comprometidos geralmente são aqueles com elevada demanda de ATP produzido pela cadeia de fosforilação oxidativa, ou aqueles com demandas rápidas e muito variáveis de ATP. A neuropatia óptica hereditária de Leber (degeneração no nervo óptico acompanhada de cegueira progressiva), por exemplo, é causada por uma mutação de sentido errado no gene mitocondrial que codifica a subunidade 4

da NADH-CoQ redutase. Qualquer uma das grandes deleções de DNA mitocondrial que já foram estudadas causam diversas outras doenças como oftalmoplegia externa crônica progressiva e síndrome de Kearns-Sayre, caracterizadas por defeitos de visão e degenerações do sistema nervoso central. Um outro tipo de condição, que se caracteriza pela presença de fibras musculares vermelhas esgarçadas e movimentos atáxicos pode ser devida a mutações no gene do RNAt mitocondrial da lisina. Como resultado dessa mutação, a tradução de diversas proteínas mitocondriais parece estar comprometida. O interessante a respeito das doenças resultantes de mutações mitocondriais na espécie humana é que, salvo uma única exceção descrita, elas sempre têm herança materna. Em outras palavras, as mulheres transmitem a doença a seus filhos e filhas, mas homens afetados jamais transmitem a doença a seus descendentes.

**Figura 24.** Representação do DNA mitocondrial humano. A fita do DNA representada pelas linhas internas é denominada cadeia leve (L, *light*). A fita do DNA representada pelas linhas externas é chamada de cadeia pesada (H, *heavy*).  $O_L$  é a origem de replicação da cadeia leve;  $O_H$  é a origem de replicação da cadeia pesada;  $P_L$  é o promotor da cadeia leve;  $P_H$  é o promotor da cadeia pesada.

## AS BASES CROMOSSÔMICAS DAS DOENÇAS GENÉTICAS

Paulo A Otto, Regina Célia Mingroni, Ângela Maria Vianna Morgante 2006 – *Princípios de Genética Humana e Médica. Em: Tratado de Clínica Médica, Amato Carlos Lopes Editor. Editora Roca Ltda.*

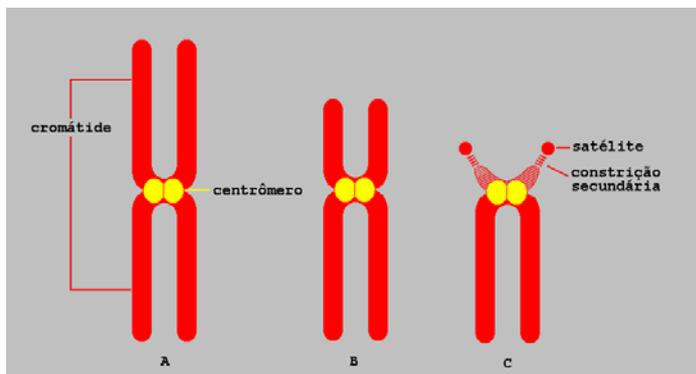
A Citogenética estuda a estrutura, a função e a evolução dos cromossomos. A Citogenética Clínica focaliza especialmente as alterações cromossômicas, os mecanismos que as originam e seus efeitos fenotípicos. Seis a sete em cada mil recém-nascidos têm uma alteração cromossômica. Essas alterações constituem a causa genética principal de malformações congênitas e retardo mental e podem estar relacionadas também com esterilidade e infertilidade. Entre os abortamentos espontâneos de primeiro trimestre, 50% têm anormalidades cromossômicas como causa. A comparação entre as freqüências das anormalidades cromossômicas nos abortos e ao nascimento mostra o efeito deletério que elas têm sobre o desenvolvimento, chegando a termo apenas uma pequena fração dos conceptos afetados.

### Como estudar os cromossomos humanos

As células somáticas humanas têm 46 cromossomos, 23 herdados de cada genitor. Vinte e dois pares cromossômicos são semelhantes no homem e na mulher e se denominam autossomos. O par de cromossomos sexuais é formado por dois cromossomos X na mulher e por um cromossomo X e um Y no homem.

Quando uma célula se divide, seus cromossomos progressivamente aumentam a condensação e encurtam, o que permite visualizá-los e analisar sua morfologia ao microscópio óptico. Já na célula que não está em divisão, os cromossomos estão muito distendidos e, apesar de cada um manter sua integridade, não permitem a análise morfológica. Assim, para analisar cromossomos são necessárias células em divisão, obtidas a partir de tecidos vivos.

Os cromossomos são analisados nas fases de metáfase ou prometáfase da divisão mitótica que dará origem a duas células com número de cromossomos igual ao da célula-mãe. O cromossomo, nessas fases, já está duplicado, consistindo de duas cromátides, unidas pelo centrômero (Figura 25). Cada cromátide é formada por uma molécula de DNA associada a proteínas e esse material é chamado de cromatina.



**Figura 25** – Os cromossomos metafásicos estão duplicados, formados por duas cromátides unidas no centrômero. De acordo com a posição do centrômero, os cromossomos são classificados em metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. Nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos humanos observam-se constrições secundárias (onde estão situados os genes que codificam RNA ribossômico) e, em sua extremidade, massas de cromatina mais condensada, os satélites

Os exames cromossômicos pós-natais, para diagnóstico de alterações cromossômicas constitutivas, são rotineiramente realizados nos linfócitos do sangue periférico, diante da facilidade de obtenção do material e da relativa simplicidade da técnica de cultivo. Outros tipos de células podem também ser usados, quando a pesquisa de uma determinada alteração exige a extensão da análise, como por exemplo os fibroblastos obtidos de biópsias de pele. No diagnóstico pré-natal, a análise cromossômica é realizada em amniócitos ou em células das vilosidades coriônicas.

Para o estudo dos cromossomos dos linfócitos, o sangue é colhido com um anticoagulante, a heparina, e após a sedimentação das hemácias, uma alíquota de plasma com os leucócitos em suspensão é inoculada no meio de cultivo, que contém a fito-hemaglutinina, o agente mitogênico que estimula os linfócitos a dividirem-se. Após cerca de 70

horas de incubação a 37° C, é grande o número de células em divisão. Para se obterem as metáfase ou prometáfases necessárias à análise, o processo de divisão deve ser interrompido nessas fases. Esse bloqueio é feito utilizando-se substâncias, como a colchicina, que impedem a formação do fuso mitótico, necessário para a separação das cromátides dos cromossomos e sua migração para as células-filhas. Após esse passo, as células são separadas do meio de cultura por centrifugação e tratadas com uma solução hipotônica, para que os cromossomos se espalhem e, assim, possam ser claramente vistos, sem estarem emaranhados uns com os outros. O material é, então, fixado com uma solução de metanol e ácido acético. Pingam-se algumas gotas da suspensão de células em fixador sobre lâminas de microscopia e, após secagem, as preparações estão prontas para serem submetidas aos diversos métodos de coloração dos cromossomos que permitem sua análise ao microscópio.

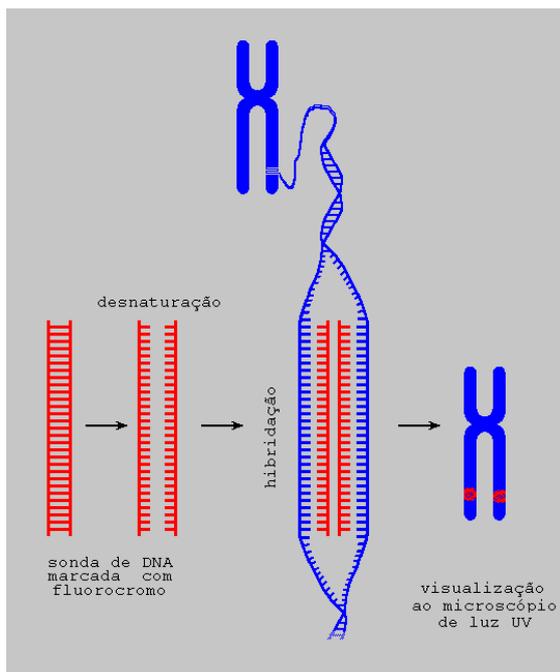
O método de coloração cromossômica rotineiramente utilizado nos exames diagnósticos é o que produz faixas claras e escuras (bandas) ao longo dos cromossomos, permitindo identificar todos os pares: as preparações cromossômicas são tratadas com uma solução de tripsina e coradas com o corante de Giemsa – bandamento G. Para a classificação dos cromossomos levam-se em conta seus tamanhos, posição do centrômero e o padrão das bandas. O conjunto de cromossomos arranjados aos pares é o *cariótipo* da célula. O termo cariótipo é utilizado também para designar a constituição cromossômica de um indivíduo. Por exemplo, o cariótipo de um homem normal é 46, XY e o de uma mulher, 46, XX. Existem normas que são seguidas internacionalmente para se descreverem os cariótipos normais e alterados (ISCN, *An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*, 1995).

Na análise dos cromossomos deve-se cuidar para que o nível de distensão dos cromossomos seja o adequado para se obterem pelo menos 550 bandas no lote haplóide. Cromossomos mais compactados impedem o diagnóstico de muitas alterações estruturais identificáveis pela análise do padrão de bandas G. O poder de resolução da técnica, entretanto, não permite a detecção de alterações que comprometam menos de 5 milhões de pares de bases do DNA e alterações maiores podem passar despercebidas, caso não produzam mudanças no padrão das bandas.

Hoje é possível a detecção de alterações menores, utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*) na análise cromossômica. Por exemplo, na pesquisa de uma determinada deleção cromossômica, usa-se um segmento de DNA, a sonda, que contém a seqüência de bases do segmento que se supõe deletado. Cópias da sonda são colocadas em contato com as preparações cromossômicas, em condições apropriadas, de modo a que ocorra sua ligação (hibridação) com o segmento exatamente correspondente (homólogo). As sondas são previamente marcadas com um fluorocromo. Pode-se, assim, verificar se o segmento está ou não presente no cromossomo, na análise ao microscópio de fluorescência (Figura 26).

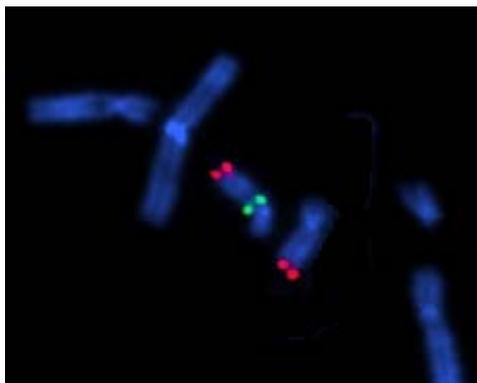
Existem sondas disponíveis comercialmente que permitem detectar microdeleções cromossômicas já descritas em associação a quadros clínicos específicos (Figura 27). Outras são homólogas às porções terminais dos cromossomos, sendo utilizadas para detectar diminutas translocações e deleções situadas nas extremidades dos cromossomos. As regiões dos centrômeros de cada cromossomo também são identificáveis e, assim, é possível contar o número de cromossomos de um tipo num núcleo interfásico, portanto na célula que não está em divisão (Figura 28). Conjuntos de sondas correspondentes a toda a extensão de um cromossomo – bibliotecas cromossômicas - podem ser hibridadas simultaneamente, o que permite, por exemplo, identificar segmentos cromossômicos adicionais num cariótipo, cujo padrão de bandas não seja característico.

As técnicas de hibridação *in situ* tornam-se progressivamente mais sofisticadas. O uso de fluorocromos de cores diferentes para marcar as sondas permite analisar vários cromossomos ao mesmo tempo e até mesmo todos os cromossomos podem agora ser analisados simultaneamente, associando-se as combinações de fluorocromos diversos a sistemas de filtros especiais e recursos computacionais (cariotipagem espectral e M-FISH). Uma outra técnica, CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) evidencia perdas e ganhos de segmentos cromossômicos hibridando, com metáfases normais, o DNA obtido da amostra que se quer testar (marcado para fluorescer em vermelho) juntamente com o DNA de uma amostra de tecido normal (marcado para fluorescer em verde). A análise da fluorescência dos cromossomos é feita por computador: um segmento com

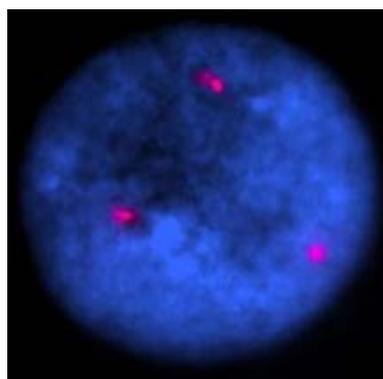


**Figura 26** – Na hibridação *in situ* fluorescente (FISH), a sonda marcada com um fluorocromo liga-se ao segmento homólogo no cromossomo metafásico, que assim é evidenciado. No processo, o DNA da sonda e dos cromossomos é desnaturado (separação das cadeias da hélice dupla) e posto em contato, oferecendo-se as condições para que volte à condição de cadeia dupla (renaturação). Quando a cadeia dupla é refeita entre o DNA da sonda e o do cromossomo (hibridação), o segmento do cromossomo pode ser visualizado fluorescente ao microscópio de luz UV.

**Figura 27** – Identificação por FISH de uma microdeleção de um cromossomo do par 17 num paciente com suspeita diagnóstica de neurofibromatose tipo 1: a sonda, correspondente ao segmento deletado, marcou um único cromossomo 17 (fluorescência verde). Nos dois cromossomos 17 também observa-se os sinais de uma outra sonda hibridada ao mesmo tempo, que serviu de controle para a sensibilidade do teste (fluorescência vermelha).



**Figura 28**– Trissomia do cromossomo 18 evidenciada num núcleo interfásico pela hibridação de uma sonda do centrômero desse cromossomo



excesso de verde está deletado na amostra teste e aquele com excesso de vermelho está duplicado nela. O estudo de tumores, que costumam apresentar alterações cromosômicas extremamente complexas, é especialmente beneficiado por essas técnicas.

### As alterações cromossômicas

Os cromossomos podem ter o número ou a estrutura alterados. As alterações do número dos cromossomos decorrem de erros na separação dos cromossomos na divisão celular (não-disjunção cromossômica). Esses erros podem acontecer na formação dos gametas (numa meiose) ou após a união dos gametas que formam o zigoto (numa mitose). As alterações estruturais resultam de quebras nos cromossomos, seguidas de fusão de extremidades que não estavam contíguas. Assim, os segmentos podem ser trocados de posição, perdidos ou duplicados. Essas alterações também podem se originar durante a formação dos gametas ou depois da formação do zigoto.

Em geral as anormalidades cromossômicas não são herdadas e surgem em cada geração como mutações novas. Isso acontece porque na maioria dos casos há perda ou ganho de cromossomos ou de segmentos cromossômicos que levam seus portadores à morte pré- ou pós-natal e aqueles que sobrevivem geralmente não os transmitem para a prole, porque são estéreis ou apresentam quadro clínico muito grave. Nas pessoas portadoras de alterações estruturais, entretanto, essa alteração está frequentemente equilibrada, ou seja, houve mudança de posição de segmentos cromossômicos, sem que ocorressem perdas ou ganhos que produzissem efeitos clínicos. Esses indivíduos podem passar essas alterações para a geração seguinte, na forma equilibrada ou não, mas entre eles há uma parcela que é estéril, por efeito do rearranjo cromossômico na gametogênese.

A Tabela 4 mostra as freqüências dos diversos tipos de alterações cromossômicas entre recém-nascidos.

**Tabela 4 – Freqüências dos diferentes tipos de alterações cromossômicas por mil nascimentos\***

| Tipos de alteração    | Freqüência/1000 |
|-----------------------|-----------------|
| Numéricas             | 3,4             |
| • Autossômicas        | 1,4             |
| • Cromossomos sexuais | 2               |
| Estruturais           | 2,6             |
| • Não equilibradas    | 0,6             |
| • Equilibradas        | 2               |
| Total                 | 6               |

\*Freqüências estimadas a partir dos estudos de séries de recém-nascidos consecutivos em diferentes países.

### As alterações cromossômicas numéricas

Os erros de divisão celular podem resultar em indivíduos com três ou quatro vezes o número haplóide ( $n = 23$ ) de cromossomos: os triploides ( $3n = 69$  cromossomos) e os tetraploides ( $4n = 92$  cromossomos), respectivamente. Ambas as condições são muito raras e letais, provocando quase sempre abortamento ou morte logo após o nascimento. A triploidia é, na maioria das vezes, resultado de dispermia, ou seja, da participação de dois espermatozoides na fertilização de um óvulo. Pode acontecer também a produção de um gameta diplóide, por uma falha na divisão meiótica ou ainda pela fusão de um óvulo com um corpúsculo polar. A tetraploidia parece resultar principalmente de um erro mitótico, depois da formação do zigoto, levando à duplicação do número total de cromossomos.

Com maior freqüência os erros de separação dos cromossomos resultam em alterações em um par, que perde ou ganha um cromossomo, produzindo-se, respectivamente, monossomias ou trissomias (as aneuploidias). Erros mais complexos, que atingem mais de um par ou com ganhos de mais de um cromossomo podem ocorrer, mas são bem mais raros. Essas alterações, mesmo quando afetam um único par cromossômico, são encontradas principalmente em abortos. Entre recém-nascidos, as monossomias autossômicas não aparecem e a única trissomia de autossomos com freqüência significativa é a do cromossomo 21, que causa a síndrome de Down, com uma incidência de 1/800 a 1/1.000. As outras duas trissomias compatíveis com a sobrevivência até o nascimento são as dos cromossomos 13 e 18, observadas em 1/10.000 e 1/6.000 nascidos vivos, respectivamente. A maioria dos afetados, entretanto, morrem nas primeiras semanas de vida. Algumas outras trissomias

autossômicas, como a do cromossomo 8, podem ser encontradas em nascidos vivos, se bem que muito raramente e, nesses casos, foram detectadas células normais ao lado das células trissômicas, caracterizando um mosaicismo cromossômico.

As aneuploidias dos cromossomos sexuais são mais freqüentes. Estima-se que 1/400 meninos e 1/650 meninas nasçam com essas alterações. Mesmo a monossomia X (45,X) é encontrada entre recém-nascidas (1/5.000), apesar de constituir a alteração cromossômica individualmente mais freqüente nos abortos. A explicação para a menor letalidade das alterações do número de cromossomos sexuais está no fato de que um dos cromossomos X nas células somáticas da mulher está inativo, num mecanismo de compensação de dose, ou seja, para compensar a presença de dois cromossomos X nas mulheres e um único no homem. O número de genes no cromossomo X é muito maior do que no cromossomo Y, onde se encontram principalmente genes que atuam no desenvolvimento e no funcionamento dos testículos, havendo raros segmentos homólogos ao cromossomo X. O silenciamento de um dos cromossomos X nas mulheres não atinge, entretanto todos os genes, havendo aqueles que funcionam em dose dupla. Os defeitos produzidos pela alteração do número de cromossomos X parecem, assim, decorrer do funcionamento alterado desses genes.

Apesar de as aneuploidias poderem decorrer de erros na separação de cromossomos, tanto meióticos (Figura 29) como mitóticos (Figura 30), elas resultam principalmente da não-disjunção cromossômica na primeira divisão meiótica materna. Estudos da origem do cromossomo extra presente em crianças com síndrome de Down, utilizando polimorfismos do DNA, mostram que em 90% dos casos a não-disjunção foi materna, 75% tendo ocorrido na primeira divisão meiótica. Quando o cromossomo extra é contribuído pelo pai, a não-disjunção tem chances semelhantes de ter acontecido em qualquer das duas divisões meióticas. Em cerca de 3% dos casos, a não-disjunção é pós-zigótica, ocorrendo, portanto, numa mitose.

Antes mesmo de se saber que a trissomia 21 era a causa da síndrome de Down, já se detectara a influência da idade materna em sua incidência. Para mulheres com menos de 35 anos de idade, o risco de nascer uma criança afetada pela síndrome é de aproximadamente 1/1.000; esse risco vai progressivamente aumentando, especialmente após os 35 anos, quando é de 1/400, atingindo 1/100 aos 40 anos e 1/25, após a idade de 45 anos. Esse risco se aplica também a outras trissomias. A idade materna a partir dos 35 anos constitui-se, assim, na indicação mais freqüente para o diagnóstico pré-natal de doenças genéticas.

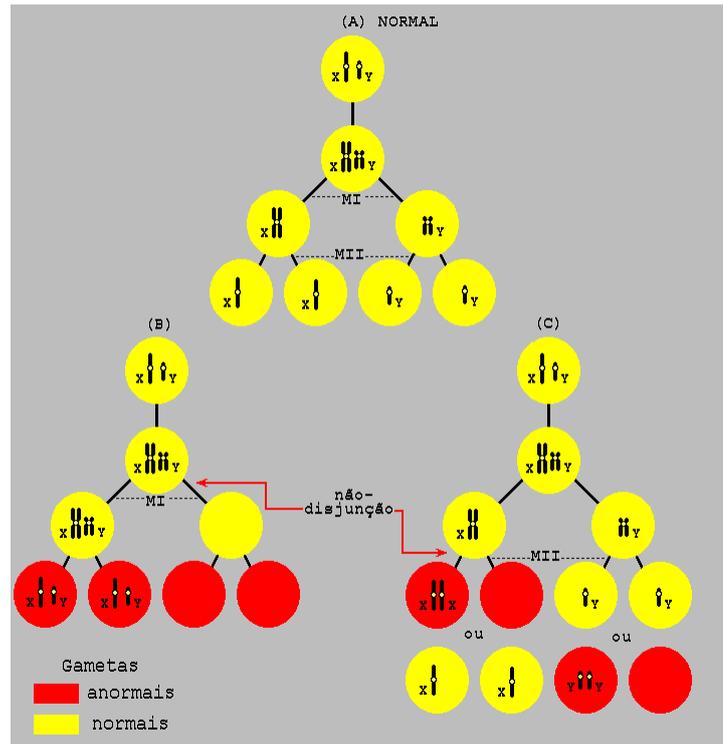
O mecanismo pelo qual a idade materna influencia a ocorrência de não-disjunção não está esclarecido. Diferentemente do que ocorre na gametogênese masculina, em que a meiose é um processo contínuo a partir da maturidade sexual, na mulher a meiose se inicia por volta do terceiro mês de vida intra-uterina. Por ocasião do nascimento, os ovócitos encontram-se no final da prófase da primeira divisão meiótica, numa fase estacionária – o dictióteno, só retomando a divisão, um a cada ciclo menstrual, a partir da puberdade. Esse “envelhecimento” do óvulo no dictióteno seria o responsável pelo aumento na incidência de não-disjunção cromossômica.

### **As alterações da estrutura cromossômica**

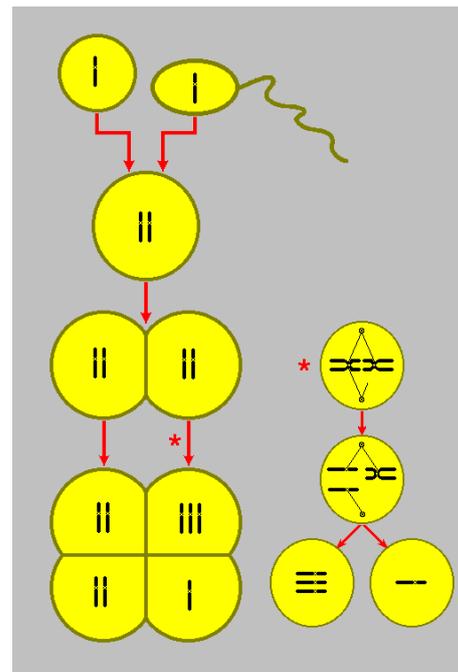
Os cromossomos podem quebrar-se e o mecanismo de reparo celular ao atuar para cicatrizá-los pode fazê-lo incorretamente, resultando em mudanças de posição, perdas e duplicações de segmentos cromossômicos. Um outro mecanismo que pode originar rearranjos cromossômicos é a recombinação “ilícita” entre segmentos do genoma que têm seqüências muito semelhantes, mas não estão situadas exatamente na mesma posição em cromossomos homólogos. Difere, assim, da recombinação que leva à troca de segmentos exatamente correspondentes que ocorre normalmente na meiose e que produz diferentes combinações de genes paternos e maternos em um par de cromossomos.

Um rearranjo cromossômico pode não alterar a informação genética, estando equilibrado sem produzir efeitos clínicos. Quando há perda ou ganho de segmentos, o rearranjo está não-equilibrado e o portador apresenta um quadro clínico caracterizado geralmente por malformações congênitas e retardo mental de graus variáveis. É interessante que rearranjos cromossômicos que se apresentam equilibrados na análise do padrão de bandas G podem estar associados a sinais clínicos. O fato de esses rearranjos serem mais freqüentes entre pessoas afetadas do que na população geral indica que não se trata sempre de simples coincidência. Na verdade, já se demonstrou, em análises mais refinadas por

**Figura 29** – Comportamento dos cromossomos na meiose: a formação de células haplóides – os gametas - a partir de uma célula germinativa diplóide (A). Formação de gametas aneuplóides, devido a não disjunção dos cromossomos X e Y na primeira (B) e na segunda divisão da meiose masculina (C).

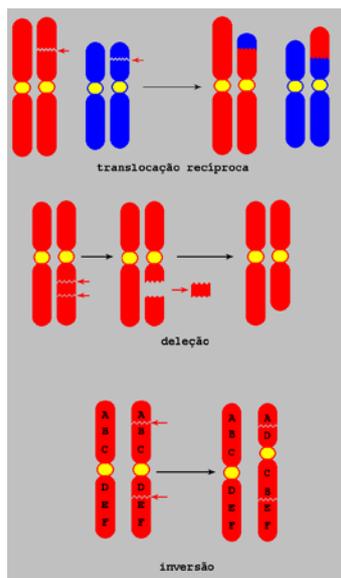


**Figura 30** – Não-disjunção cromossômica pós-zigótica, numa divisão mitótica no início do desenvolvimento, originando um indivíduo com três linhagens celulares: 45,X/47,XXX/46,XX (mosaicismo cromossômico).



Um rearranjo cromossômico pode não alterar a informação genética, estando equilibrado sem produzir efeitos clínicos. Quando há perda ou ganho de segmentos, o rearranjo está não-equilibrado e o portador apresenta um quadro clínico caracterizado geralmente por malformações congênitas e retardo mental de graus variáveis. É interessante que rearranjos cromossômicos que se apresentam equilibrados na análise do padrão de bandas G podem estar associados a sinais clínicos. O fato de esses rearranjos serem mais freqüentes entre pessoas afetadas do que na população geral indica que não se trata sempre de simples coincidência. Na verdade, já se demonstrou, em análises mais refinadas por hibridação *in situ* e do DNA, que as quebras em rearranjos aparentemente equilibrados podem danificar genes, levando a um fenótipo alterado. Esse tipo de alteração está abaixo do poder de resolução da análise cromossômica por bandamento.

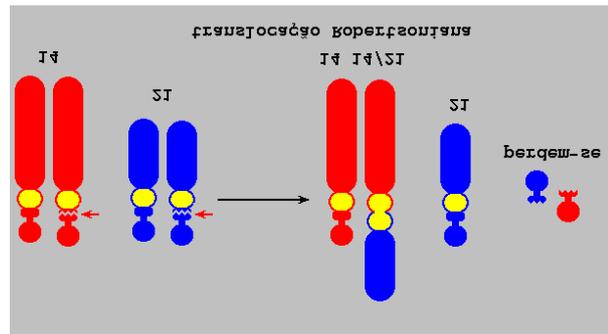
A Figura 31 mostra alguns tipos de alterações estruturais dos cromossomos humanos.



**Figura 31** – Alterações cromossômicas estruturais

As translocações são rearranjos que consistem em trocas de segmentos entre cromossomos. Entre as crianças com síndrome de Down, por exemplo, uma fração de aproximadamente 4% tem uma trissomia 21 por translocação: possuem dois cromossomos 21 livres e um terceiro translocado para um outro cromossomo (Figura 32). Essas translocações geralmente ocorrem na formação de um dos gametas que originou a criança e não tendem a repetir na irmandade do afetado. Entretanto, um dos genitores pode ser portador da translocação em estado equilibrado e, se este for o caso, há risco aumentado de repetição da síndrome de Down na família. A Figura 32 mostra o que pode ocorrer na meiose de um portador de translocação equilibrada entre os cromossomos 14 e 21: na meiose ocorre normalmente o emparelhamento dos cromossomos homólogos, o que assegura que cada gameta formado receba um representante de cada par. No portador da translocação equilibrada os cromossomos 21 e 14 se emparelham com os homólogos que formam o cromossomo translocado. Quando esses cromossomos vão para os gametas, podem fazê-lo em seis diferentes combinações. Dois tipos de gametas podem originar crianças normais, com cromossomos normais ou com a translocação equilibrada. Os demais gametas vão formar zigotos com alterações cromossômicas, monossomias e trissomias do cromossomo 14 ou do 21. Dessas alterações, a única compatível com o desenvolvimento até o nascimento é a trissomia do 21. Assim, teoricamente, o risco de criança com síndrome de Down na prole do portador é de 1/3. O risco empírico, entretanto, é bem diferente: quando a mãe é a portadora da translocação, o risco é de cerca de 15% e é de menos de 5%, quando o pai é portador. Esse risco menor do que o esperado é em parte explicado pelo abortamento espontâneo de fetos com trissomia 21. A diferença entre os riscos para homens e mulheres portadores pode decorrer de seleção contra os espermatozoides com alterações cromossômicas ou de peculiaridades meióticas que possam estar favorecendo o tipo de segregação dos cromossomos que origina gametas normais.

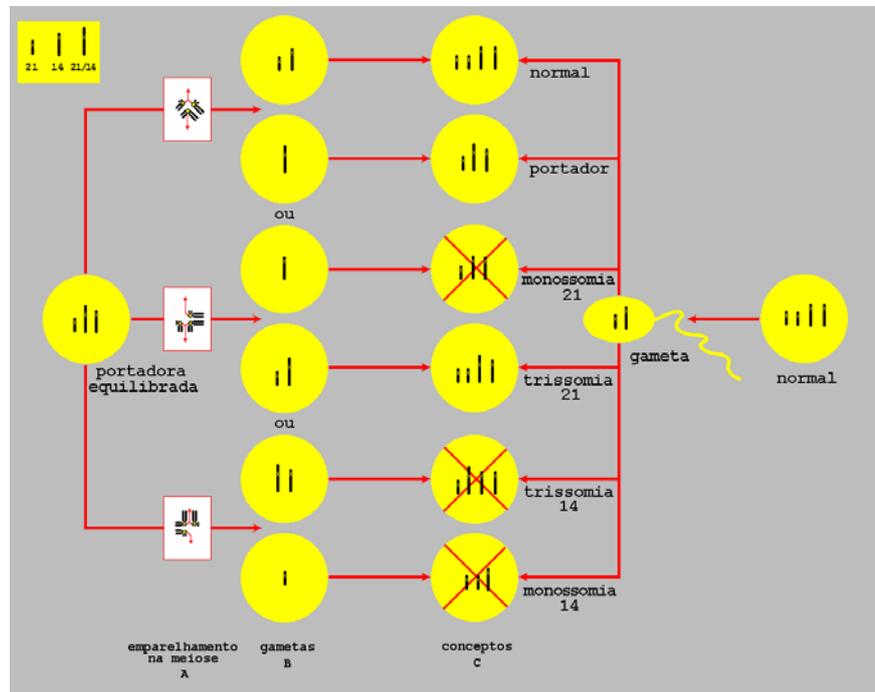
**Figura 32** – Os dois cromossomos 21 livres e um terceiro translocado para um cromossomo 14, em uma criança com síndrome de Down. O esquema mostra como o cromossomo translocado se formou. Houve no processo a perda de pequenos segmentos dos dois cromossomos, compreendendo basicamente genes que produzem RNA ribossômico. Como esses genes estão repetidos muitas vezes nos outros cromossomos acrocêntricos, essa perda não traz efeitos clínicos.



O fato de a síndrome de Down poder ser causada por uma translocação herdada torna a realização do exame cromossômico dos afetados ou de seus pais necessária, mesmo quando o diagnóstico pode ser firmado com base nos sinais clínicos.

O que apresentamos sobre as translocações na síndrome de Down, aplica-se aos rearranjos estruturais em geral. Quando uma alteração estrutural é detectada numa criança, os genitores devem ter seus cromossomos analisados. Se um dos genitores é portador da alteração cromossômica equilibrada, outras pessoas de sua família também podem ser portadoras, com risco aumentado de ter criança com alteração cromossômica. Esses possíveis portadores devem ser identificados e alertados sobre essa possibilidade, estando indicado que se submetam ao exame cromossômico. Uma das indicações indiscutíveis de diagnóstico pré-natal é justamente quando um dos membros do casal tem uma alteração cromossômica equilibrada (Figura 33).

**Figura 33** – Um portador de translocação equilibrada entre os cromossomos 14 e 21 (A) tem fenótipo normal, possuindo toda a informação genética desses cromossomos necessárias para o desenvolvimento normal. Pode formar, entretanto, gametas com alterações cromossômicas: na meiose, o emparelhamento do cromossomo translocado com os cromossomos 14 e 21 normais (B) leva à formação de seis diferentes tipos de gametas (C).



### Quando Solicitar Exame Cromossômico

Foi citado anteriormente a necessidade de certos exames de laboratório para esclarecer ou confirmar o diagnóstico. Muitos deles são exames normalmente executados por laboratórios clínicos, mas alguns, por motivos históricos ou por ainda serem muito usados em pesquisa, são freqüentemente realizados nos laboratórios de genética humana ou nos serviços de Aconselhamento.

Os mais importantes são: o estudo direto dos cromossomos humanos ao microscópio para determinação do cariótipo e o estudo do DNA. Como se trata de exames caros e trabalhosos, o clínico deve solicitá-los apenas quando ele for plenamente indicado. Não há sentido, por exemplo, em solicitar estudo de cariótipo em doenças sabidamente mendelianas, como as mucopolissacaridoses, ou as formas bem caracterizadas de nanismo; ou em defeitos de causa multifatorial, como o pé torto ou o lábio leporino; ou em entidades que podem pertencer a uma ou outra dessas categorias, como a hidrocefalia ou a microcefalia.

Suspeita-se de anomalia cromossômica e pede-se, com plena indicação o estudo citogênico de laboratório em casos de:

1. Malformações congênitas múltiplas, que correspondem a síndromes já reconhecidas devido a anomalias cromossômicas (mongolismo, síndrome do miado do gato, etc.).

2. Malformações congênitas múltiplas, que não constituem síndrome conhecida de aberração cromossômica, desde que também não se encaixem em síndrome gênica, multifatorial ou ambiental conhecida.

3. Duas ou mais malformações associadas ao atraso de desenvolvimento e retardo mental.

4. Sinais menos típicos do que os anteriores, que sejam, entretanto, reforçados por um ou mais dos seguintes sinais ou circunstâncias: antecedentes pré ou perinatais – mãe de idade elevada, poli-hidrâmnios, artéria umbilical única, placenta pequena, apresentação pélvica ou podálica, estatura e peso baixos ao nascer em relação à idade gestacional; sinais clínicos – anomalias físicas menores, fisionomia do paciente totalmente diferente da de seus parentes.

5. Alguns dos sinais abaixo indicativos de aberrações dos cromossomos sexuais (em vários desses casos o exame de cromatina sexual é suficiente para, em associação com sinais clínicos, firmar o diagnóstico): testículos pequenos; amenorréia primária; hipogonadismo; fertilidade diminuída ou nula; genitália externa ambígua.

6. Pessoa normal que teve criança portadora de aberração cromossômica estrutural (translocação) para investigar a presença da translocação equilibrada.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇAS GENÉTICAS

*Regina Célia Mingroni Netto*

São várias as estratégias para se estudar aspectos moleculares das doenças hereditárias, pois algumas ainda não tiveram os genes responsáveis identificados. Em outras, apesar de o gene causador ter sido identificado, ocorrem tantos tipos de mutações diversas que se torna difícil desenvolver um único teste para diagnóstico. Contudo, para a maioria dos casos, é possível fazer aconselhamento genético seguro e também diagnóstico pré-natal, desde que se conheça pelo menos a localização aproximada do gene no cromossomo.

Os testes diagnósticos baseados em análise de DNA são realizados em crianças e adultos com relativa facilidade, a partir de procedimentos de extração de DNA de sangue periférico. Um volume de 5ml de sangue fornece DNA mais do que suficiente para vários testes, sendo a sobra do DNA estocada para estudos futuros. Se necessário, o DNA pode ser extraído a partir de amostras muito menores de sangue, como, por exemplo, 500µl, caso o objetivo seja estudar o DNA através da PCR.

A objetivo básico das técnicas de diagnóstico pré-natal é obter amostras de tecido fetal para análises bioquímicas, de DNA ou de cromossomos. A coleta de amostras de vilosidade coriônica, de líquido amniótico ou mesmo de sangue fetal através da cordocentese permite obter DNA em quantidade suficiente para as análises que descreveremos a seguir. A vilosidade coriônica é a parte da futura placenta de origem fetal que, localizada fora do embrião, tem constituição genética igual à do feto. Na amniocentese, são coletadas no líquido amniótico as células chamadas amniócitos que podem ser submetidas a estudos. A coleta é feita transabdominalmente, geralmente a partir da 16ª semana de gestação, através de uma seringa especial guiada por ultrassom. Porém, pode ser necessário fazer uma cultura de células para se obter material suficiente para análise, o que torna este estudo mais demorado. A cordocentese consiste na coleta de sangue fetal através de uma agulha introduzida nos vasos do cordão umbilical. Entre essas técnicas de coleta, a amostra de vilosidade coriônica é a menos invasiva e a mais precoce (realizada entre a 8ª e a 12ª semana de gestação). Portanto, ela tem sido a preferida na obtenção de material para estudos de DNA.

A seguir, vamos detalhar alguns exemplos de doenças hereditárias e as ferramentas moleculares que podem ser utilizadas no seu diagnóstico.

### **MUTAÇÕES QUE AFETAM SÍTIOS DE RESTRIÇÃO: DETECÇÃO DIRETA POR SOUTHERN BLOTTING**

Uma maneira das maneiras mais simples de se estudar uma doença hereditária é através da detecção de uma mutação que modifica um sítio de restrição. Quando o DNA dos afetados é digerido com enzimas de restrição, separado em gel de agarose, submetido a *Southern-blotting* e hibridação com uma sonda específica para o gene, fragmentos de DNA de tamanho alterado surgem como resultado da hibridação, diferentes daqueles esperados para as pessoas normais. Um exemplo desse tipo de análise é o representado pela mutação que causa a anemia falciforme na espécie humana (Fig. 34).

A anemia falciforme resulta de uma mutação de ponto que substitui um ácido glutâmico (GAG) por uma valina (GTG) na posição 6 da cadeia beta da hemoglobina. Felizmente, para efeito de diagnóstico, a mutação que troca A por T elimina sítios de restrição de várias enzimas conhecidas. Assim, essa mutação pode ser facilmente detectada após digestão com enzima de restrição seguida de *Southern-blotting* e hibridação com sondas do gene. Por exemplo, a enzima de restrição *Mst* II gera um fragmento de 1,1 kb no DNA de pessoas normais. Este sítio de *Mst* II é destruído na presença da mutação e nas pessoas portadoras surge então um fragmento de 1,3 kb. A figura 1 mostra os resultados desse tipo de análise numa família em que ocorre a anemia falciforme. Este tipo de exame só é possível porque é sempre o mesmo tipo de mutação que leva à anemia falciforme, em todas as famílias estudadas. Porém, doenças em que todos os casos são devidos a um único tipo de mutação são, infelizmente, uma exceção. Como veremos, outras doenças requerem outras estratégias de análise mais elaboradas.

A análise por meio do *Southern-blotting* seguido de hibridação pode ser também usada no diagnóstico de muitas outras doenças hereditárias, desde que a mutação altere o tamanho de um fragmento de restrição de maneira detectável ou cause a deleção de um certo fragmento de restrição. Por exemplo, cerca de 60% dos casos de Distrofia Muscular do tipo Duchenne são devidos a deleções diversas no gene da distrofina, localizado no cromossomo X. Antes do

advento das técnicas de PCR, era comum hibridar o DNA dos afetados com sondas de cDNA do gene da distrofina, procurando-se detectar deleções. Uma sonda de cDNA hibrida com vários exons do gene simultaneamente, e a ausência de um sinal de hibridação pode significar uma deleção (Fig. 35).

Um tipo muito especial de mutação responsável por doenças foi identificado a partir de 1991. Algumas doenças como a síndrome do cromossomo X frágil, a distrofia miotônica de Steinert e a doença de Huntington são causadas por um mecanismo mutacional peculiar: a expansão anormal de trinucleotídeos repetidos polimórficos. Em outras palavras, uma seqüência de trinucleotídeos (por exemplo, CGG na síndrome do X frágil) pode variar normalmente na população até um certo número de cópias. Acima de um certo número de cópias, podem surgir os sinais clínicos da doença. O mais curioso sobre essas síndromes é que o número de cópias dos trinucleotídeos pode ir aumentando a cada geração, o que acarreta maior gravidade do quadro clínico ou maior risco de prole afetada para os portadores das expansões maiores. No caso da distrofia miotônica e da síndrome do X frágil, em que as expansões acarretam um aumento apreciável no tamanho de um dado fragmento de restrição que abrange as repetições, o diagnóstico das expansões é feito por *Southern-blotting* seguido de hibridação com sondas radioativas, como apresentado na figura 36.

### **USO DE MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS DE LIGAÇÃO: GENE DA DOENÇA AINDA NÃO IDENTIFICADO**

Em muitas das doenças hereditárias atualmente em investigação, ainda não foi possível identificar o gene responsável. Em outras, o gene já foi identificado, mas existe uma enorme variedade de tipos de mutações diferentes que afetam o mesmo gene, tornando a análise da mutação inviável através de um único método de diagnóstico. Nesses casos, somente métodos sofisticados de detecção de mutação ou o seqüenciamento dos éxons do gene da doença nos afetados poderiam ser usados para identificar cada tipo de mutação. Nesses casos e nos casos das doenças com genes ainda não identificados, é possível usar os RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*) como ferramenta indireta de aconselhamento genético.

Como já dissemos, os RFLPs representam diferenças em sítios de restrição que ocorrem como polimorfismos na população em geral. Essas pequenas variações na seqüência de bases do DNA responsáveis pelos RFLPs não acarretam efeitos fenotípicos e não são responsáveis pela doença em si. Contudo, se localizados muito próximos ao gene da doença em estudo, servem como indicadores indiretos da segregação da mutação que causa a doença. Portanto, para usar um RFLP em aconselhamento genético, é necessário saber previamente que o marcador escolhido localiza-se próximo ao gene da doença, existindo uma baixa probabilidade de ocorrer permutação entre eles. Essa informação é obtida através de estudos de ligação prévios entre o marcador e o gene da doença, realizados a partir de várias famílias. Na figura 4, podemos observar como um RFLP permite concluir quais são os prováveis indivíduos portadores de um gene mutado na genealogia, em que segrega uma doença de herança ligada ao cromossomo X.

Convém lembrar, porém, que este método não representa um método de detecção direta da mutação e que tem suas limitações. Primeiramente, devem ser estudados vários indivíduos da mesma família para que se obtenham resultados conclusivos. Ainda, os indivíduos portadores certos da mutação devem ser informativos, ou seja, heterozigotos em relação aos marcadores selecionados. Se isto não ocorrer, deve-se procurar um outro marcador molecular para o qual a família seja informativa. Leva-se em conta também no aconselhamento genético a probabilidade, ainda que pequena, de que ocorra um evento de recombinação entre os marcadores e o gene da doença, levando a uma interpretação errada dos resultados. Mesmo com estas limitações, esta metodologia é muito usada e resultados com confiabilidade de 95% ou mais podem ser oferecidos às famílias que buscam aconselhamento genético.

**Figura 34.** Detecção direta da mutação da cadeia  $\beta$  da hemoglobina através de digestão com enzima de restrição e *Southern blotting*. (a) A troca de bases (A por T) destrói o sítio de reconhecimento de várias enzimas de restrição, incluindo *Mst* II. (b) Esta enzima corta o gene da globina normal, originando um fragmento de 1,1kb e outro de 0,2 kb, detectáveis através da hibridação com uma sonda da região 5' do gene da  $\beta$ -globina. c) Diagnóstico pré-natal da anemia falciforme utilizando o polimorfismo de *Mst* II. A mãe (M) e o pai (F) são portadores do alelo que causa a siclemia pois têm dois fragmentos, 1,1kb e 1,3kb. O filho normal (C) é homocigoto em relação ao alelo normal de 1,1kb. O feto herdou um alelo mutado de cada um dos pais e será afetado pela siclemia.

**Figura 35.** Identificação de deleções na distrofia muscular Duchenne utilizando sondas de cDNA. O DNA de meninos com DMD (pistas de 1 a 4A) e seus irmãos normais (pistas de 1 a 4B) foi digerido com a enzima *Taq* I e hibridado com uma sonda de cDNA que detecta sete exons no DNA dos indivíduos normais (i a vii). Os meninos afetados têm diversas deleções e o paciente 4A apresenta um fragmento de tamanho anormal, além de outros exons deletados. A primeira pista indica o marcador de peso molecular.

**Figura 36.** Detecção da mutação do loco FMR-1 causadora da síndrome do cromossomo X frágil. (N) é um homem normal, sem nenhuma expansão de trinucleotídeos no loco FMR-1; (TN) é um homem portador de uma pequena expansão naquele loco, a qual não tem efeitos fenotípicos; nesse caso, diz-se que o indivíduo é portador da pré-mutação. (A) é um homem afetado pela síndrome, apresentando retardo mental; ele é portador de uma enorme expansão no loco FMR-1, ou seja, da mutação completa.

**Figura 37.** Herança codominante de um RFLP mapeado no cromossomo X humano. Os alelos 1 e 2 diferem pela presença de um sítio de restrição para a enzima *Eco* RI (E). Note que, nesta família, o alelo 2 segrega com a mutação que causa doença, enquanto que o alelo 1 aparece no indivíduo do sexo masculino que não herdou a doença da mãe. Note também que a presença do alelo 2 nas irmãs dos afetados permitiu a conclusão de que estas mulheres são heterozigotas quanto ao gene da doença.

Da mesma forma que os RFLPs, existem outros tipos de seqüências polimórficas dispersas no genoma humano, igualmente úteis no mapeamento de genes que causam doenças e no aconselhamento genético. São os chamados VNTRs (*variable number of tandem repeats*) ou minissatélites. Esses polimorfismos consistem em repetições presentes em número

variável de cópias nos indivíduos da população. Os módulos constituintes das repetições são seqüências repetitivas de 9 até cerca de 60 pares de bases. São tantos os tipos de segmentos repetidos (o que os pesquisadores da área chamam de "alelos") na população que praticamente todas as pessoas são heterozigotas quanto ao número de cópias (no caso dos RFLPs, geralmente existem somente dois ou poucos "alelos" diferentes na população). A diferença entre os "alelos" pode ser detectada se o DNA dos indivíduos for digerido por uma enzima de restrição cujo sítio de corte flanqueie a VNTR, seguido de eletroforese em gel de agarose e da hibridação com sonda específica. A grande vantagem das VNTRs sobre os RFLPs reside no maior grau de polimorfismo presente na população, o que significa maior chance de que uma dada família seja informativa para um marcador.

Quando uma sonda de DNA é complementar apresenta a diversos minissatélites, a hibridação resulta em um padrão complexo de bandas que é denominado de *fingerprinting* de DNA, ou impressão digital genética. Dado o alto grau de polimorfismo das bandas na população, é praticamente impossível que dois indivíduos não aparentados tenham os mesmos comprimentos de fragmentos nas várias VNTRs estudadas simultaneamente, daí o nome de impressão digital genética (Fig. 38).

**Figura 38.** VNTRs (*variable number of tandem repeats*): (a) o loco da VNTR é um intron do gene da mioglobina composto por quatro repetições de uma seqüência de 33pb. (b) A variabilidade em vários loci de VNTR pode gerar diversidade de fragmentos suficiente para identificar indivíduos. No exemplo, entre duas e oito cópias da VNTR estão presentes nos três loci diferentes (I a III), que são detectados simultaneamente pela mesma sonda. Embora indivíduos diferentes possam ter alguns alelos em comum, a chance de que dois indivíduos tenham todos os fragmentos em comum é mínima. Os sítios de corte das enzimas de restrição estão indicados por setas.

A figura 39 mostra o resultado de um *fingerprinting* com bandas idênticas obtido de gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Tanto a impressão digital genética (sondas multilocais) como VNTRs analisadas individualmente (sondas unilocais) são muito usadas para resolver questões de paternidade duvidosa e identificação de indivíduos para finalidades forenses.

**Figura 39.** *Fingerprinting* de DNA em pares de gêmeos, após hibridação com uma sonda que detecta VNTRs em vários loci. Cada par de pistas contém o DNA de pares de gêmeos. Os gêmeos do primeiro par e do terceiro par têm padrões idênticos de bandas, indicando que são gêmeos monozigóticos. O par de gêmeos do meio tem padrões distintos, indicando que são gêmeos dizigóticos. A figura também ilustra o grau de variação detectada entre indivíduos que não são gêmeos idênticos.

Existe também um terceiro tipo de polimorfismo de DNA muito usado em estudos de ligação e identificação de indivíduos: são os chamados microsatélites. Eles são constituídos por seqüências repetidas de dinucleotídeos, trinucleotídeos ou tetranucleotídeos, geralmente. Por exemplo, repetições do dinucleotídeo "AC " de número variável são constituintes comuns desse tipo de polimorfismo. Como os "alelos" diferem entre si por dois, três ou quatro nucleotídeos apenas, a análise não é possível em géis de agarose comuns. Fragmentos pequenos de DNA contendo as repetições polimórficas são amplificados pela PCR na presença de *primers* altamente específicos. Os produtos da amplificação são separados em géis de acrilamida semelhantes aos usados para seqüenciamento do DNA. Por empregar a PCR, este método tem a vantagem de utilizar quantidades muito menores de DNA que um "blotting" comum seguido de hibridação, e os resultados são visualizados muito mais rapidamente. Por isso, os microsatélites são também utilizados na identificação de indivíduos ou em questões de paternidade. Mais modernamente, eles também são estudados nos analisadores genéticos automáticos, ou seja, nos mesmos equipamentos que analisam o seqüenciamento automatizado do DNA.

### **A TÉCNICA DA PCR NO ESTUDO DAS DOENÇAS HEREDITÁRIAS**

A reação da PCR (reação em cadeia da polimerase) tem facilitado muito os estudos de DNA para efeito de diagnóstico. Para que a PCR seja utilizada em algum teste diagnóstico, é fundamental o conhecimento da seqüência de bases do DNA da região em estudo, pelo menos parcialmente. Desse modo, *primers* específicos à região em estudo podem ser construídos.

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

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

A terceira vantagem reside no tempo gasto pelos exames baseados na PCR: algumas horas de amplificação são seguidas por mais algumas horas de eletroforese e os produtos já são analisados. É possível fornecer um resultado em menos de 48 horas, o que é altamente desejável, principalmente em casos de diagnóstico pré-natal. Em contrapartida, um método baseado em *Southern-blotting* requer no mínimo uma semana até o resultado final.

Em último lugar, a especificidade da reação permite que várias seqüências possam ser amplificadas simultaneamente desde que os produtos tenham tamanho diferente e possam ser diferenciados após eletroforese em gel. Um exemplo importante desta análise, chamada de

**Figura 40.** Diagnóstico de distrofia muscular Duchenne pela análise de exons deletados por PCR múltiplo. A barra representa os 2000 kb do gene da distrofina. Foram construídos pares de *primers* para amplificar as nove regiões do gene da distrofina mais freqüentemente deletadas nos afetados representadas (barras negras). Amostras de DNA de cada paciente são amplificadas na presença dos nove pares de *primers* simultaneamente e os produtos da PCR são analisados diretamente em gel de agarose corado com brometo de etídeo. O paciente 1 não tem deleção de nenhum fragmento enquanto que o paciente 4 tem uma grande deleção. Os outros pacientes têm deleções diversas. A pista "branco" é um controle da amplificação realizada sem nenhum DNA, e serve para verificar se os reagentes da PCR não estão contaminados.

multiplex, é a aplicação na análise simultânea de deleções em vários exons do gene que causam a distrofia muscular de Duchenne. Na reação representada na figura 40, nove regiões do gene são analisadas no mesmo teste. A ausência de amplificação significa deleção da região que seria amplificada.

Um outro exemplo interessante da aplicação rotineira da PCR no estudo de doenças é o caso da fibrose cística, a doença autossômica recessiva mais freqüente nas populações de origem européia. Descobriu-se, após a clonagem do gene, que o tipo de mutação mais freqüente em caucasóides é uma deleção de três nucleotídeos (TTC) no éxon 10 do gene, localizado no cromossomo 7. Esta mutação, conhecida como deleção  $\Delta F508$ , pode ser estudada através da PCR pois os afetados apresentam um certo produto de amplificação que fica três pares de bases menor do que o das pessoas normais. A diferença pode ser observada

por eletroforese em gel de poliacrilamida. O resultado obtido em uma família com fibrose cística está mostrado na figura 8.

Assim, do ponto de vista cronológico, é muito comum que uma doença seja primeiramente estudada indiretamente com o uso de RFLPs, micro ou minissatélites, enquanto o gene responsável ainda não foi identificado. Depois da identificação do gene, pode ser comum o emprego de sondas marcadas. Quando o gene já está muito bem caracterizado, as porções críticas já estão seqüenciadas e as principais mutações causadoras da doença são conhecidas, é comum a substituição dos métodos de diagnóstico baseados em Southern-blotting por métodos baseados na PCR, que visam a identificação das mutações específicas.

**Figura 41.** Resultados da reação da PCR, revelando a mutação tipo deleção  $\Delta F508$  que causa a fibrose cística. O afetado (em preto) é homocigoto para a mutação e apresenta duas bandas de 47pb; os indivíduos heterocigotos para a mutação, indicados por um ponto preto, apresentam duas bandas de tamanho distinto, 47 e 50pb.

## O ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Priscila Guimarães Otto, Paulo A Otto, Oswaldo Frota-Pessoa 1998 – *Genética Humana e Clínica*. Editora Roca Ltda. São Paulo, pg 307-312.

Os casos de Aconselhamento Genético, sejam enviados por clínicos, sejam vindos por iniciativa das próprias famílias, podem ser organizados, do ponto de vista prático, nas categorias que comentaremos a seguir:

**A** - Casal normal, com história reprodutiva insatisfatória por qualquer das razões abaixo:

1. Esterilidade (aberração dos cromossomos sexuais?).
2. Abortos numerosos, com ou sem alguns filhos normais ou afetados (translocação equilibrada em um dos cônjuges, talvez detectável apenas pelas técnicas de bandeamento dos cromossomos?).
3. Uma ou mais crianças com anormalidades (distúrbios ambientais durante a gestação, o parto ou a primeira infância? Translocação equilibrada em um dos cônjuges? Gene recessivo patogênico em heterozigose nos dois?).

**B** - Casal normal, sem filhos ou com filhos normais, que temem que sua prole venha a ser afetada por uma das seguintes razões:

4. Os cônjuges são consangüíneos (risco global de 13% para primos em 1º grau, ou mais que isso se houver precedentes na família com afecções autossômicas recessivas).
5. Os cônjuges são relativamente idosos (risco de cerca de 2% após os 40 anos quanto ao nascimento de criança mongolóide, ligeiro aumento no risco de outras anomalias cromossômicas devido à elevação na taxa de não-disjunção na mulher; ligeiro aumento do risco de doenças dominantes, por mutação nova, devido ao acúmulo de mutações na estirpe germinativa do homem).
6. A mulher é Rh-negativa e o homem Rh-positivo (se a mulher não recebeu transfusão de sangue Rh-positivo, o risco só existe para crianças Rh-positivas nascidas após o primeiro produto Rh-positivo; e, mesmo assim, uma assistência médica adequada poderá evitar a eritroblastose fetal).
7. Um dos cônjuges recebeu radiação ionizante ou drogas mutagênicas, por exemplo, para tratamento de câncer, ou fez uso de drogas possivelmente teratogênicas, ou ainda, sofreu certas infecções (sífilis, rubéola, tuberculose), que considera transmissíveis ao feto (exceto em casos de altas doses de radiação ionizante ou drogas mutagênicas, o risco fica pouco aumentado se o agente em questão cessar de atuar antes que se inicie a gravidez).
8. Há precedente, na família de um dos cônjuges ou de ambos, de anomalias que parecem hereditárias.

**C** - Casal normal, com um ou mais filhos afetados (decidir com base em anamnese e dados clínicos e laboratoriais se a afecção é genética, ambiental ou multifatorial para estimar o risco de recorrência). São especialmente importantes as seguintes categorias:

9. Retardo mental (drogas ou infecções durante a gravidez? Trauma de parto? Infecção na primeira infância? Mutação dominante nova? Genes recessivos. Anomalia cromossômica?).
10. Defeito físico congênito, simples ou múltiplo, com ou sem retardo mental (mesmas possibilidades do item 9).
11. Síndrome de herança mendeliana clara (com base em diagnóstico firme, estimar o risco de recorrência que é, em geral, alto; conforme o caso, estender o aconselhamento a outros membros da família, tentando a detecção de heterozigotos, quando indicado).
12. Síndrome multifatorial (recorrer a riscos empíricos; os riscos, em geral, são baixos).
- A) Pessoa afetada, solteira ou já casada, cuja anomalia possa passar à prole. Há a distinguir várias categorias, conforme risco para a prole:
13. Risco nulo ou quase: caso das síndromes sexuais esterilizantes (Turner, Klinefelter, feminização testicular, etc.) ou que exigem confinamento com impedimento reprodutivo (retardo mental e psicoses graves).
14. Risco moderado: caso de defeitos multifatoriais, como lábio leporino; de doenças ligadas ao sexo, como hemofilia, já que os afetados são homens cujas crianças são normais, embora as filhas sejam transmissoras; de doenças recessivas de gravidade média ou grande, desde que o afetado não se case com parente consangüíneo.

15. Risco alto: síndromes mendelianas autossômicas dominantes de gravidade e penetrância médias e altas.
- B) Grupo heterogêneo de casos quanto à motivação para o Aconselhamento Genético:
  16. Casos médico-legais ou privados referentes a paternidade duvidosa, troca de crianças, etc.
  17. Crianças a serem adotadas, para as quais se pretende determinar a probabilidade de virem a apresentar afecções hereditárias ou características raciais específicas.
  18. Pares de gêmeos que se apresentam para determinação de zigosidade (se são monozigóticos ou dizigóticos).
  19. Casos de diagnósticos pré-natal de afecções genéticas nos países em que o aborto provocado é legal quando o exame pré-natal revela que a criança teria alta probabilidade de ir a ser afetada.

## **CIRCUNSTÂNCIAS DO ACONSELHAMENTO**

O clínico aplica-se principalmente ao tratamento de seus pacientes; cada vez mais, entretanto, ele está assumindo a responsabilidade de orientá-los sobre planejamento familiar em casos de doenças hereditárias. A negligência em fazê-lo é indesculpável sempre que a doença é grave e de alto risco de recorrência. Por exemplo, ante um caso de catarata dominante, fenilcetonúria ou distrofia muscular progressiva tipo Duchenne, o dever mais crucial do clínico é fazer o Aconselhamento Genético ou encaminhar os interessados para serviço especializado que o faça.

### **Em Que Casos o Aconselhamento Genético é Indicado?**

É importante, portanto, que mesmo os médicos não especializados em genética desenvolvam e apliquem critérios práticos para decidir em quais de seus casos é indicado o Aconselhamento Genético. Eis alguns desses critérios:

1. Doenças ou defeitos, congênitos ou tardios, que não tenham obviamente causa infecciosa, traumática ou geriátrica, mesmo quando não diagnosticados em termos de síndrome conhecida e embora o afetado constitua caso isolado na família.
2. Casos de afecção repetida na família, que não seja claramente causado por fator não-genético.
3. Casais consangüíneos em qualquer grau, que tenham tido prole com afecção não claramente ambiental ou tenham parentes com afecções autossômicas recessivas; e namorados, noivos ou casados, mesmo com filhos normais, que sejam primos em 1º ou 2º grau ou tenham maior grau de consangüinidade, embora sem precedente de doenças autossômicas recessivas na família.
4. Casos, mesmo isolados, de doenças ou defeitos que sabidamente têm componente hereditário significativo, quer mendeliano, quer multifatorial.

### **Quem Deve Fazer o Aconselhamento?**

Em princípio, o médico da família é a pessoa mais indicada para encarregar-se do Aconselhamento Genético pelo menos em sua fase inicial (descobrir que há indicação para o Aconselhamento) e final (apoiar emocionalmente a família e orientá-la psicologicamente quanto à decisão a tomar perante o relatório técnico).

Em casos típicos e relativamente simples de doenças genéticas, como albinismo universal, Síndrome de Down (com cariótipo analisado), acondroplasia (com diagnóstico diferencial seguro), o clínico bem informado deve encarregar-se inteiramente do aconselhamento; e com a difusão que a genética vem adquirindo no meio médico, seu âmbito de ação tende a aumentar.

Resta, porém, um problema: o clínico deve saber genética suficiente para reconhecer em que casos sua genética é insuficiente para que ele resolva sozinho o caso. Isto é o mais difícil: porém, na prática, evita-se qualquer perigo adotando o princípio que qualquer clínico geral consciente já se acostumou a aplicar em relação aos diferentes setores da medicina: em caso de dúvida, encaminha-se o interessado ao especialista.

## O Especialista

A quem enviar o consulente nos casos mais complicados? Existem no Brasil vários serviços de Genética Médica e Aconselhamento Genético, em geral associados às universidades. Cada clínico geral deve relacionar-se com um deles, do mesmo modo que se relaciona com clínicos especializados em Neurologia, Hematologia e tantos outros setores.

Os especialistas em Aconselhamento são médicos que se especializaram em genética ou biólogos que se dedicaram à genética humana e adquiriram tirocínio em Aconselhamento.

Alguns dentre os últimos dedicaram-se à investigação sobre certas doenças a ponto de se tornarem proficientes no diagnóstico diferencial: mas, como regra, o geneticista que trabalha em aconselhamento solicita do clínico diagnóstico seguro para basear nele suas estimativas de risco.

Em casos em que reste dúvida, ele recorre a assessores clínicos especializados, tal como faz o clínico geral.

Não há dúvida que o ideal é o serviço de aconselhamento situado em um centro universitário, de modo a usufruir da colaboração tanto de geneticistas como das diversas clínicas especiais e também de psicólogos.

Em muitos casos, o próprio clínico prefere que o serviço de Aconselhamento se encarregue de orientar ou firmar o diagnóstico preciso, avalie riscos e oriente diretamente a família. Mais raramente o clínico recorre ao serviço de Aconselhamento, ou a um geneticista, apenas para a estimativa dos riscos, encarregando-se de transmitir o resultado à família e apoiá-la psicologicamente quanto às suas decisões.

Finalmente, há situações em que o clínico solicita este ou aquele exame especializado do âmbito genético, como poderia solicitar um eletroencefalograma ou uma dosagem de hemoglobina.

## ETAPAS DO ACONSELHAMENTO

Uma descrição das principais fases por que passa, em geral, um caso de Aconselhamento Genético servirá para salientar certas características desse serviço e mostrar como nele se combinam componentes muito variados.

### A - Determinação do tipo de herança

1. Diagnóstico seguro da afecção do propósito (primeiro afetado na família a ser examinado), se necessário com confirmação por testes de laboratório e consulta a especialistas clínicos; ou sua mais completa caracterização, caso não se chegue ao diagnóstico formal. Em muitos casos é importante insistir no diagnóstico diferencial, pois muitas doenças parecidas têm herança bem diversa (por exemplo, as mucopolissacaridoses e as distrofias musculares progressivas).
2. Levantamento do heredograma para investigar a possível existência de outros afetados e seu grau de parentesco com o propósito e para determinar possíveis casamentos consangüíneos.
3. Estudo clínico dos outros afetados que existam para determinar se apresentam a mesma doença do propósito e que variações a expressividade da afecção apresenta-se na família.
4. Balanço entre as possíveis causas genéticas e ambientais da afecção, do propósito e de outros afetados mediante anamnese, principalmente sobre antecedentes pré-natais e perinatais.
5. Delineamento do tipo de transmissão do componente causal genético, quando possível, com base nos dados dos itens 2 a 4.
6. Pesquisa bibliográfica orientada pelo nome da nosologia quando se conseguiu diagnóstico formal; ou pelos sinais mais característicos, em caso contrário. Hoje em dia já existem programas de computador que executam essa tarefa; há também diversos serviços de rede de computadores que fornecem detalhes atualizados sobre qualquer doença genética.
7. Comparação dos dados da literatura com as conclusões ou hipóteses do item 5 para firmar-se o tipo de herança ou de causa ambiental no caso em estudo.

8. Exame dos membros da família aparentemente normais, quando for o caso, para detectar transmissores do gene ou de aberrações cromossômicas equilibradas. Isso pode consistir em aplicação de exames de DNA, testes de detecção de heterozigotos em casos de genes recessivos, como na fenilcetonúria e hemofilia, ou de genes co-dominantes como na siclemia; ou na investigação de sinais frustos ou subclínicos para reconhecimento de heterozigotos quanto a gene dominante de penetrância incompleta; ou ainda, em caso de aberrações cromossômicas estruturais, no estudo citogênico para detecção de portadores equilibrados de aberrações estruturais.

**B - Cálculo dos riscos**

9. Estimativa dos riscos de recorrência da afecção em crianças que venham a nascer dos pais do propósito e de outros casais da família. No caso de causa poligênica ou multifatorial, recorrer aos riscos empíricos mais bem colhidos da literatura.
10. Redação do relatório, que deve incluir referência aos dados clínicos e genéticos pertinentes, a análise do problema e a enunciação dos riscos.

**C - Entrevista de Aconselhamento**

11. Avaliação, ao longo das entrevistas de exame e coleta de dados, das tensões emocionais presentes nos pais, irmãos e outros parentes dos afetados.
12. Explicação verbal dos termos do relatório à família, de maneira adaptada às suas condições culturais e sob forma que não precipite crises emocionais de importância. Em certos casos, omite-se esta etapa e remete-se o relatório, sob caráter confidencial, ao clínico.
13. Ajuda aos consulentes para que conscientizem os riscos e adotem atitude racional a respeito.
14. Assessoramento dos consulentes sobre métodos de garantir o êxito do planejamento familiar que venham a adotar em face dos riscos.
15. Esclarecimento tranqüilizador aos membros da família que temam, sem razão, riscos altos de recorrência da afecção, quando for o caso.
16. Aconselhamento de outros membros da família, mesmo que não fossem de início consulentes, quando o estudo tenha demonstrado que sua prole corre alto risco.
17. Nos casos indicados, explicação aos solteiros da família sobre a importância de evitarem casamentos consangüíneos.

**D - Acompanhamento**

18. Quando indicado, seguimento dos casos através de contatos a intervalos longos para aferir a eficácia do aconselhamento ou reforçá-lo.

## DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

*Paulo A Otto, Regina Célia Mingroni, Ângela Maria Vianna Morgante 2006 – Princípios de Genética Humana e Médica. Em: Tratado de Clínica Médica, Amato Carlos Lopes Editor. Editora Roca Ltda.*

O diagnóstico pré-natal consiste na aplicação de um conjunto de técnicas capazes de verificar a saúde e o desenvolvimento do concepto (embrião ou feto) e de nele detectar, quando presentes, defeitos e doenças. Alguns métodos permitem a visualização direta (amnioscopia, fetoscopia) ou indireta (ultrassonografia, raios-X) do concepto e a conseqüente detecção de anomalias anatômicas. Outros dependem da obtenção de fragmentos de tecido (biópsia de vilosidades coriônicas), de líquido amniótico (amniocentese) ou de alíquotas de sangue (cordocentese), material esse que é colhido para a aplicação direta ou indireta (após cultivo) de testes bioquímicos (para detecção de erros inatos de metabolismo), moleculares (testes de DNA para a detecção de genes mutantes) e citogenéticos (estudo dos cromossomos e determinação do cariótipo para verificar-se suspeita de aberração cromossômica).

A verificação da evolução do ganho ponderal e do aumento da circunferência abdominal e a ausculta fetal já faziam parte de longa data da rotina do acompanhamento pré-natal das gestantes; alterações aí detectadas já constituíam evidência de defeito ou doença no concepto. Atualmente, mesmo em países subdesenvolvidos, já faz parte da rotina obstétrica o acompanhamento das condições de gestação pela ultra-sonografia, que já inclui um exame morfofuncional geral do feto. As demais técnicas referidas no parágrafo anterior aplicam-se a situações específicas, onde há risco aumentado de certos tipos de defeitos ou doenças para o concepto.

### Principais indicações do exame de diagnóstico pré-natal

**Idade materna avançada:** mães idosas têm chance aumentada de gerar crianças portadoras de defeitos cromossômicos, em especial as trissomias autossômicas. O efeito está bem demonstrado na síndrome de Down, na qual a probabilidade de um afetado chegar a nascer é muito maior que nas demais trissomias (como as dos cromossomos 13 e 18, responsáveis respectivamente pelas síndromes de Patau e Edwards), onde o efeito é praticamente anulado pela alta taxa de abortamento espontâneo precoce. De fato, a principal aplicação do diagnóstico pré-natal ainda continua sendo a idade materna avançada com a finalidade específica de verificar-se se o concepto é portador ou não do defeito cromossômico responsável pela síndrome de Down (geralmente uma trissomia simples do cromossomo 21). Geralmente o exame é indicado para gestantes com 38 anos ou mais, pois este grupo de mulheres contribui com praticamente metade de todos os casos da síndrome de Down. Se todas essas mulheres se submetessem a esse exame e optassem pela interrupção da gravidez quando for constatada a trissomia, a incidência da síndrome de Down ao nascimento baixaria de cerca de 1/800 para 1/1600, ou seja, a freqüência de afetados na população seria reduzida à metade da taxa normal de ocorrência. Para se reduzir mais ainda essa freqüência seria necessário submeter ao exame, em condições de rotina, um número muito grande de mulheres, o que ainda é inviável economicamente. No entanto, mesmo no grupo de mulheres com maior risco, com idade entre 40 e 50 anos, o risco é por si só baixo, de 4% no máximo; apesar disso, encontra-se cerca de 40 vezes aumentado em relação ao risco de mães jovens, que é da ordem de 1/1000.

**Defeitos de fechamento do tubo neural:** determinados por mecanismo multifatorial, eles apresentam um espectro de expressividade clínica que varia da espinha bífida oculta ou aberta e dos diversos tipos de meningomielocoele até defeitos extremamente graves como as encefalocoeles e a anencefalia, estas últimas resultantes de anomalias do desenvolvimento embrionário que comprometem a extremidade cranial do tubo neural. O risco de repetição desses defeitos na prole de casais que já tiveram uma criança afetada é baixo, da ordem de 4%. Como, no entanto, o defeito pode ser detectado com segurança através de técnicas simples e não-invasivas, como a ultrassonografia, comumente indica-se o exame para casais que já tiveram criança afetada. Como na vigência do defeito os níveis de alfa-feto-proteína encontram-se elevados no soro materno e no líquido amniótico, a dosagem dessa substância (associada à aplicação da técnica da ultrassonografia) está indicada. No caso da anencefalia, defeito incompatível com a sobrevivência do concepto, freqüentemente os casais têm solicitado à autoridade legal permissão para interrupção da gravidez, que geralmente é fornecida através de um alvará. Desta maneira, além das situações já previstas em lei que permitem a

interrupção da gravidez no Brasil, vai se abrindo pouco a pouco espaço para aí incluírem as condições de defeitos e malformações muito graves, que diminuem grandemente a qualidade de vida ou impedem totalmente a sobrevivência do concepto.

**Casais com prole afetada por doença recessiva:** no caso de doenças autossômicas recessivas os genitores de afetados são heterozigotos, o que determina o risco alto de repetição (25%) do defeito ou doença numa criança qualquer que venham a ter. No caso de doenças ligadas ao X recessivas esse risco varia de 17 a 25% nos casos isolados, fixando-se em 25% na situação de casos com recorrência na irmandade ou na família. São conhecidas atualmente entre 3000 e 4000 doenças e defeitos diferentes condicionados por esses tipos de mecanismo, mas na prática existem testes moleculares que podem ser aplicados em diagnóstico pré-natal em menos de 10% dessas condições. A situação ainda é complicada atualmente pelo fato de a maioria dos laboratórios de biologia molecular capazes de processarem esses exames serem especializados em apenas um certo número deles. O número de doenças pesquisadas aumenta quando se considera a possibilidade da aplicação de estudos indiretos de ligação com marcadores mapeados nas vizinhanças do loco da doença. De qualquer maneira, existindo o exame, claramente está ele indicado nessa situação, talvez a mais importante pela grandeza do risco a ela associada.

**Portadores de alteração cromossômica equilibrada:** numa fração pequena de casais com crianças afetadas por defeitos cromossômicos um dos genitores é portador da alteração cromossômica em estado dito equilibrado, ou seja, sem que redunde em manifestações fenotípicas para o seu portador. Outros parentes do afetado também podem ser portadores equilibrados. O tipo de defeito mais freqüentemente encontrado nesses casos são as translocações equilibradas, como as que podem ocorrer entre os braços longos dos cromossomos 21 e 14 na síndrome de Down. A verificação empírica das taxas de recorrência nesses casos mostrou que o risco é da ordem de 15 a 20%, quando a mãe é portadora da translocação equilibrada e menor que 5%, quando o portador é o pai. A ordem de grandeza dessas cifras seguramente indica a aplicação de técnicas de diagnóstico pré-natal.

**Outras indicações:** a aplicação de técnicas de diagnóstico pré-natal também está indicada em casos de suspeita de infecção durante a gravidez capaz de produzir defeitos fetais (como é o caso da rubéola, sífilis, citomegalovirose etc), no caso de ingestão de drogas com capacidade teratogênica, como a talidomida, em doenças maternas de natureza sistêmica como o diabetes e ainda em casos de imunização materna. A maioria dos serviços de diagnóstico pré-natal ainda indica a aplicação do exame em casos de casais que tiveram crianças portadoras de defeitos cromossômicos; como esses defeitos geralmente são de natureza esporádica e o seu risco de repetição é pequeno ou desprezível, geralmente da ordem de 1% ou menos, o exame aqui se justifica para a tranquilização psicológica que possa trazer aos casais nessa situação. Algumas outras situações, no entanto, não justificam a aplicação do exame, como é o caso da consangüinidade parental. Apesar de o risco de doença autossômica recessiva na prole de primos em primeiro grau estar aumentado cerca de dez vezes em relação ao risco correspondente para não-consangüíneos, o número enorme de doenças possíveis e a ausência de manifestações detectáveis em condições de rotina de muitas delas tornam inviável a aplicação do método, do mesmo modo que para a população geral.

### **Principais técnicas utilizadas no diagnóstico pré-natal**

Muitos serviços de diagnóstico por imagem já se tornaram proficientes no diagnóstico de defeitos congênitos em exames de rotina durante o acompanhamento de gestantes, mas são os serviços de patologia fetal que congregam especialistas na detecção desses defeitos. Além da parte relativa ao diagnóstico por imagem, os serviços de patologia fetal estão aparelhados para a aplicação das técnicas de que trataremos nesta seção. Nesses serviços os profissionais prestam esclarecimentos adequados aos consulentes sobre todos os aspectos, técnicos, médicos e éticos dos exames, mas é importante que, ao encaminhar suas consulentes para diagnóstico pré-natal, seu médico já lhes esclareça de maneira geral em que consiste o método e quais são suas limitações e riscos associados.

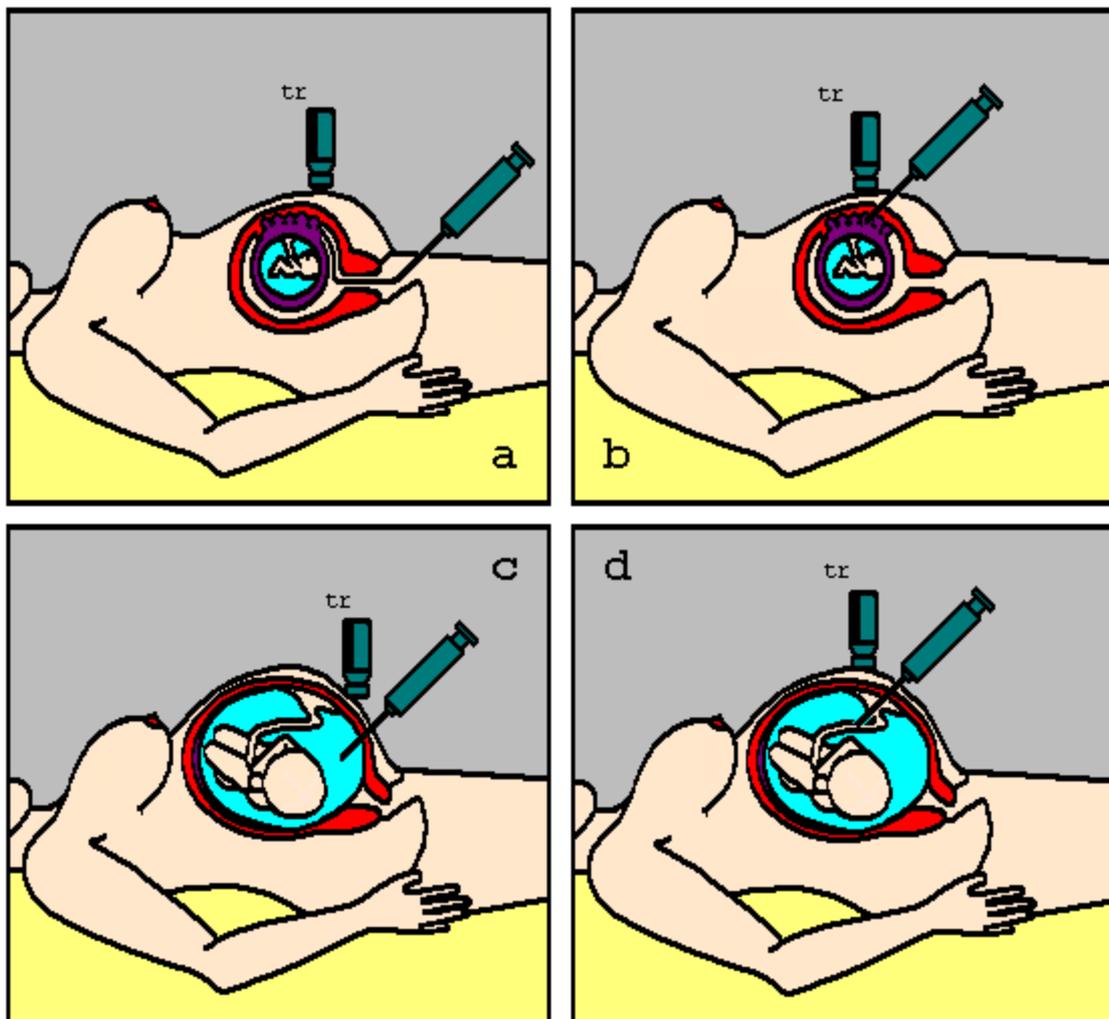
### **Ultrassonografia**

Trata-se de um método não-invasivo e inócuo que consiste na emissão de ondas ultrassônicas de alta freqüência, cujo reflexo (eco) é captado por um transdutor e transformado

em imagem num monitor. Apesar de depender da perícia e preparo do ultrassonografista, a aparelhagem conta com o auxílio de computador capaz de realizar cálculos e medidas em tempo real. Equipamento Doppler a cores acoplado à ultrassonografia permite determinações de fluxo nos vasos do feto. A ultrassonografia em duas dimensões foi a primeira utilizada e permite a obtenção de cortes tomográficos do concepto com boa resolução. Atualmente está sendo substituída pela ultrassonografia tridimensional, que permite a visualização da imagem em profundidade, inclusive em tempo real, com aparelhagem mais sofisticada. Teoricamente o exame pode ser aplicado com sucesso a partir da décima-primeira semana da gestação, uma vez que nessa ocasião a morfologia fetal já está praticamente definida e a maioria (cerca de 80%) das malformações eventualmente presentes já podem ser detectadas. A época ideal para a sua aplicação depende, no entanto, do aparelho ou sistema a ser investigado. Assim, defeitos de fechamento do tubo neural (espinhas bífidas, meningomielocelos e anencefalias) podem ser diagnosticados com segurança apenas a partir da décima-quinta semana e as displasias esqueléticas, de uma maneira geral, mais tardiamente, a partir da décima-oitava semana. Num exame de rotina realizado num serviço de patologia fetal são verificados sistematicamente sinais morfológicos indicadores de defeitos cromossômicos, como o aumento da translucência nucal, geralmente devido a acúmulo de linfa (higroma cístico incipiente) nessa região e muito comum na monossomia X (síndrome de Turner) e nas trissomias autossômicas (síndromes de Down, Patau e Edwards). A presença desse sinal indica a coleta de material do concepto e a realização de estudo cromossômico. Além de ser empregada no diagnóstico direto de uma série de defeitos, a ultrassonografia é usada sistematicamente para monitorar os outros exames invasivos de diagnóstico pré-natal, como se pode verificar no esquema da Figura 34 abaixo, em que o transdutor de ultrassonografia está sempre presente no acompanhamento das técnicas de biópsia de vilosidade coriônica transcervical ou transabdominal, amniocentese e cordocentese. Embora idealmente toda gravidez devesse ser acompanhada através da técnica, constituem indicações de certa maneira formais da ultrassonografia pré-natal, entre outras, as seguintes:

- a) gestações complicadas por variações patológicas da quantidade de líquido amniótico, muitas vezes associadas a malformações do concepto. Assim, o polidrâmnio pode indicar a presença de defeitos obstrutivos de tubo digestivo como a atresia do esôfago, enquanto o oligodrâmnio muitas vezes é manifestação de defeitos renais (síndrome de Potter ou seqüência do oligodrâmnio devido a agenesia renal bilateral);
- b) casais com história de filhos afetados por doença autossômica recessiva cujos sinais são passíveis de detecção pelo exame, como é o caso de várias displasias ósseas (síndrome de Ellis-van Creveld, aplasia de eixo radial que ocorre na síndrome de Fanconi, forma recessiva grave de osteogênese imperfeita) ou os defeitos de vários órgãos e sistemas que ocorrem na síndrome de Meckel-Gruber (microcefalia e defeitos de fechamento cranial do tubo neural como a encefalocele occipital, polidactilia, rim policístico, onfalocele); prole de indivíduos adultos afetados por doenças autossômicas dominantes como a acondroplasia e outras formas de displasia óssea hereditária;
- c) antecedentes na família (parentes em primeiro grau) com malformações de natureza multifatorial como os defeitos de fechamento de tubo neural já mencionados, fendas de lábio ou palato;
- d) casais com história de filhos ou parentes próximos afetados por microcefalia e outros defeitos de desenvolvimento craniano;
- e) antecedentes familiares de hidrocefalia, principalmente se os afetados forem de sexo masculino e suspeitar-se da forma clássica recessiva ligada ao X por estenose congênita do aqueduto de Sylvius. O defeito é pesquisado, verificando-se se existe ou não dilatação do sistema ventricular cerebral, uma vez que muitos afetados apresentam circunferência craniana normal ao nascimento.

Resumimos a seguir as principais técnicas invasivas de diagnóstico pré-natal, representadas esquematicamente na Figura 34. Todos esses procedimentos são monitorados pela ultrassonografia.



**Figura 42** - Principais técnicas de diagnóstico pré-natal, todas monitoradas pela ultrassonografia (tr indica o aparelho transdutor): a) biópsia de vilosidades coriônicas por via vaginal transcervical; b) biópsia de vilosidades coriônicas por via transabdominal; c) amniocentese; d) cordocentese ou punção do cordão umbilical.

### **Biópsia das vilosidades coriônicas**

O exame desse material permite a aplicação de técnicas que visam o estudo do cariótipo, a verificação do sexo do embrião, a aplicação de testes bioquímicos e enzimáticos e a extração e análise do DNA. Entre a sétima e a décima-primeira semana da gravidez é possível atingir a margem do cório frondoso que irá formar a futura placenta por meio de uma cânula introduzida através da vagina e do colo do útero. Através dela aspira-se o material e, com o auxílio de uma lupa estereoscópica, seleciona-se o material de origem embrionária (vilosidades coriônicas). Nessa época as células das vilosidades dividem-se ativamente e espontaneamente e é possível obter-se metáfases para estudo cromossômico diretamente ou após curto período de incubação. Em algumas situações a obtenção de material via vaginal transcervical é dificultada ou impossibilitada pela ocorrência de vaginite, anomalias de útero e de canal cervical ou de gravidez múltipla; opta-se então por atingir a placa coriônica através de uma punção transabdominal, que constitui a técnica de eleição entre a 11ª e a 17ª semana, ocasião em que a bolsa amniótica já preencheu totalmente a cavidade uterina, eliminando o espaço virtual livre que permitia o acesso ao cório frondoso sem lesar as membranas do embrião. Recentemente esta via está sendo usada com frequência cada vez maior, tendendo a substituir totalmente a via vaginal transcervical.

### **Amniocentese**

É a punção transabdominal suprapúbica, por meio de uma longa agulha conectada a uma seringa, da cavidade amniótica, com a finalidade de obtenção do líquido, que às vezes é o próprio material a ser analisado (no caso de dosagem de pigmentos, alfa-feto-proteína e outras

substâncias). Geralmente o que se pretende colher são as células que se encontram suspensas no líquido por descamação dos epitélios de revestimento externo (fibroblastos de pele) ou interno (células originárias dos tratos urinário, digestivo e respiratório). Como nas outras técnicas que visam a obtenção de material de origem fetal, a amniocentese é monitorada pela ultrassonografia, que permite assim a seleção de regiões onde a coleta do líquido é mais fácil, além de afastar com segurança as possibilidades de lesão placentária ou fetal. O material obtido é concentrado por centrifugação e submetido a cultura de células previamente às análises citológicas, bioquímicas e cromossômicas que se pretende nele aplicar. Como já referido anteriormente, o exame é realizado a partir da 17ª semana contada a partir da última menstruação. Como as demais técnicas de diagnóstico pré-natal, o procedimento é seguro, praticamente desprovido de riscos e complicações para a gestante e o concepto, além de poder ser realizado em consultório, em regime de atendimento ambulatorial. Embora não haja a necessidade de indicação formal de anestesia local, esta é aplicada com certa frequência para eliminar a dor e o desconforto produzidos pela punção abdominal. A dosagem da alfa-feto-proteína, antigamente realizada com frequência para o diagnóstico dos defeitos de fechamento do tubo neural, vem sendo substituída progressivamente pela ultrassonografia, pois a capacidade discriminante das aparelhagens mais modernas é excelente e permite, nas mãos de um profissional experiente, detectar com segurança esses defeitos.

A taxa de conceptos com aberrações cromossômicas (monossomia e outras aneuploidias do cromossomo X, trissomias autossômicas e casos de mosaicismo) detectadas em material colhido através da técnica da biópsia das vilosidades coriônicas é significativamente maior do que a observada usando-se a técnica da amniocentese. Parte da discrepância pode ser explicada pela probabilidade de abortamento devido a defeitos cromossômicos ser maior nas fases iniciais da gravidez, em que o primeiro método é aplicado.

### **Cordocentese**

A cordocentese consiste na punção por agulha da veia umbilical do feto, proximamente à inserção do cordão na placenta. Pode ser realizada em qualquer ocasião a partir da décimo-oitava semana da gravidez. No material colhido (de 1 a 10 ml de sangue, dependendo da época da punção e do tipo de exame) podem ser realizados os mais diversos exames, que incluem o estudo do cariótipo, a determinação de anticorpos em casos de suspeita de aloimunização ou de infecções, testes bioquímicos e moleculares.

### **Fetoscopia**

O procedimento, que consiste na inserção de um cateter munido de fibra óptica na cavidade amniótica por via transabdominal, permite, através da inspeção visual direta do feto, o diagnóstico de uma série de defeitos externos e de várias afecções congênitas da pele e anexos. O próprio fetoscópio permite o uso de acessórios como agulhas com a finalidade de se obterem amostras de tecidos fetais. São comumente diagnosticados pela inspeção direta proporcionada pelo procedimento defeitos crânio-faciais, de extremidades e até do tegumento; a análise indireta de material colhido ou biopsiado permite o diagnóstico de defeitos cromossômicos, hemoglobinopatias, defeitos da coagulação, erros inatos de metabolismo e um sem número de outras afecções.

O diagnóstico pré-natal oferece a opção de ter filhos para casais que evitariam a procriação na ausência do exame por temerem o aparecimento ou repetição de doença genética em sua prole. Inversamente, no caso de gravidezes não-planejadas de casais em risco, o diagnóstico pré-natal de normalidade do concepto vai permitir, na maioria das vezes, que a gestação seja levada a termo, pois no cômputo geral o resultado do exame afasta a possibilidade do defeito temido.

## LEITURAS COMPLEMENTARES

A Oficina 2 completa: “Temas de Biologia. Trabalhando Temas Fundamentais: Código Genético e Síntese de Proteínas. J. M. Amabis e G. R. Matho. Editora Moderna, encontra-se disponível no *site* da Editora Moderna <http://www.moderna.com.br>

As atividades completas realizadas nas Oficinas 3 e 4 “A Família Silva e seus genes” e “Meiose e as leis de Mendel” estão disponíveis no site <http://www.ib.usp.br/microgene>. Esses kits educacionais podem ser emprestados para utilização em escolas de Ensino Médio.

Para saber mais sobre a **Síndrome do X-frágil** visite os endereços:

- <http://www.xfragil.org.br>
- <http://www.ib.usp.br/textos/>

Para saber mais sobre **Mutação e Câncer** leia o texto do anexo 3.

**ANEXO 1**

## Levantamento de conceitos sobre DNA, cromossomos e genes

1. Para você, a expressão “uma molécula de DNA” significa
  - a) uma única cadeia de desoxirribonucleotídeos
  - b) duas cadeias de desoxirribonucleotídeos complementares e emparelhados
  - c) não tenho certeza sobre o significado dessa expressão.
  
2. Em sua concepção, cromossomos são estruturas que
  - a. só existem durante as divisões celulares.
  - b. só existem durante as interfases.
  - c. existem sempre durante o ciclo de vida da célula.
  - d. não tenho certeza sobre o significado do termo.
  
3. Em sua concepção, o termo cromatina refere-se a estruturas que
  - a. só existem durante as divisões celulares
  - b. só existem durante as interfases
  - c. existem sempre durante o ciclo de vida da célula
  - d. não tenho certeza sobre o significado do termo
  
4. Um cromossomo, antes de sua duplicação, possui
  - a. uma única molécula de DNA
  - b. duas moléculas de DNA
  - c. muitas moléculas de DNA
  - d. não tenho certeza da resposta
  
5. Cada uma das cromátides que constituem um cromossomo metafásico contém
  - a. uma única cadeia de desoxirribonucleotídeos
  - b. duas cadeias complementares de desoxirribonucleotídeos
  - c. um número variável de cadeias de desoxirribonucleotídeos
  - d. não sei responder à questão
  
6. Dentre as frases a seguir, a que melhor define um gene é
  - a. uma unidade de transcrição na molécula de DNA
  - b. uma molécula de DNA em um cromossomo
  - c. uma cadeia simples de DNA que codifica um polipeptídeo
  - d. um segmento da molécula de DNA que codifica um polipeptídeo
  - e. não tenho certeza da resposta
  
7. Os diferentes alelos de um mesmo gene diferem entre si por
  - a. se localizarem em cromossomos não homólogos
  - b. se localizarem em posições diversas em cromossomos homólogos
  - c. se localizarem em células diferentes de um mesmo organismo
  - d. terem seqüências de nucleotídeos diversas
  - e. não sei responder à questão.

**Anexo 2**

Retirado de Temas de Biologia. Trabalhando Temas Fundamentais: Código Genético e Síntese de Proteínas. J. M. Amabis e G. R. Matho. Editora Moderna <http://www.moderna.com.br>



**Anexo 3**

*Lyria Mori - Ciência Hoje 180: 33- 37, 2002.*









## Anexo 4

Esta figura faz parte do texto da página 65 – “doenças condicionadas por mecanismo multifatorial” e foi citada como figura 9.

