

GENÉTICA: A CIÊNCIA DA VIDA

**Conceitos e aplicações práticas
na genética humana**



Prof. Dra. Eliane Patrícia Cervelatti-Mendonça
Pe. Paulo Fernando Vendrame, SDB
Prof. Dr. André Luis Ornellas

GENÉTICA:

A CIÊNCIA DA VIDA

**Conceitos e aplicações práticas
na genética humana**

Prof. Dra. Eliane Patrícia Cervelatti-Mendonça
Pe. Paulo Fernando Vendrame, SDB
Prof. Dr. André Luis Ornellas

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Papa João Paulo II - UniSALESIANO
- Campus Araçatuba – SP

C419g Cervelatti-Mendonça, Eliane Patricia
Genética: ciência da vida – conceitos e aplicações práticas na genética humana / Eliane Patricia Cervelatti-Mendonça 1.ed. –
Araçatuba: UniSALESIANO, 2025.
257p.
ISBN 978-65-87577-13-5

1. Genética 2. Genética humana 3. Biologia celular 4. Biologia molecular 5. Genoma 6. DNA humano 7. DNA – Mutação 8. Herança genética I. Cervelatti-Mendonça, Eliane P. Título

CDU 575

“Àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos (...), a Ele seja a glória, por todas as gerações, para todo o sempre. Amém!”

Efésios 3:21

Prefácio

As páginas deste livro foram cuidadosamente pensadas para abrir portas para um universo fascinante — o da Genética. Um campo que não apenas explica o que somos, mas também nos projeta para o futuro da ciência, da medicina e da própria humanidade.

Nas últimas décadas, presenciamos descobertas que pareciam ficção científica: manipulação genética, terapias gênicas, testes moleculares, vacinas baseadas em RNA mensageiro... tudo isso moldando o presente e redesenhando o futuro. Mas para entender a grandiosidade desses avanços, é preciso dar o primeiro passo: compreender o DNA.

Este livro foi escrito com a intenção de tornar essa jornada acessível. Os conceitos aqui não são tratados com distância acadêmica, mas com proximidade, clareza e, principalmente, paixão. Ele foi feito para quem está começando, para quem tem curiosidade, para quem deseja entender — e se encantar.

Leia com atenção, com olhos curiosos e mente aberta. Permita-se surpreender com a beleza dos processos biológicos, com a lógica dos genes, com o intrincado funcionamento da vida em seu nível mais íntimo.

O conhecimento verdadeiro se revela mais profundamente a cada novo olhar.

Porque a Genética não é apenas uma ciência.

É uma forma de entender a vida.

Boa leitura!

Eliane Patrícia Cervelatti-Mendonça

Dedicatória

Ao meu marido André pelo amor, apoio, incentivo e compreensão pela minha ausência durante a elaboração desse livro. Você é meu grande amor e minha vida é melhor com você ao meu lado.

Aos meus pais Joel (*in memoriam*) e Laura, cujo amor, dedicação e incentivo incondicional me permitiram ir muito além do que jamais imaginei.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos. Minha vida mais feliz com vocês.

Agradecimentos

Ao reitor Pe. Paulo Vendrame e ao pró-reitor acadêmico Dr. André Luis Ornellas, pela confiança, incentivo e apoio constante ao desenvolvimento de diversos projetos acadêmicos, em especial à elaboração deste livro, que só se tornou possível graças à sensibilidade e ao compromisso de ambos com a missão educadora salesiana.

Ao Departamento de Comunicação do UniSALESIANO – Araçatuba, pelo cuidado meticuloso, pela paciência e pela dedicação exemplar na edição e revisão de cada capítulo. Em especial, a designer do projeto gráfico e diagramadora Rosiane Cerverizo, pelo profissionalismo e a atenção aos detalhes foram fundamentais para garantir a qualidade final desta obra.

Ao Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium – UniSALESIANO de Araçatuba, uma casa da qual tenho a alegria e o orgulho de fazer parte há 21 anos. Minha profunda gratidão por todo o suporte institucional, pela infraestrutura generosamente disponibilizada e por cultivar diariamente um ambiente acolhedor e inspirador, onde ideias se transformam em realizações concretas.

À Dra. Cibele Cristina Castilho, por gentilmente ceder imagens de grande relevância, que contribuíram de forma significativa para ilustrar e enriquecer visualmente esta publicação. Sua colaboração foi essencial para dar ainda mais vida e sensibilidade ao conteúdo.

Ao Cauê, Théo e Enzo, bem como a seus familiares, por permitirem que suas histórias de amor, superação e coragem fossem compartilhadas com tamanha generosidade. Cada relato presente neste livro é um testemunho poderoso da força do afeto e da esperança, e é uma honra poder eternizá-los em palavras.

Sumário

Prefácio	5
Dedicatória	7
Agradecimentos	9
Introdução	11
Sumário	5
1. DNA: Estrutura, Organização e Replicação	7
1.1 Estrutura do DNA	8
1.2 Organização do DNA durante o ciclo celular	13
1.3 Replicação	21
2. Do DNA às proteínas	29
2.1 Estrutura de um gene para RNAm	31
2.2 Transcrição	33
2.3 Controle da expressão gênica	46
2.4 Usando a informação contida no RNAm para produção de proteínas	52
3. Genes e Genomas: decifrando a organização da informação contida no DNA Humano	57
3.1 Genes	58
3.2 Regiões repetidas	64
3.3 DNA Mitocondrial	75
3.4 DNA Espaçador	76
4. Mutações Gênicas	80
4.1 Como surgem as mutações gênicas	81
4.2 Consequências da mutação gênica	87
4.3 Alelos de um gene	93
4.4 Interação entre os diferentes alelos de um gene	95
4.5 Transmissão de uma mutação gênica ao longo das gerações ..	102

5. Transmissão do material genético	105
5.1 Mecanismos celulares envolvidos na transmissão do DNA	106
5.2 Análise dos padrões de herança	114
6. Mutações Cromossômicas e suas consequências em humanos ..	135
6.1 Técnicas para identificação cromossômica	137
6.2 Mutações cromossômicas numéricas	141
6.3 Mutações cromossômicas estruturais	151
6.4 Aneuploidias envolvendo os cromossomos autossômicos em huma- nos	159
6.5 Aneuploidias envolvendo cromossomos sexuais humanos	166
6.6 Exemplo de distúrbio causado por uma alteração cromossômica estrutural não balanceada	175
7. Biologia Molecular: análise do DNA	179
7.1 Obtenção do DNA que será analisado	180
7.2 Eletroforese de ácidos nucleicos (DNA e RNA)	182
7.3 Hibridização de RNA	190
7.4 Enzimas de restrição (as 'tesouras' da biologia molecular)	194
7.5 Reação em cadeia da Polimerase (ou PCR do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	203
7.6 PCR tempo real	211
7.7 Sequenciamento	214
7.8 Microarranjos ou <i>Chips</i> de DNA (<i>Microarrays</i>)	222
8. Superando o diagnóstico genético: relato de casos reais	228
8.1 Relato I - Amiotrofia Espinhal Progressiva (APE)	229
8.2 Relato II - Síndrome de Down	236
8.3 Relato III - Transtorno do Espectro Autista	243
8.4 Considerações Finais	252



DNA

ESTRUTURA, ORGANIZAÇÃO E REPLICAÇÃO

Você certamente já ouviu falar sobre Genética e DNA. Mas como é essa molécula, afinal de contas? Como ela pode ser observada no interior de uma célula eucariote? As células são capazes de duplicá-lo? Como isso acontece? A resposta a cada uma dessas perguntas você encontrará ao longo desse capítulo!

1.1 - ESTRUTURA DO DNA

Há muitos aspectos a serem abordados na Genética, mas a compreensão de cada um deles certamente será mais fácil se inicialmente discutirmos a estrutura da molécula de DNA em si.

A estrutura em dupla hélice do DNA foi descrita em 1953 (um fato relativamente recente na ciência) na Universidade de Cambridge (Inglaterra), por Francis Crick e James Watson, ou simplesmente Watson e Crick. No entanto, embora não tenha tido o merecido reconhecimento na época, os resultados dos estudos realizados por uma cientista chamada Rosalind Franklin foram determinantes para essa descoberta. Infelizmente isso aconteceu pelo simples fato de se tratar de uma mulher. Que fique registrado aqui contribuição dessa notável pesquisadora para essa descoberta tão importante para a ciência!

Mas como é, afinal de contas, o DNA? Vamos começar falando sobre a sua composição: nucleotídeos. Esses são os 'monômeros,' ou pequenas unidades que se unem para formar uma molécula muito maior, o DNA. Os nucleotídeos, por sua vez, são formados por fosfato, açúcar (uma pentose) e uma base nitrogenada: adenina, timina, citosina e guanina que, de acordo com sua estrutura química, são classificadas como purinas (adenina e guanina) ou pirimidinas (citosina e timina). De fato, o que diferencia um nucleotídeo do outro é justamente a sua base nitrogenada. Para facilitar a sua compreensão, a estrutura de cada um desses monômeros é apresentada na figura 1.1 de modo simplificado, mas tenha em mente que não encontramos

símbolos geométricos e sim estruturas químicas nessa molécula ok?

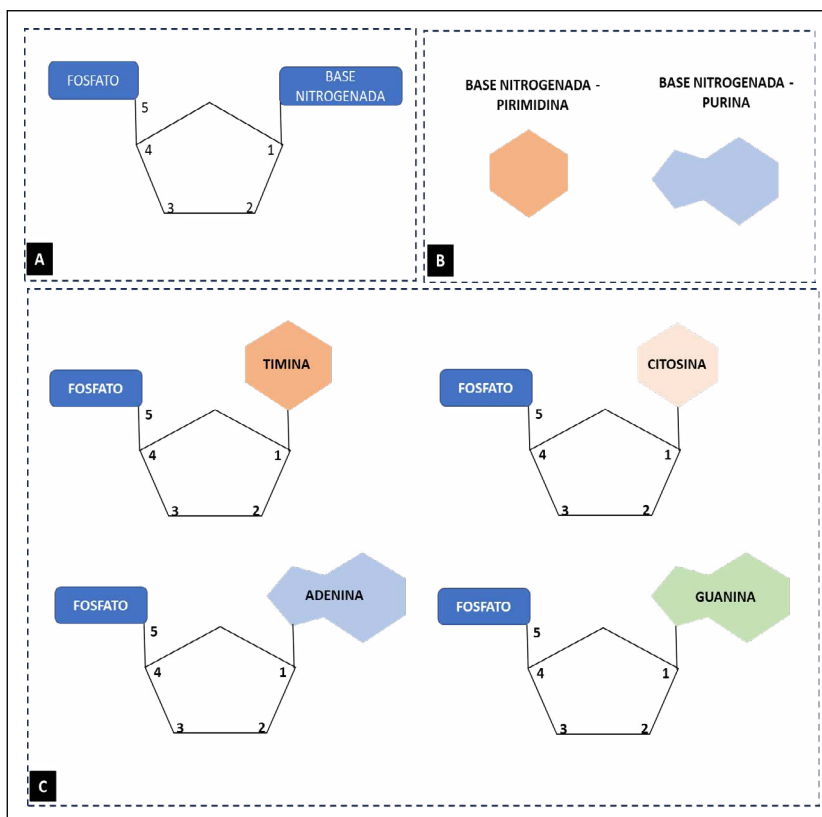


Figura 1.1: A) Ilustração simplificada da estrutura de um nucleotídeo (os números de 1 a 5 representam os locais onde se encontram os carbonos dessa pentose); B) Representação ilustrativa da estrutura das bases nitrogenadas purinas e pirimidinas e C) Ilustração simplificada da timina, citosina, adenina e guanina (encontrados no DNA).

Para formar o DNA, os nucleotídeos se unem originando uma 'cadeia de nucleotídeos'. Mas como isso acontece afinal de contas? Nesse caso, a ligação só ocorre no carbono 3' (lê-se 3 'linha') de forma que, após a formação da cadeia de nucleotídeos, será possível identificar o seu início e o seu fim. Isso mesmo, na extremidade onde se encontra o carbono 5' (lê-se 5 'linha') é o início e na 3' o final. Parece complicado? Calma, esse processo está ilustrado nas figuras 1.2 e 1.3 abaixo para facilitar a sua compreensão.

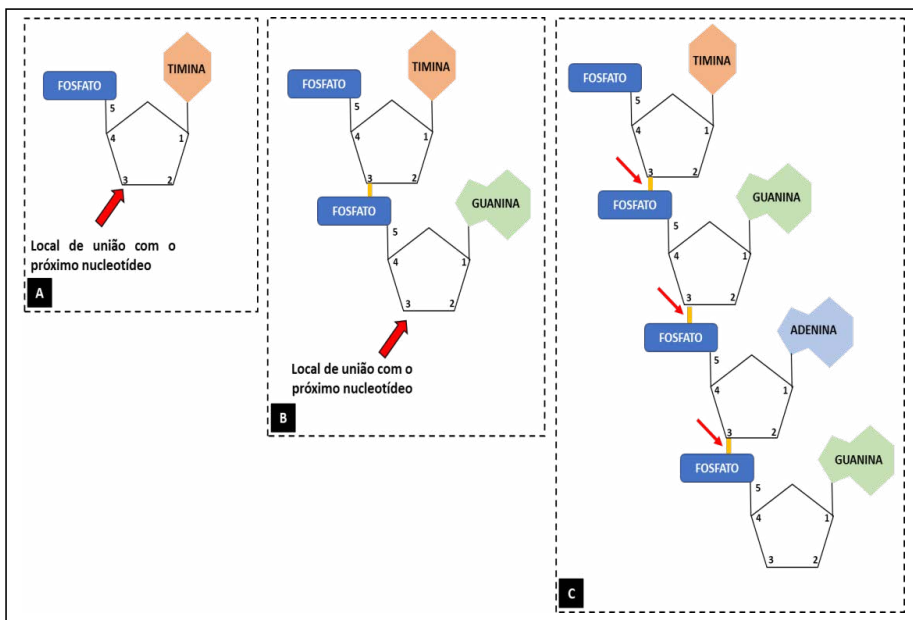


Figura 1.2: Ilustração demonstrando os estágios sucessivos na formação de uma cadeia de nucleotídeos (as setas indicam o local de união entre eles). Note em 'A', 'B' e 'C' o aumento da cadeia e a união dos nucleotídeos sempre no carbono 3'.

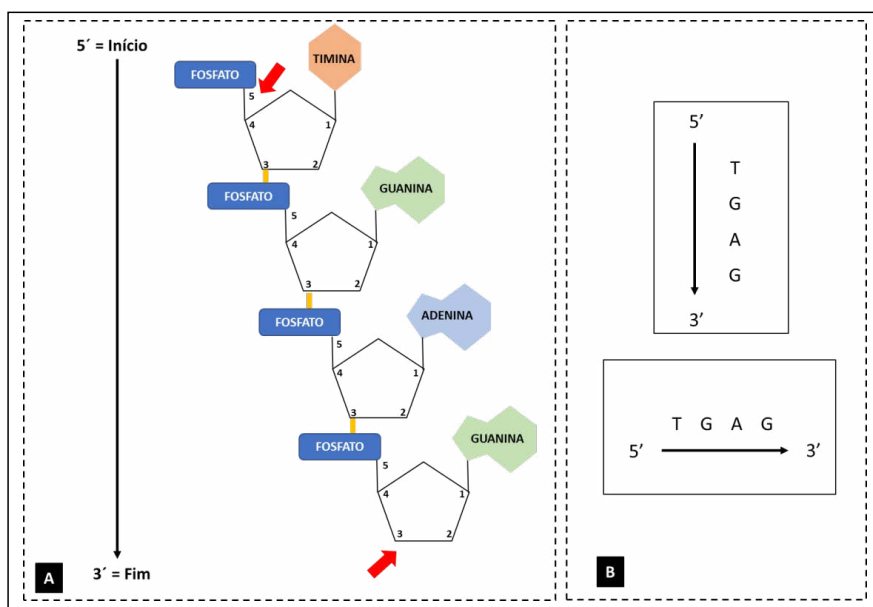


Figura 1.3: A) Ilustração demonstrando uma cadeia de nucleotídeos. É possível observar as extremidades 5' (início) e 3' (fim). B) Maneiras simplificadas de se representar uma cadeia de nucleotídeos do DNA.

Bem, já entendemos como uma cadeia de nucleotídeos é formada. No entanto, o DNA é composto por duas cadeias de nucleotídeos que apresentam algumas características muito importantes. 1) elas são complementares, sempre se formam ‘pares’ específicos: adenina com guanina (ou vice-versa) e timina com citosina (ou vice-versa); 2: elas são antiparalelas, ou seja, estão lado a lado mas em direções opostas e 3) são unidas por pontes de hidrogênio (pares citosina/guanina com 3 pontes de hidrogênio e pares adenina/timina com duas). A diferença na quantidade de pontes de hidrogênio entre os pares de nucleotídeos se deve a estrutura química de cada um, a qual permite a formação de duas ou três pontes de H (figura 1.4).

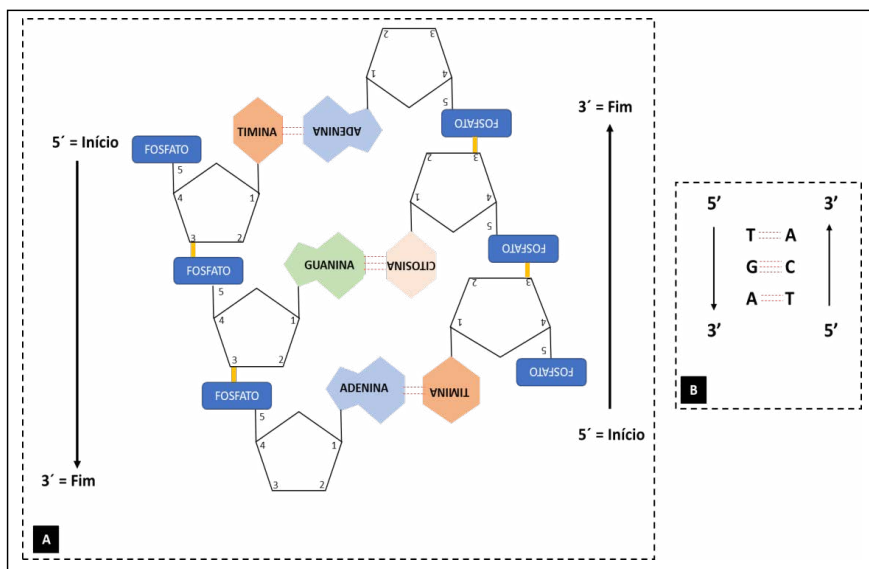


Figura 1.4: A) Ilustração mostrando as duas cadeias de nucleotídeos do DNA. Note que elas estão em sentidos opostos (são antiparalelas), sempre se formam pares específicos (são complementares) e estão unidas por pontes de Hidrogênio (linhas tracejadas que unem cada par de nucleotídeos). B) Apresentação simplificada das duas cadeias de nucleotídeos (note que suas principais características estão representadas).

Conhecendo um pouco mais sobre a estrutura do DNA e como interpretá-la, é possível determinar o tamanho da sequência de nucleotídeos analisada, conforme apresentado na figura 1.5 abaixo.

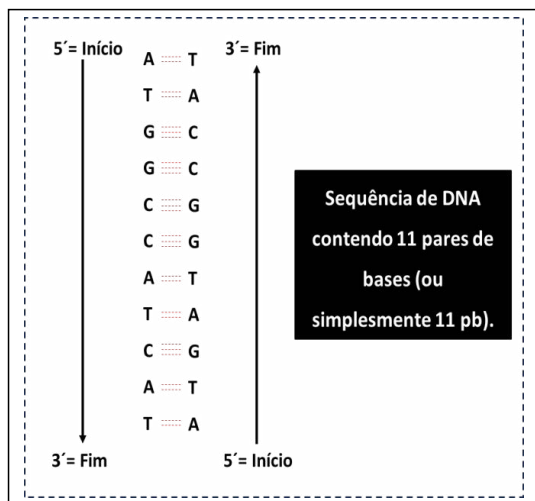


Figura 1.5: Ilustração mostrando de maneira simplificada como as duas cadeias de nucleotídeos do DNA podem ser representadas. Note que é possível determinar o tamanho da sequência de DNA contando o número de pares de bases.

Por fim, essas duas cadeias de nucleotídeos 'se enrolam' formando a dupla-hélice de DNA (figura 1.6).

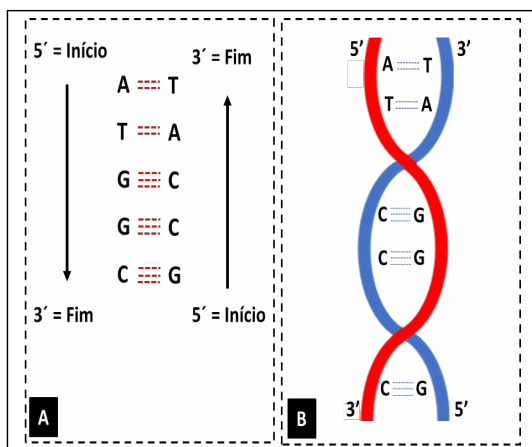


Figura 1.6: A) Ilustração mostrando de maneira simplificada como as duas cadeias de nucleotídeos do DNA podem ser representadas e B) Dupla-hélice de DNA formada a partir das cadeias de nucleotídeos apresentadas em 'A' (representadas em cores diferentes para sua melhor compreensão).

Entendemos agora a composição e estrutura do DNA! É importante ressaltar aqui que esses aspectos básicos da molécula se

aplicam a todas as espécies. Isso mesmo, desde uma bactéria até o ser humano, todos os seres vivos possuem DNA com os mesmos nucleotídeos que se unem e formam uma dupla-hélice. No entanto, para cada espécie o tamanho da molécula, bem como a sequência de nucleotídeos ali armazenada são diferentes. A partir de agora nosso interesse se volta especificamente para o DNA humano. Se já sabemos como ele é, como vamos encontrá-lo em nossas células?

1.2 - ORGANIZAÇÃO DO DNA DURANTE O CICLO CELULAR: CROMATINA E CROMOSSOMO

A organização do DNA humano no interior de uma célula varia de acordo com a etapa do ciclo celular em que ela se encontra. Dessa forma, precisamos abordar (ainda que resumidamente), alguns aspectos fundamentais sobre esse assunto.

O ciclo de vida de uma célula é dividido em: I) interfase (momento em que a célula não está se dividindo) e II) mitose (divisão celular que ocorre na maioria das células, pois a meiose ocorre somente para formação dos gametas). A mitose e meiose serão descritas posteriormente, portanto vamos destacar aqui alguns aspectos da interfase. Essa etapa do ciclo celular é subdividida em: G1 ('G' de 'Gap', que significa 'intervalo' em inglês), S ('de 'síntese) e G2.

Ao final da mitose, as células formadas estão em interfase,

mais precisamente em G1. Nesse momento, a célula desempenhará suas funções no corpo humano e, na ausência de algum sinal proliferativo, que estimule a progressão no ciclo, ela pode permanecer por um tempo indeterminado nessa fase (G0 = ‘G zero’). No entanto, quando fatores proliferativos estimulam o avanço no ciclo, a célula entra na fase S, quando ela duplicará o seu DNA (processo também conhecido como ‘replicação’, que será discutido adiante nesse capítulo). Ao final da fase S, a célula entra em G2 e por fim inicia a mitose, formando duas células filhas. É importante ressaltar que a célula apresenta ‘pontos de checagem’ (*‘checkpoints’*) entre cada uma das fases, quando ‘confere se há algum problema’, ou seja, só avança de G1 para S se estiver tudo correto (o que vale para as demais fases do ciclo celular) (figura 1.7).

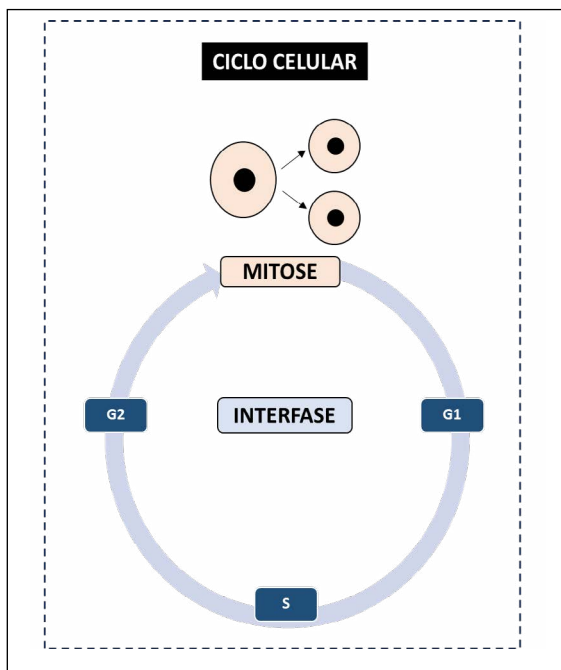


Figura 1.7: Ilustração apresentada as diferentes fases do ciclo celular.

CROMATINA: ORGANIZAÇÃO DO DNA DURANTE A INTERFASE

Bem, agora que já temos uma visão geral sobre o ciclo de vida de uma célula, podemos abordar como encontramos o DNA durante a interfase e a mitose (ou meiose). O DNA humano, por exemplo, é uma molécula longa, com cerca de 2 metros de comprimento. A questão é: como uma molécula tão longa cabe em uma célula tão pequena? A solução vem através da interação do DNA com proteínas chamadas 'histonas'.

Existem diferentes tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 e H4. Com exceção da H1, as demais se associam (duas de cada), para formar uma estrutura, um 'suporte protéico' em torno do qual o DNA começa a se 'enrolar', dando duas voltas (que contém uma sequência com cerca de 147 pares de bases), formando um 'nucleossomo'. A histona H1 é importante pois ela fixa o DNA ao núcleo do nucleossomo. Considerando que o DNA humano é muito longo e contém bilhões de pares de bases, vários nucleossomos são formados. Por fim, o DNA associado a proteínas é chamado 'cromatina', onde se encontram vários nucleossomos, e é assim que o encontramos durante a interfase (figura 1.8). Dessa maneira, o tamanho da molécula é reduzido de tal forma que caiba no núcleo celular.

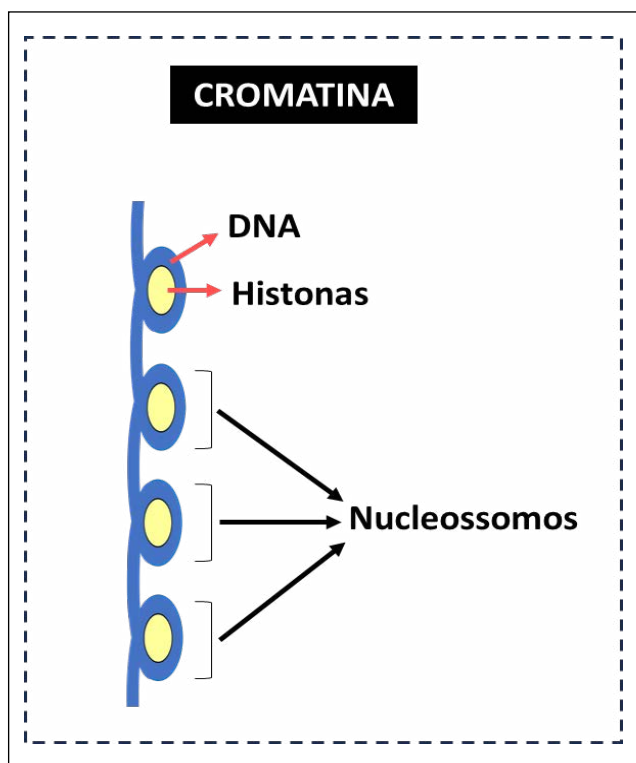


Figura 1.8: Ilustração mostrando a estrutura da cromatina. Note o DNA 'enrolado' ao redor da estrutura formada pelas histonas (formando vários nucleossomos).

Euromatina e Heterocromatina

Mesmo durante a interfase, quando o DNA se encontra na forma de cromatina, é possível encontrar regiões com diferentes níveis de compactação em sua estrutura (mais 'enroladas' ou menos 'enroladas').

As menos compactadas são chamadas euromatina (menos compactada durante a interfase) e as mais compactadas heterocromatina (mais compactada durante a interfase). A heterocromatina, por sua vez, é subdividida em heterocromatina constitutiva, quando essa região com alto nível de compactação é encontrada de forma constante em todos os tipos celulares (como em um neurônio e um fibro-

blasto, por exemplo). Por outro lado, a heterocromatina facultativa se refere a uma região que pode estar muito compactada em um tipo celular e em outro não. Essa diferença no nível de compactação também pode ser observada de acordo com o estágio de diferenciação celular, por exemplo. Isso mostra o papel dos níveis de compactação da cromatina em um evento muito importante chamado 'expressão gênica', o qual será discutido no capítulo 2.

CROMOSSOMO: ORGANIZAÇÃO DO DNA DURANTE A DIVISÃO CELULAR

Sabemos que durante a interfase o DNA se encontra na forma de cromatina. Mas o que acontece com ele durante a divisão celular (mitose ou meiose)? Vamos lembrar quando uma célula recebe um sinal que deverá 'avançar' no ciclo celular, ainda durante a interfase, mais precisamente na fase 'S', ela duplica o seu DNA. Esse DNA duplicado será dividido em partes iguais durante a mitose, por exemplo. Já pensou na dificuldade da célula para separar em partes iguais cerca de 2 metros de DNA que foram duplicados e se encontram dispersos no seu núcleo na forma de cromatina? Para resolver essa questão, assim que a célula entra em divisão, ela começa a compactar a sua cromatina, processo que vai avançando até que essa cromatina fique altamente compactada, formando um cromossomo (figura 1.9). Assim é muito mais fácil separar o DNA presente na célula em duas partes iguais. Os cromossomos só podem ser observados durante a

divisão celular. Na verdade, é durante a metáfase que eles são mais bem visualizados, portanto vamos conhecer melhor a estrutura de um cromossomo 'metafásico', ok? Eles são formados por duas cromátides-irmãs, que são duas moléculas de DNA idênticas (a célula duplicou o seu DNA, lembre-se disso), que estão unidas entre si através de uma região chamada centrômero.

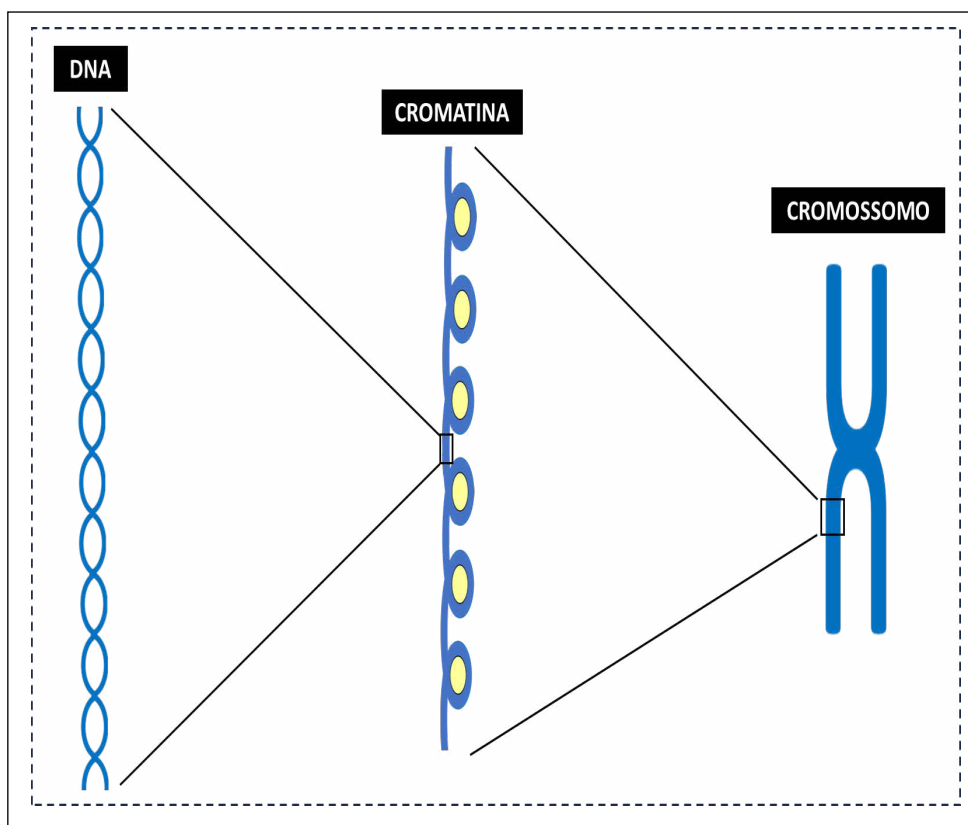


Figura 1.9: Ilustração mostrando a estrutura do DNA, cromatina e cromossomo. As regiões ampliadas pelos retângulos são meramente ilustrativas, o objetivo é demonstrar os diferentes níveis de compactação entre eles.

Os centrômeros serão muito importantes para a separação do DNA durante a divisão celular e dividem o cromossomo em duas partes, ou simplesmente dois 'braços cromossômicos'. A posição do centrômero pode variar, e de acordo com a sua localização os cromossomos são classificados como: metacêntrico (centrômero em posição mais ou menos central), submetacêntrico (centrômero longe da posição central) e acrocêntrico (centrômero próxima à extremidade do cromossomo). Quando o centrômero não ocupa posição central, os braços cromossômicos terão tamanhos diferentes, sendo um maior (braço longo, representado pela letra 'q') e um menor (braço curto, representado pela letra 'p'), como pode ser observado na figura 1.10.

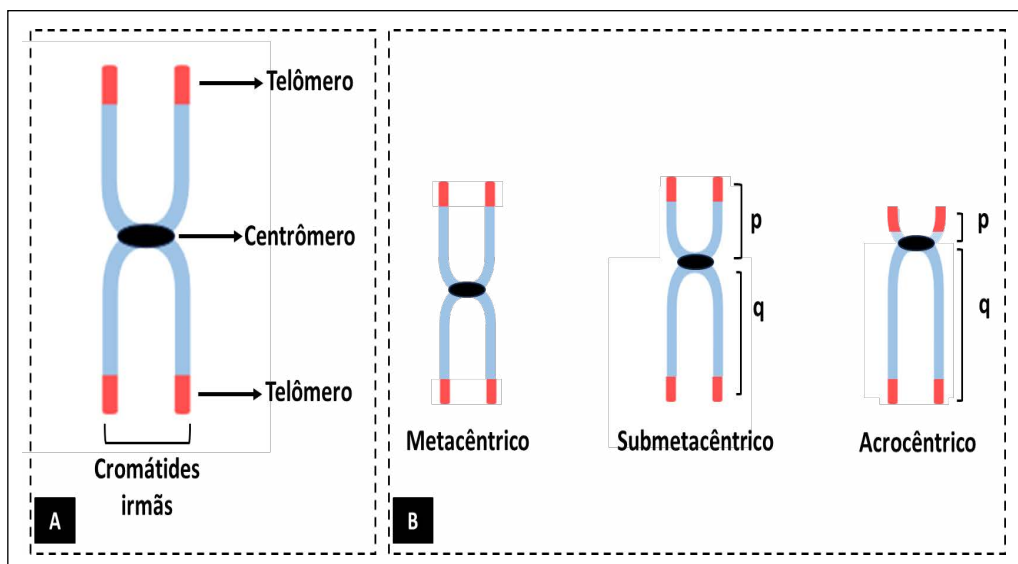


Figura 1.10: A) Ilustração apresentando a estrutura de um cromossomo e seus componentes e B) Classificação dos cromossomos de acordo com a posição do centrômero (note que o braço curto é representado pela letra 'p' e o longo pela letra 'q').

Para finalizarmos nossa discussão sobre a estrutura dos cromossomos, é importante falarmos sobre suas extremidades, chamadas telômeros. Nessa região existem sequências curtas de nucleotídeos que se repetem várias vezes uma ao lado da outra, que são fundamentais para proteger toda informação contida ao longo do cromossomo. Isso porque a cada vez que a célula vai copiar o seu DNA, os telômeros vão encurtando gradualmente, até chegar um momento em que eles estão muito curtos e, para evitar que a célula perca regiões do DNA importantes para o seu funcionamento, ela entra em senescência celular, o que faz parte do processo de envelhecimento.

Agora que já conhecemos os cromossomos, a pergunta é: quantos cromossomos encontramos em uma célula humana? Considerando que tudo começa com a união dos gametas masculino e feminino, cada um contendo 23 cromossomos em seu interior, nossas células somáticas (qualquer célula do corpo humano, exceto os gametas), possuem 46 cromossomos. Herdamos um conjunto cromossômico completo (representado pela letra 'n' = haplóide) de cada genitor, dessa maneira, cada célula possui dois conjuntos cromossômicos ($2n$) e é chamada diplóide. Portanto, o cariótipo humano é diplóide ($2n = 46$), sendo que apenas os gametas são haplóides ($n = 23$). Dos 23 pares de cromossomos humanos, 22 são comuns entre homens e mulheres, sendo chamados de autossomos. Observa-se uma diferença apenas no último par, os 'cromossomos sexuais': XX em mulheres e XY em homens (figura 1.11).

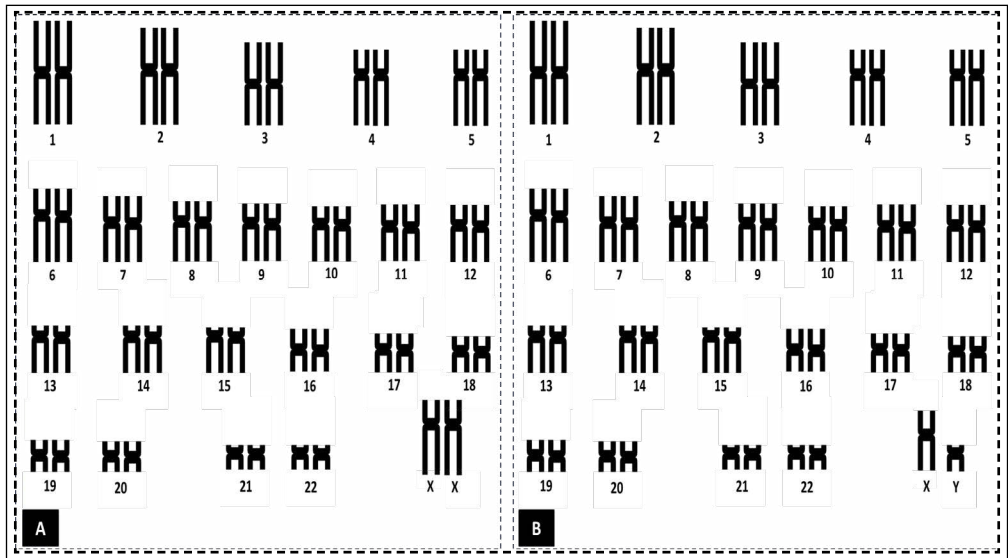


Figura 1.11: Ilustração mostrando o cariótipo humano. A) Feminino e B) Masculino. Note que o último par corresponde aos cromossomos sexuais XX / XY.

1.3 - REPLICAÇÃO

Discutimos anteriormente nesse capítulo que a célula faz uma cópia do seu DNA durante a fase S da interfase. Esse processo, também chamado de ‘replicação’ é um evento celular muito importante, por isso vamos abordar suas principais características a partir de agora.

O objetivo desse processo é um só: produzir uma cópia idêntica da molécula de DNA já existente na célula. Vamos começar com uma visão resumida do processo e então vamos detalhando cada etapa, ok? Inicialmente a célula separa as cadeias de nucleotídeos do DNA, em seguida uma enzima chamada DNA polimerase usa cada uma das cadeias como um ‘molde’ e produz a cadeia de nucleotídeos complementar. Com isso, já podemos entender uma característica funda-

mental da replicação: ela é semiconservativa, ou seja, ‘conserva’ uma das cadeias existentes e a usa como molde para produção da nova cadeia. Assim, na nova molécula de DNA produzida, uma cadeia de nucleotídeos é original e a outra é nova (figura 1.12). Parece tão simples, não? Na verdade, esse é apenas o nosso ‘ponto de partida’, vamos conhecer outros aspectos fundamentais desse processo, a partir de agora.

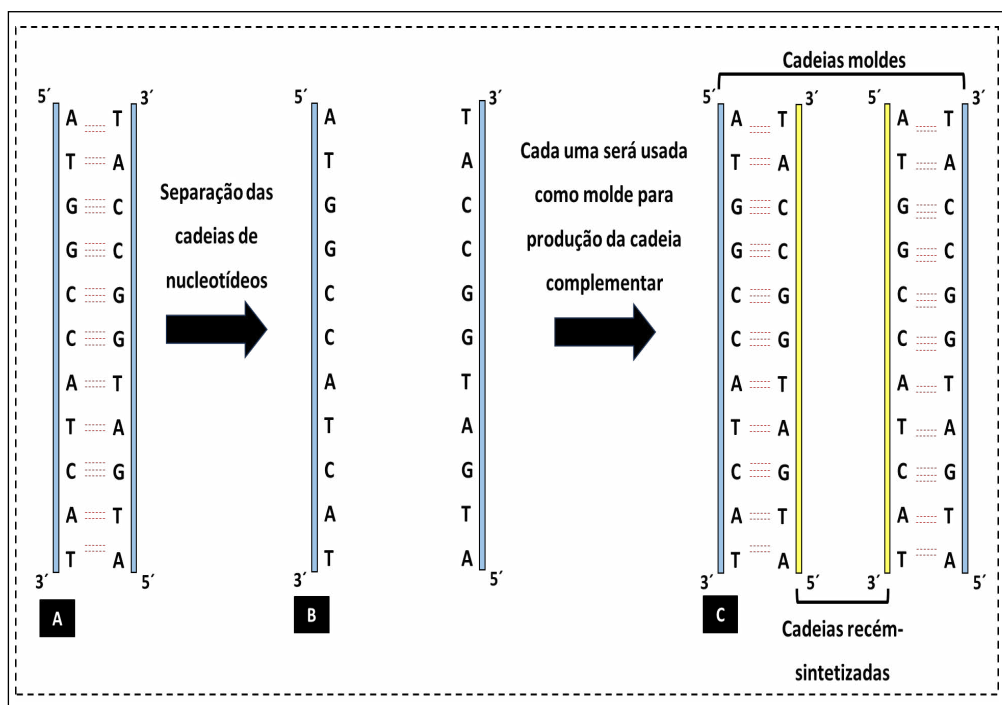


Figura 1.12: Ilustração mostrando que a replicação do DNA é semiconservativa. A) Molécula de DNA que será duplicada; B) Separação das cadeias de nucleotídeos e C) Cada cadeia serviu como molde para produção da cadeia complementar.

A separação das cadeias de nucleotídeos do DNA não acontece espontaneamente, mas é realizada pela enzima Helicase, que vai ‘abrindo’ aos poucos o DNA. Inicialmente, a separação das cadeias

ocorre em uma pequena região do DNA, onde observam-se duas ‘forquilhas de replicação’: locais de união entre as duas fitas-molde recém separadas e o dupla fita de DNA ainda não replicado. Assim que a cópia dessa região inicial é concluída, a separação das cadeias ‘avança’ para os dois lados e novamente uma nova região do DNA é separada e copiada em seguida. Agora podemos entender outra característica fundamental da replicação: ela é bidirecional, ou seja, avança para as duas direções a partir do local onde a dupla fita de DNA começou a ser separada (figura 1.13).

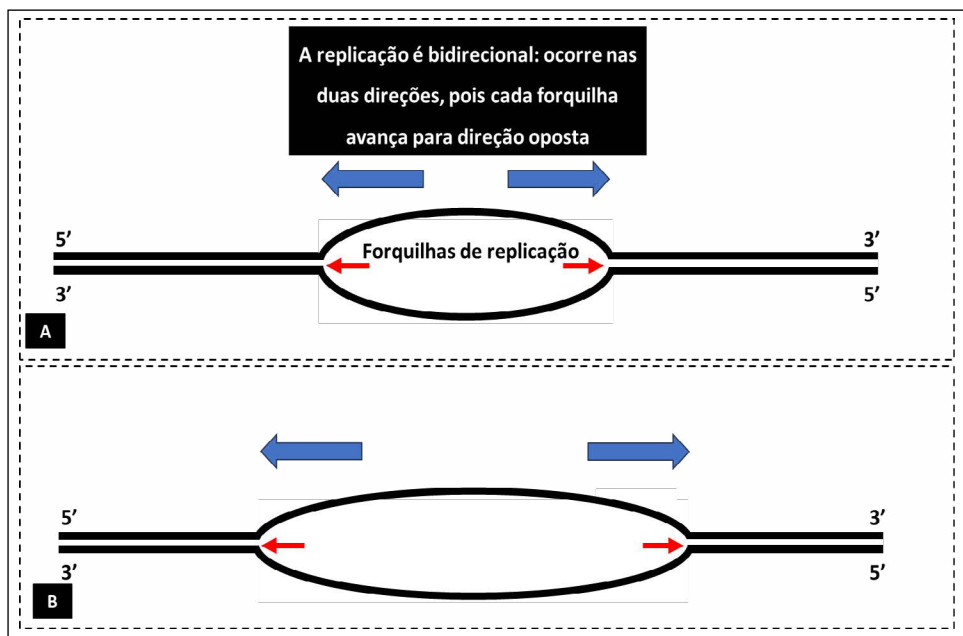


Figura 1.13: Ilustração mostrando que a replicação do DNA é bidirecional (nas duas direções). Note em 'A' e 'B' o avanço das forquilhas de replicação para direções opostas.

Uma vez que as cadeias estão separadas, elas serão mantidas na forma de fita simples por ‘proteínas de ligação ao DNA de fita sim-

ples', as quais se ligam a cada cadeia de nucleotídeo e evitam que a dupla fita se forme novamente. A questão agora é a seguinte: conforme vamos avançando com a separação das cadeias, uma 'torção adicional' é gerada na região que está na frente de cada forquilha de replicação. Nessa etapa, enzimas conhecidas como Topoisomerases são responsáveis por remover essas torções e superespirais e agem da seguinte maneira: 1) elas quebram uma das fitas de DNA (ou as duas), o que permite que o DNA rotacione (gire) se tornando novamente uma molécula relaxada e 2) unem novamente as cadeias de nucleotídeos.

A terceira característica da replicação do DNA é que ela é semidescontínua. O ponto agora é: o que isso significa? Vamos lá, é apenas mais um aspecto incrível desse processo! A enzima DNA polimerase só realiza a síntese do DNA no sentido 5' para 3', e ela simplesmente não consegue iniciar o processo (ou seja, colocar os primeiros nucleotídeos). A solução do problema é usar outra enzima para essa etapa inicial. Quem entra em ação nesse momento é uma RNA polimerase, que se baseia na cadeia molde e inicia a produção da cadeia nova colocando os primeiros nucleotídeos, na verdade uma sequência curta com aproximadamente 11 nucleotídeos, que é chamada *primer*. Uma vez que a cópia foi iniciada, a DNA polimerase dá continuidade a cópia do DNA a partir do *primer*. Portanto, conforme a 'forquilha de replicação' vai avançando e separando as cadeias de nucleotídeos, uma das fitas que servirá como molde para cópia do DNA

está na mesma direção que a forquilha de replicação se move. Essa será chamada fita contínua (principal / líder) e nesse caso o *primer* será colocado apenas uma vez no início da replicação, permitindo que a sua síntese ocorra de forma contínua. A outra fita, no entanto, está na direção oposta à que forquilha avança e, mesmo nesse caso, a cópia do DNA acontecerá de 5' para 3'. Para isso, conforme as cadeias de nucleotídeos vão sendo separadas, um novo *primer* é colocado na região 5' da fita e a partir dele a síntese do DNA será realizada. Portanto, nesse caso a um novo *primer* é colocado cada vez que uma nova região do DNA é exposta, e a síntese ocorre de forma descontínua, ou seja, de 'pedaço em pedaço', sendo cada fragmento chamado 'fragmento de Okasaki' em homenagem ao cientista que o descreveu (essa é chamada fita 'descontínua' / 'tardia'). Por isso a replicação é semidescontínua, visto que das duas novas cadeias que foram produzidas, a síntese de uma foi contínua, ao passo que a da outra foi descontínua. É importante destacarmos mais um ponto: vocês perceberam que quem começa a cópia do DNA é uma RNA polimerase? Isso significa que os nucleotídeos que ela coloca são nucleotídeos de RNA (ribonucleotídeos), e não de DNA (desoxinucleotídeos). E agora, podemos deixar assim mesmo? Não!!!! Será preciso removê-los, tarefa realizada pela enzima DNA polimerase I, que além de retirá-los também é capaz de inserir no lugar nucleotídeos de DNA no lugar. Por fim, a enzima DNA ligase une cada um dos fragmentos de Okasaki. Ufa! (figura 1.14).

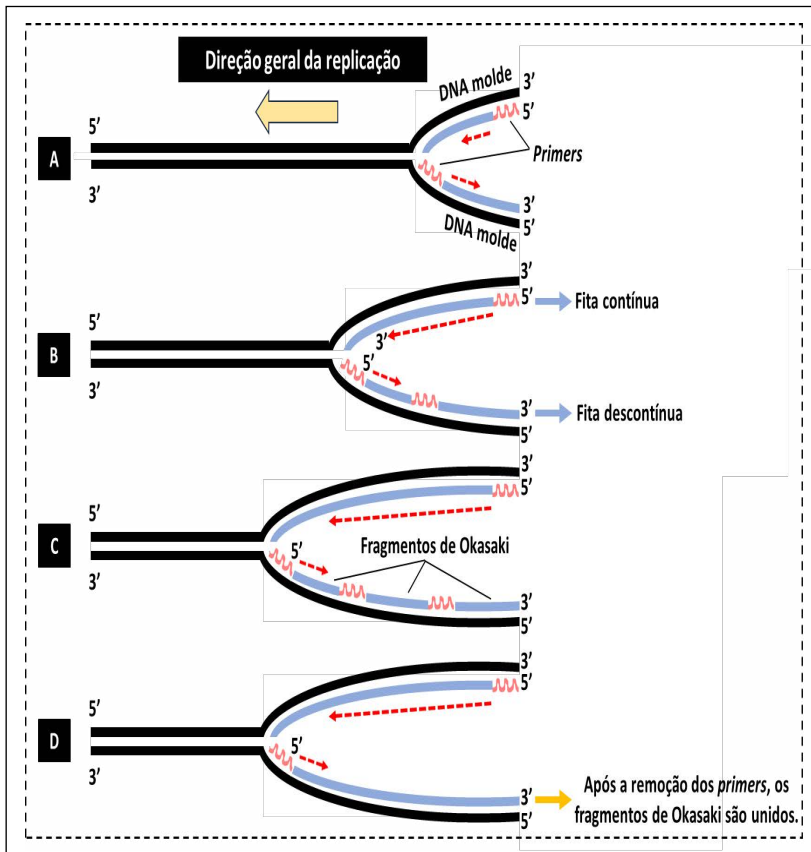


Figura 1.14: Ilustração mostrando que a síntese de DNA é semidescontínua. Note em 'A', 'B' e 'C' o avanço da forquilha de replicação, com isso uma cadeia é produzida de forma contínua e a outra de forma descontínua, gerando vários 'fragmentos de Okasaki'. Em 'D' observe que na fita descontínua, após a síntese de DNA os *primers* são removidos e os fragmentos de Okasaki unidos entre si. Observação: o avanço da síntese de DNA em apenas uma forquilha de replicação é apresentado.

Por fim, vamos falar brevemente sobre a cópia do DNA nos telômeros (as extremidades dos cromossomos). Essa região é formada por sequência curta (em humanos 5' TTAGGG 3') que se repete várias vezes uma ao lado da outra, chamadas repetições *em tandem* (exemplo: 5' TTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'). Na síntese da 'fita contínua' não haverá nenhum problema para cópia dessa região. No en-

tanto, para a 'fita descontínua', lembre-se que primeiro será colocado um *primer* que em seguida deve ser removido. Uma vez que ele foi retirado, como copiar essa extremidade do DNA? Uma enzima chamada Telomerase possui em sua estrutura uma pequena sequência de RNA, o qual é utilizado como molde a partir do qual ela produz as sequências repetidas presentes nas regiões teloméricas (figura 1.15).

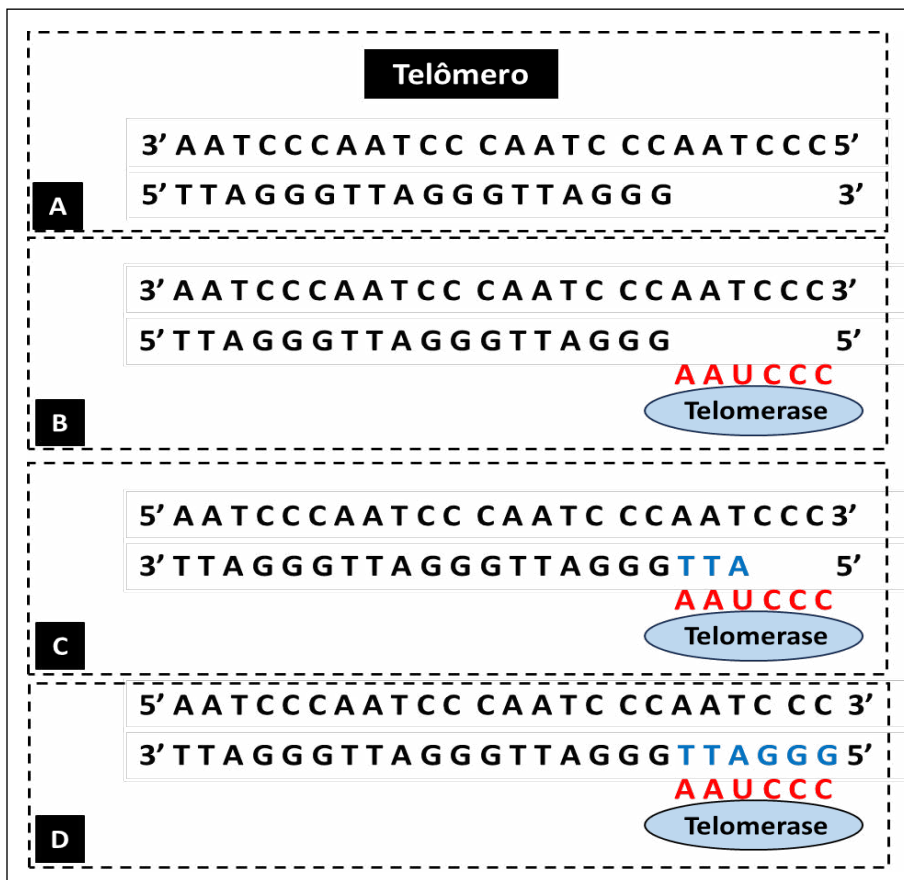


Figura 1.15: Ilustração mostrando em 'A', 'B', 'C' e 'D' a ação da telomerase durante a replicação dos telômeros.

REFERÊNCIAS

Griffiths, Anthony J., F. et al. Introdução à Genética. Disponível em: Minha Biblioteca, (12th edição). Grupo GEN, 2022.

Junqueira, L., C. e José Carneiro. Biologia Celular e Molecular. Disponível em: Minha Biblioteca, (10th edição). Grupo GEN, 2023.

Robertis, Edward M., D. e José Hib. De Robertis Biologia Celular e Molecular. Disponível em: Minha Biblioteca, (16th edição). Grupo GEN, 2014.



Do DNA às proteínas

O DNA é o ‘banco de informação genética’. Nele a célula encontra, por exemplo, a informação necessária para a produção de suas proteínas (moléculas fundamentais na execução da maioria das funções celulares). Mas como essa informação está armazenada? E como ela é usada? Ao longo desse capítulo, vamos analisar aspectos fundamentais do DNA para que você compreenda como isso é realizado por essa molécula.

O papel do DNA na produção de proteínas é algo que está bem estabelecido há muito tempo. As proteínas são moléculas fundamentais pois executam a maioria das funções celulares (observação: alguns RNAs também desempenham esse papel), sendo então produzidas pelas células de acordo com a sua necessidade: quando ela precisa e na quantidade necessária. Uma vez que as proteínas são produzidas, elas realizam suas funções celulares por um período e então começam a ‘perder sua atividade / ficar desgastada pelo uso / ou simplesmente não são mais necessárias’, sendo então eliminadas. Quando preciso, uma nova proteína idêntica à anterior será produzida. A questão agora é: como a célula sabe exatamente como será essa proteína? Essa informação está armazenada no DNA, mais precisamente em um gene para RNAm (RNA mensageiro), portanto, sempre que a célula precisa produzir uma proteína, ela terá a sua disposição o ‘molde’ para sua produção nele.

Uma vez que a informação necessária para a produção das proteínas está armazenada nos genes para RNAm, como exatamente ela é usada? Já pararam para pensar como é a estrutura desse tipo de gene e como é a produção do RNAm e da respectiva proteína? Como a célula é capaz de reconhecer o início e fim do gene de interesse? Como é, afinal de contas, o controle para que determinada proteína seja produzida somente em um momento específico e na quantidade necessária? Bem, vamos obter a resposta para cada uma dessas

perguntas ao longo desse capítulo. Falaremos especificamente de eucariontes, mas é importante ter em mente que procariontes também são capazes de produzir RNAm e proteínas, no entanto apresentam algumas características únicas para esses processos, ok?

2.1 - ESTRUTURA DE UM GENE PARA RNAm

A função desse tipo de gene está bem definida para as células: é nele que se encontra a informação necessária para produzir uma proteína. Ao analisar esse tipo de gene, nota-se a presença de regiões específicas fundamentais para o seu funcionamento, as quais serão descritas a seguir e estão apresentadas na figura 2.1.

Região codificante: corresponde a sequência de nucleotídeos que será usada para produção do RNAm, ou seja, onde de fato está a informação para produção da proteína. Em eucariontes, essa região é dividida em éxons (sequências que serão transcritas e traduzidas) e íntrons (sequências que serão transcritas, mas não serão traduzidas), conforme abordaremos adiante ainda nesse capítulo.

Região promotora: nessa região encontram-se sequências importantes para o início adequado da transcrição (o local onde a enzima RNA polimerase se liga), e que também desempenham um papel importante no controle da expressão gênica. Normalmente, é caracterizada pela presença das sequências CAAT e TATA, por exemplo, que se localizam antes, ou 'rio acima' (*up stream* em inglês) da região que

de fato será transcrita, a região codificante. Além disso, alguns promotores apresentam uma alta proporção dos nucleotídeos citosina e guanina (as ilhas CpG – o ‘p’ é o grupo fosfato que fica entre os nucleotídeos adjacentes). Acredita-se que tais regiões podem ser importantes tanto para a ligação de algumas proteínas chamadas fatores de transcrição, quanto para a metilação do DNA, o que estaria associado à repressão da expressão gênica (isso porque a estrutura da cromatina será alterada, o que será abordado adiante nesse capítulo).

Região reguladora (acentuadores e inibidores): localizada antes ou ‘rio acima’ à região promotora (pode estar bem distante, na verdade). A sequência de nucleotídeos presente nessa região é única para cada gene (ao contrário do observado na região promotora). Isso é importante pois essa é a região responsável por um aumento ou redução acentuados da transcrição. Portanto, nesse caso é preciso um controle específico, que permita que cada gene seja individualmente seja ‘ativado’ ou ‘inibido’ de acordo com as necessidades da célula.

Sinais de término (ou sequência de finalização): ainda não foi totalmente identificada. No entanto, frequentemente se encontra a sequência AATAAA em uma região anterior a ela.

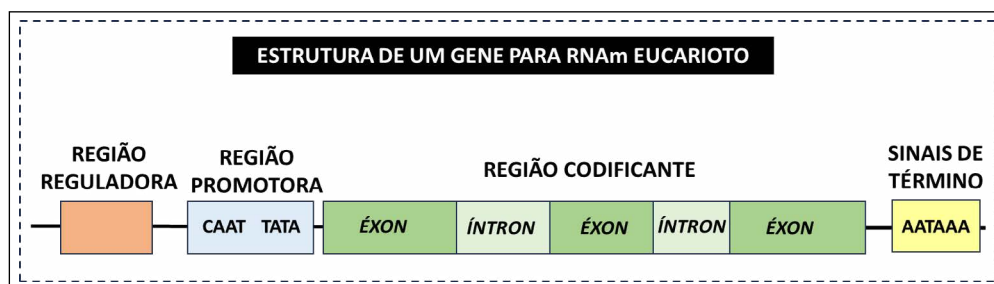


Figura 2.1: Ilustração mostrando as principais regiões de um gene para RNAm de eucariotos.

Agora que já conhecemos a estrutura desse gene, vamos analisar como a célula ‘usa’ a informação que ele contém na produção de proteínas, ok?

2.2 - TRANSCRIÇÃO

Como a célula usa a informação contida no DNA para produzir uma proteína? Inicialmente, ela produz uma molécula de RNAm, onde toda informação necessária para síntese proteica estará armazenada. Mas como a célula produz uma molécula de RNAm? Bem, a resposta em si é simples: através de um processo chamado ‘transcrição’, que vamos conhecer a partir de agora.

Esse evento celular pode ser resumido da seguinte forma: a célula analisa o nucleotídeo presente no DNA, e coloca o complementar para formar o RNAm (observação: lembre-se que o RNA não tem o nucleotídeo timina, portanto em seu lugar coloque a uracila). Um exemplo de como esse processo deve ser feito é apresentado na figura 2.2. Quando um gene está sendo transcrito, podemos afirmar dizer que a célula está ‘expressando esse gene’.

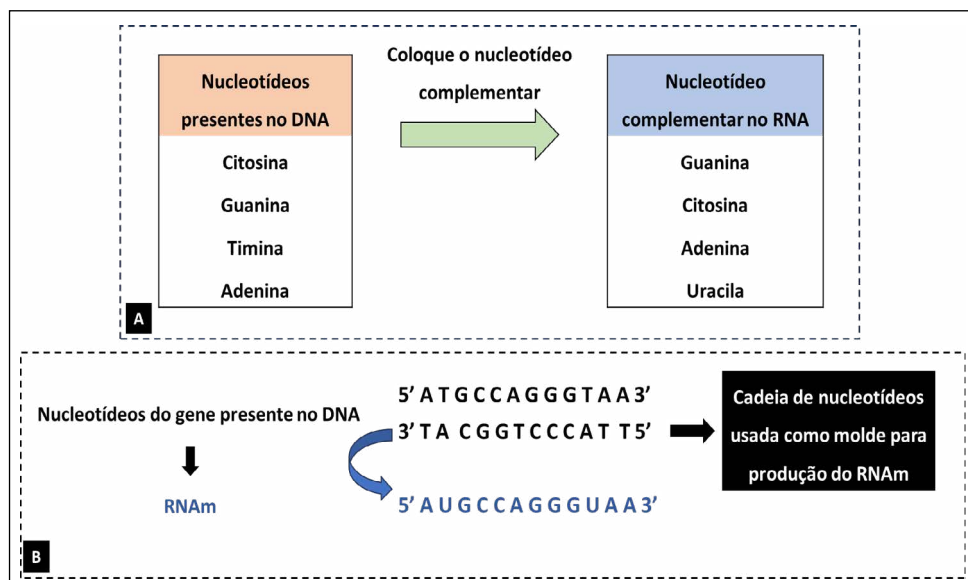


Figura 2.2: Ilustração simplificada da transcrição. A) Como usar a informação presente no DNA para produção do RNA e B) Exemplo da produção do RNAm a partir do DNA.

Uma vez que já temos uma ‘visão geral desse processo’, vamos nos aprofundar para compreender exatamente como a RNA polimerase (RNA polimerase III em eucariontes), enzima responsável pela produção do RNAm, realiza a sua tarefa, que é dividida em 3 etapas: I) iniciação; II) alongamento e III) término.

I) Início: etapa em que ocorre a ligação da RNA polimerase (em eucariontes, juntamente com outras proteínas chamadas ‘fatores gerais de transcrição’ – GTFs da sigla em inglês) na região promotora do gene. A participação dos GTFs é importante, por exemplo, pois a RNA polimerase não consegue reconhecer as sequências promotoras do gene (sendo guiada, portanto, pelos GTFs). Após a ligação da RNA polimerase ao promotor do gene, o DNA se ‘desenrola’ e a ligação

entre os pares de bases é rompida, separando as cadeias de nucleotídeos, resultando no começo da transcrição (que também ocorre de 5' para 3') (figura 2.3).

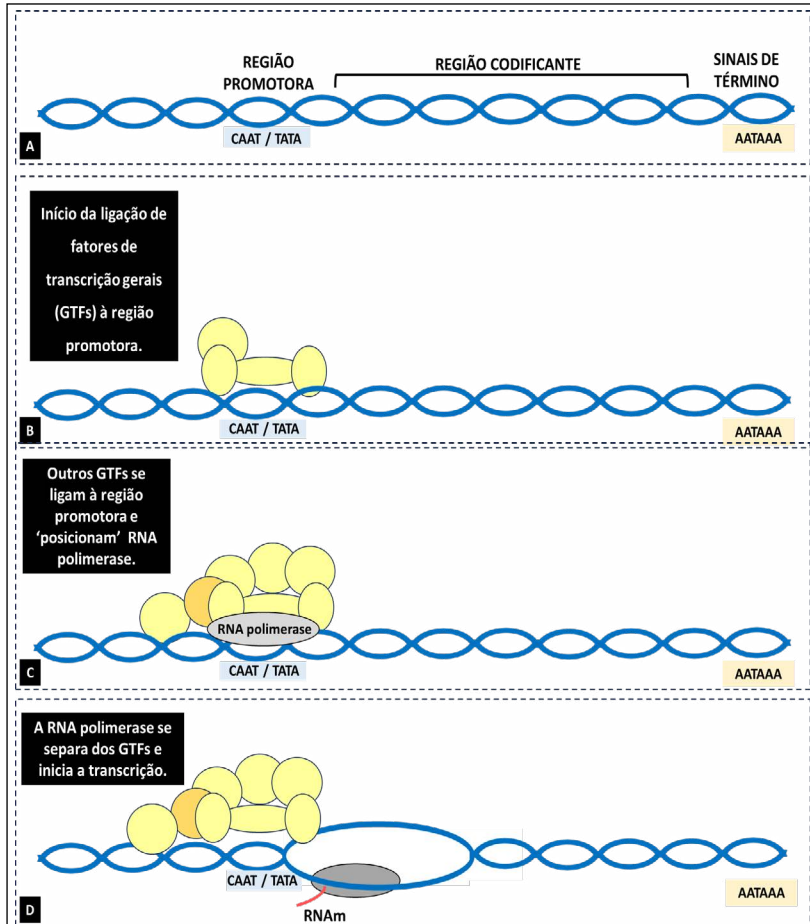


Figura 2.3: Ilustração mostrando o início da transcrição em eucariontes. Note em 'A' as regiões fundamentais de um gene para RNAm para esse processo, em 'B' e 'C' os fatores de transcrição (em amarelo) se ligando ao promotor do gene e 'posicionando' a RNA polimerase. Finalmente, em 'D' a enzima avança e inicia a produção do RNAm.

II) Alongamento: uma vez que a sequência inicial de nucleotídeos foi produzida, a RNA polimerase dá continuidade ao processo. É incrível notar que a mesma enzima produz o RNAm, 'desenrola' o DNA

a sua frente e ‘enrola’ novamente o DNA na região onde a transcrição já aconteceu (figura 2.4).

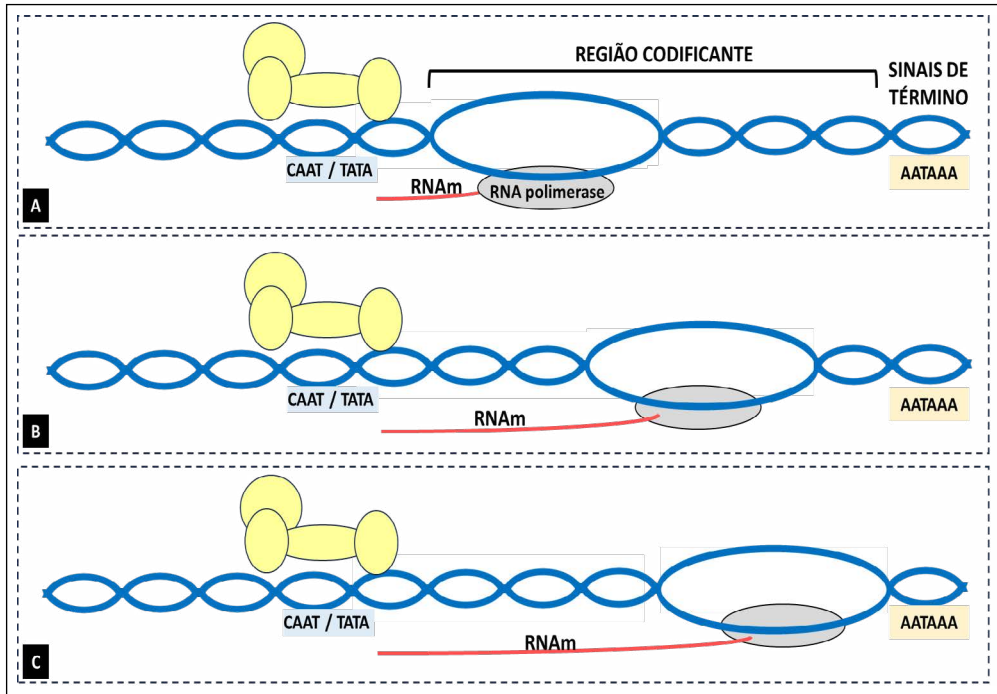


Figura 2.4: Ilustração mostrando em ‘A’, ‘B’ e ‘C’ o avanço da etapa de ‘alongamento’ da transcrição. Note que a enzima RNA polimerase percorre a região codificante, produzindo o RNAm correspondente.

III) Término: após transcrever de todo gene (mais precisamente, a região codificante) a RNA polimerase se separa do DNA molde e libera o RNAm produzido. Essa etapa final para a RNA polimerase III é desencadeada por sequência específica (presença de uma região rica em pares GC seguida de uma sequência de adeninas) (figura 2.5).

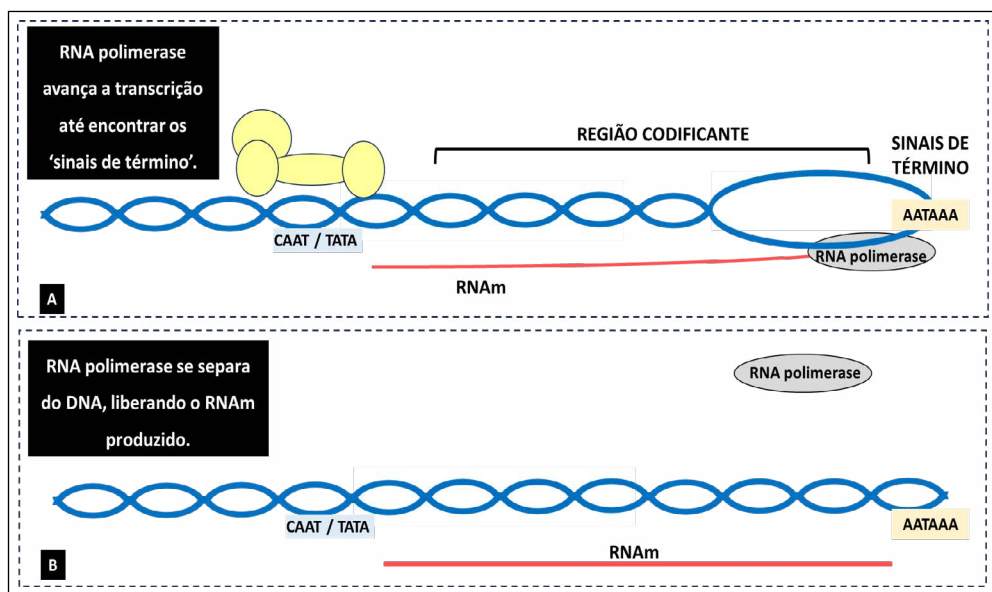


Figura 2.5: Ilustração mostrando o término da transcrição em eucariotos. 'A' a RNA polimerase encontra os 'sinais de término' e em 'B' ela já foi liberada, assim como o RNAm produzido.

PROCESSAMENTO DO RNAm EM EUCARIOTOS

Essa é uma característica exclusiva de eucariotos, e tem como consequências mudanças tanto na estrutura quanto na função do RNAm. Esse processamento envolve diferentes eventos, sendo que alguns ocorrem simultaneamente a transcrição.

Mas por que isso acontece, afinal de contas? Um aspecto determinante é a presença do núcleo celular em eucariotos, pois é nele que a transcrição acontece. No entanto, como a produção da proteína (ou simplesmente tradução), acontece no citoplasma, portanto o RNAm deve sair núcleo em direção ao citoplasma. Por isso, é preciso desenvolver estratégias para proteger as extremidades 5'e 3' da molécula da degradação, conforme descrito abaixo.

assim como o tamanho dessas regiões, varia de acordo com o gene analisado e entre diferentes organismos.

Portanto, ao final da transcrição teremos um transcrito primário, ou pré-RNA, que ainda passará por algumas alterações importantes, entre elas a remoção dos íntrons através de um processo chamado '*splicing*' ou 'recomposição'. Alguns detalhes desse processo chamam a atenção pela sua precisão. Por exemplo, como saber exatamente onde é um íntron ou um éxon? A resposta está na existência de sequências de nucleotídeos específicas nos limites íntron/éxon que mostram onde é o final de um éxon e o início de um íntron e vice-versa, e é a partir delas que a célula sabe o local exato da remoção de um íntron. Mais precisamente, a sequência GU marca o início do íntron, enquanto AG mostra o seu final. Além disso, outra região importante é encontrada no interior do íntron e conhecida como 'ponto de ramificação', onde se encontra uma 'adenina' muito conservada que é fundamental no processo de *splicing* (figura 2.7).

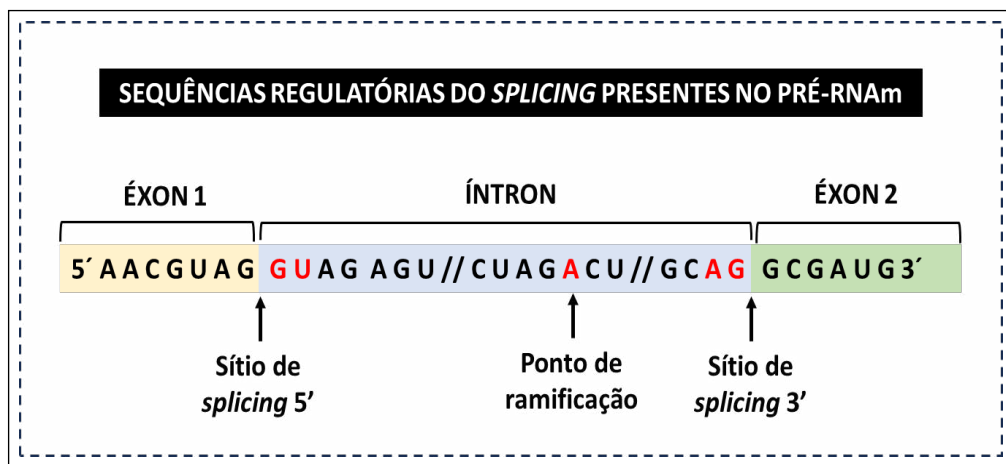


Figura 2.7: Ilustração mostrando sequências de nucleotídeos que indicam o início e fim do íntron e um ponto de ramificação, todas importantes para remoção precisa dessa sequência do pré-RNA_m.

Vamos começar a discutir outros aspectos importantes desse processo. Nesse caso, não há nenhuma enzima específica atuando, e sim um grande complexo, ou simplesmente uma ‘máquina’ chamada *spliceossomo*, responsável pela remoção dos íntrons. Em sua estrutura encontram-se cinco tipos especiais de RNAs, os ‘pequenos RNAs nucleares’ (ou ‘snRNAs’, do inglês ‘*small nuclear RNAs*’): U1, U2, U4, U5 e U6, os quais estão complexados (associados) a várias proteínas, formando complexos RNA-proteínas chamados ‘pequenas proteínas ribonucleares’ (ou snRNPs, do inglês ‘*small nuclear ribonuclear proteins*’).

De uma forma simples e direta, para remoção do íntron os snRNPs reconhecem e se ligam ao sítio de *splicing* 5’ (sequência GU), ao ponto de ramificação e sítio de *splicing* 3’ (sequência AG). Em

seguida, é feito o corte no sítio de *splicing* 5', resultando na formação de um laço (*lariat*) e finalmente um corte na extremidade 3' do íntron. Consequentemente, ocorre a liberação do íntron e união dos éxons. Portanto, são as snRNPs que reconhecem os sítios de processamento e de ramificação, realizam o corte no RNA (ou ajudam nesse processo) e por fim fazem as reações de religação fundamentais para a união dos éxons (figura 2.8).

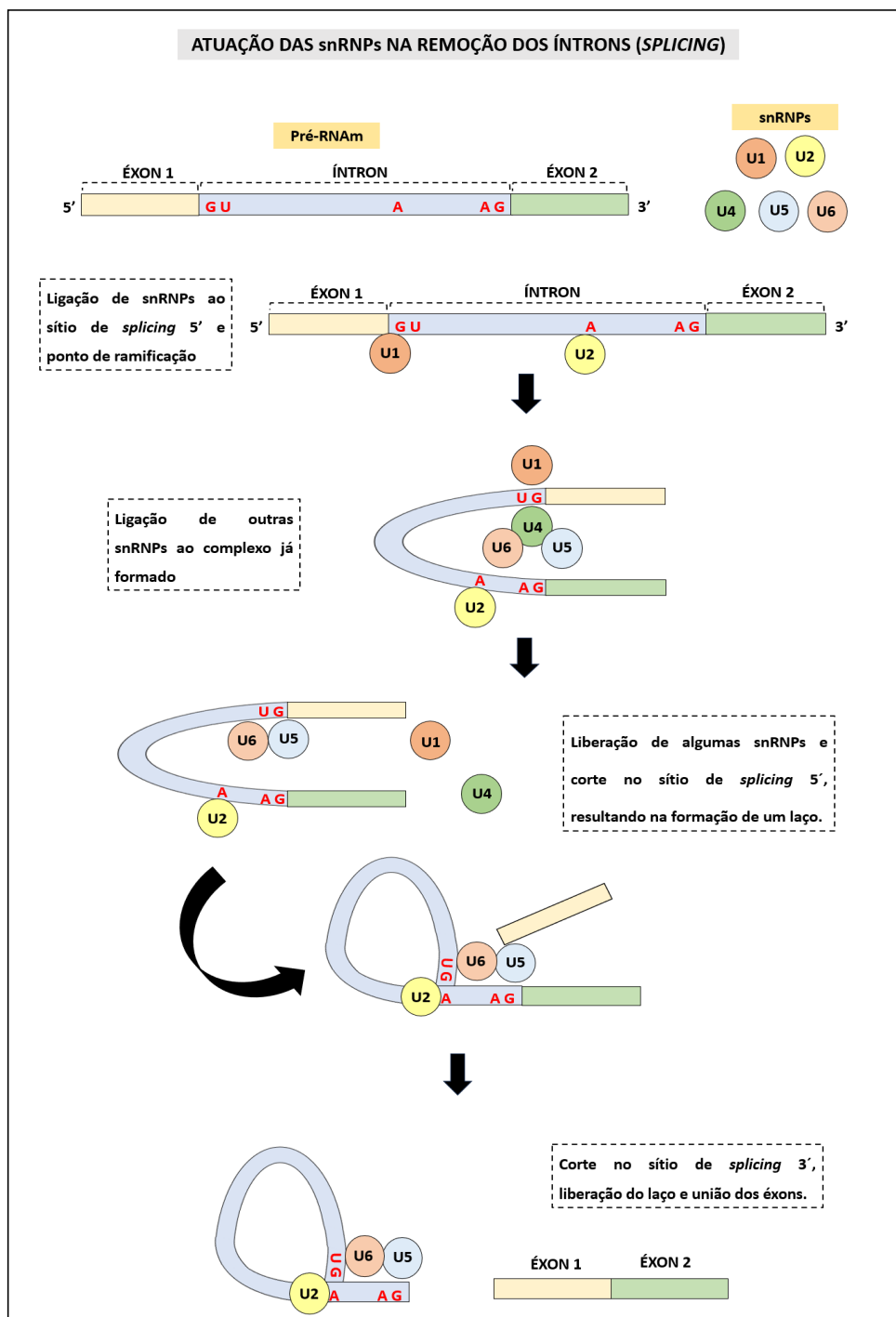


Figura 2.8: Ilustração mostrando as diferentes etapas da remoção dos íntrons, processo mediado pelas snRNPs.

A maioria dos íntrons são removidos dessa maneira, no entanto, embora sejam eventos raros, existem também os íntrons de autoprocessoamento, os quais são capazes de realizar sua autoexcisão e são divididos em dois grupos (I e II) de acordo com sua estrutura e mecanismo de processamento.

Você pode se perguntar: mas qual a vantagem na existência dos íntrons, uma região que é transcrita e em seguida removida? Não seria ‘trabalho dobrado’? A princípio é possível ter essa ideia em mente, mas na verdade não é tão simples assim, até porque as células não manteriam em processo se ele não fosse vantajoso para elas. O aspecto positivo nesse caso é que a região codificante foi ‘dividida’ em blocos, os éxons, que podem ser combinados de diferentes maneiras. Essa ‘combinação alternativa’ é chamada ‘*splicing*’ (ou processamento) alternativo e permite que a partir de um gene diferentes proteínas (chamadas isoformas) sejam formadas (figura 2.9). Dessa maneira as células são capazes de ampliar o seu proteoma (conjunto de proteínas produzidas) a partir dos genes existentes em seu DNA. Para se ter uma ideia da importância desse evento, atualmente acredita-se que cerca de 90% dos genes humanos passem pelo ‘*splicing*’ alternativo, permitindo que a partir de um gene sejam produzidas duas ou mais isoformas da proteína.

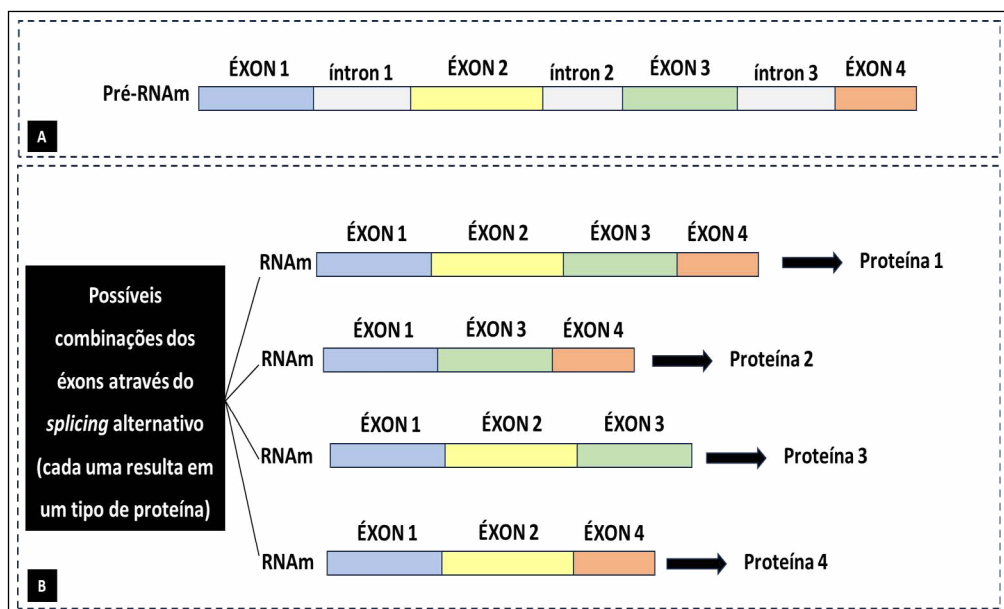


Figura 2.9: A) Pré-RNAm contendo íntrons e éxons e B) Através do *splicing* alternativo, as diferentes combinações dos éxons permitem a produção de diferentes proteínas.

Um aspecto muito interessante com relação ao '*splicing*' alternativo é que esse evento é específico para cada tipo de tecido do corpo humano (é 'tecido específico'). Por exemplo, a partir do 'gene 1' será produzida uma isoforma da proteína em um fibroblasto, que será diferente em um neurônio, e assim por diante. Ainda existem muitos aspectos a serem compreendidos sobre como é feito o controle desse evento celular, mas sabe-se que existem uma variedade de 'fatores de *splicing*', considerados fatores intrínsecos (por se encontrarem no interior da célula), além de fatores extracelulares, como estresse mecânico, por exemplo, que são fundamentais nesse contexto. Alterações ou erros nesse processo estão associados a algumas doenças em humanos como câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes,

por exemplo. Isso porque se a combinação de éxons não ocorrer da maneira correta, a proteína final produzida será diferente e, nesse caso, acaba colaborando para a instalação de uma patologia.

EDIÇÃO DO RNA

Além das modificações já descritas acima, a molécula de RNAm passa ainda por um processo de edição após a sua transcrição, o que permite alterar a sua sequência final. Mas o que ocorre nesse momento, afinal de contas? A remoção de um grupo amina de um nucleotídeo por uma enzima desaminase (desaminação). Vamos entender melhor esse processo analisando alguns exemplos a partir de agora.

A desaminação é um processo tecido-específico que ainda é alvo de muitos estudos para ser completamente compreendido. Nesse caso, a molécula passa por uma modificação enzimática que, por exemplo, converte a adenosina (um nucleosídeo formado pela base nitrogenada adenina e a ribose) em inosina (troca de A para I). Ou seja, uma enzima remove um grupo amina da adenosina, que é então convertida em inosina. É importante ressaltar que a inosina agora pode parear com a citosina. Dessa maneira, inicialmente, ocorreria o pareamento 'A' com 'U', mas 'I' agora pareia com 'C', o que modifica a sequência da proteína que será produzida a partir desse RNAm. Esse evento ocorre em um canal iônico no cérebro de mamíferos, levando a troca de apenas um aminoácido na proteína e alterando a sua permeabilidade ao cálcio. Pode parecer simples, mas a ausência desse

processo compromete gravemente o desenvolvimento cerebral.

Outro exemplo desse processo envolve a citosina, que será convertida em uridina (troca de C para U). Por se tratar de um evento tecido específico, essa desaminação pode ser observada em células intestinais, mas não em células hepáticas, por exemplo. Como resultado, a proteína produzida em cada órgão é diferente, executando funções diferentes. Incrível não?

2.3 - CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

As propriedades biológicas das células são determinadas pelas proteínas presentes em seu interior. No entanto, embora cada tipo de célula, como um neurônio ou um hepatócito (célula do fígado), por exemplo, apresente em seu interior conjuntos específicos de proteínas, o DNA de ambas é igual. Isso mesmo! Não parece contraditório? O segredo é: embora a informação para produção de qualquer proteína que a célula precise está presente no DNA de todas as células, elas controlam o uso dessa informação de tal forma que somente aquelas necessárias à execução de suas funções são produzidas (figura 2.10).

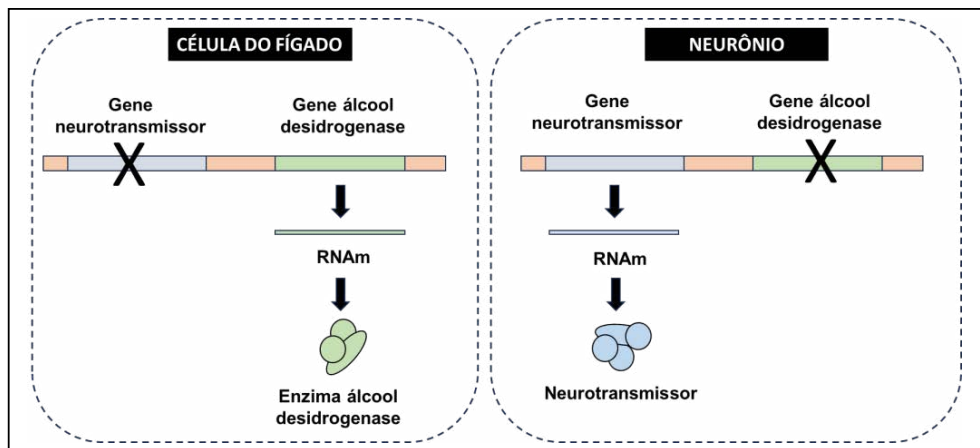


Figura 2.10: Ilustração mostrando que, embora o DNA das células seja o mesmo, elas 'usam' somente a informação necessária à execução de suas funções.

Outro aspecto importante é que as células são capazes de monitorar o seu ambiente em que se encontram, alterando o seu padrão de expressão gênica de acordo com os sinais externos recebidos.

Vamos analisar a partir de agora como ela controla a expressão dos seus genes. Em eucariotos, a maioria dos genes está 'desligada', portanto o que acontece com maior frequência é uma regulação positiva, que resulta na ativação da transcrição (expressão) do gene de interesse. Além disso, embora a expressão gênica possa ser regulada em diferentes etapas, a maioria dos genes é controlada a nível transcricional, ou seja, permitindo ou não que o RNAm seja produzido.

Em eucariotos, a enzima RNA polimerase só consegue se ligar ao promotor do gene com a ajuda de proteínas chamadas fatores gerais de transcrição, que por sua vez reconhecem e se ligam a regiões específicas do DNA (acredita-se que as regiões ricas em nucleotídeos citosina e guani-

na nos promotores sejam importantes para a ligação dessas proteínas).

A ligação da enzima RNA polimerase à região promotora do gene resulta na transcrição em níveis basais. No entanto, nesse momento a participação da região reguladora é fundamental, portanto, é importante ter em mente que ela é composta por sequências que estão mais próximas ao promotor do gene ('proximais') enquanto outras podem estar bem distantes ('distais'). Não é intrigante imaginar como todos esses elementos, de perto ou de longe, atuam no controle da expressão gênica? Bem, o fato é que todos eles conseguem interagir entre si graças à formação de uma alça que os aproxima (uau!!!). Mas como essas regiões todas controlam a expressão de um gene? Bem, isso é possível graças à participação de diferentes proteínas, que podem ser divididas em duas categorias: I) proteínas reguladoras, que se ligam diretamente ao DNA, como os acentuadores (ou *enhancers* – do inglês) e os fatores gerais de transcrição (GFTs) e II) proteínas correguladoras, que não se ligam diretamente ao DNA e podem ser coativadoras ou correpressoras, as quais aumentam ou reduzem o nível de transcrição (figura 2.11). Finalmente, é importante ressaltar que diferentes proteínas podem estar associadas às regiões reguladora e promotora num determinado momento, o que é chamado de 'regulação/interação combinatória'. Dessa forma, de acordo com a 'combinação de proteínas reguladoras e correguladoras', é possível criar diferentes padrões de expressão gênica. Assim, a célula é capaz de iniciar ('ligar') a transcrição de um gene, ajustar exatamente o padrão necessário para a condição em que se encontra e, por fim, interromper ('desligar') esse processo. Isso é realmente incrível!

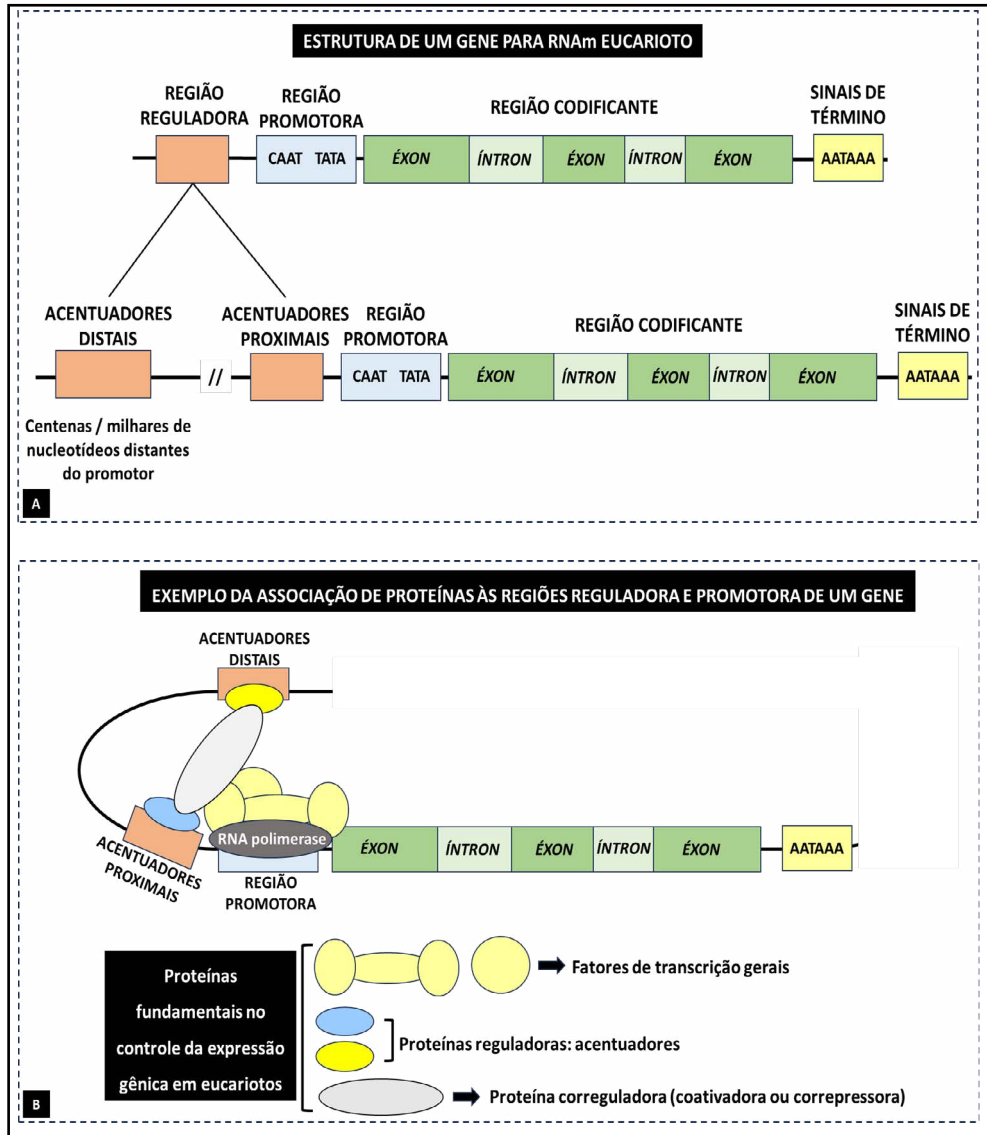


Figura 2.11: Ilustração mostrando aspectos fundamentais da participação de proteínas no controle da expressão gênica em eucariotos. A) Detalhes da estrutura de um gene para RNAm (note a região reguladora) e B) Formação de uma alça que aproxima os diferentes elementos da região reguladora do gene entre si e ao promotor, bem como a associação de diferentes proteínas à cada uma delas.

A associação dos diferentes tipos proteínas reguladoras e correguladoras ao DNA sem dúvida é fundamental no controle da expressão gênica em eucariotos. No entanto, outro aspecto determinante nesse contexto é o fato de DNA estar associado a proteínas chamadas histonas, formando a cromatina. Isso porque remodelagem da cromatina também exerce um papel fundamental no controle da expressão gênica: de forma bem simplista, condensando 'desliga' genes e descondensando 'liga' genes. Mas como isso acontece, afinal de contas? Bem, a epigenética estuda justamente essas mudanças na expressão gênica que podem ser herdadas e que não são causadas por alteração na sequência de nucleotídeos, mas sim pela alteração no nível de compactação da cromatina. Os diferentes estados epigenéticos podem ser obtidos através de mudanças químicas, como a metilação do DNA e a modificação de histonas. Vamos entender melhor como isso funciona.

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil no nucleotídeo citosina (geralmente aqueles presentes nas ilhas CpG das regiões promotoras), fazendo com que os fatores de transcrição e a RNA polimerase não consigam se ligar ao DNA que se encontra metilado, reprimindo a transcrição do gene. Essa 'marca epigenética' é mais estável e pode ser transmitida às células filhas na divisão celular. Alterações no padrão epigenético são observados em alguns tipos de câncer, onde se nota tanto a hipometilação de grandes segmentos do DNA quanto a hipermetilação de algumas regiões (em especial as ilhas CpG).

Já a modificação de histonas envolve alterações nas histonas H2A, H2B, H3 e H4 tais como acetilação, metilação e fosforilação. Nosso objetivo aqui não é descrever o processo químico em si, mas é importante ter em mente que tais mudanças ocorrem em aminoácidos específicos de cada histona. Mas o que acontece de fato? Bem, um exemplo é a acetilação, processo que consiste na adição de um grupo acetil e que estabelece um ambiente permissivo à transcrição (que só ocorrerá de fato com a associação dos fatores de transcrição e RNA polimerase à região promotora). Já a desacetilação (a remoção de grupo acetil) leva à condensação da cromatina.

Essa variação epigenética é algo 'flexível', que é alterado de acordo com as necessidades da célula, ou pode ser de longa duração (nesse caso, chegando a ser transmitida ao longo das gerações). Estudos recentes mostram que o estilo de vida de um indivíduo pode contribuir para alterações no seu perfil epigenético. Os benefícios da prática de atividade física à saúde, por exemplo, são amplamente conhecidos a muito tempo. Foi demonstrado que a prática de atividade física induz modificações no padrão de metilação do DNA que estão associadas às adaptações fenotípicas observadas no indivíduo. Isso não é incrível? Hábitos saudáveis podem influenciar positivamente no 'funcionamento' do seu DNA. Portanto, coloque a prática de atividades físicas como algo importante na sua rotina diária e 'potencialize o funcionamento do seu DNA' (ativando/reprimindo a expressão de genes que resultarão em efeitos benéficos à sua saúde).

2.4 - USANDO A INFORMAÇÃO CONTIDA NO RNAm PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS

Agora que já entendemos a todos os processos envolvidos na produção e maturação final de uma molécula de RNAm, vamos analisar como a sua informação é usada para a produção de proteínas.

Um aspecto que devemos ter em mente é que a composição do RNAm e das proteínas é diferente (nucleotídeos e aminoácidos respectivamente). Dessa maneira, a célula não pode agora simplesmente copiar ou transcrever a sequência de nucleotídeos de RNAm, ela precisa ‘interpretar’, ou ‘traduzir’ essa mensagem. Mas como isso é feito, afinal de contas? Simples: cada 3 nucleotídeos no RNAm formam um códon, que determina qual aminoácido será colocado na proteína! Considerando que no RNA temos 4 nucleotídeos (A, U, G e C), existem 64 combinações possíveis de trincas que, juntas, constituem o código genético.

O código genético tem 3 características muito importantes:

- I) Não é sobreposto, ou seja, os códons não compartilham nucleotídeos entre si (figura 2.12);

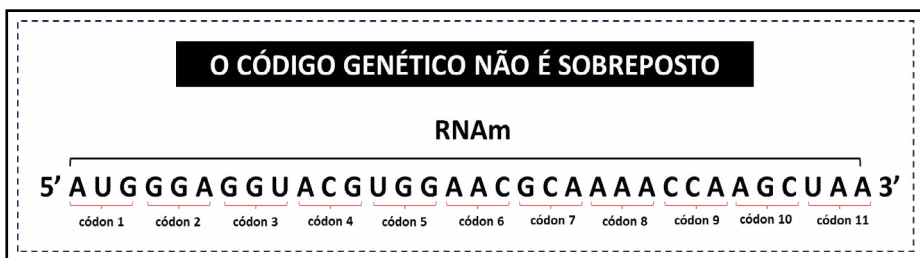


Figura 2.12: Ilustração demonstrando um RNAm e seus respectivos códons (note que não há sobreposição entre eles).

- II) É universal, o que significa que ele é praticamente o mesmo para todos os organismos (existem raras exceções). Por exemplo, o códon AUG especifica o aminoácido metionina em humanos, em bactérias, em animais e em qualquer outra espécie.
- III) É degenerado, ou seja, mais de um código pode especificar o mesmo aminoácido, sendo que geralmente a variação se encontra no terceiro nucleotídeo. Exemplo: os códons GGU, GGC, GGA e GGG especificam o aminoácido glicina (note que a diferença está na última posição do códon) (tabela 2.1).

A questão agora é: como saber qual o aminoácido especificado por cada um dos códigos genéticos? Nesse momento, consulte a tabela do código genético, que apresenta de forma organizada os diferentes códigos genéticos e os respectivos aminoácidos especificados por cada um deles (tabela 2.1). Note que você encontra o código genético e o aminoácido por ele especificado logo ao lado (exemplo: GGA especifica o aminoácido glicina). É dessa maneira que a informação contida no RNAm é utilizada para a formação da proteína.

SEGUNDA BASE DO CÓDON									
	U		C		A		G		
U	UUU	Fenilalanina	UCU	Serina	UAU	Tirosina	UGU	Cisteína	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leucina	UCA		UAA	Código de parada	UGA	Código de parada	A
	UUG		UCG		UAG		UGG		Triptofano
C	CUU	Leucina	CCU	Prolina	CAU	Histidina	CGU	Arginina	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Glutamina	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		
A	AUU	Isoleucina	ACU	Treonina	AAU	Asparagina	AGU	Serina	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lisina	AGA	Arginina	A
	AUG	Metionina (início)	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Valina	GCU	Alanina	GAU	Ácido aspártico	GGU	Glicina	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Ácido glutâmico	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		

TERCEIRA BASE DO CÔDON									
	U		C		A		G		
U	UUU	Fenilalanina	UCU	Serina	UAU	Tirosina	UGU	Cisteína	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leucina	UCA		UAA	Código de parada	UGA	Código de parada	A
	UUG		UCG		UAG		UGG		Triptofano
C	CUU	Leucina	CCU	Prolina	CAU	Histidina	CGU	Arginina	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Glutamina	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		
A	AUU	Isoleucina	ACU	Treonina	AAU	Asparagina	AGU	Serina	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lisina	AGA	Arginina	A
	AUG	Metionina (início)	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Valina	GCU	Alanina	GAU	Ácido aspártico	GGU	Glicina	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Ácido glutâmico	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		

Tabela 2.1: Código genético com sessenta e quatro códons, dos quais três determinam o fim da tradução (UAA, UAG e UGA).

A figura 2.13 abaixo mostra como a sequência de nucleotídeos do RNAm determina a sequência de aminoácidos de uma proteína.

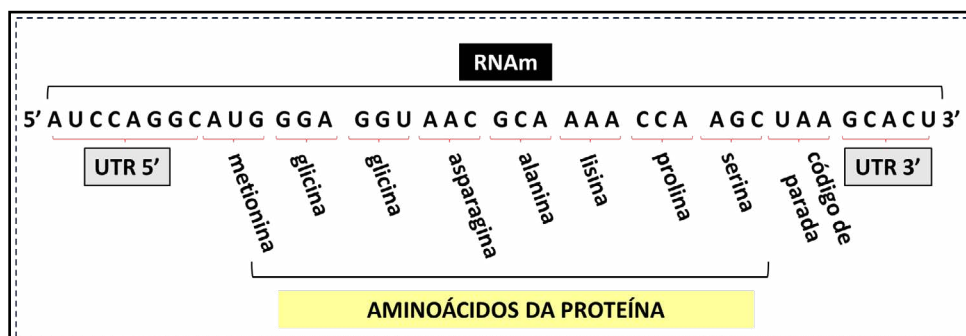


Figura 2.13: Ilustração de um RNAm e a sequência de aminoácidos por ele determinada (UTR = região não traduzida).

Observe que na figura 2.13 acima o último código genético não especifica nenhum aminoácido, e sim um código de parada. Ele mostra para a célula que todos os aminoácidos que formam a proteína já foram inseridos, e a sua síntese deve ser finalizada. A partir do momento em que esse código de parada é encontrado, nenhum outro aminoácido será adicionado. É como se fosse um ‘ponto final’, indicando onde termina a proteína. Para finalizarmos nosso bate papo sobre RNAm e síntese proteica, é importante ter em mente que, assim como o código de parada sinaliza o final da proteína, o seu início também é indicado pela presença de um códon específico, nesse caso para o aminoácido metionina (AUG). Dessa maneira, esse processo começa a partir do AUG iniciador e avança até o código de parada. No entanto, há uma sequência de nucleotídeos no início, que antecede o código AUG, que não é traduzida, sendo chamada de região não traduzida 5’ ou simplesmente UTR5’ (do inglês *untranslated region*). Da mesma forma, há uma sequência de nucleotídeos no RNAm que se encontra após o código de parada que não será traduzida, essa é a região não traduzida 3’ ou simplesmente UTR3’ (figura 2.13).

REFERÊNCIAS

Artemaki, P.I.; Kontos, C.K. Alternative Splicing in Human Physiology and Disease. *Genes* 2022, 13, 1820. <https://doi.org/10.3390/genes13101820>.

Griffiths, Anthony J., F. et al. Introdução à Genética. Disponível em: Minha Biblioteca, (12th edição). Grupo GEN, 2022.

Lindholm ME, Marabita F, Gomez-Cabrero D, Rundqvist H, Ekström TJ, Tegnér J, Sundberg CJ. An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. *Epigenetics*. 2014 Dec;9(12):1557-69. doi: 10.4161/15592294.2014.982445. PMID: 25484259; PMCID: PMC4622000.

Robertis, Edward M., D. e José Hib. De Robertis Biologia Celular e Molecular. Disponível em: Minha Biblioteca, (16th edição). Grupo GEN, 2014.

Watson, James, D. et al. Biologia Molecular do Gene. Disponível em: Minha Biblioteca, (7th edição). Grupo A, 2015.



GENES E GENOMAS:

Decifrando a organização da informação contida no DNA humano

O DNA humano contém bilhões de nucleotídeos. Será que ao longo de toda sua sequência encontramos genes para produção de proteínas? Será que há algum outro tipo de informação armazenada nessa molécula? A função de cada uma de suas regiões já é conhecida? Não perca um só detalhe desse capítulo e surpreenda-se ainda com o DNA!

No capítulo anterior, analisamos a papel do DNA na produção de proteínas, destacando a importância dos genes para RNAm nesse processo. A questão agora é a seguinte: será que todo do DNA (ou sua grande maioria) é ocupado por genes para RNAm? A resposta a essa pergunta é realmente surpreendente! Ao longo desse capítulo, vamos analisar a complexidade do DNA e descrever o tipo de informação armazenada nessa molécula. Felizmente, os avanços científicos das últimas décadas estão ajudando a esclarecer vários aspectos importantes nesse sentido. Então, vamos nos aprofundar no conhecimento sobre a ‘anatomia do genoma’ dos eucariotos (como sempre, enfatizando o humano, ok?).

3.1 - GENES

Vamos começar falando sobre as regiões do DNA conhecidas como ‘genes’. Mas como o que é um gene, afinal de contas? Bem, podemos defini-lo como uma sequência de nucleotídeos do DNA onde se encontra a informação necessária para produzir uma molécula de RNA. Existem diferentes tipos de genes, os quais serão descritos a partir de agora.

Genes para RNAm

Vamos iniciar nossa discussão abordando os genes para RNA mensageiro (RNAm), cuja estrutura e função foi descrita no capítulo 2. Devido ao seu papel determinante na síntese proteica, esses genes

de imediato despertaram grande interesse. Diante disso, por muito tempo a comunidade científica teve como objetivo conhecer os genes para RNAm presentes em nosso DNA, o que foi possível graças ao Projeto Genoma Humano, cujos resultados foram publicados em 2001. É claro que os dados obtidos trouxeram muitas respostas, mas também geraram muitas perguntas. Por exemplo: observou-se que o DNA humano possui de 20.000 a 25.000 genes para RNAm, o que corresponde a menos de 2% do nosso genoma. Isso significa que 98% do nosso DNA simplesmente não tinha função conhecida, e por um tempo foi equivocadamente chamado de 'DNA lixo'. Por isso, desde a publicação da primeira versão do Projeto Genoma, vários grupos de pesquisa se dedicaram a compreender como a informação contida no DNA é usada pela célula. Convenhamos: não é possível que 98% simplesmente não sirva para nada!

Atualmente, sabe-se que esses genes para RNAm estão espalhados ao longo do DNA e, de uma forma geral, eles representam uma pequena proporção do DNA de eucariotos como um todo (e não apenas de humanos). Além disso, a quantidade desse tipo de genes para esse tipo de RNA na molécula varia entre as espécies.

De uma forma geral, nos organismos multicelulares entre 20 e 25% desses genes existem como 'cópia única' ao longo do genoma, enquanto os demais formam 'famílias gênicas', formadas por dois ou mais genes, os quais apresentam similaridade na sua sequência de

nucleotídeos, além do que as funções são relacionadas. Além disso, existem alguns genes que codificam proteínas que são continuamente utilizadas pela célula em grande quantidade. Para suprir essa demanda, eles existem em múltiplas cópias, que geralmente se organizam uma ao lado da outra (*em tandem*). Como exemplo, podemos citar os genes para histonas, proteínas fundamentais para a formação da cromatina (lembre-se que a cromatina é formada por DNA associado às histonas, ok?).

Pseudogenes

Vamos continuar nossa discussão sobre o DNA nuclear analisando os pseudogenes. Tais regiões são cópias de genes que codificam proteínas, no entanto perderam sua função original devido a presença de algumas alterações (mutações). Alguns são inativos, enquanto outros não. Em humanos, por exemplo, existem aproximadamente 15.000 pseudogenes, dos quais cerca de 20% podem ser transcricionalmente ativos.

Com o conhecimento obtido a partir da análise do DNA humano e de outras espécies, os pseudogenes foram divididos em diferentes categorias de acordo com a sua 'origem'. Vamos conhecer um pouco mais sobre cada uma delas:

- 1) Pseudogenes unitários: se originaram a partir de um gene cópia única, mas perderam suas funções originais devido a

presença de várias mutações.

- II) Pseudogenes duplicados: surgiram a partir da duplicação gênica (novamente, perderam suas funções originais devido às alterações que apresenta).
- III) Pseudogenes processados: nesse caso, tudo começa com a transcrição reversa de um RNAm (na transcrição reversa, ocorre a produção de DNA a partir do RNAm), que em seguida é novamente inserido no DNA. Portanto, esse tipo de pseudogene geralmente não apresenta íntrons e promotor.

Embora o papel funcional dos pseudogenes não seja completamente compreendido, alguns são capazes de se ‘relacionar’ com o gene a partir do qual se originaram, ativando ou reprimindo a sua expressão gênica, por exemplo. Estudos recentes têm demonstrado que eles podem colaborar no desenvolvimento de algumas doenças e na progressão de diferentes tipos de câncer, como o de mama, próstata e pulmão, entre outros.

Genes para RNAs não codificantes

O conhecimento com relação a estrutura e composição do DNA aumentou muito, de forma que genes para outros tipos de RNA foram descritos, os quais foram divididos em dois grandes grupos: 1) RNAs codificantes: onde se encontra a informação para a síntese protéica – RNA mensageiro (RNAm) e 2) RNAs não codificantes: os ncRNAs (do

inglês '*non-coding RNAs*'). Esses tipos de RNAs estão presentes em procariotos e eucariotos, mas como sempre nosso foco será no DNA humano, ok?

Bem, como a estrutura e função do RNAm já foi discutida no capítulo 2, vamos abordar alguns aspectos sobre os ncRNAs. Um ponto importante é que eles executam a sua função celular na forma de RNA, portanto, como já mencionado anteriormente, embora as proteínas sejam fundamentais na execução das funções celulares, há tipos de RNAs que também atuam em diferentes momentos para que a célula consiga desempenhar seu papel no corpo humano.

Em eucariotos, os ncRNAs são classificados tendo como referência a sua localização: aqueles que se encontram no núcleo são os pequenos RNAs nucleares ou snRNA (do inglês *small nuclear RNA*), os presentes no nucléolo, a região do núcleo onde ocorre a síntese dos ribossomos são os pequenos RNAs nucleolares, ou snoRNA (do inglês *small nucleolar RNA*) e estão envolvidos na modificação de RNA ribossômico (RNAr). Por fim, aqueles localizados no citoplasma são os pequenos RNAs citoplasmáticos, ou scRNA (do inglês *small cytoplasmatic RNA*).

Mas o que exatamente esses ncRNAs fazem nas células? Vamos considerar alguns exemplos para compreender a importância dessas moléculas. Os RNAs ribossômicos (RNAr) que junto com proteínas formam os ribossomos e transportador (RNAt) são fundamentais

na síntese protéica, por exemplo. Um aspecto importante com relação a esses tipos de RNA é que existem múltiplas cópias dos seus respectivos genes. Uma célula humana embrionária, por exemplo, precisa de pelo menos 100 cópias de genes ribossomais. Nesse caso, apesar do produto final não ser uma proteína, esses RNAs são fundamentais no processo de síntese proteica, que ocorre continuamente no interior de uma célula, o que justifica a necessidade de múltiplas cópias.

Há também os longos ncRNAs (ou lncRNA), geralmente maiores que 200 nucleotídeos e milhares deles foram identificados em humanos. A função desses lncRNAs ainda não é completamente compreendida, mas alguns deles estão envolvidos no controle da expressão gênica. Estudos recentes demonstram que há lncRNAs fundamentais, por exemplo, no controle da expressão de genes relacionados com o câncer, como aqueles envolvidos com a progressão do tumor e metástase. Dessa maneira, há relatos na literatura científica de que a expressão de alguns lncRNAs está desregulada no câncer de mama, bexiga e pulmão, por exemplo.

Em contrapartida, existem também os microRNAs (ou miRNAs), com tamanho variando entre 17 a 25 nucleotídeos que agem no controle da expressão gênica a nível pós-transcricional (ou seja, agem no RNAm produzido na transcrição). Essas moléculas são capazes de se ligar a um determinado RNAm alvo através da complementaridade de sequências, o que leva a degradação do RNAm

(quando a complementaridade é total) ou impede a tradução (quando a complementaridade é parcial). Considerando que tamanho do miRNA é pequeno e a possibilidade de ação mesmo diante de uma complementaridade parcial, um único miRNA pode regular centenas de genes e cada gene-alvo pode ser regulado por múltiplos miRNA. Dessa forma, a rede de interação entre os miRNA e RNAm é realmente complexa. Além disso, um achado muito importante é que essas moléculas também são encontradas no meio extracelular, em fluídos corporais, sendo denominados miRNA circulantes ou simplesmente c-miRNA. Nesse ambiente, elas seriam importantes na comunicação celular, por exemplo.

Em humanos, cerca de 2588 miRNAs já foram descritos. Elas participam do controle de processos importantes como tais como proliferação e diferenciação celular. Estudos recentes mostram que alterações no padrão de expressão de alguns miRNAs estão envolvidos em diversas condições patológicas, tais como algumas doenças neurológicas e alguns tipos de câncer, por exemplo.

3.2 - REGIÕES REPETIDAS

A presença de sequências repetidas é algo observado no genoma de procariotos e eucariotos. Considerando o modo como as ‘unidades de repetição’ (a sequência de nucleotídeos que se repete) estão organizadas no genoma, há duas classes gerais de DNA repeti-

tivo: I) repetições *em tandem* (lado a lado) e II) repetições distribuídas pelo genoma (ou interespaçadas) (figura 3.1).

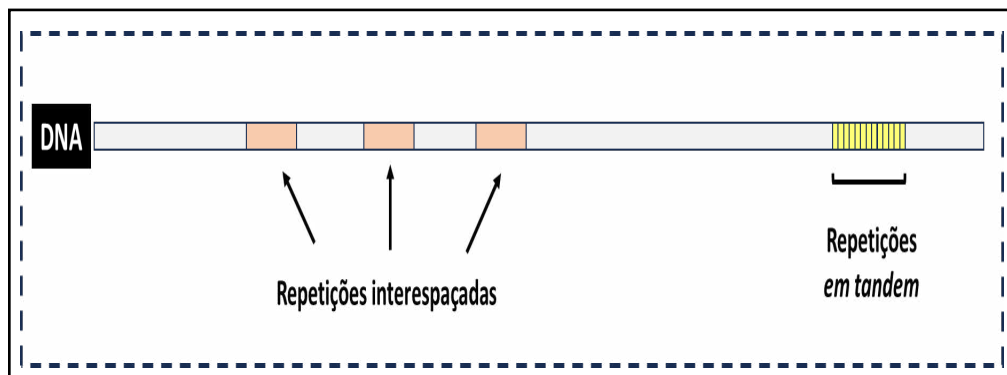


Figura 3.1: Ilustração mostrando os diferentes tipos de repetições observadas ao longo do DNA: interespaçadas ou *em tandem* (lado a lado).

Aproximadamente 50% do DNA humano contém essas sequências repetitivas, cuja função permaneceu desconhecida por um tempo. No entanto, o avanço no conhecimento do DNA (incluindo o humano) permitiu a associação de tais regiões a alguns aspectos muito importantes. Vamos conhecer alguns exemplos a partir de agora.

REPETIÇÕES *EM TANDEM* (LADO A LADO)

Repetições *em tandem* são aquelas que estão agrupadas, uma ao lado da outra, e correspondem a aproximadamente 3% do genoma humano. Sequências de DNA curtas e altamente repetitivas são conhecidas como 'DNA satélite'. Tais regiões geralmente formam 'blocos constitutivos' de heterocromatina (ou seja, a cromatina nesses locais apresenta-se altamente compactada continuamente), e são com-

ponentes essenciais de estruturas importantes como centrômeros e telômeros presentes nos cromossomos.

Além disso, minissatélites e microssatélites também são exemplos de repetições *em tandem*, no entanto estão em outras regiões do genoma. Vamos explorar alguns aspectos muito interessantes sobre essas regiões a partir de agora!

Minissatélites: são sequências de DNA contendo entre 15 à 50 nucleotídeos que se repetem várias vezes lado a lado (figura 3.2).

Microssatélites: são repetições mais curtas, contendo até 6 nucleotídeos também conhecidas como STRs (*short tandem repeats – pequenas repetições em tandem*) ou SSRs (*simple sequence repeats – sequências repetidas simples*) (figura 3.2).

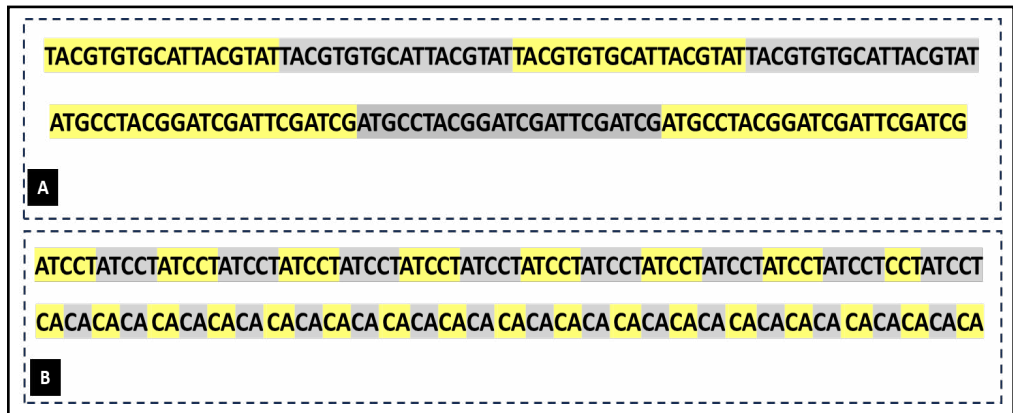


Figura 3.2: Ilustração mostrando exemplos de repetições *em tandem* presentes no DNA. A) Minissatélites e B) microssatélites.

Embora não sejam regiões codificantes, o conhecimento sobre essas sequências tem aumentado nos últimos anos e, o que a princí-

pio era considerado como ‘DNA lixo’ tem se revelado cada vez mais interessante. Essas repetições *em tandem* são altamente mutáveis (podem ser alteradas com grande frequência), o que acaba levando a um aumento ou redução no número de cópias da unidade de repetição e consequentemente ao aumento ou redução no tamanho do microssatélite. Tal condição é conhecida como ‘instabilidade de microssatélite’ (MSI – *microsatellite instability*).

Para entendermos as consequências da MSI, antes é preciso considerar que existem microssatélites nas regiões intergênicas (entre os genes), nas regiões reguladoras e até mesmo distribuídos ao longo de genes que codificam proteínas. Nesse último exemplo, a mutação no microssatélite pode levar a um ganho ou perda da função de um gene, uma vez que a proteína mutante produzida será diferente da proteína original. Já as alterações daqueles presentes nas regiões reguladoras podem alterar a expressão gênica (e assim a quantidade de produto gênico). Além disso, a MSI pode contribuir na alteração do padrão de compactação da cromatina, tornando-a mais ‘fechada’ levando a uma consequente mudança no padrão de expressão gênica, uma vez que a informação contida na cromatina mais ‘fechada’ não está ‘acessível’ para a transcrição. Em humanos, tais alterações estão associadas ao surgimento da síndrome do X frágil, transtorno do espectro autista e outras doenças neurológicas, além de outras patologias e alguns tipos de câncer. Isso claramente mostra a importância dessas regiões no DNA humano.

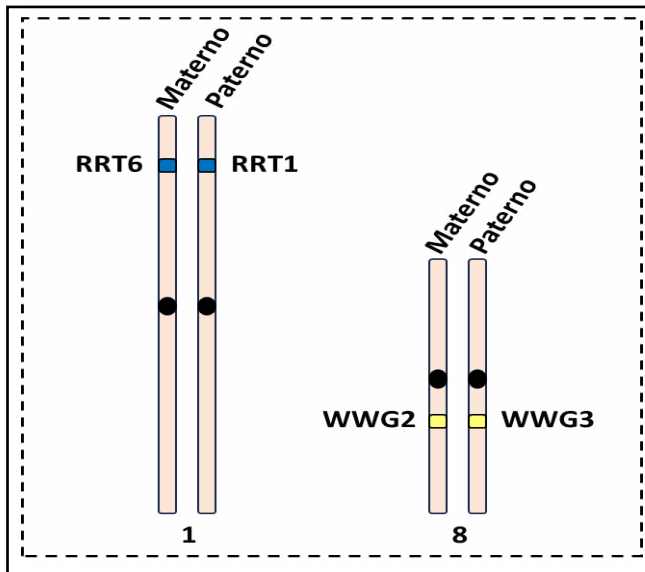


Figura 3.4: Ilustração demonstrando que um indivíduo pode ter no máximo dois alelos de um determinado microssatélite (um de origem materna e outro de origem paterna) e que cada um ocupa um locus (local) específico em um cromossomo.

Atualmente, existem diferentes técnicas de Biologia Molecular que nos permitem analisar o DNA. Dessa forma é possível, por exemplo, determinar o tamanho de cada microssatélite de um indivíduo, gerando assim a sua ‘impressão de DNA digital’ que é então analisada em testes de paternidade e pela Genética Forense na análise de amostras biológicas encontradas na cena de um crime, por exemplo (conforme descrito no capítulo 7).

REPETIÇÕES DISTRIBUÍDAS PELO GENOMA: TRANSPOSONS

Ao contrário das repetições *em tandem*, que se encontram uma ao lado da outra, essas regiões se encontram dispersas pelo DNA e são maiores que os microssatélites (tamanho acima de 100pb). Uma característica única é a sua capacidade de se ‘mover’ (isso mesmo!!!), integrando-se a novas regiões do genoma, um mecanismo conheci-

do como transposição. Portanto, essas regiões são conhecidas como ‘transposons’ ou ‘elementos transponíveis’. Esse tipo de sequência corresponde a aproximadamente 48% do DNA humano e, de acordo com o modo como a ‘mudança de local’ acontece, elas são divididas em duas classes principais:

I) Transposons de DNA: se movem usando um mecanismo de ‘corta e cola’, ou seja, se movem para o novo local sem copiar o seu DNA antes (figura 3.5).

II) Retrotransposons: usam um mecanismo de ‘cópia e cola’ para se moverem, de forma que primeiro fazem uma cópia do seu RNA e só então se movem para o novo local (figura 3.5).

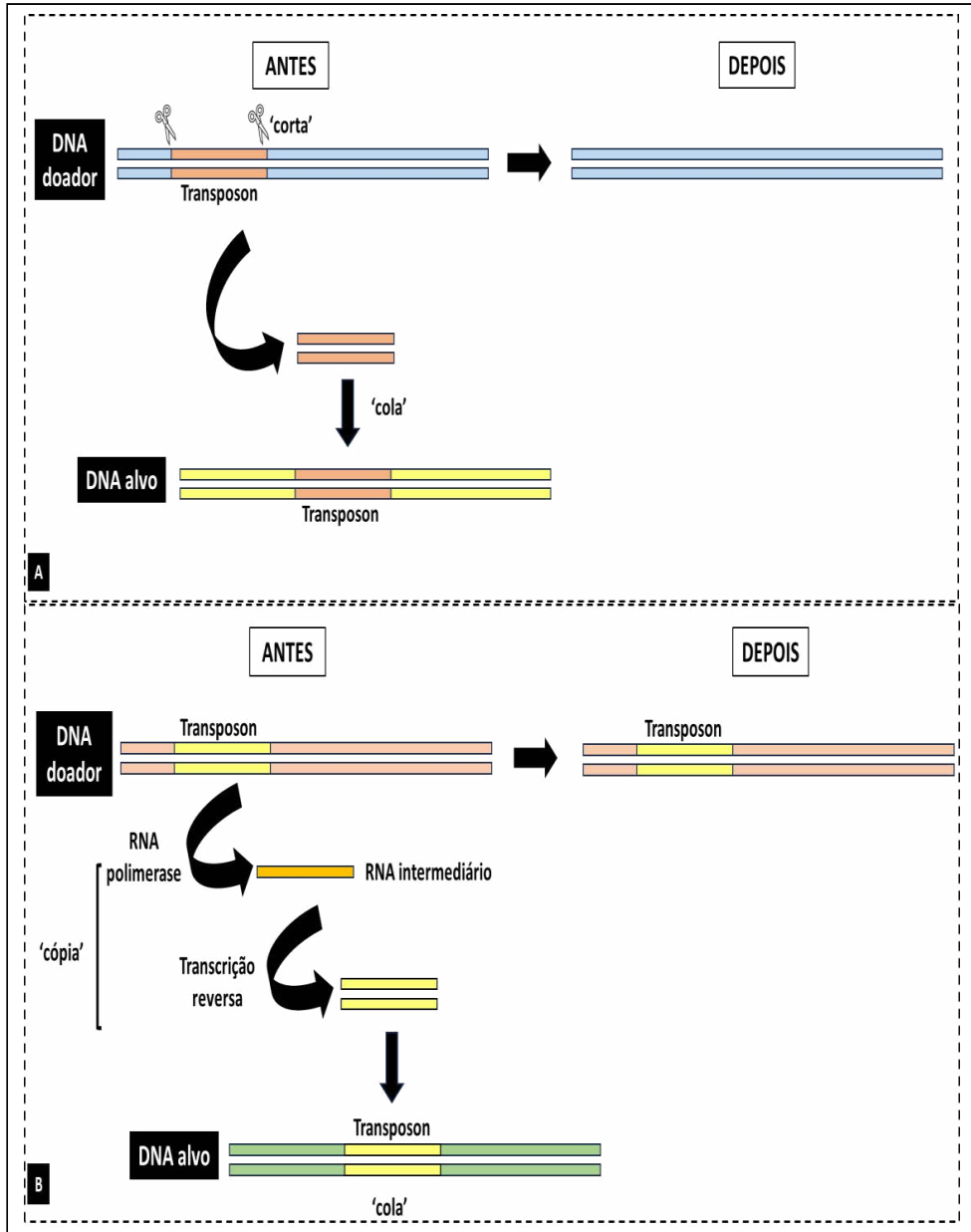


Figura 3.5: Ilustração simplificada dos diferentes mecanismos de transposição. A) Transposons de DNA: corta e cola e B) Retrotransposon: cópia e cola.

Além da diferença no modo de transposição, essas classes apresentam características únicas que serão descritas abaixo.

Retrotransposons (classe I)

Existem algumas classes de retrotransposons, sendo que 3 delas serão discutidas nesse capítulo: 1) semelhantes aos retrovírus, 2) LINES (do inglês '*long interspersed elements*' = elementos longos interespçados e 3) SINES (do inglês '*short interspersed elements*' = elementos curtos interespçados).

I) Retrotransposons semelhantes aos retrovírus

Como o próprio nome sugere, a estrutura desses elementos móveis apresenta vários aspectos em comum com os retrovírus. Por exemplo: a presença de longas repetições terminais diretas, conhecidas como LTRs (do inglês *long terminal repeats*). Além disso, movem-se por retrotransposição e são capazes de codificar uma enzima chamada transcriptase reversa, que produz DNA a partir de um molde de RNAm (figura 3.6).

II) LINES

Não apresentam as LTRs em sua estrutura. No entanto, com um tamanho de aproximadamente 6.000 pb, em sua estrutura interna apresentam um promotor que controla a expressão de toda a 'maquinaria' necessária para a sua transposição, o que inclui enzimas como a transcriptase reversa. Além disso, apresentam uma cauda poli A. O elemento LINE mais abundante em humanos é o L1 (cerca de 500.000 cópias) e ainda está ativo. Dessa maneira, estudos

demonstraram que a sua movimentação acabou criando mutações associadas a algumas doenças hereditárias, tais como alguns casos de hemofilia e distrofia muscular (figura 3.6).

III) **SINEs**

Essa é a classe de retrotransposons com menor tamanho, que pode variar entre 100pb a aproximadamente 400pb. Os SINEs não codificam uma transcriptase reversa, portanto dependem de outro elemento retrotransponível (um LINE) que produza essa enzima para se mover (figura 3.6). No genoma humano, o SINE mais frequente é o elemento *Alu* (que ainda está ativo). Existem mais de um milhão dessas sequências ao longo do DNA humano, sendo que o tamanho médio de cada uma é de aproximadamente 300pb. Considerando que ele ainda está ativo e o local da nova inserção é aleatório, sua inserção pode levar a inativação de um gene ou alteração do padrão de expressão gênica. De acordo com o gene envolvido nesse processo, a consequência pode ser prejudicial, colaborando para o surgimento de doenças humanas como câncer de mama e de ovário, leucemia, hemofilia A, entre outras.

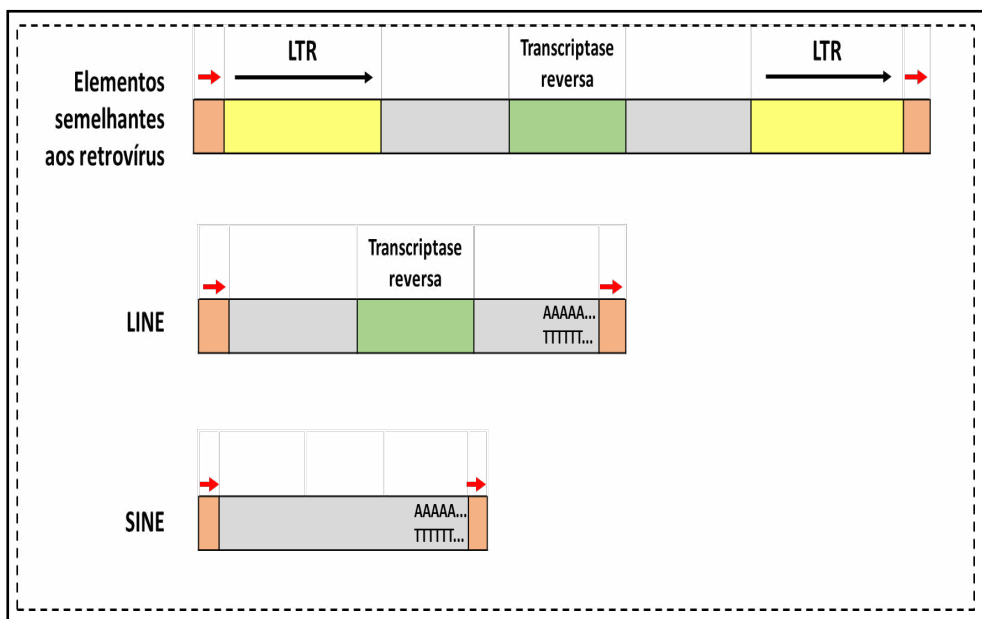


Figura 3.6: Ilustração simplificada da estrutura de alguns tipos de retrotransposons. As setas em vermelho indicam duplicações do sítio-alvo. LTR: *long terminal repeats* (repetições longas terminais).

Transposon de DNA (classe II)

Em sua estrutura, possuem repetições terminais invertidas e, entre elas, se encontra o gene para enzima transposase, responsável pelo 'movimento' dessa região, que envolve a excisão seguida da reinserção no novo local (figura 3.7). Essas regiões correspondem a aproximadamente 5% do nosso DNA e estão inativas em humanos.

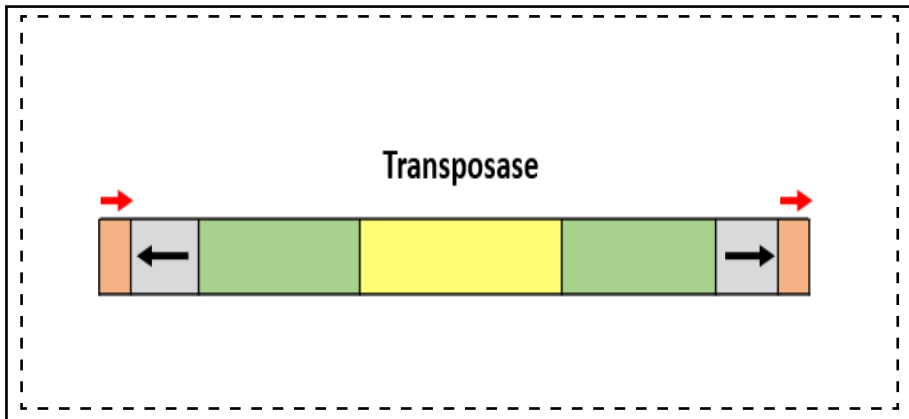


Figura 3.7: Ilustração simplificada da estrutura básica de um transposon de DNA. As setas pretas indicam as repetições terminais invertidas. As setas vermelhas indicam as duplicações do sítio-alvo.

3.3 - DNA MITOCONDRIAL

Considerando que as células eucariontes animais possuem DNA tanto no núcleo quanto nas mitocôndrias, vamos analisar o mitocondrial, ok? Trata-se de um DNA circular com 16.659pb e 37 genes onde não são observados íntrons, a partir dos quais algumas das proteínas necessárias para a realização de suas funções são produzidas. As demais são produzidas pela célula e encaminhadas ao seu interior, como é o caso das enzimas responsáveis pela replicação. Portanto, o fato de possuir DNA próprio não torna a mitocôndria independente do restante da célula.

Há alterações (mutações) no DNA mitocondrial humano responsáveis por doenças que apresentam um padrão de herança único: são transmitidas exclusivamente pela mãe (herança materna do DNA mitocondrial, que é discutida no capítulo 5). Um aspecto importante nes-

se contexto é que, embora o número de mitocôndrias presentes em uma célula varie de acordo com sua função (sendo mais frequentes quando o consumo energético é maior), normalmente há centenas de mitocôndrias em uma célula. Dessa maneira, pode haver uma mistura de mitocôndrias com o DNA normal (selvagem) e o mutado na mesma célula, uma condição conhecida como heteroplasmia.

3.4 – DNA ESPAÇADOR

Ao analisar o DNA de uma espécie, como o humano, por exemplo, será que toda sequência de nucleotídeos encontrada poderá ser classificada em alguma das categorias que discutimos até agora? A resposta é não. Pode parecer contraditório que com todo avanço científico (que inclui um enorme avanço na capacidade de sequenciamento) essa seja a resposta. Portanto, as regiões que ainda têm função desconhecida são classificadas como ‘DNA espaçador’.

O fato é que desde a conclusão da primeira versão do sequenciamento do genoma humano em 2001, a comunidade científica tem se dedicado para compreender não apenas a sequência de nucleotídeos presente no DNA, mas o seu significado biológico. Portanto, a tendência é que a proporção da molécula que corresponde a DNA espaçador diminua. Ao longo desses anos, felizmente nota-se um grande avanço nesse sentido, o que tem trazido inúmeros benefícios para a área da saúde, como a compreensão dos mecanismos envolvidos em

algumas doenças genéticas. Ainda há muito a ser elucidado, e provavelmente ainda nos surpreenderemos com muitos aspectos dessa incrível e apaixonante molécula: o DNA!

REFERÊNCIAS

Andrew T.M. Bagshaw, Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes, *Genome Biology and Evolution*, Volume 9, Issue 9, September 2017, Pages 2428–2443, <https://doi.org/10.1093/gbe/evx164>

Chakravarthi BV, Dedigama-Arachchige P, Carskadon S, Sundaram SK, Li J, Wu KH, Chandrashekar DS, Peabody JO, Stricker H, Hwang C, Chitale DA, Williamson SR, Gupta NS, Navone NM, Rogers C, Menon M, Varambally S, Palanisamy N. Pseudogene Associated Recurrent Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia*. 2019 Oct;21(10):989-1002. doi: 10.1016/j.neo.2019.07.010. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31446281; PMCID: PMC6713813.

Colombino M., Cossu A., Manca A., Dedola M.F., Giordano M., Scintu F., Curci A., Avallone A., Comella G., Amoruso M., Margari A., Bonomo G.M., Castriota M., Tanda F., Palmieri G. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol*. 2002 Sep;13(9):1447-53. doi: 10.1093/annonc/mdf240. PMID: 12196371.

Cosme, M. V., & de Oliveira, E. C. A. (2023). Atuação dos RNAs não codificantes longos (lncRNAs) no câncer. *Biosaúde*, 23(2), 85–94. <https://doi.org/10.5433/2525-555X.2021.v23.n2.45412>.

Liao, X., Zhu, W., Zhou, J. et al. Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. *Commun Biol* 6, 954 (2023). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05322-y>.

Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CS, Ferreira EDS, Menon ETN, Diniz SN, Pezuk JA. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *Einstein (Sao Paulo)*. 2021 Jul 16;19:eRB5996. doi: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996. PMID: 34287566; PMCID: PMC8277234.

Lou W, Ding B, Fan W. High Expression of Pseudogene PTTG3P Indicates a Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *Mol Ther Oncolytics*. 2019 Mar 27;14:15-26. doi: 10.1016/j.omto.2019.03.006. PMID: 31011629; PMCID: PMC6463746.

Menck, Carlos F., M. e Marie-Anne Van Sluys. *Genética molecular básica: dos genes ao genoma*. Disponível em: Minha Biblioteca, Grupo GEN, 2017.

Pradhan RK, Ramakrishna W. Transposons: Unexpected players in cancer. *Gene*. 2022 Jan 15;808:145975. doi: 10.1016/j.gene.2021.145975. Epub 2021 Sep 27. PMID: 34592349.

Venter, J.C. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351. doi: 10.1126/science.1058040.

Wang S, Yu J. Long non-coding RNA transcribed from pseudogene PPIAP43 is associated with radiation sensitivity of small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*. 2019 Nov;18(5):4583-4592. doi: 10.3892/ol.2019.10806. Epub 2019 Sep 4. Erratum in: *Oncol Lett*. 2020 Feb;19(2):1635. doi: 10.3892/ol.

Watson, James, D. et al. *Biologia Molecular do Gene*. Disponível em: Minha Biblioteca, (7th edição). Grupo A, 2015.

Yue C, Ren Y, Ge H, Yan L, Xu Y, Wang G, Wu J. Pseudogene DU-XAP10 can be used as a diagnostic and prognostic biomarker in human cancers. *J Cell Physiol*. 2019 Dec;234(12):23685-23694. doi: 10.1002/jcp.28937. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31169303.



MUTAÇÕES GÊNICAS

Embora o DNA humano tenha bilhões de nucleotídeos, é fundamental que cada que nenhum seja alterado. No entanto, há raras ocasiões em que ocorrem alterações em um ou alguns deles. Como essas alterações, chamadas 'mutações gênicas', acontecem? E qual a consequência dessas mudanças para as células? Esses são os temas centrais desse capítulo. Não perca um só detalhe e amplie ainda mais seu conhecimento sobre o DNA!

Agora que já conhecemos a estrutura do DNA e o seu papel fundamental no armazenamento da informação genética, que por sua vez é determinante na produção de proteínas, entendemos também que a molécula de DNA não pode ser alterada.

De fato, a célula apresenta vários mecanismos para garantir não apenas a integridade do DNA, mas também para assegurar que a sua sequência de nucleotídeos não seja alterada. No entanto, há raras situações em que uma mutação (alteração) surge nessa molécula. A partir desse momento, duas perguntas surgem: 1) O que causou essa mutação e 2) isso terá alguma consequência? Vamos responder a cada uma dessas questões ao longo desse capítulo, ok?

Essas pequenas alterações, que resultam na mudança de um ou alguns nucleotídeos no DNA, são conhecidas como mutações gênicas. Elas podem alterar a sequência de genes individuais ou ocorrer em uma região intergênica (aquela que se encontra entre os genes). São importantes pois são a ‘fonte primária’ de variabilidade genética para uma espécie. Como assim, variabilidade genética? Vamos lembrar que na espécie humana os indivíduos não são iguais entre si (isso ocorre apenas entre os gêmeos monozigóticos, aqueles que são idênticos e que ainda assim podem acumular mutações individuais ao longo de suas vidas). Na verdade, é a variabilidade genética entre os indivíduos que dá a cada ser humano a sua individualidade! Ou seja, se compararmos o DNA de diferentes indivíduos, embora eles

apresentem 46 cromossomos, a sequência de nucleotídeos não será idêntica. É essa diferença, ou variação, que surge através de uma mutação gênica que chamamos de variabilidade genética!

4.1- COMO SURGEM AS MUTAÇÕES GÊNICAS

A partir de agora vamos começar a analisar o surgimento das mutações gênicas, as quais podem resultar na alteração de um ou alguns nucleotídeos. De uma forma geral, essas alterações no DNA podem surgir espontaneamente ou podem ser induzidas após a exposição das células a um agente mutagênico, que nada mais é que qualquer tipo de agente químico ou físico capaz de induzir o surgimento de uma mutação.

Erros introduzidos durante a cópia do DNA.

Uma característica fundamental do DNA é que as suas cadeias de nucleotídeos são complementares, o que envolve a formação de pares específicos: adenina com timina (ou vice-versa) e citosina com guanina (ou vice-versa). Durante a cópia do DNA, a célula separa as cadeias de nucleotídeos e usa cada uma como um molde a partir do qual a cadeia complementar será produzida (detalhes desse processo estão descritos no capítulo 1).

Embora haja uma grande precisão durante a cópia do DNA, a célula pode cometer um erro nesse processo e formar pares ilegítimos,

como citosina e timina, por exemplo. Na maioria das vezes, essa falha é reconhecida e corrigida pelas 'enzimas de reparo' responsáveis pela revisão do DNA, portanto a taxa de surgimento de mutações durante a replicação é muito baixa. No entanto, há casos em que esse erro não é corrigido, resultando em uma mutação permanente (figura 4.1).

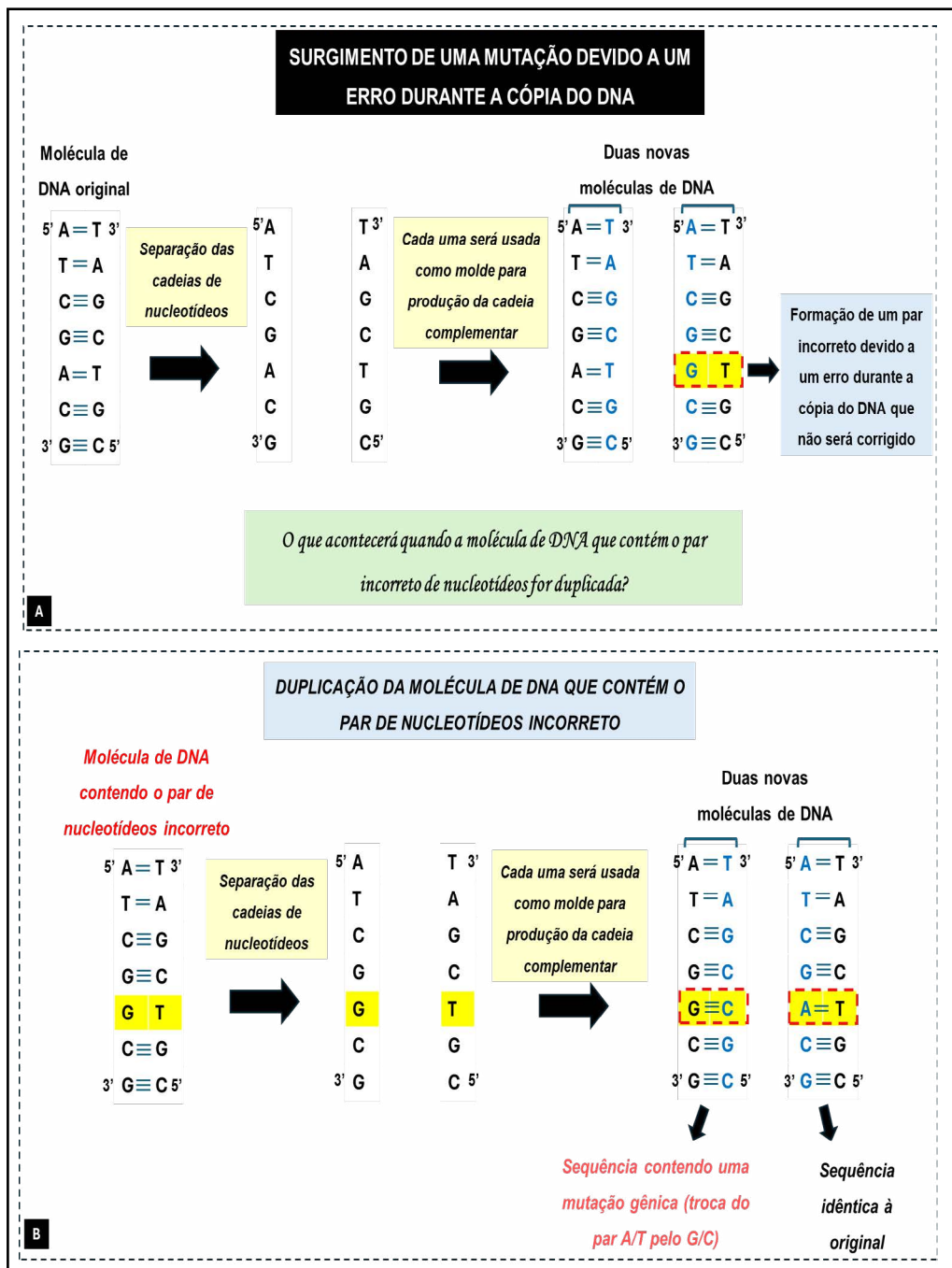


Figura 4.1: A) Ilustração demonstrando um erro cometido durante a cópia do DNA que não foi corrigido e B) Resultado da duplicação da molécula de DNA contendo um par incorreto, que é o surgimento de uma mutação gênica.

Erros durante o reparo de uma lesão no DNA.

Danos na molécula de DNA podem surgir espontaneamente ou de forma induzida pela exposição à agentes mutagênicos, sendo que muitas vezes esses danos podem ser corrigidos. No entanto, a maquinaria celular responsável por esse reparo é capaz de remover o nucleotídeo danificado e inserir outro normal, porém diferente do original, criando assim uma mutação gênica.

Como exemplo, vamos analisar o que pode ocorrer durante o reparo de uma depurinação, um dano no DNA que envolve com uma adenina ou guanina. Nesse caso, ocorre a quebra da ligação entre a base nitrogenada e a pentose do nucleotídeo, de forma que o que o nucleotídeo danificado não apresenta mais em sua estrutura nenhuma base nitrogenada. Isso representa um problema para a célula, pois como saber qual nucleotídeo colocar na nova cadeia de nucleotídeos durante a replicação? Quando a enzima DNA polimerase se deparar com tal situação, ela pode colocar qualquer nucleotídeo na fita que está sendo produzida, o que representa um alto risco de criar uma nova mutação toda vez que o DNA for duplicado, ou pode levar à interrupção do processo de replicação. Para resolver essa situação, o nucleotídeo danificado será removido e outro normal será inserido em seu lugar. O problema é que a célula pode acabar inserindo um nucleotídeo diferente do que havia no local inicialmente, criando assim uma mutação. Ao contrário dos erros cometidos durante a cópia do DNA que na maioria das vezes são corrigidos, as mutações que surgem nesse caso serão permanentes, pois o novo par de nucleotídeos formado estará correto, no entanto é diferente do original (figura 4.2).

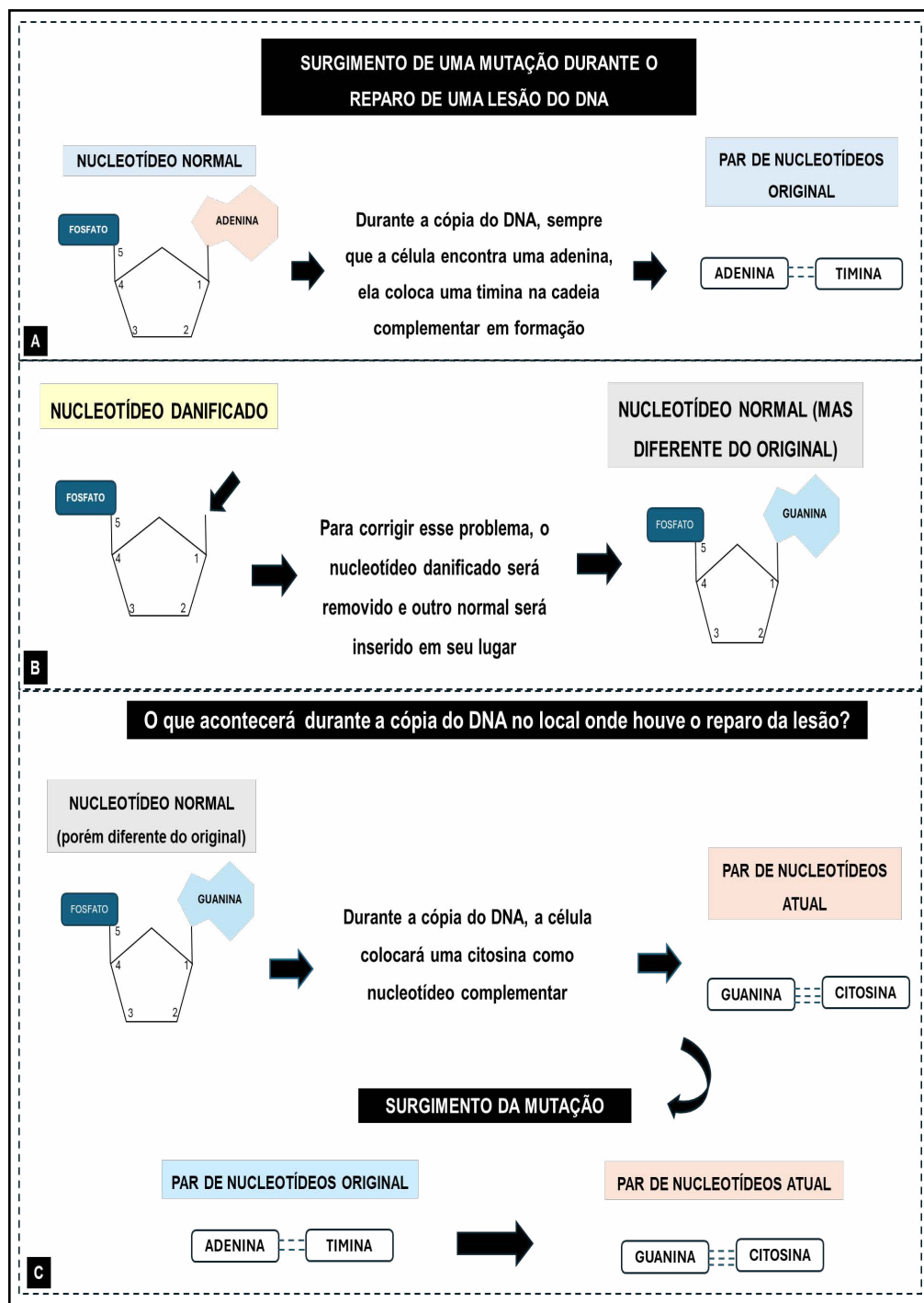


Figura 4.2: Ilustração simplificada do surgimento de uma mutação durante o reparo de uma lesão de um dano na molécula de DNA.

4.2 - CONSEQUÊNCIAS DA MUTAÇÃO GÊNICA

A partir do momento que a sequência de nucleotídeos do DNA foi alterada, a pergunta que surge é: isso será prejudicial para o indivíduo ou não? Na verdade, essa resposta não é tão simples, mas vamos analisar o que pode acontecer com a proteína que será produzida a partir da versão mutante do gene a partir de agora, ok?

A mutação pode ter efeitos fenotípicos.

Isso depende do gene que foi alterado. Nesse caso, a alteração aconteceu em um gene com uma função importante na célula, como um gene envolvido no controle do ciclo celular ou em um receptor de membrana, por exemplo. É importante ressaltar que nem toda mutação gênica é prejudicial! Infelizmente, existem sim várias doenças genéticas cuja causa foi uma mutação gênica, mas também existem indivíduos que são naturalmente resistentes ao vírus HIV (o que também se deve a uma alteração no DNA), o que é extremamente benéfico!

Além disso, é preciso considerar o local específico em que essa mutação aconteceu. Às vezes, ela acontece na região reguladora do gene, alterando a expressão do gene. Portanto a proteína ainda será normal, mas ela será produzida no momento e/ou na quantidade anormais.

A mutação pode não ter efeitos fenotípicos.

Pode parecer estranho, mas é exatamente isso! O DNA foi alterado e não haverá nenhuma consequência para o indivíduo. Temos algumas explicações para esse fato:

- a) A mutação não alterou a sequência de aminoácidos da proteína. Vamos lembrar que o código genético é degenerado, ou seja, mais de um códon pode especificar o mesmo aminoácido e que geralmente a variação envolve o terceiro nucleotídeo. Por exemplo: os códons CCC, CCA, CCU e CCG especificam o aminoácido prolina. Portanto, se a mutação resulta na troca de um códon CCC para um CCA, isso não resultará em uma mudança na proteína.
- b) Houve sim uma mudança na sequência de aminoácidos, mas isso não alterou as propriedades funcionais da proteína.
- c) A mutação aconteceu em uma região intergênica.

Tendo em mente que análise da consequência de uma mutação gênica no fenótipo de um indivíduo depende dos fatores acima abordados, vamos discutir a partir de agora as consequências de uma mutação para o gene mutante.

Algumas mutações levam a substituição de apenas um nucleotídeo, sendo também conhecidas como SNPs (do inglês '*single nucleotide polymorphism*' – polimorfismo de nucleotídeo único), enquanto outras levam a inserção ou deleção de alguns nucleotídeos e são conhecidas com INDEL (IN = inserção / DEL = deleção).

MUTAÇÕES QUE ENVOLVEM SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Mutações sinônimas

São alterações no DNA que não causam alteração alguma na proteína, uma vez que o novo códon formado continua especificando o mesmo aminoácido (figura 4.3).

DNA	A T G	C C C	G T A	A G G	C T T	T A A
	T A C	G G G	C A T	T C C	G A A	A T T
RNA _m	A U G	C C C	G U A	A G G	C U U	U A A
Proteína	metionina	prolina	valina	treonina	leucina	Código de parada

↓

DNA	A T G	C C C	G T G	A C G	C T T	T A A
	T A C	G G G	C A C	T G C	G A A	A T T
RNA _m	A U G	C C C	G U G	A C G	C U U	U A A
Proteína	metionina	prolina	valina	treonina	leucina	Código de parada

↓

MUTAÇÃO SINÔNIMA

Figura 4.3: Mutação sinônima (a troca de nucleotídeos no DNA não altera o aminoácido na proteína).

Mutações de troca de sentido

Quando a troca de um nucleotídeo no DNA resulta na troca de um aminoácido na proteína (figura 4.4).

DNA	A T G	CCC	G T A	A G G	C T T	T A A
	T A C	GGG	C A T	T C C	G A A	A T T
RNA _m	A U G	CCC	G U A	A G G	C U U	U A A
Proteína	metionina	prolina	valina	treonina	leucina	Código de parada
↓						
DNA	A T G	C A C	G T A	A C G	C T T	T A A
	T A C	G T G	C A T	T G C	G A A	A T T
RNA _m	A U G	C A C	G U A	A C G	C U U	U A A
Proteína	metionina	histidina	valina	treonina	leucina	Código de parada
↓						
MUTAÇÃO DE TROCA DE SENTIDO						

Figura 4.4: Mutação de troca de sentido (a troca de nucleotídeos no DNA altera o aminoácido na proteína).

Mutações sem sentido

Nesse caso, a mutação acabou criando código de parada precoce onde anteriormente um aminoácido normal era especificado. Como resultado, a proteína mutante é menor que a proteína normal (figura 4.5).

DNA	A T G	C C C	G T A	T T G	C T T	T A A
	T A C	G G G	C A T	A A C	G A A	A T T
RNA _m	A U G	C C C	G U A	U U G	C U U	U A A
Proteína	metionina	prolina	valina	leucina	leucina	Código de parada
DNA	A T G	C C C	G T A	T A G	C T T	T A A
	T A C	G G G	C A T	A T C	G A A	A T T
RNA _m	A U G	C C C	G U A	U A G	C U U	U A A
Proteína	metionina	prolina	valina	Código de parada		
MUTAÇÃO SEM SENTIDO						

Figura 4.5: Mutação sem sentido (a troca de nucleotídeos acaba criando um código de parada precoce, portanto a proteína mutante é menor que a normal).

Mutações que alteram o *splicing* do RNA_m

Conforme descrito no capítulo 2, a retirada dos íntrons do RNA_m através do *splicing* envolve o reconhecimento de sequências específicas de nucleotídeos nos limites ‘intron / éxon’. Algumas mutações ocorrem justamente nessas regiões, eliminando um sítio de corte ou criando um novo sítio de corte no íntron (figura 4.6).

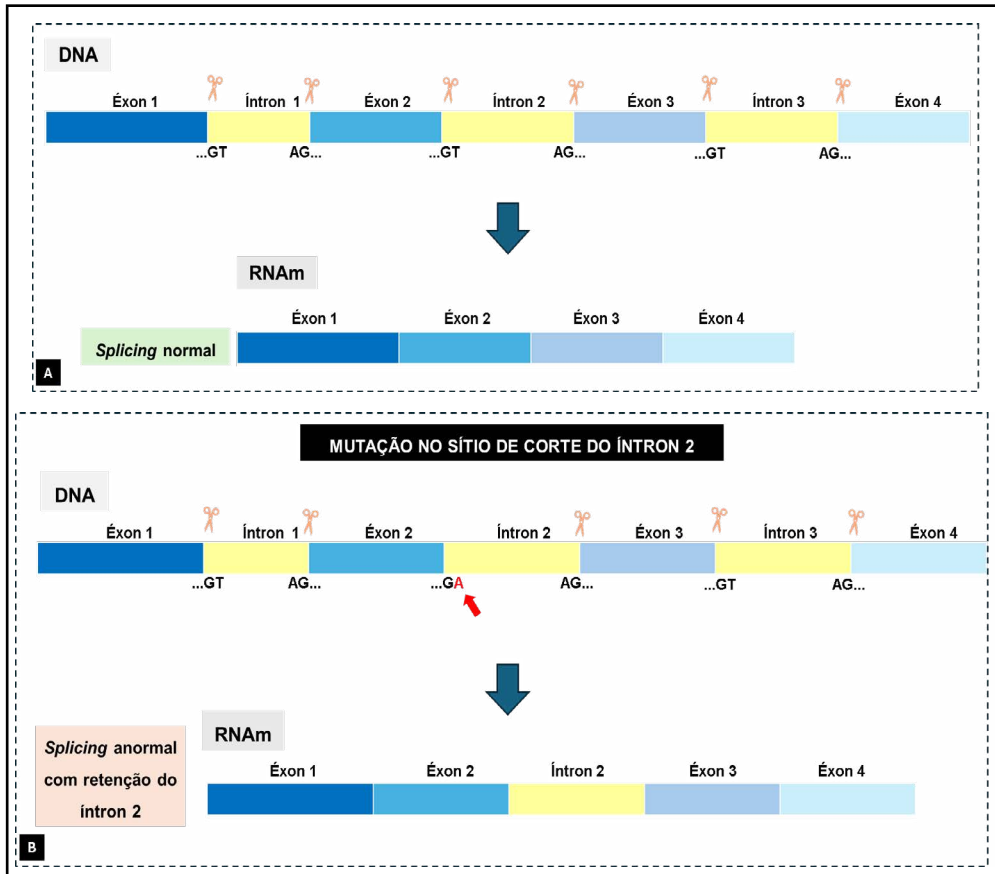


Figura 4.6: Mutações que alteram o ‘*splicing*’ do RNAm. A) Sequência original e remoção correta dos íntrons. e B) A presença de uma mutação no sítio de corte do íntron 2 resulta na sua retenção, portanto o RNAm final está alterado.

MUTAÇÕES ‘INDEL’ E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Pequenas deleções e inserções

São mutações que levam a perda ou ao ganho de um ou alguns nucleotídeos. Como consequência, a partir do ponto onde houve a mutação a sequência dos códons será diferente da original, portanto, os aminoácidos adicionados a partir desse momento também serão diferentes. Nesse caso, há uma mudança na matriz de leitura (figura 4.7).

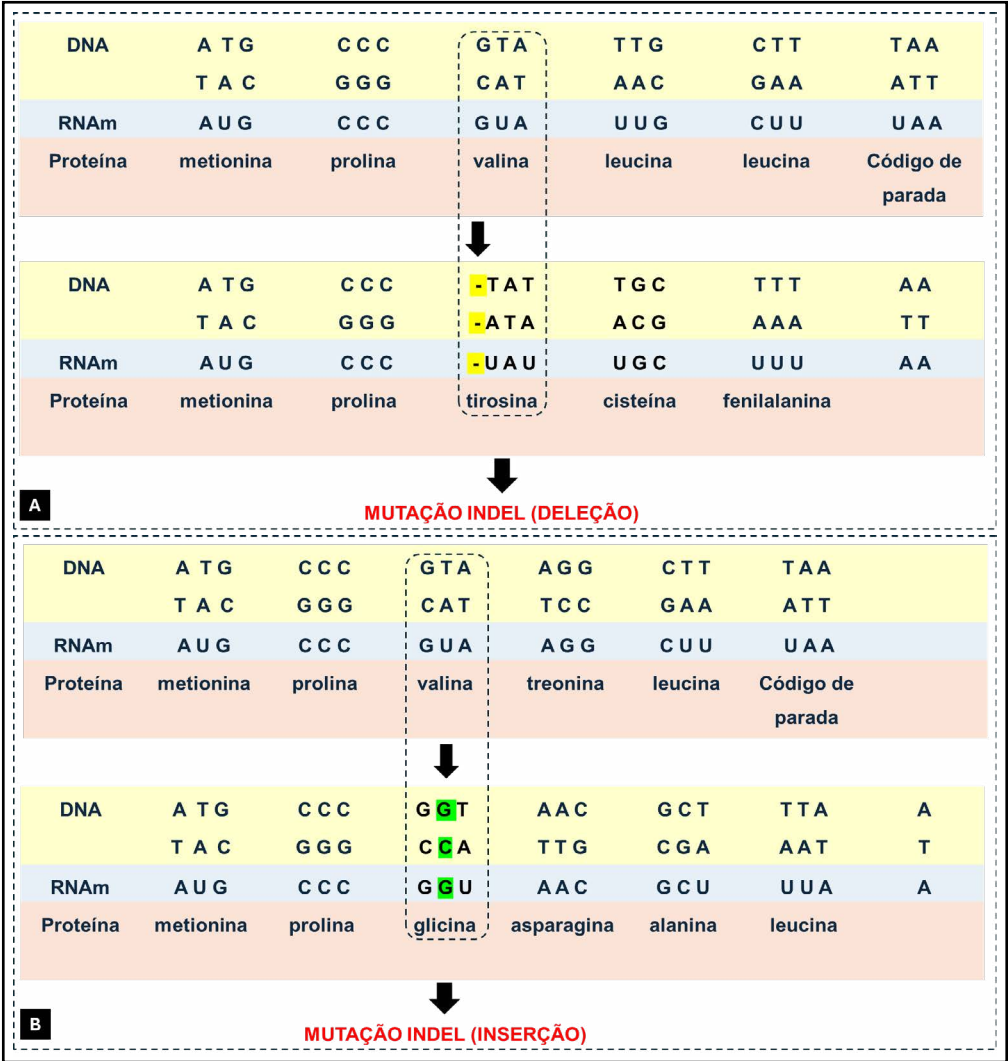


Figura 4.7: Mutações do tipo INDEL. A) Deleção e B) Inserção. Notem que todos os códons a partir do local da mutação foram alterados.

4.3 - ALELOS DE UM GENE

Quando essa mutação ocorre em um gene, a partir desse momento ele passa a ter duas versões: a versão original e a mutante, que são chamadas simplesmente de ‘alelos’. Os alelos podem ser definidos

como ‘variações do mesmo gene’ ou ‘formas alternativas do mesmo gene’ de uma forma bem simplista e objetiva (figura 4.8).

		5	10	15	20	25	30
		↓	↓	↓	↓	↓	↓
Sequência de nucleotídeos original		ATGAAGTTGACCGTACGTATCCATGTAGTA					
SNP	Alelo 1	ATGAAGTTGACCGTACGTATCCATGTAGTA					
	Alelo 2	ATGAAGTTGA ^T CGTACGTATCCATGTAGTA					

Figura 4.8: Exemplo de alelos de um gene onde se observa um SNP (polimorfismo de nucleotídeo único). Os números acima da sequência de nucleotídeos original indicam a posição de cada um deles. Nesse caso, a variação ocorreu na posição 11 com a troca de uma citosina (C) por uma timina (T).

É importante ressaltar que um gene pode ter vários alelos. No entanto, considerando que nós humanos somos diplóides, teremos apenas duas cópias de cada um, pois receberemos um alelo da mãe e outro do pai. Dessa maneira, cada indivíduo poderá ter duas cópias iguais de um alelo e será um homozigoto (exemplo: AA, aa, BB, bb, DD, etc), ou apresentará duas cópias diferentes desse alelo e será um heterozigoto (exemplo: Aa, Bb, Dd, etc) (figura 4.9).

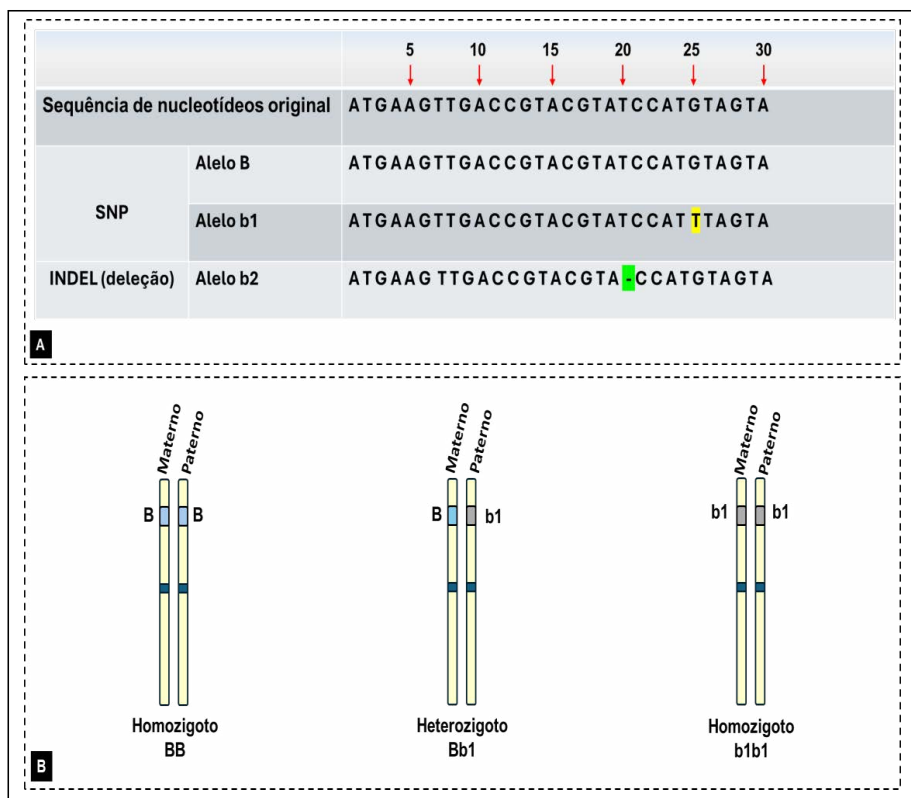


Figura 4.9: A) Exemplo de um gene que possui vários alelos. O alelo B corresponde a sequência original, o alelo b1 apresenta um SNP e o alelo b2 apresenta uma deleção. B) Representação de indivíduos homozigotos e heterozigotos.

4.4 - INTERAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES ALELOS DE UM GENE

Agora que já entendemos o que são alelos de um gene e que em nossas células teremos duas cópias deles (uma herdada da mãe e outra do pai), você já parou para pensar o que acontece em uma célula quando dois alelos diferentes estão presentes em um heterozigoto (figura 4.10)? Pois é exatamente sobre isso que vamos discutir a partir de agora!

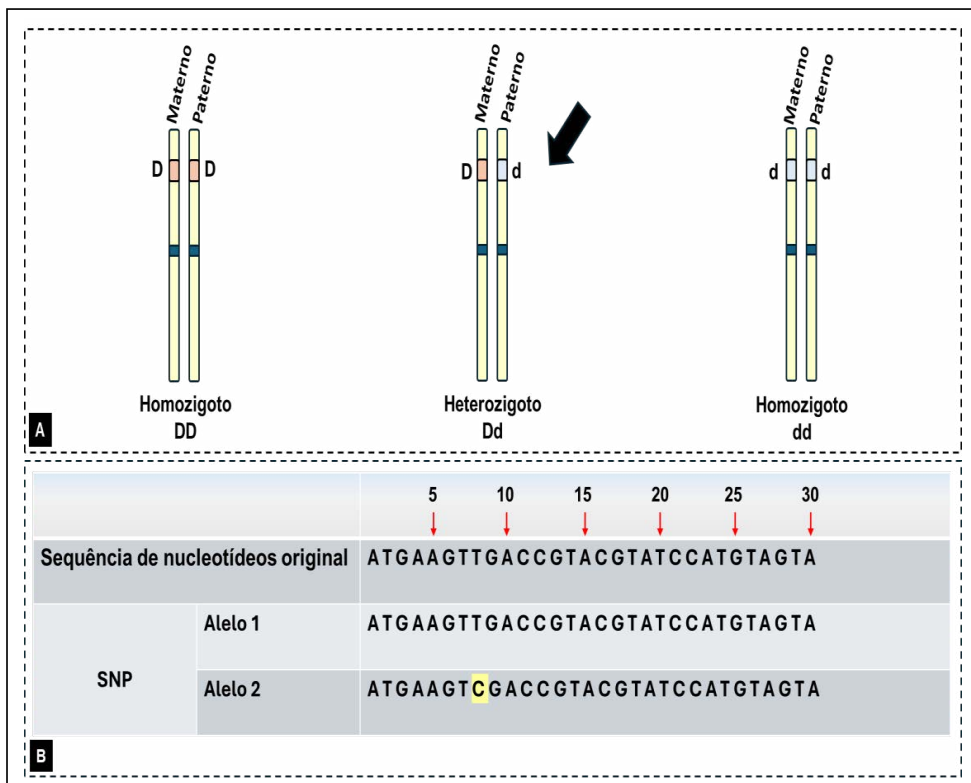


Figura 4.10: A) Ilustração representando as possíveis combinações de alelos nos indivíduos, com destaque para o heterozigoto. B) Representação molecular da sequência de nucleotídeos em cada alelo, mostrando a variação que existe na posição 8 (troca de T por C).

A interação entre diferentes alelos pode ocorrer de três maneiras:

1) Dominância completa; 2) Dominância incompleta e 3) Codominância.

Dominância completa.

Um dos alelos se expressa (domina) e o outro não ('se esconde'). Nesse caso, o alelo dominante é representado pela letra maiúscula (exemplo: 'A', 'B', 'D', etc) e o recessivo pela letra minús-

cula (exemplo: 'a', 'b', 'd', etc). Quando a relação entre os alelos é de dominância completa, um heterozigoto será representado por Aa, Bb etc.

A questão agora é: como explicar a dominância e a recessividade em termos de produtos gênicos? Ou seja, como as proteínas produzidas a partir do alelo dominante e recessivo interagem? Na verdade, a proteína produzida a partir do alelo dominante é funcional e desempenha seu papel normal na célula, ao passo que a produzida a partir do recessivo não é funcional (não consegue desempenhar sua função). Vamos considerar as situações abaixo e analisar a figura 4.11 ok?

Indivíduo AA: tem as duas cópias do alelo que produz a versão funcional da proteína, portanto a função será desempenhada na célula.

Indivíduo Aa: tem apenas uma cópia do alelo que produz a versão funcional da proteína, o que já é suficiente para que a função seja normalmente executada pela célula. Assim, a presença de apenas um alelo dominante já é suficiente para que a característica determinada por ele se manifeste.

Indivíduo aa: tem os dois alelos que produzem a versão não funcional da proteína, portanto, a função não será executada na célula.

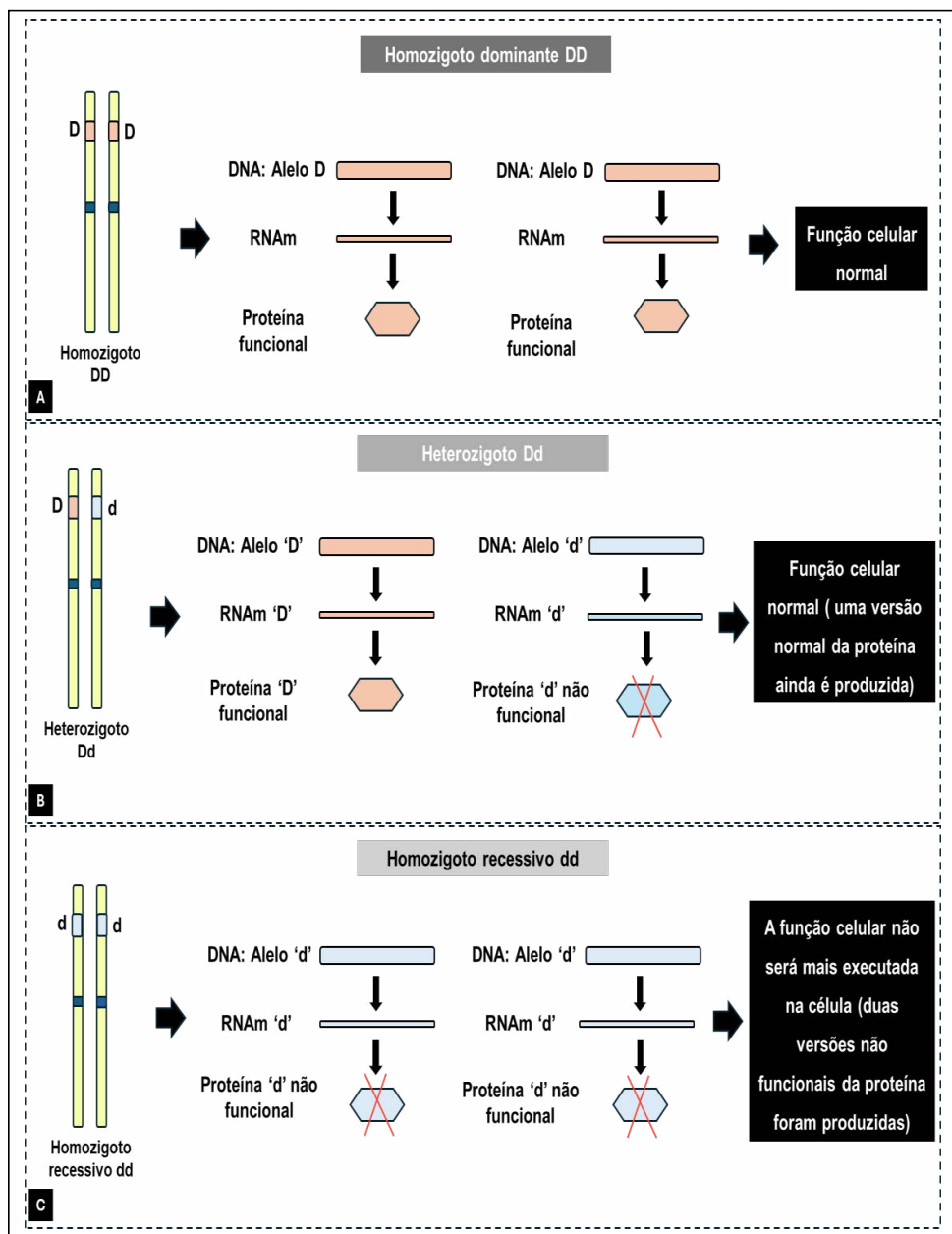


Figura 4.11: Interação entre os produtos gênicos em uma célula quando a interação entre os alelos é de dominância completa. A) Homozigoto dominante; B) Heterozigoto e C) Homozigoto recessivo.

Dominância incompleta.

Nesse caso, o heterozigoto será um intermediário entre os dois homozigotos. Vamos analisar o que acontece com a cor das pétalas da flor de *Antirrhinum majus*, conhecida popularmente como 'boca de leão'. O cruzamento de uma planta que produz flores vermelhas (c^+/c^+) com uma que produz flores brancas (c/c), resultará em descendentes heterozigotos (c^+/c) que produzem flores rosa (figura 4.12). Notem que nesse caso os alelos não serão representados por letras maiúscula e minúscula, ok?

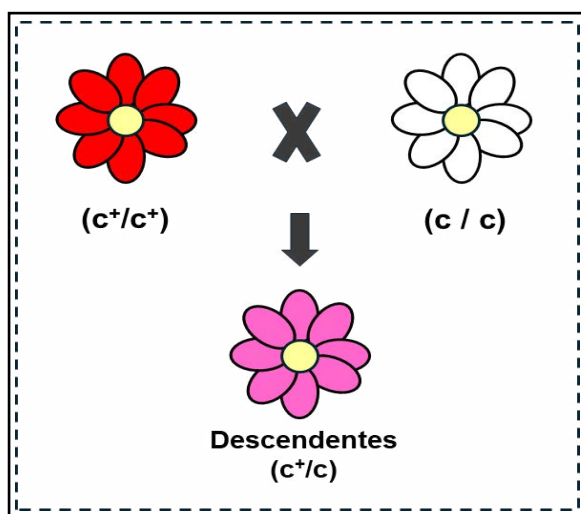


Figura 4.12: Ilustração demonstrando a interação entre os alelos na dominância incompleta. Note que nesse caso o heterozigoto tem características intermediárias entre os dois homozigotos. Observação: a flor representada na figura é apenas uma ilustração, não se trata da 'boca de leão'.

Mas o que acontece nesse caso? Por que os heterozigotos apresentam um fenótipo intermediário entre os dois homozigotos? Na verdade, cada alelo selvagem (c^+) produz uma quantidade já estabelecida do seu produto proteico. Vamos analisar as situações abaixo apresentadas e a figura 4.13 para entender melhor a dominância incompleta.

Plantas c^+/c^+ : cada alelo produz uma dose correta já estabelecida

de proteína. Dessa maneira, com as duas cópias há muito pigmento nas células de forma que a cor fica mais intensa (vermelha).

Plantas c^+/c : possuem apenas uma cópia do alelo que produzirá a quantidade padrão da proteína, fazendo com que a quantidade de pigmento presente nas células seja menor. Portanto, a cor da flor será rosa.

Plantas c/c : não haverá produção de pigmentos na célula e a flor será branca.

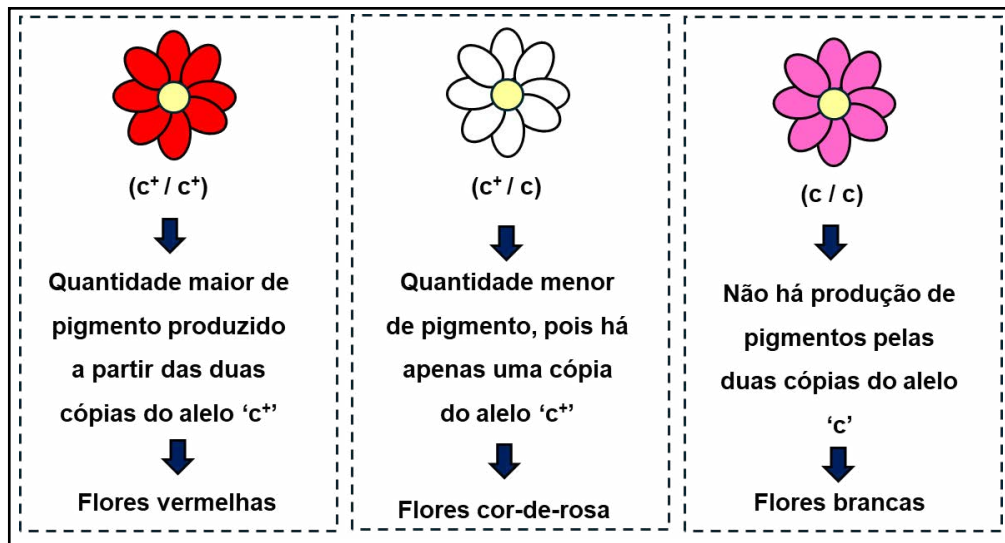


Figura 4.13: Explicação molecular da dominância incompleta: a diferença na quantidade de pigmentos é responsável pela diferença nas cores das pétalas. Observação: a flor representada na figura é apenas uma ilustração, não se trata da 'boca de leão'.

Codominância.

A codominância é caracterizada por casos em que o heterozigoto expressa as características determinadas pelos dois alelos! Um

exemplo clássico pode ser observado na determinação dos grupos sanguíneos ABO em humanos. O gene 'I' é o responsável por essa característica e possui 3 alelos: 'I^A' (determina o tipo sanguíneo A), 'I^B' (determina o tipo sanguíneo B), e 'i' (determina o tipo sanguíneo O). As possíveis combinações desses alelos e os respectivos tipos sanguíneos estão apresentados na figura 4.14 abaixo.

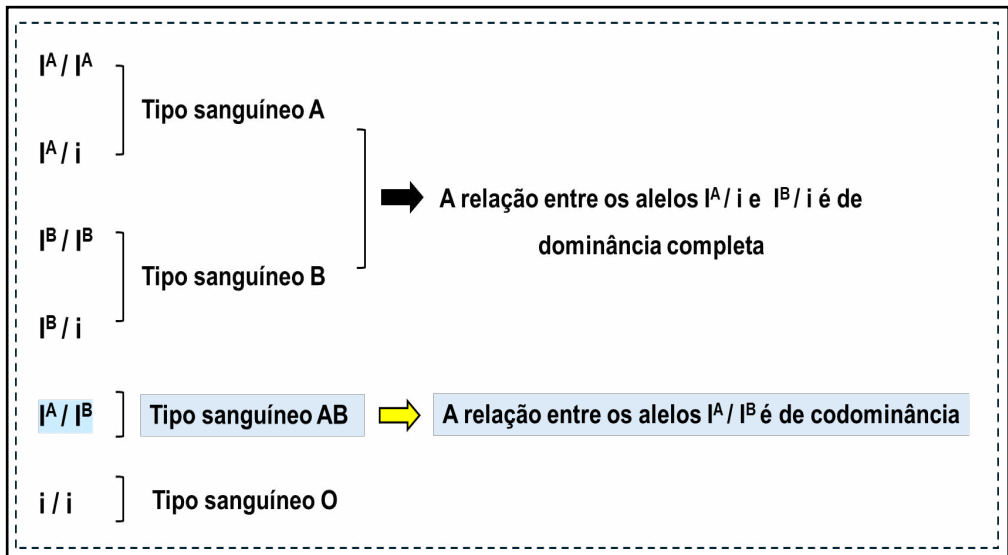


Figura 4.14: Determinação do grupo sanguíneo ABO em humanos onde é possível observar a codominância entre os alelos I^A / I^B e a dominância completa entre os alelos I^A / i e I^B / i.

Mas como compreender a base molecular da codominância dos grupos sanguíneos ABO? Nesse caso, cada alelo determina a presença de um tipo carboidrato na superfície das hemácias. Há pequenas variações entre cada um deles, o que já é suficiente para determinar os diferentes tipos sanguíneos (figura 4.15).

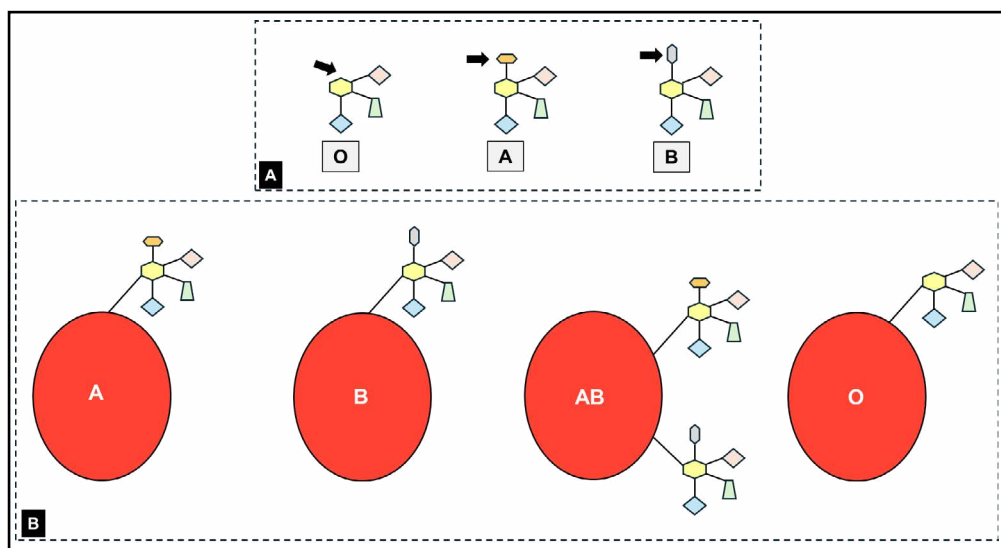


Figura 4.15: Ilustração simplificada da determinação dos grupos sanguíneos ABO em humanos. A) Estrutura dos carboidratos presentes na superfície das hemácias dos diferentes tipos sanguíneos (as setas indicam a região onde existe uma pequena variação entre eles); B) Carboidratos presentes na superfície das hemácias dos tipos sanguíneos A, B, AB e O.

4.5 - TRANSMISSÃO DE UMA MUTAÇÃO GÊNICA AO LONGO DAS GERAÇÕES

O DNA é transmitido ao longo das gerações, sendo que um indivíduo possui 50% do seu DNA de origem materna e 50% de origem paterna. Vamos considerar que uma mutação aconteceu em um indivíduo: ela será transmitida aos seus descendentes ou não? Depende do tipo de célula em que essa alteração genética aconteceu, se é uma célula somática ou uma célula germinativa. Vamos analisar melhor o que de fato acontece.

Mutações somáticas e mutações germinativas

Mutações somáticas são aquelas que acontecem em qualquer célula que formam o corpo humano (células adiposas, fibroblastos etc.) exceto as que formarão os gametas. Nesse caso, a mutação não será transmitida às próximas gerações.

Já as mutações germinativas ocorrem em células que formarão os gametas (espermatozóides e oócitos). Portanto, nesse caso elas poderão ser transmitidas aos descendentes caso o gameta mutante participe da fecundação. É importante destacar que um indivíduo normal, com ancestrais também normais, portanto, sem nenhum histórico de doenças genéticas na família, pode apresentar gametas portadores de mutações genéticas não detectados.

REFERÊNCIAS

Griffiths, Anthony J., F. et al. Introdução à Genética. Disponível em: Minha Biblioteca, (12th edição). Grupo GEN, 2022.

Menck, Carlos F., M. e Marie-Anne Van Sluys. Genética molecular básica: dos genes ao genoma. Disponível em: Minha Biblioteca, Grupo GEN, 2017.

McInnes, Roderick R. Thompson & Thompson Genética Médica. Disponível em: Minha Biblioteca, (8th edição). Grupo GEN, 2016.

Pimentel, Márcia Mattos, G. et al. Genética Essencial. Disponível em:
Minha Biblioteca, Grupo GEN, 2013.

Watson, James, D. et al. Biologia Molecular do Gene. Disponível em:
Minha Biblioteca, (7th edição). Grupo A, 2015.



TRANSMISSÃO DO MATERIAL GENÉTICO

O DNA é a molécula hereditária. Mas como ele é transmitido dos pais aos seus descendentes? A compreensão desse tema em humanos é importante em especial quando há relatos de uma doença que se manifesta em diferentes indivíduos da mesma família. Não é possível impedir a sua transmissão, mas a probabilidade de que os descendentes herdem a condição em análise pode ser determinada quando a causa é o distúrbio causado por um único gene (monogênico). Quais aspectos devem ser considerados para compreender o padrão de transmissão de um distúrbio genético? Há exceções a serem consideradas? Ao longo desse capítulo, você encontrará a resposta a cada uma dessas perguntas. Vamos lá!

Nesse capítulo vamos analisar como ocorre a transmissão do nosso material genético, o DNA! Vamos começar discutindo os mecanismos celulares que permitem esse processo, em seguida vamos aplicar todo esse conhecimento para abordarmos os padrões de herança em humanos.

5.1 - MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA TRANSMISSÃO NO DNA.

Quando pensamos na transmissão do DNA, é preciso abordar esse processo considerando que todas as células do corpo humano herdam o DNA da sua célula mãe e que os genitores transmitem seu DNA aos seus descendentes. Portanto, a partir de agora vamos analisar como uma célula transmite seu DNA às células filhas através da mitose, e como os pais transmitem seu DNA aos seus descendentes através da meiose (que permite a formação dos gametas).

MITOSE: TRANSMISSÃO DO DNA ENTRE AS CÉLULAS EM UM ORGANISMO

A mitose é um evento celular fundamental no corpo humano e ocorre em todas as células somáticas (ou sejam, em todas as células do corpo humano exceto os gametas – óócitos e espermatozoides). Existem diferentes mecanismos genéticos envolvidos no controle desse processo para garantir que a célula se multiplique apenas quando necessário, uma vez que divisão celular descontrolada pode levar a

formação de um tumor.

Vamos apenas lembrar que o ciclo celular é dividido em 2 fases: interfase e mitose, reforçando que é na interfase que a célula se prepara para passar pela mitose, duplicando todo o seu conteúdo, inclusive o seu DNA, conforme descrito no capítulo 1.

Considerando esse processo em humanos, a célula que entra em mitose tem em seu interior 92 moléculas de DNA (46 moléculas duplicadas), as quais se encontram na forma de cromatina e que precisam ser divididas em duas partes iguais. Para garantir que isso ocorra com precisão, a célula inicialmente compacta a cromatina na prófase. Quando a cromatina está totalmente compactada, o DNA agora está na forma de cromossomo, os quais se organizam na região equatorial (central) da célula (isso ocorre metáfase). Notem que esses processos iniciais facilitam a separação de todo DNA presente na célula em duas partes iguais! Em seguida, cada metade do cromossomo (cada cromátide-irmã) é separada para lados opostos da célula na anáfase. Por fim, a célula começa a 'descompactar' os cromossomos, que voltam a assumir a forma de cromatina e divide o seu citoplasma em dois na telófase (figura 5.1).

De forma resumida, ao longo da mitose o DNA: I) é compacto; II) é organizado no centro da célula e III) é separado em duas partes iguais. Isso parece simples, mas não é! E a exatidão com que esses processos ocorrem é fundamental para que todas as células do nosso corpo sejam formadas. Dessa maneira, a mitose garante não apenas

a transmissão do DNA entre as células, mas também que todas as células em um indivíduo tenham a mesma quantidade de material genético.

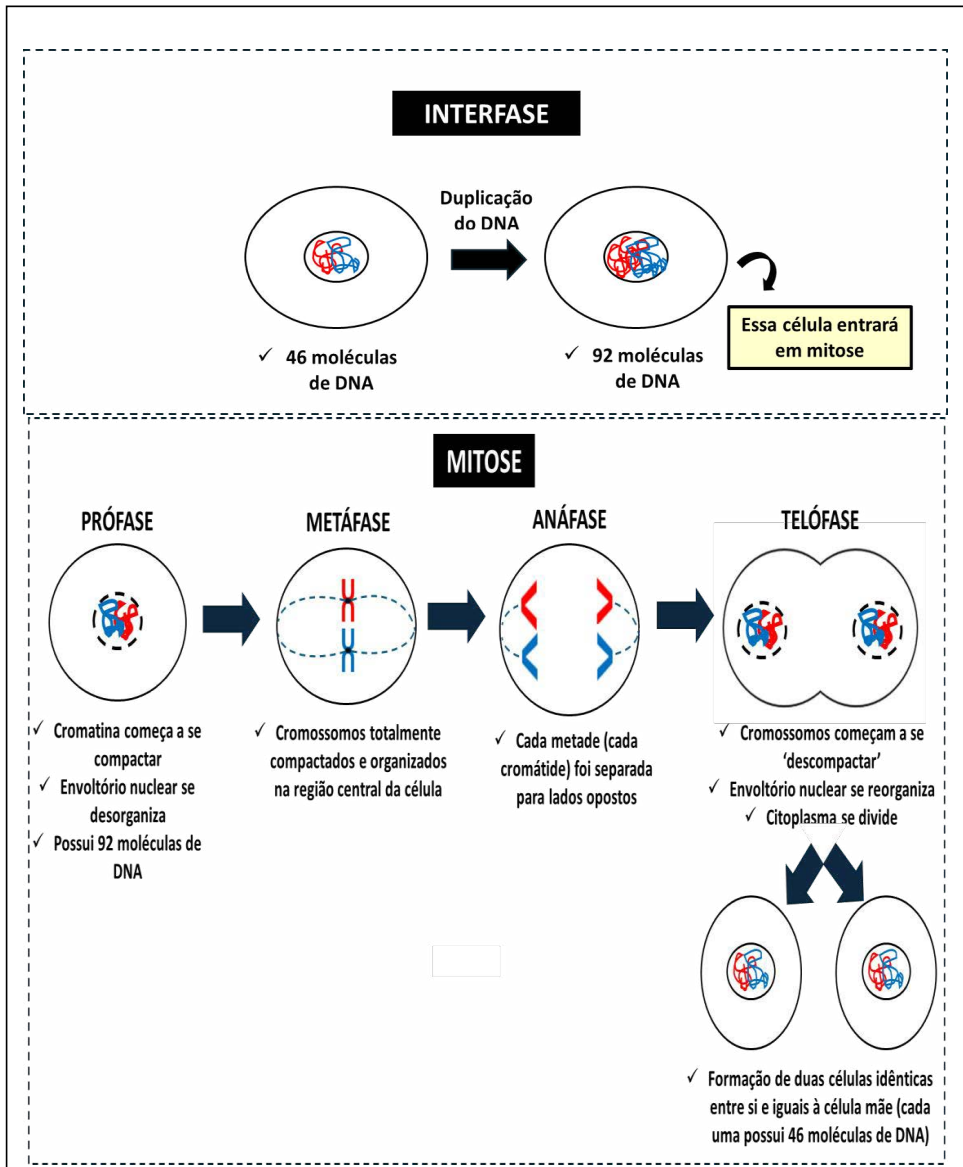


Figura 5.1: Ilustração mostrando os principais eventos da mitose.

MEIOSE: TRANSMISSÃO DO DNA ENTRE AS GERAÇÕES

É incrível pensarmos que o DNA é transmitido de uma geração para outra! Isso ocorre através dos gametas, que por sua vez são formados através da meiose. Esse processo de divisão celular apresenta aspectos únicos e outros muito parecidos aos da mitose.

Novamente, consideraremos esse evento em humanos, mas esses eventos se aplicam a praticamente todas as espécies com reprodução sexuada. A célula previamente duplica o seu DNA na interfase e entra em meiose, no entanto, a célula se divide duas vezes: meiose I e meiose II. Como em cada divisão ela separa o seu material genético em duas partes iguais, ao final da meiose II cada célula formada apresentará metade de quantidade de DNA (23 cromossomos). Vamos analisar os principais aspectos desse processo, ok?

A meiose I é a etapa que apresenta os aspectos exclusivos da meiose! A célula começa esse processo com seu DNA na forma de cromatina, que então começa a se compactar. Conforme a compactação avança, os pares de cromossomos homólogos se organizam e ficam pareados (lado a lado). Nesse momento ocorre a troca de segmentos genéticos, a recombinação genética entre os cromossomos materno e paterno graças ao 'crossing-over', um evento importantíssimo pois aumenta a variabilidade genética da espécie! Em seguida, os cromossomos homólogos se organizam na região equatorial da célula, sendo separados para lados opostos em seguida e por fim o citoplasma é dividido, originando duas células filhas haplóides. Como

assim, haplóides? Bem, lembre-se que a célula-mãe é diplóide, pois tinha em seu interior um par de cromossomos (um materno e outro paterno), e eles foram separados, de forma que cada célula filha apresenta em seu interior apenas um deles (materno ou paterno), portanto é haplóide (figura 5.2).

Um aspecto importante que pode gerar alguma confusão é número de conjuntos cromossômicos (representado pela letra 'n') e conteúdo de DNA (número de moléculas de DNA, representado pela letra 'C'). Ao final de meiose I humana, uma célula que tinha 23 pares de cromossomos, ou seja, dois conjuntos cromossômicos (um materno e outro paterno: $2n = 46$) passa a apresentar apenas um, com 23 cromossomos ($n = 23$) em seu interior. Com relação a conteúdo de DNA, no início a célula apresentava 92 moléculas de DNA (tinha em seu interior 46 cromossomos duplicados) e agora apresenta 46 (23 cromossomos duplicados). Reforçando: $C = 46$ significa que existem 46 moléculas de DNA presentes nos 23 cromossomos duplicados da célula. Dessa maneira, considerando que os cromossomos ainda estão duplicados, a célula inicia novamente um processo de divisão, a meiose II.

A meiose II é muito parecida com a mitose. Os cromossomos totalmente compactados se organizam na região equatorial da célula, em seguida cada cromátide-irmã é separada para lados opostos e por fim o citoplasma é dividido, formando células filhas com 23 cromossomos (como não estão mais duplicados, agora $C = 23$) (figura 5.3).

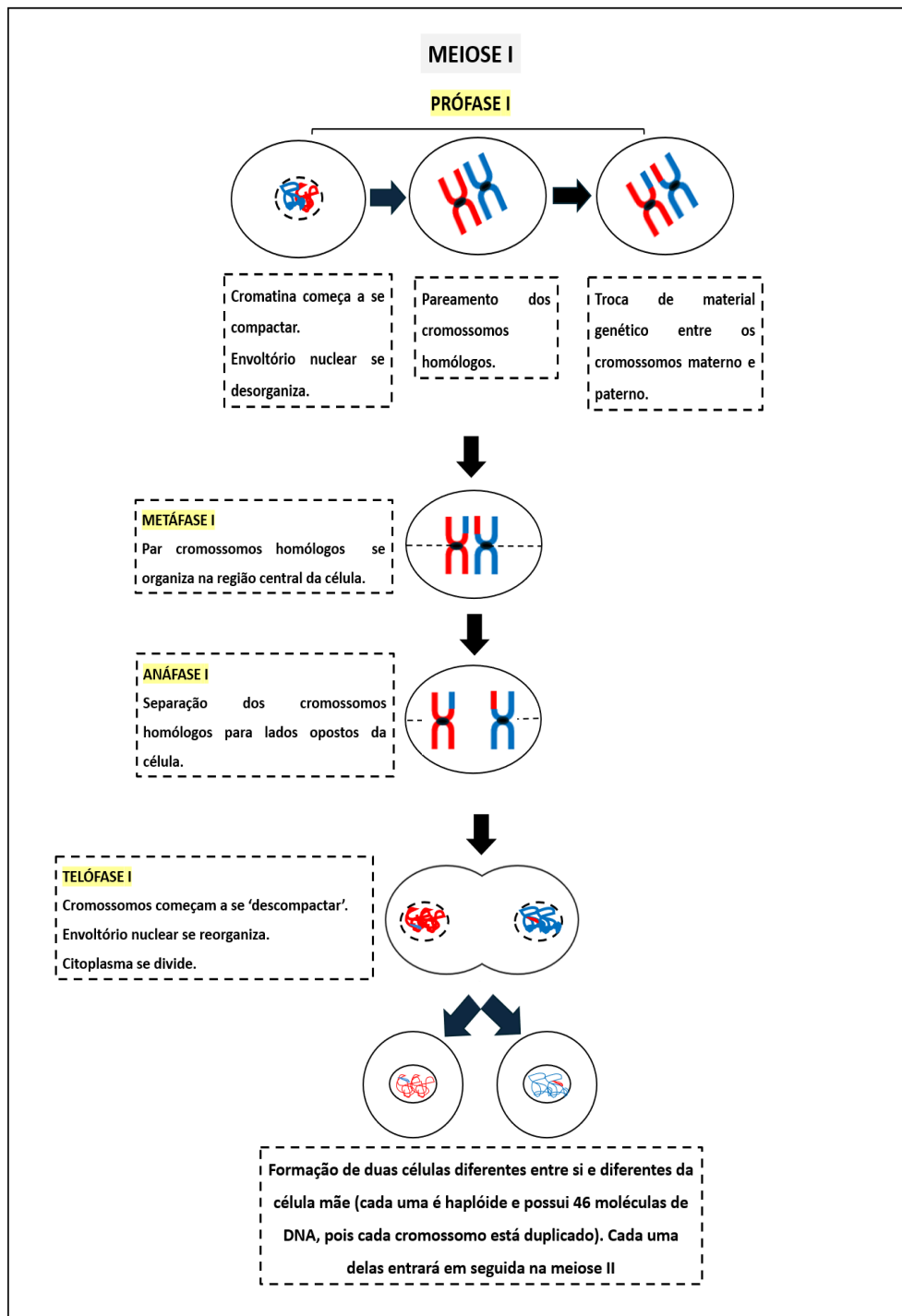


Figura 5.2: Ilustração mostrando os principais eventos da meiose I em humanos.

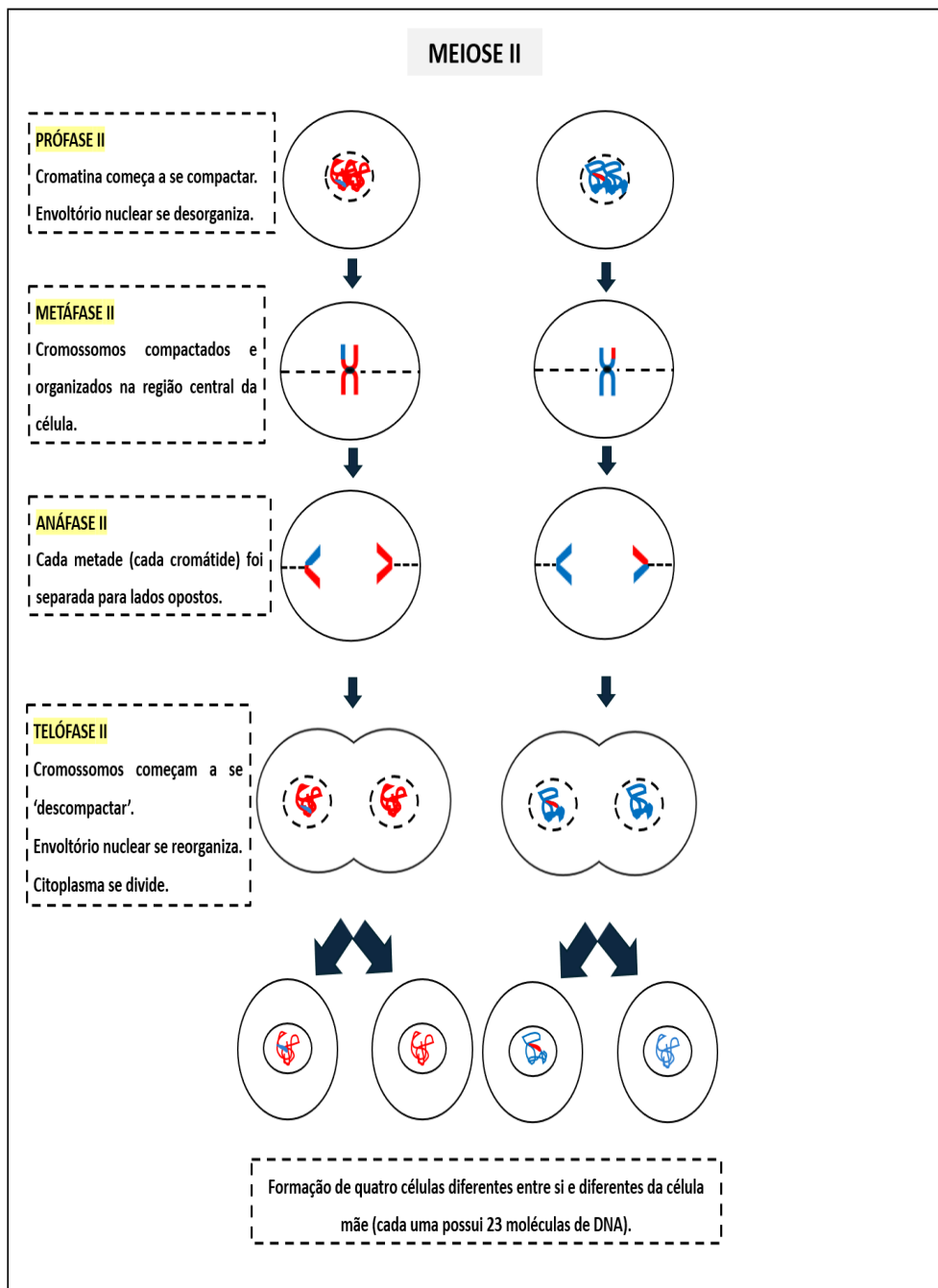


Figura 5.3: Ilustração mostrando os principais eventos da meiose II em humanos (note que as duas células formadas na meiose I passam por esse evento).

A meiose tem um significado biológico enorme, pois através dela há um aumento da variabilidade genética da espécie, separação aleatória dos alelos e redução pela metade do número de cromossomos. Assim, com a união dos gametas materno e paterno durante a fecundação, a primeira célula do corpo humana, o zigoto, é formada contendo em seu interior 50% do DNA paterno e 50% do DNA materno (figura 5.4).

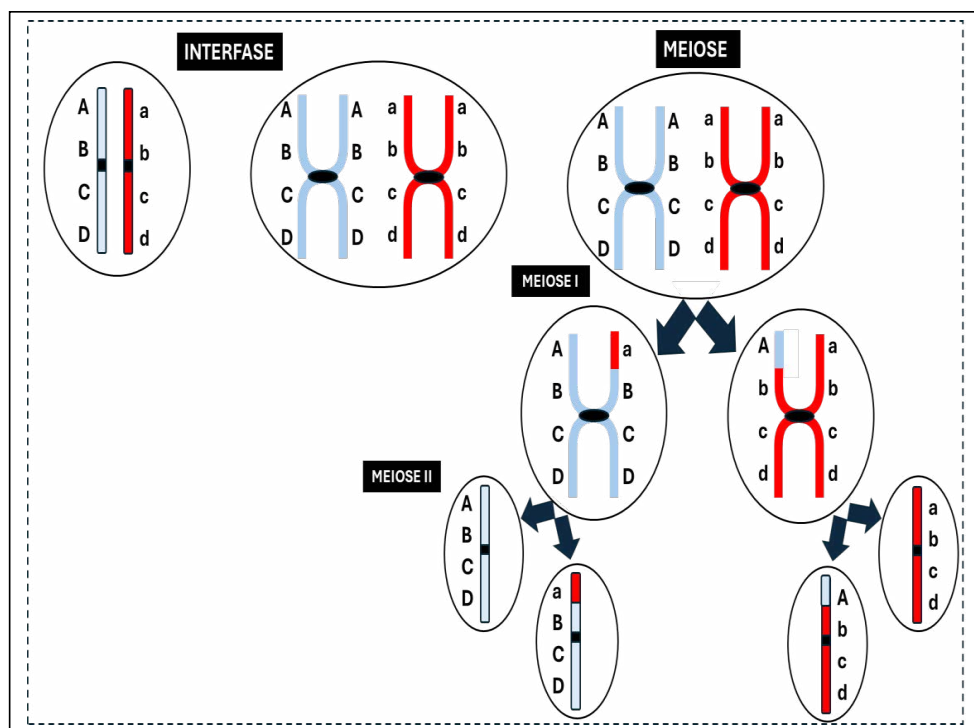


Figura 5.4: Ilustração mostrando as consequências genéticas da meiose: separação dos alelos, aumento da variabilidade genética e redução do número de cromossomos pela metade.

Ao analisarmos a meiose humana masculina e feminina, um aspecto importante deve ser considerado. Embora o processo em si

seja igual, o momento em que ele ocorre é diferente. Nos homens, esse processo começa na puberdade e continua até a velhice. Em mulheres, esse processo começa ainda na vida intrauterina e é interrompido. Na puberdade ele será concluído, e normalmente apenas um gameta feminino é liberado a cada ciclo menstrual.

5.2 - ANÁLISE DOS PADRÕES DE HERANÇA

Uma vez que já compreendemos os processos celulares envolvidos na transmissão do DNA, vamos iniciar nossa abordagem sobre esse tema em humanos analisando os padrões de herança monogênicos, mais precisamente os casos de distúrbios genéticos, nos quais a causa é a alteração de apenas um gene. Em seguida, abordaremos exemplos de padrões atípicos de herança (casos que fogem completamente às regras) e por fim a herança multifatorial. Vamos lá!

PADRÕES DE HERANÇA MONOGÊNICA

A análise dos distúrbios monogênicos deve considerar sempre dois fatores: 1) qual é a localização do gene de interesse (o responsável pelo distúrbio) e 2) qual é o alelo responsável pela condição em análise (o dominante ou o recessivo). Mas por que afinal de contas? Bem, vamos analisar como cada uma dessas variáveis interfere ou não na transmissão do distúrbio.

O gene responsável pelo distúrbio em análise obrigatoriamente se encontra em algum cromossomo do cariótipo humano. Esses cromos-

somos, por sua vez, são classificados como autossomos e sexuais. Os autossomos são aqueles em comum entre os cariótipos masculino e feminino (do 1 ao 22) e os sexuais são os cromossomos 'X' e 'Y', que variam entre os sexos (mulheres XX e homens XY) (figura 5.5).

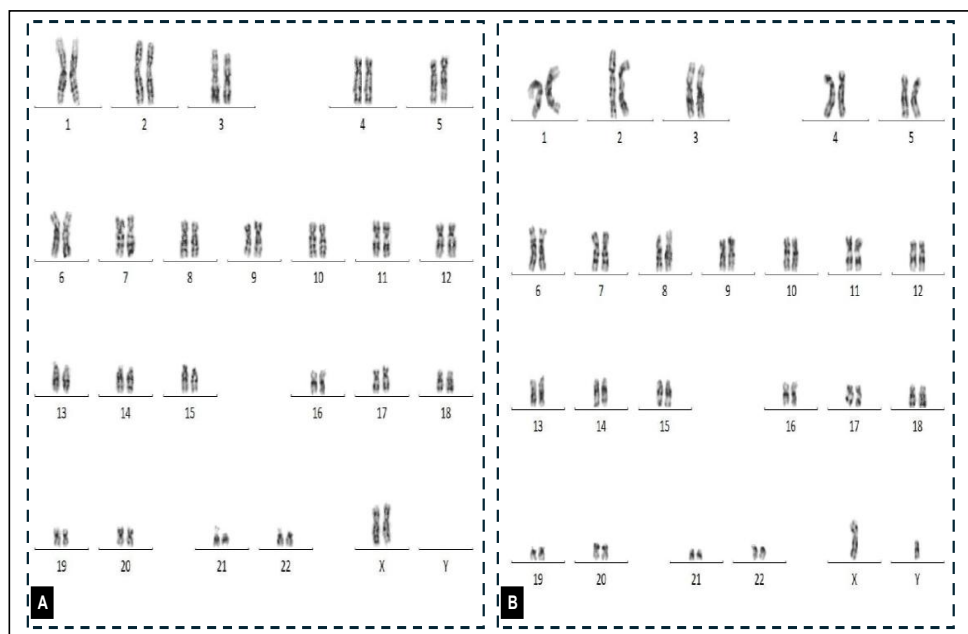


Figura 5.5: A) Cariótipo feminino e B) Cariótipo masculino. Imagens gentilmente cedidas pela Dra. Cibeles Cristina Castilho.

Dessa maneira, se o gene de interesse se encontrar em qualquer cromossomo do 1 ao 22, será transmitido pelo pai e pela mãe ao filho ou à filha. Nesse caso, a transmissão independe do sexo e a proporção de homens e mulheres afetados será a mesma. Trata-se de um distúrbio autossômico. No entanto, se o gene responsável pela condição em análise se encontra no cromossomo 'X' e a mulher é afetada, ela poderá sim transmiti-lo a seus filhos e filhas, mas, se o

homem é afetado, o distúrbio será transmitido do pai somente para as filhas. Trata-se de um distúrbio ligado ao X. Se estiver no cromossomo 'Y', o pai transmite somente para seus filhos (distúrbio ligado ao Y). Perceberam como a localização do gene interfere em sua transmissão? (figura 5.6).

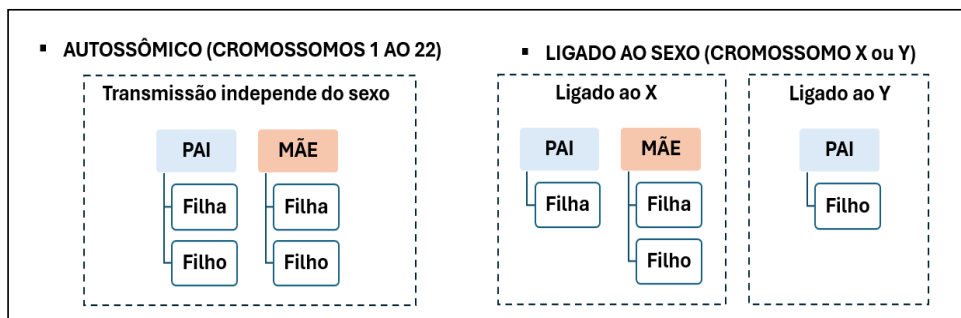


Figura 5.6: Ilustração sobre a transmissão de um distúrbio de acordo com a localização do gene responsável pela condição em análise.

Vamos agora analisar o papel do alelo responsável pela condição em análise nesse contexto. Nos distúrbios dominantes em que o alelo 'A' por exemplo é o responsável pela condição em análise, indivíduos 'AA' e 'Aa' serão afetados, enquanto os 'aa' serão normais. Note que a presença de apenas um alelo dominante já é suficiente para pessoa ser afetada, isso porque o que ele determina prevalece sobre o alelo recessivo (que 'se esconde'), portanto nesses casos a frequência do distúrbio na família será maior. Já em um distúrbio recessivo causado alelo 'b' por exemplo, indivíduos 'BB' e 'Bb' serão normais, enquanto os 'bb' serão afetados (agora, a frequência do distúrbio na família é menor pois é preciso que os dois alelos recessivos estejam presentes

no mesmo indivíduo para ele ser afetado). Fique atento pois ao analisar um distúrbio dominante e um recessivo teremos situações diferentes, portanto não generalize pensando que indivíduos homozigotos recessivos (aa, bb, dd, etc) sempre serão afetados, ok?

Dessa maneira, ao considerarmos a localização de gene de interesse e qual o alelo responsável pela condição teremos: I) distúrbio autossômico recessivo, II) distúrbio autossômico dominante, III) distúrbio ligado ao X dominante, IV) distúrbio ligado ao X recessivo e V) distúrbio ligado ao Y. Note que em cada caso está descrito qual o alelo responsável pela condição em análise e a sua localização.

Antes de analisar cada um deles, é preciso compreender como é realizada a análise da transmissão de um determinado distúrbio ao longo das gerações de uma família. Para facilitar essa análise, são usados símbolos para elaboração de um 'heredograma', que nada mais é que a elaboração gráfica da história da família (histórico familiar), conforme apresentado na figura 5.7 abaixo.

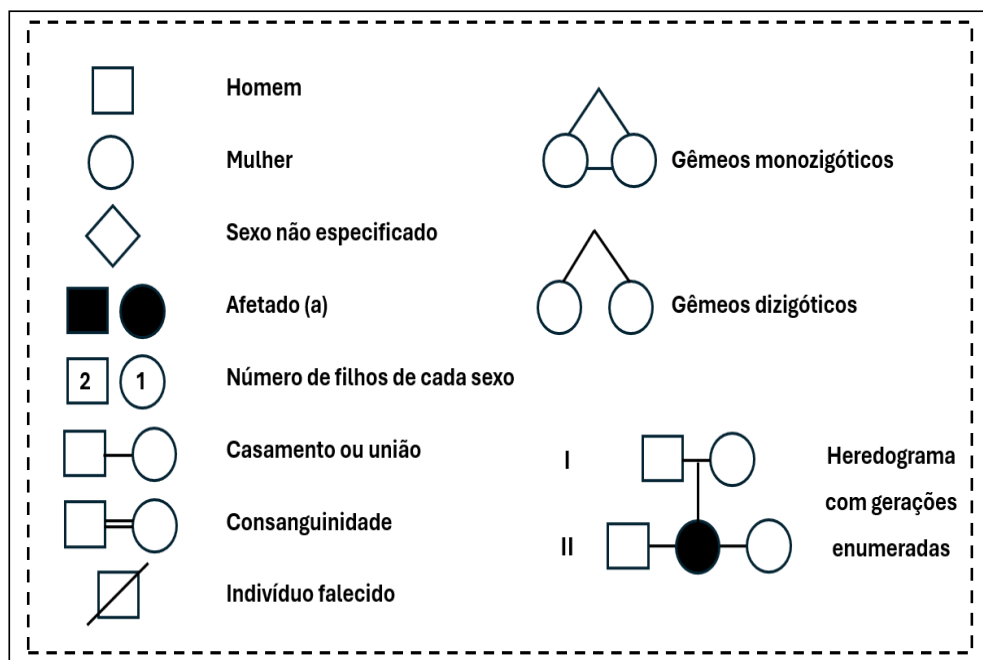


Figura 5.7: Exemplos dos principais símbolos usados em um heredograma.

Distúrbios autossômicos recessivos

Nesse caso, a transmissão independe do sexo (por ser autossômico) e indivíduos que tiverem os dois alelos recessivos serão afetados. Se o alelo 'a' for o alelo mutante responsável pelo distúrbio, indivíduos 'AA e Aa' serão normais, enquanto os 'aa' serão afetados.

Normalmente, nos heredogramas desse tipo de distúrbio os genitores (pais) são normais e tem descendentes afetados (meninas e meninos). Mas como explicar tal fato? Bem, o pai e a mãe são heterozigotos (Aa), ou seja, embora sejam normais, eles possuem o alelo recessivo e o transmitem aos seus descendentes (são portadores assintomáticos do alelo deletério). A mãe transmitiu um 'a' e o pai o

outro 'a' (figura 5.8). Como exemplos podemos citar a fibrose cística e a anemia falciforme.

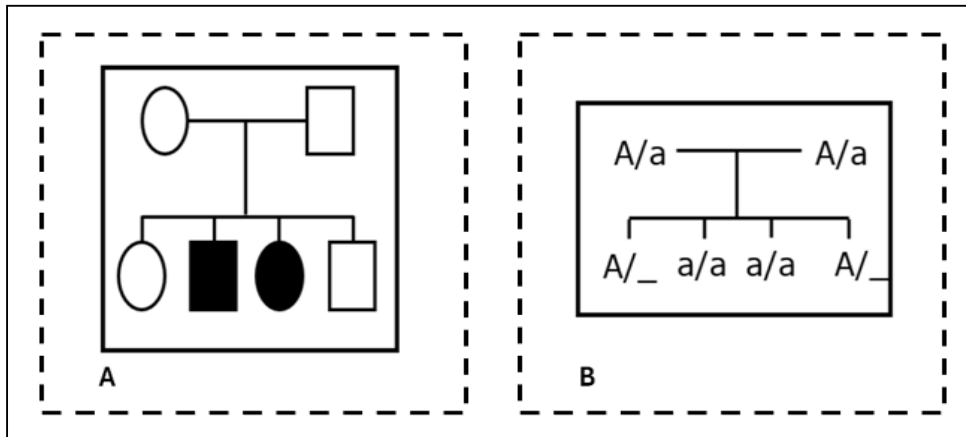


Figura 5.8: A) Heredograma típico de um distúrbio autossômico recessivo; B) O mesmo heredograma apresentado em 'A', mas agora evidenciando qual o genótipo dos genitores e dos descendentes.

Consanguinidade

Nos casos em que os genitores são consanguíneos (apresentam algum grau de parentesco), o risco da ocorrência de um distúrbio autossômico recessivo nos descendentes será maior. Isso ocorre porque normalmente o alelo recessivo é raro na população em geral. No entanto, os indivíduos de uma família podem herdar um alelo mutante de um ancestral comum, de tal maneira que nessa família ele será mais frequente, com uma quantidade maior de indivíduos heterozigotos (embora normais), que poderão transmitir o alelo recessivo ao descendente, que será afetado. Vale ressaltar que a consanguinidade não é a explicação mais comum a ocorrência dos distúrbios autossômicos recessivos.

Distúrbios autossômicos dominantes.

Nesses distúrbios, continuamos com a transmissão independente do sexo, mas agora o alelo envolvido é o dominante, o que terá algumas implicações muito importantes. Se considerarmos que o alelo “A” é o responsável pela condição em análise, indivíduos “AA e Aa” serão afetados, enquanto os “aa” serão normais. Note que basta a presença de um alelo dominante para o indivíduo ser afetado. Portanto, a presença do distúrbio é mais comum e observa-se indivíduos afetados (homens e mulheres) em todas as gerações de uma família. Genitores afetados tem descendentes também afetados, ao passo que genitores normais tem descendentes também normais (figura 5.9). Como exemplo, podemos citar a pseudoacondroplasia (tipo de nanismo).

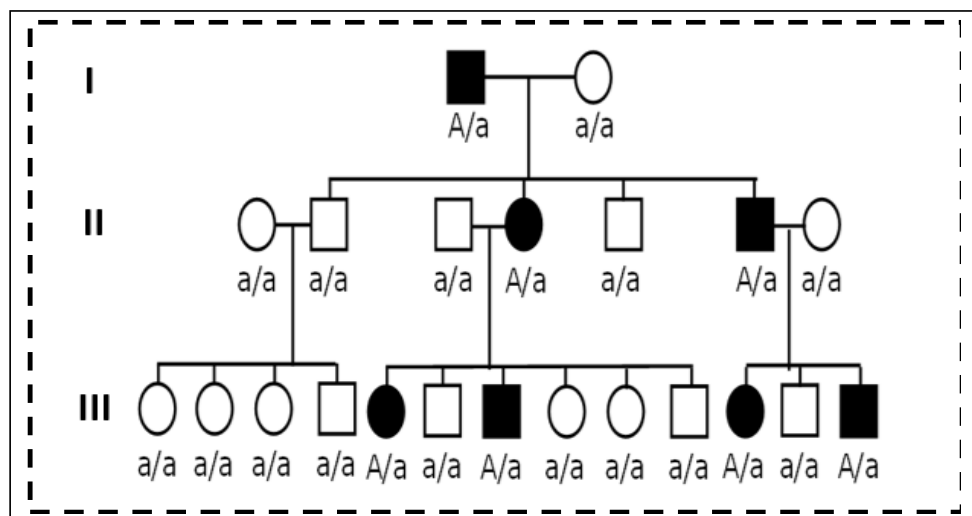


Figura 5.9: Heredograma típico de um distúrbio autossômico dominante. Note que ele se manifesta em todas as gerações e que afetados incluem tanto homens quanto mulheres. Além disso, pais normais terão descendentes também normais.

Padrões de herança ligada ao sexo

A herança ligada ao sexo se refere aos casos em que o gene responsável pela condição em análise se encontra nos cromossomos sexuais: X ou Y. Portanto, é importante conhecermos um pouco mais sobre a estrutura de cada um deles.

De início, vale ressaltar que o cromossomo X é maior que o Y e possui mais genes. Além disso, existem genes encontrados somente no X, os genes ligados ao X. Da mesma forma, existem genes presentes exclusivamente no cromossomo Y – os genes ligados ao Y. Por fim, há uma pequena região em comum entre os dois cromossomos, a região de homologia entre o X e o Y (figura 5.10)

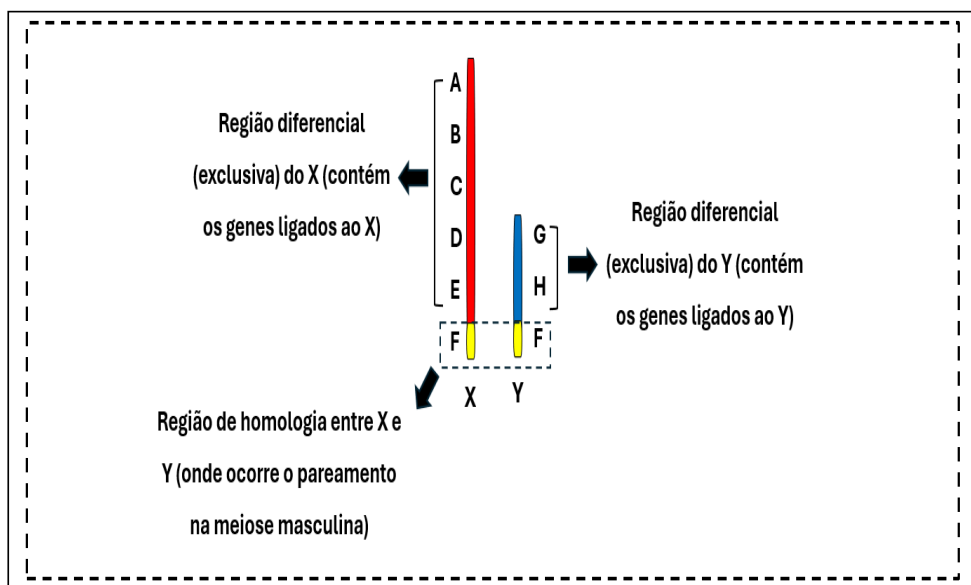


Figura 5.10: Ilustração apresentada a estrutura e composição dos cromossomos X e Y. Note a presença de regiões exclusivas (diferenciais) de cada um, bem como uma região de homologia entre esses cromossomos.

Além disso, mulheres possuem duas cópias do cromossomo X (são XX), portanto são homogaméticas, ou seja, o gameta feminino sempre herdará um cromossomo X. Já os homens são o sexo XY, portanto são heterogaméticos, pois podem formar gametas com o cromossomo X ou com o cromossomo Y. Vamos discutir os diferentes tipos de distúrbios ligados aos cromossomos sexuais a partir de agora.

Distúrbios recessivos ligados ao X

O alelo responsável nesse caso é o recessivo (exemplo 'a') e se encontra na região diferencial (exclusiva) do cromossomo X. Agora sabemos exatamente em qual cromossomo o gene de interesse se encontra, portanto, isso será representado conforme demonstrado na figura 5.11 abaixo.

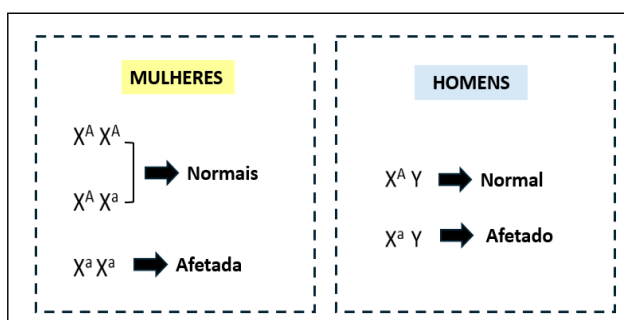


Figura 5.11: Ilustração representando os indivíduos normais e afetados para um distúrbio recessivo ligado ao X.

Um fato que merece destaque na figura 5.11 acima é que os homens possuem apenas um cromossomo X, o que significa que são hemizigotos para genes ligados ao X. Isso porque eles serão X^A ou X^a ,

apresentam apenas uma cópia e não podem ser homozigotos (presença de dois alelos iguais) nem heterozigotos (presença de dois alelos diferentes). Como consequência, a proporção de homens afetados é maior que a de mulheres.

Mas como será a transmissão desse tipo de distúrbio ao longo das gerações? O pai afetado transmite o X com o alelo recessivo para todas suas filhas, mas para nenhum filho. A mãe afetada transmite o X com o alelo recessivo para filhos e filhas. A figura 5.12 abaixo apresenta um heredograma típico de um distúrbio recessivo ligado ao X.

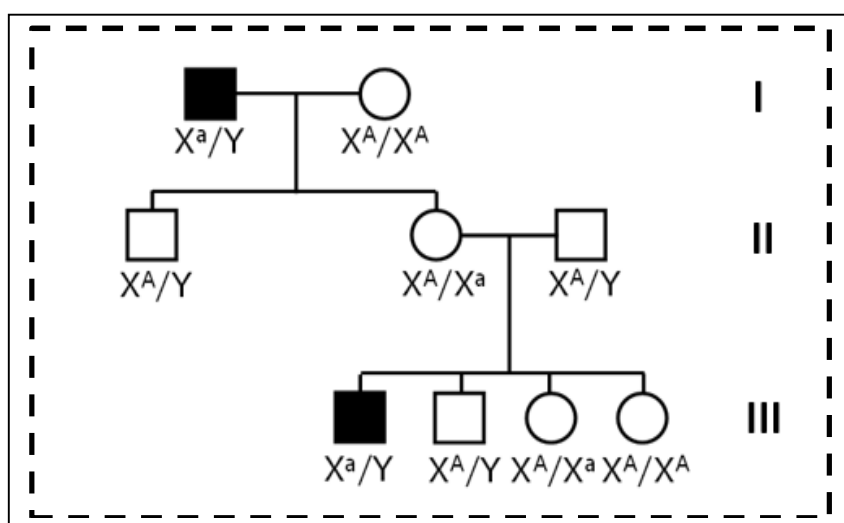


Figura 5.12: Heredograma de um distúrbio recessivo ligado ao X.

Resumidamente, a herança recessiva ligada ao X apresenta algumas características importantes, dentre elas: 1) incidência da doença é mais alta nos homens que nas mulheres; 2) mulheres hete-

rozigotas geralmente não são afetadas; 3) o gene responsável pela condição é transmitido por um homem afetado para todas suas filhas. Qualquer filho de suas filhas terá 50% de chance de herdá-lo e 4) o gene em geral nunca é transmitido de pai para filho. Como exemplos de distúrbios recessivos ligados ao X podemos citar o daltonismo e a hemofilia.

Distúrbios dominantes ligados ao X

O alelo responsável nesse caso é o dominante (exemplo 'A') e se encontra na região diferencial do cromossomo X. Os indivíduos normais e afetados estão representados na figura 5.13 abaixo.

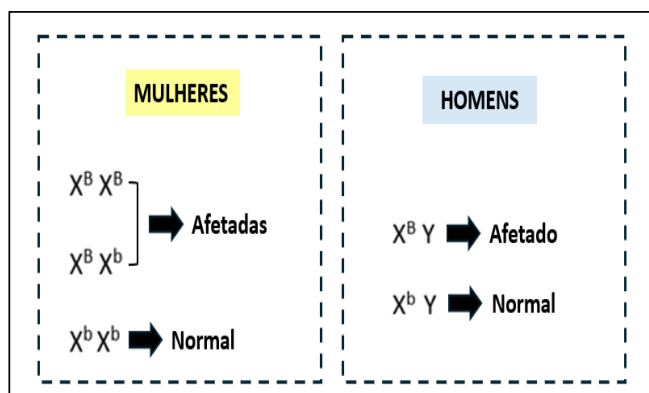


Figura 5.13: Ilustração representando os indivíduos normais e afetados para um distúrbio dominante ligado ao X.

As características desse distúrbio envolvem: 1) em caso de mulheres afetadas, se elas forem heterozigotas a prole masculina e feminina tem 50% de chance de herdar o fenótipo (se elas forem homozigotas dominantes todos seus descendentes serão afetados) e 2) os homens afetados que se casam com mulheres normais terão TODAS

as filhas e NENHUM filho afetado. É importante ressaltar que nesse caso elas não serão apenas portadoras do alelo deletério, elas serão de fato afetadas (figura 5.14).

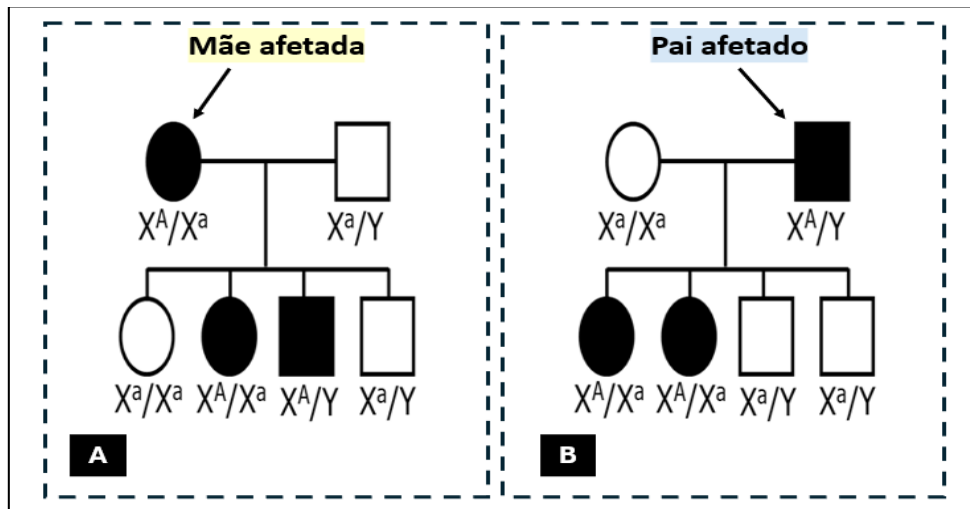


Figura 5.14: Heredogramas de um distúrbio dominante ligado ao X. A) Mãe afetada (heterozigota) e B) Pai afetado.

Como exemplo de distúrbio dominante ligado ao X, podemos citar o raquitismo hipofosfatêmico (também conhecido como raquitismo resistente à vitamina D), no qual há comprometimento da capacidade dos túbulos renais na reabsorção do fosfato filtrado.

Inativação do cromossomo X

Como estamos analisando os distúrbios ligados ao X, é importante considerarmos a inativação do cromossomo X. Trata-se de um evento normal que segue a seguinte regra: TODO cromossomo X além de um deve ser inativado. Considerando que mulheres são XX, isso se

aplica a todas as células somáticas femininas. Mas o que é inativar um cromossomo X? Bem, trata-se de um processo que ocorre logo no início do desenvolvimento embrionário, onde um cromossomo X terá a maioria do seu DNA compactado (uma pequena região consegue ‘escapar’ da compactação). Mais precisamente, esse processo ocorre logo nas primeiras mitoses após a formação do zigoto e é um evento aleatório, ou seja, o cromossomo X de origem materna ou paterna pode ser inativado. No entanto, uma vez inativado, o padrão de inativação será mantido sempre que a célula se dividir, de forma que o corpo de uma mulher pode ser um mosaico (mistura) de células apresentando o cromossomo X materno ou paterno inativado (figura 5.15).

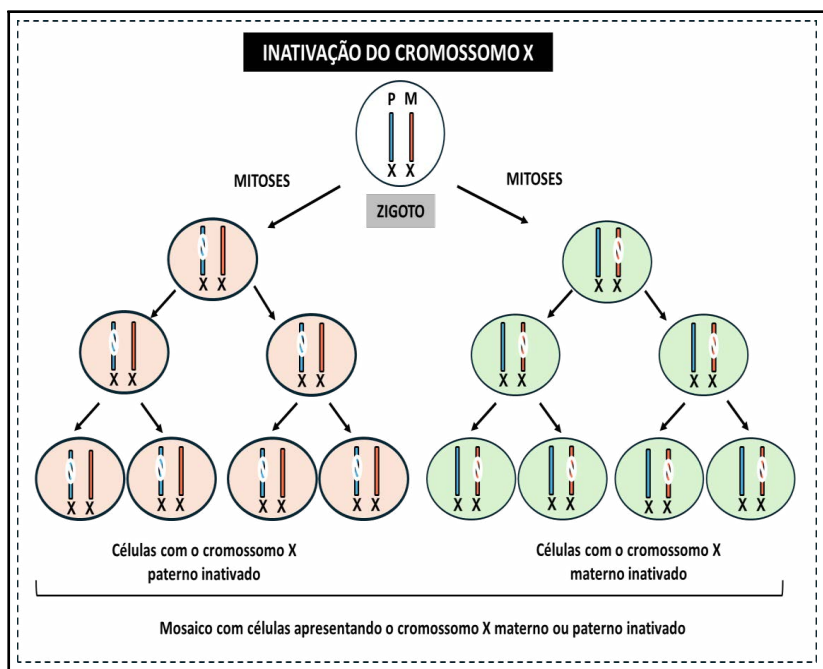


Figura 5.15: A inativação do cromossomo X ocorre nas primeiras mitoses após a formação do zigoto e é um evento aleatório, de forma que o corpo feminino pode ser um mosaico com relação à inativação do cromossomo X.

Com a maioria do seu DNA compactado continuamente (seja interfase ou mitose), os genes presentes nessa região estão ‘silenciados’ (não serão usados para produção de RNAm e proteínas). Apenas a região que ‘escapa’ da inativação consegue expressar seus genes (figura 5.16). Voltaremos a falar sobre esse assunto quando analisarmos alterações cromossômicas em envolvem o cromossomo X no capítulo 6, ok?

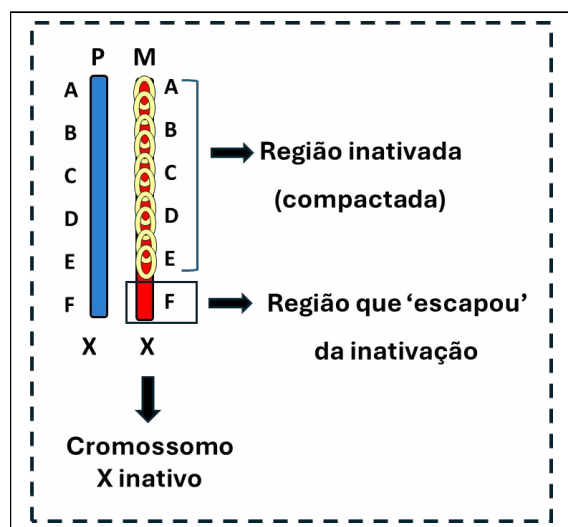


Figura 5.16: Ilustração representando a inativação do cromossomo X (note a região que ‘escapou’ desse processo). M = materno e P = paterno.

Distúrbios ligados ao Y

O cromossomo Y é pequeno e possui poucos genes, a maioria deles envolvido com características masculinas como formação de testículos, produção de hormônios e de gametas masculinos. Podemos citar a hipertricose auricular, que causa crescimento excessivo de pelos nas orelhas. Nesse caso, o pai afetado transmite essa característica a todos seus filhos.

PENETRÂNCIA E EXPRESSIVIDADE

Já analisamos os diferentes padrões dos distúrbios monogênicos. Nesse momento, é preciso considerar dois fatores fundamentais: penetrância e expressividade.

A penetrância é a porcentagem de indivíduos que tem o alelo e apresentam o fenótipo correspondente. Nos casos em que a penetrância é 100%, o indivíduo tem o genótipo para um determinado distúrbio e fenótipo associado a ele. No entanto, há casos em que a pessoa é portadora do genótipo que determina a manifestação do distúrbio, mas é normal. Essa variação pode ocorrer entre indivíduos ou mesmo com a idade. Em casos em que a penetrância é de 50% por exemplo, significa que apenas metade das pessoas portadores do genótipo para um determinado distúrbio são de fato afetadas. Por outro lado, a expressividade avalia o quanto determinado alelo é expresso em um fenótipo (a intensidade do fenótipo). Por exemplo, o alelo em questão determina a cor azul. Alguns indivíduos são azuis, enquanto outros azul gradualmente mais claro. Todos manifestam a característica, mas com maior ou menor intensidade (figura 5.17).

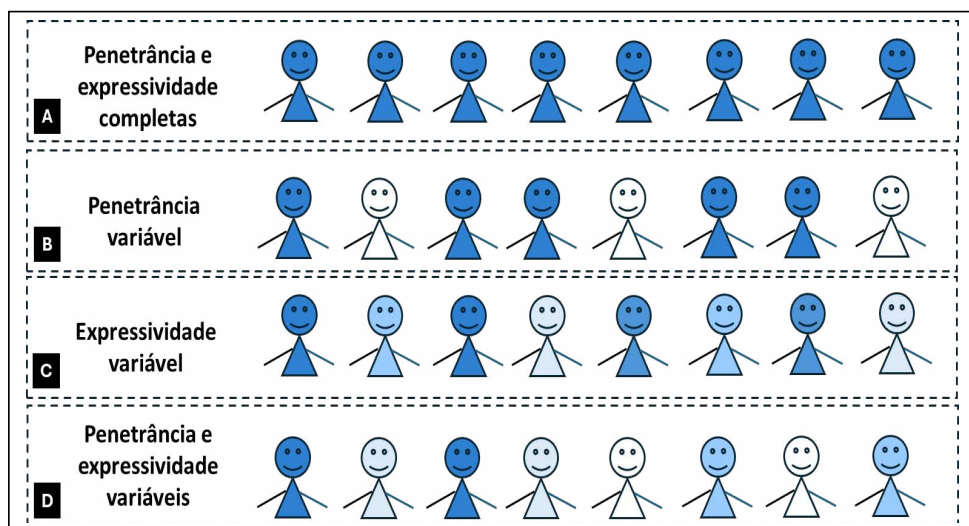


Figura 5.17: Ilustração mostrando como a penetrância e a expressividade influenciam na manifestação de um determinado fenótipo (no exemplo acima, a cor azul). A) Todos os que possuem os alelos para cor azul, expressam essa característica da forma esperada (penetrância e expressividade completas). B) Três indivíduos não expressam a característica determinada pelos alelos azuis, ao contrário, são brancos (penetrância variável). C) Nota-se uma variação na intensidade da cor azul (expressividade variável). D) Alguns indivíduos não apresentam a cor esperada, enquanto outros apresentam uma variação em sua intensidade (penetrância e expressividade variáveis).

PADRÕES ATÍPICOS DE HERANÇA

A partir de agora, vamos discutir dois exemplos de ‘padrões atípicos de herança’, os quais não seguem os padrões descritos por Mendel. Portanto, o alelo responsável pela condição em análise e sua localização não interferem no padrão de transmissão através das gerações.

Mosaicismo

Trata-se de uma situação em que um indivíduo a princípio tinha suas células geneticamente normais, no entanto, o DNA presente em

uma de suas células sofre uma mutação e a partir de então ele apresentará duas populações de células geneticamente distintas em seu organismo (será um mosaico). Caso a mutação seja responsável por uma doença genética, ela surgiu nesse indivíduo apesar da ausência de um histórico familiar anterior (figura 5.18). Essa mutação poderá ser transmitida às próximas gerações se a mutação for germinativa, mas se for uma mutação somática não.

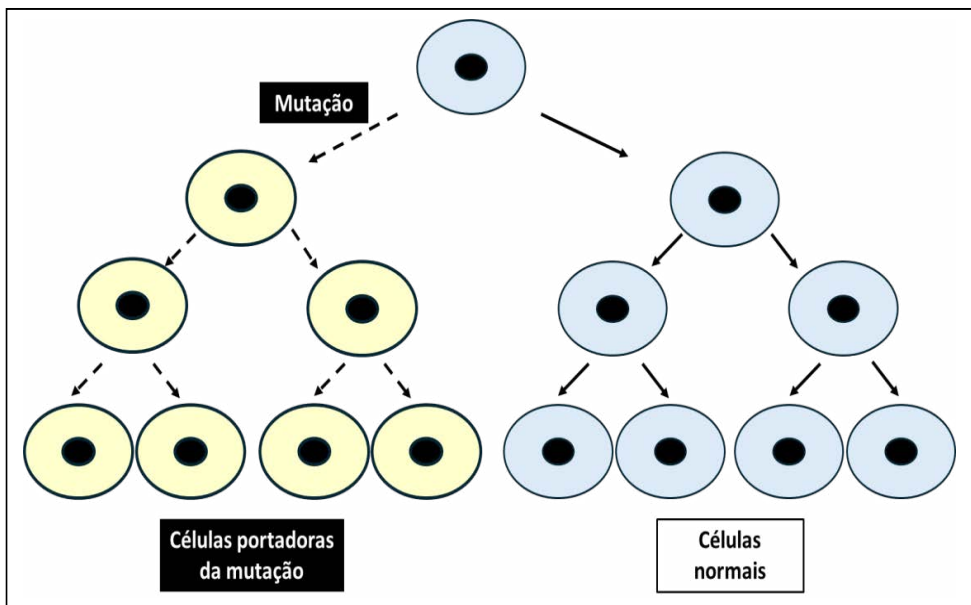


Figura 5.18: Surgimento da mutação em um indivíduo, que se tornará um mosaico.

Herança do DNA mitocondrial

Além do núcleo, onde encontramos 50% do DNA materno e 50% paterno, também encontramos DNA nas mitocôndrias (organelas fundamentais em nossas células). No entanto, esse DNA mitocondrial é transmitido exclusivamente pelas mães. Mas por que, afinal de

contas? Bem, o gameta feminino (oócito) possui mitocôndrias assim como o gameta masculino (espermatozoide). Mas as mitocôndrias paternas se concentram na cauda do espermatozoide, que degenera logo após a fecundação. Dessa maneira, na primeira célula do corpo humano, o zigoto, encontramos apenas as mitocôndrias maternas.

Infelizmente, o DNA presente na mitocôndria também pode sofrer mutações que resultam em doenças genéticas. Nesse caso, quando a mãe é afetada, todos os seus descendentes também serão. Por outro lado, quando o pai é afetado e a mãe é normal, todos os descendentes desse casal também serão normais (figura 5.19).

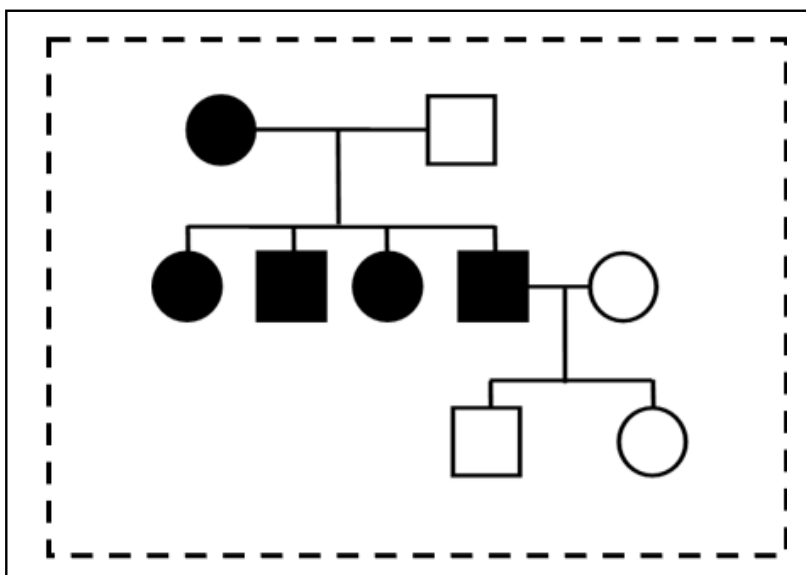


Figura 5.19: Heredograma demonstrando a herança materna do DNA mitocondrial.

Como exemplo desse padrão de herança, podemos citar a Neuropatia óptica hereditária de Leber, que causa a morte rápida do nervo

óptico, levando a cegueira na vida adulta jovem.

***Imprinting* genômico (ou impressão genômica)**

Nesse caso, não haverá nenhuma mutação, no entanto, a expressão do alelo varia de acordo com a sua origem, ou seja, se é materno ou paterno. Mas o que está envolvido nesse padrão de expressão diferencial, afinal de contas? Bem, o que explica tal fato é a compactação da cromatina, portanto trata-se de uma forma de inativação gênica. No *imprinting* materno, apenas a cópia herdada do pai se expressa, pois o gene materno está inativo. Por outro lado, no *imprinting* paterno, apenas o gene materno se expressa, pois o herdado do pai está inativo. Dessa forma, um alelo que se encontra em uma região compactada não consegue se expressar e o fenótipo associado a ele não se manifesta.

Para ilustrar esse mecanismo, vamos analisar duas síndromes com características clínicas diferentes: Prader-Willi e Angelman. Portadores da síndrome de Prader-Willi apresentam retardo no desenvolvimento, baixa estatura, obesidade e leve a moderada deficiência intelectual, por exemplo. Já na síndrome de Angelman, as alterações envolvem deficiência intelectual grave e crises convulsivas, entre outros aspectos. O intrigante é que a causa das duas síndromes é a deleção de uma região do cromossomo 15, que é praticamente idêntica nos dois casos. Como entender a diferença nas manifestações clínicas? Bem, a explicação é que na síndrome de Prader-Willi, a deleção

foi no cromossomo 15 paterno, enquanto na de Angelman a perda foi no cromossomo 15 materno. Incrível, não?

DISTÚRBIOS MULTIFATORIAIS

Nossa constituição genética claramente está associada ao nosso fenótipo, no entanto, isso não significa que existe apenas um gene no controle de uma característica, tampouco exclui a participação do ambiente. Em alguns casos existem vários genes que exercem um efeito integrado sobre determinado fenótipo, além disso, seus efeitos estão sujeitos a fatores ambientais. Portanto, esses traços normais são considerados como características multifatoriais (pois dependem da participação de genes e do ambiente) e poligênicos (devido a influência de vários genes).

Isso também se aplica a algumas a algumas doenças, tais como diabetes tipo II, hipertensão e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, entre outras. Devido a participação de vários genes e da influência do ambiente, nesses casos não se observa um padrão de herança mendeliano como nos distúrbios monogênicos. Na verdade, eles raramente produzem um padrão de herança claro. O que se nota, por exemplo, é que existe uma ‘agregação familiar’, que pode ser explicada considerando que os membros de uma família apresentam maior similaridade genética em relação ao restante da população além da exposição a fatores ambientais comuns,

como estilo de vida, por exemplo. Dessa forma, para uma família com um indivíduo afetado, o risco de recorrência é proporcional ao grau de parentesco (quanto mais próximo, maior).

REFERÊNCIAS

Griffiths, Anthony J., F. et al. Introdução à Genética. Disponível em: Minha Biblioteca, (12th edição). Grupo GEN, 2022.

Menck, Carlos F., M. e Marie-Anne Van Sluys. Genética molecular básica: dos genes ao genoma. Disponível em: Minha Biblioteca, Grupo GEN, 2017.

Robertis, Edward M., D. e José Hib. De Robertis Biologia Celular e Molecular. Disponível em: Minha Biblioteca, (16th edição). Grupo GEN, 2014.

McInnes, Roderick R. Thompson & Thompson Genética Médica. Disponível em: Minha Biblioteca, (8th edição). Grupo GEN, 2016.

Watson, James, D. et al. Biologia Molecular do Gene. Disponível em: Minha Biblioteca, (7th edição). Grupo A, 2015.



MUTAÇÕES CROMOSSÔMICAS

e suas consequências em humanos

As células possuem vários mecanismos para garantir a integridade do nosso DNA. No entanto, assim como pequenas alterações podem ser observadas (como discutido no capítulo 4), há casos em que a mudança envolve uma proporção maior do material genético: cromossomos inteiros ou parte deles. O que causa tais alterações e quais as suas consequências? Vamos encontrar a resposta a cada uma dessas perguntas ao longo desse capítulo.

Vimos anteriormente que o nosso DNA está organizado em 23 pares cromossomos, formando o nosso cariótipo, que pode ser definido como o conjunto das características constantes dos cromossomos de uma espécie. Mas que características são essas, afinal de contas? Bem, primeiro é preciso considerar que o número de cromossomos deve ser sempre o mesmo. Além disso, cada cromossomo tem um tamanho e posição de centrômeros específicos que devem ser constantes. Embora existam vários mecanismos para garantir a manutenção dessas características, há casos em que a quantidade ou mesmo a estrutura de um cromossomo é alterada.

Em humanos, tais mudanças são responsáveis por malformações congênitas, perdas reprodutivas (abortos espontâneos) e deficiência intelectual, além do que contribuem significativamente no desenvolvimento do câncer, formando a principal categoria de doenças genéticas. Há inclusive uma área específica da Genética, a Citogenética que tem como objetivo analisar as alterações cromossômicas e suas consequências.

Nosso foco principal nesse capítulo é abordar os diferentes tipos de mutações cromossômicas e suas consequências em humanos. No entanto, antes vamos estudar as principais técnicas para análise de cada cromossomo, o que é fundamental para determinar se no cariótipo analisado há ou não alguma alteração.

6.1 - TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO CROMOSSÔMICA

BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

Quando analisamos o cariótipo humano notamos que alguns cromossomos apresentam o tamanho e posição de centrômero parecidos, o que dificulta a identificação precisa de cada um. Dessa maneira, ao analisar os cromossomos humanos considerando apenas tamanho e posição de centrômero, será possível classificá-los em 7 grupos (de A até G) (tabela 6.1 / figura 6.1).

Tabela 6.1: Classificação dos cromossomos humanos (grupos A – G).

GRUPO	CROMOSSOMOS	CARACTERÍSTICAS
A	1 - 3	3 pares de cromossomos grandes (1 e 3 metacêntricos / 2 submetacêntrico)
B	4 - 5	2 pares submetacêntricos grandes
C	6 - 12 + X	7 pares submetacêntricos médios + X
D	13 - 15	3 pares acrocêntricos médios
E	16 - 18	3 pares de cromossomos pequenos (16 metacêntrico / 17 e 18 submetacêntricos)
F	19 - 20	2 pares metacêntricos pequenos
G	21 e 22 + Y	2 pares acrocêntricos pequenos + Y

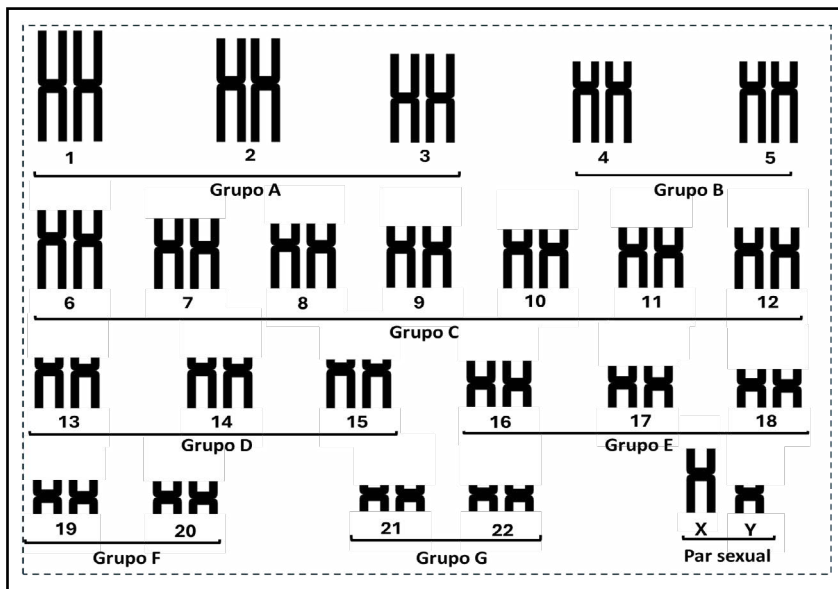


Figura 6.1: Cariótipo humano mostrando os grupos A – G.

Já o uso de uma técnica de bandeamento cromossômico permite a análise de cromossomos individuais (e suas possíveis alterações). Isso porque o DNA é tratado com corantes específicos que resultam no surgimento de bandas claras e escuras, as quais são características para cada cromossomo. Na maioria das técnicas de bandeamento, as células são cultivadas em laboratório e a divisão celular (mitose) é interrompida durante a metáfase, momento no qual os cromossomos estão totalmente compactados e as cromátides ainda estão unidas, o que facilita muito a análise do material genético (desa forma, analisam-se os ‘cromossomos metafásicos’).

Embora existam diferentes técnicas de bandeamento cromossômico, vamos conhecer a mais popular delas, o bandeamento Giem-

sa (ou simplesmente bandeamento G). Nesse caso, os cromossomos são previamente tratados para desnaturar as proteínas (removendo-as) e então corados com o corante Giemsa, que revela um padrão de bandas claras (consideradas G-negativas), regiões de DNA rico em CG onde se encontram genes muito ativos (eucromatina) e escuras, consideradas bandas G de fato. São regiões ricas em pares A / T e que apresentam a cromatina mais compactada e por consequência, os genes estão menos ativos (heterocromatina). O uso dessa técnica permite não apenas a identificação precisa de um cromossomo, mas também a detecção de alterações cromossômicas. Um exemplo muito interessante é apresentado na figura 6.2 abaixo, onde são apresentados os cromossomos 8 e 9 humanos, que apresentam tamanho e posição de centrômero muito similares, mas que através da análise do padrão de bandas G podem ser precisamente identificados.

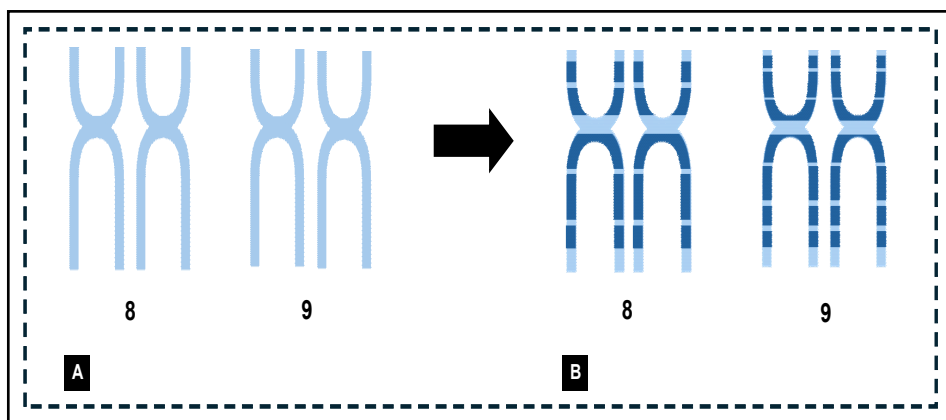
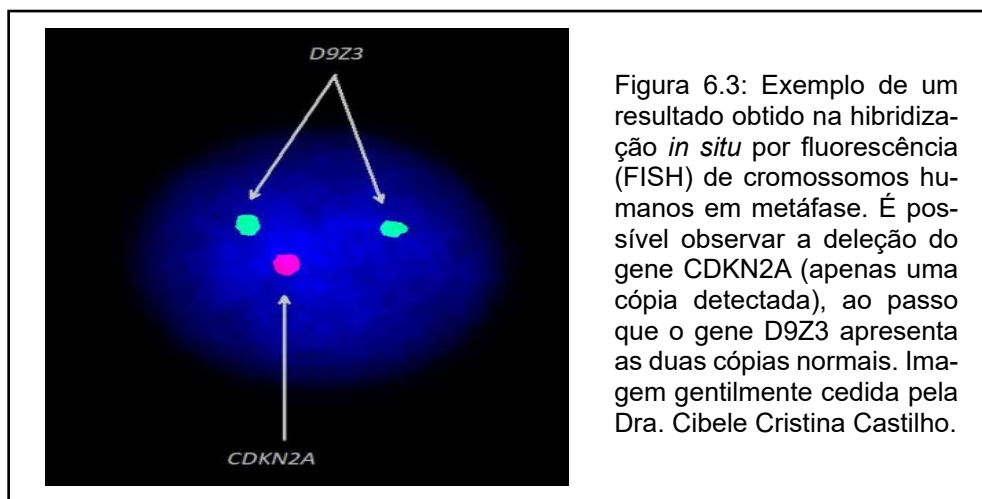


Figura 6.2: Ilustração demonstrando os cromossomos humanos 8 e 9, cujo tamanho e posição de centrômero são muito parecidos (A), mas que podem ser precisamente identificados com o uso do bandeamento G, que revela um padrão de bandas exclusivo de cada cromossomo (B).

A análise do padrão de bandas de cada cromossomo é padronizado e ocorre da seguinte maneira: as bandas presentes em cada braço cromossômico são enumeradas do centrômero em direção ao telômero, sendo que a número 1 é a mais próxima ao centrômero. Dessa maneira, é possível identificar qualquer banda de interesse (e a região do DNA que nela se encontra).

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA - 'FISH'

Outra técnica muito útil na análise cromossômica é hibridização *in situ* por fluorescência, conhecida como 'FISH' (do inglês, *fluorescence in situ hybridization*). De um modo geral, em uma hibridização é possível buscar por regiões de interesse no DNA graças ao uso de sondas, que são sequências de nucleotídeos complementares à região que se deseja encontrar. No FISH, as sondas são marcadas com corantes fluorescentes e, se encontram na amostra em análise uma região complementar, se ligam a ela, o que é observado pela detecção do sinal fluorescente. Dessa forma, é possível analisar a presença de um cromossomo e a sua quantidade, bem como a presença ou ausência de uma região cromossômica, entre outros aspectos (figura 6.3).



Agora que já conhecemos como é a análise dos cromossomos, vamos analisar as possíveis alterações cromossômicas numéricas e estruturais e suas causas, bem como suas consequências em humanos.

6.2 - MUTAÇÕES CROMOSSÔMICAS NUMÉRICAS

Existem dois tipos de alterações cromossômicas numéricas: I) euploidias, que envolvem todo o conjunto cromossômico e II) aneuploidias, em que apenas um ou alguns cromossomos estão envolvidos. Mas quais as principais características de cada uma delas? Vamos analisar isso a partir de agora, ok? Para facilitar nossas considerações sobre esse tema, vamos inicialmente compreender como seria cada alteração no cariótipo de uma ‘espécie virtual’ que chamaremos de ‘alfa’. Em seguida, analisaremos como ficaria o cariótipo humano em cada situação.

EUPLOIDIA

É uma alteração numérica que envolve o todo conjunto cromossômico (n). Para uma espécie com cariótipo normal diplóide ($2n$), um cariótipo triplóide com 3 conjuntos cromossômicos ($3n$) ou tetraplóide com quatro conjuntos cromossômicos ($4n$), são exemplos de euploidia.

Para facilitar sua compreensão, vamos inventar uma espécie a qual chamaremos de 'alfa', que é diplóide, e tem ao todo 10 cromossomos ($2n = 10$). Nesse caso, o cariótipo anormal triplóide teria 15 cromossomos ($3n = 15$) e o tetraplóide anormal teria 20 cromossomos ($4n = 20$) (figura 6.4).

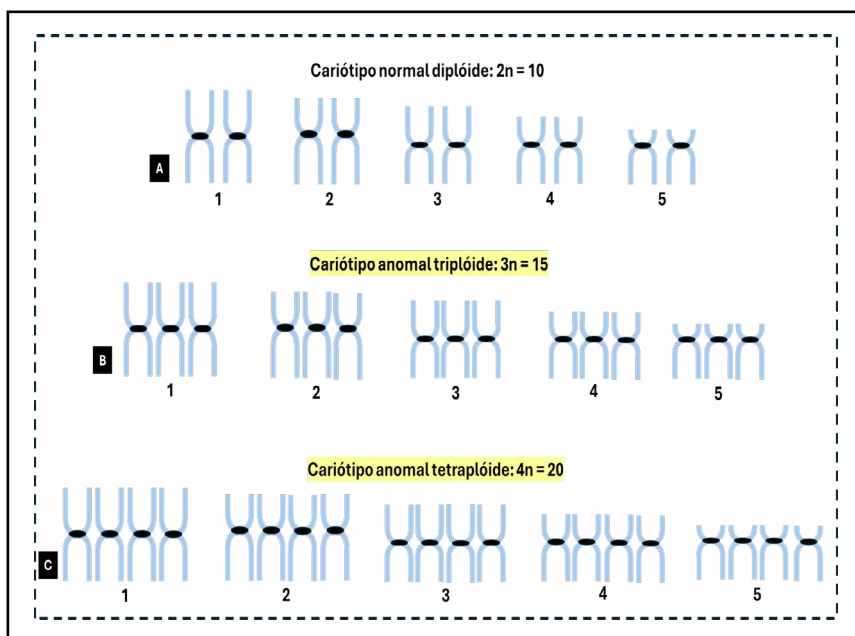


Figura 6.4: Ilustração mostrando em 'A' o cariótipo normal diplóide ($2n$) da espécie 'alfa' e dois portadores de euploidia: triplóide ($3n$) em 'B' e tetraplóide ($4n$) em 'C'.

Agora que já entendemos o que ocorre em uma euploidia, vamos analisar a espécie humana, cujo cariótipo normal é diplóide, totalizando 46 cromossomos ($2n = 46$). Como nesse tipo de alteração o cariótipo apresenta um múltiplo de 'n', em humano um cariótipo triploide teria 69 cromossomos ($3n = 69$) e um tetraploide 92 ($4n = 92$), por exemplo.

Embora a euploidia não seja comum em humanos, vamos analisar alguns aspectos da triploidia ($3n$). Como explicar a presença de um conjunto cromossômico inteiro a mais nessas células? Bem, a explicação mais comum é a dispermia: quando dois espermatozóides fecundam o mesmo ovócito (figura 6.5). Por favor, note que a dispermia não leva à formação de gêmeos! Além disso, a falha na separação dos cromossomos na meiose materno ou paterna pode resultar em um gameta $2n$.

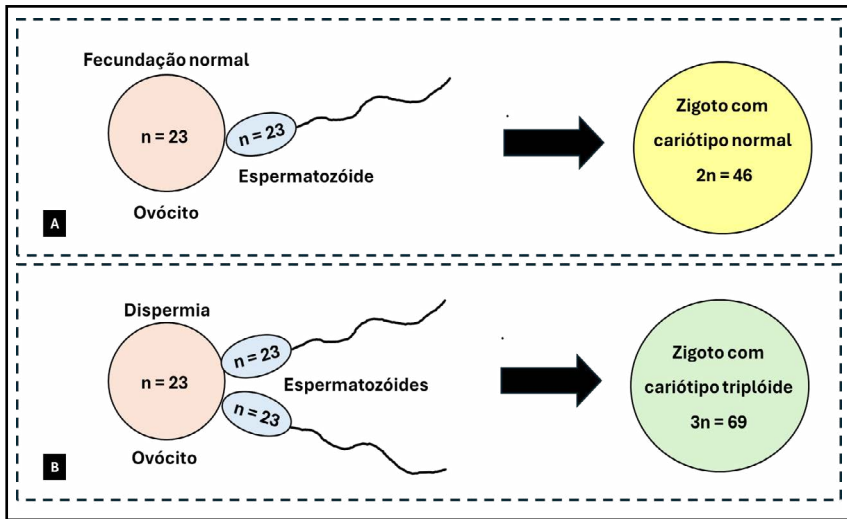


Figura 6.5: Ilustração mostrando uma fecundação normal (A) e uma dispermia (B), que leva a formação de um zigoto triploide.

Independente da causa, na maioria das vezes a triploidia resulta em um aborto espontâneo. Quando um feto triploide consegue sobreviver a termo, infelizmente sobrevive por pouco tempo (devido às várias malformações que ele apresenta).

ANEUPLOIDIAS

Nesse caso, o cariótipo apresenta apenas um ou alguns cromossomos a mais ou a menos. Para espécies com cariótipo diploide ($2n$), pode-se observar alguns dos exemplos abaixo representados.

- ✓ Monossomia: $2n - 1$
- ✓ Trissomia: $2n + 1$
- ✓ Tetrassomia: $2n + 2$

Considerando novamente a espécie 'alfa' cujo cariótipo normal é $2n = 10$, um cariótipo com monossomia apresenta 9 cromossomos ($2n - 1$), com trissomia 11 cromossomos ($2n + 1$) e com tetrassomia 12 cromossomos ($2n + 2$) (figura 6.6).

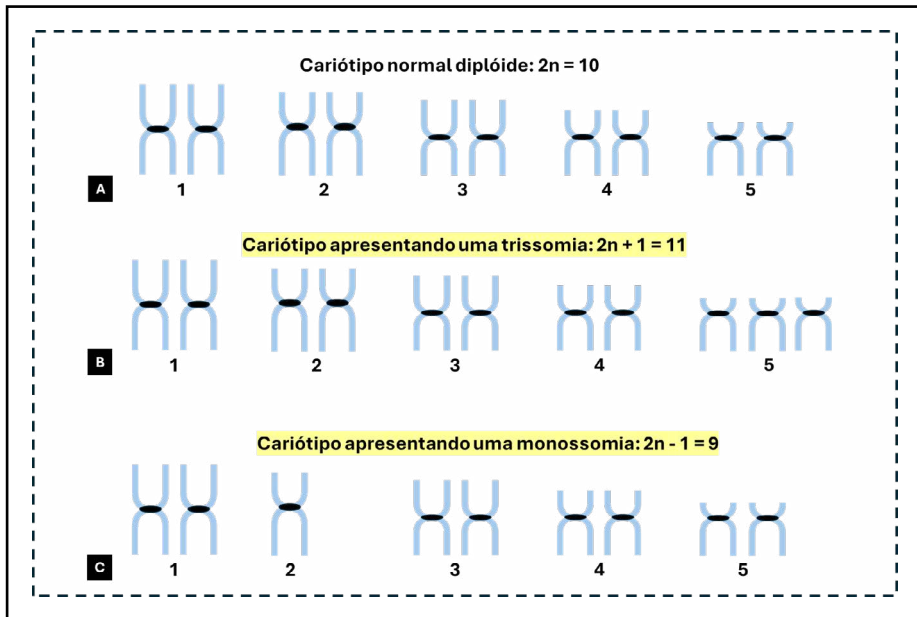


Figura 6.6: Ilustração mostrando em 'A' o cariótipo normal diplóide ($2n$) da espécie 'alfa' e dois cariótipos portadores de aneuploidia: trissomia ($2n + 1$) em 'B' e monossomia ($2n - 1$) em 'C'.

Já em humanos, considerando que o cariótipo normal possui 46 cromossomos ($2n = 46$), na monossomia observam-se 45 cromossomos ($2n - 1$), na trissomia 47 ($2n + 1$) e na tetrassomia 48 ($2n + 2$).

A aneuploidia pode ser causada por uma falha na separação dos cromossomos na meiose (não disjunção meiótica) ou na mitose (não disjunção mitótica), então vamos analisar cada situação separadamente. Não disjunção meiótica observa-se uma falha na separação

dos cromossomos durante a meiose (I ou II), resultando na formação de gametas cromossomicamente anormais (com 22 ou 24 cromossomos, por exemplo). Caso esses gametas participem da fecundação, o zigoto apresentará 45 ou 47 cromossomos (figura 6.7). Como a célula inicial já apresenta essa alteração, todas as células desse indivíduo também serão anormais (as consequências observadas dependem do cromossomo que está envolvido na alteração, como será descrito posteriormente nesse capítulo).

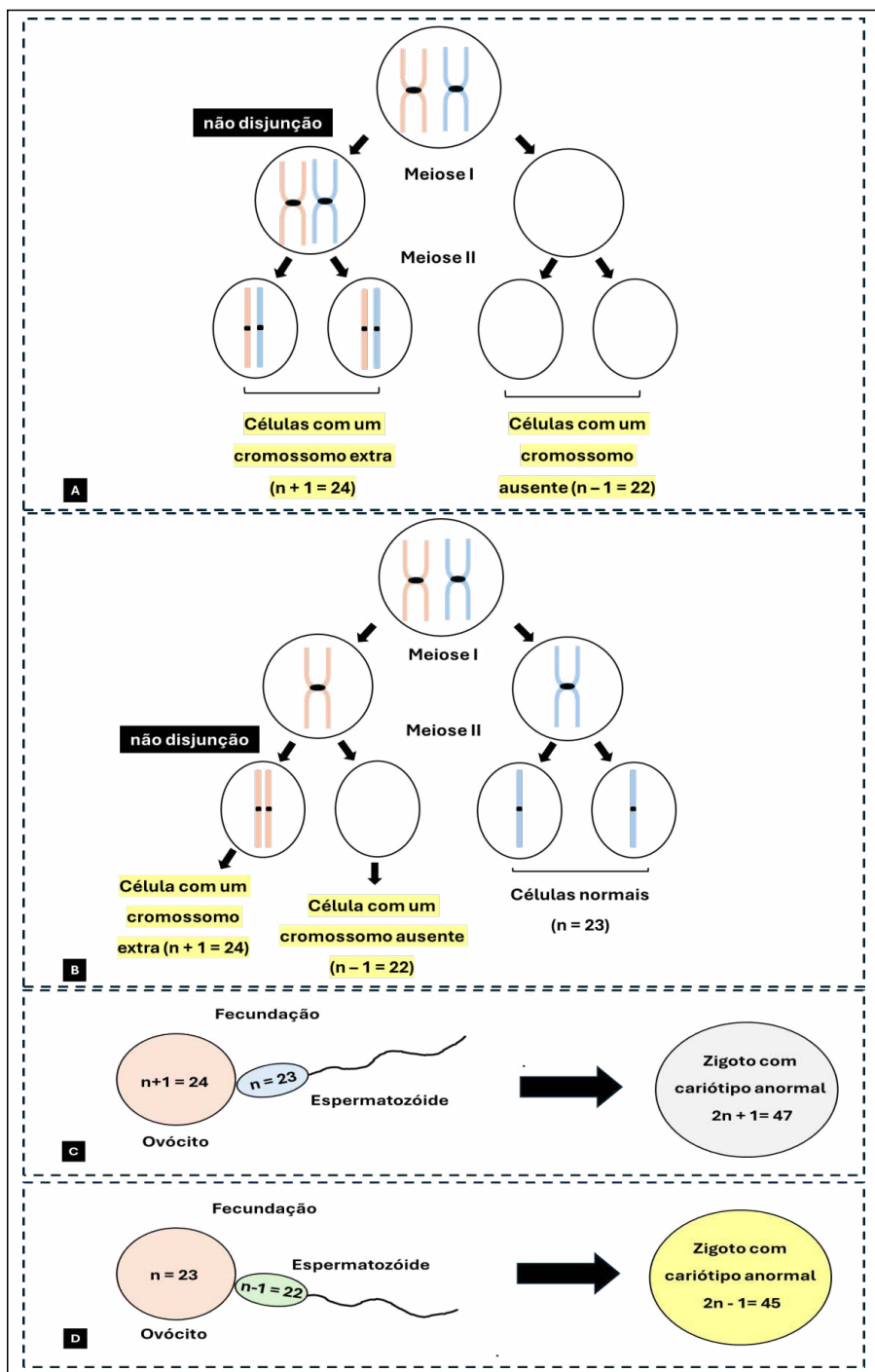


Figura 6.7: A e B) Consequências da não disjunção na meiose I e II respectivamente. C e D) Consequências da participação de um gameta aneuplóide na fecundação.

Um aspecto importante a ser considerado é que o aumento da idade da mulher eleva os riscos de uma não disjunção meiótica (portanto da formação de gametas cromossomicamente anormais). Isso ocorre porque a gametogênese feminina começa ainda na vida fetal, é interrompida e só continua a partir da puberdade. Desse momento em diante, a cada mês um gameta concluirá a meiose. Diante disso, quanto maior a duração da meiose (o que acontece com o avançar da idade da mulher), maior o risco da existência de falhas nesse processo.

Na não disjunção mitótica, o zigoto inicial apresenta 46 cromossomos. No tanto, em algum momento, há uma falha na separação dos cromossomos durante a mitose, resultado em células com 45 e 47 cromossomos. A perda de um cromossomo é mais grave que o ganho, de forma que a célula com 45 cromossomos será eliminada. No entanto, a que possui 47 cromossomos permanece viável e se multiplica normalmente, gerando células-filhas com 47 cromossomos. Dessa maneira, ao analisarmos as células desse indivíduo, ele será um mosaico, pois apresentará em seu organismo dois grupos de células: as normais com 46 cromossomos e as cromossomicamente anormais com 47 (figura 6.8). As alterações observadas em um mosaico dependem da quantidade de células normais e anormais que ele apresenta em seu organismo. Se o erro na separação dos cromossomos aconteceu nas primeiras mitoses, logo após a forma-

ção do zigoto, esse indivíduo terá mais células anormais e, portanto, apresentará mais alterações. Por outro lado, caso a falha tenha ocorrido bem tardiamente no desenvolvimento, um grupo menor de células será cromossomicamente anormal, e o indivíduo terá poucas ou nenhuma alteração. Portanto, cada mosaico deve ser analisado como um caso único, pois não há como controlar em que momento a alteração ocorre. Na maioria das vezes, as consequências são tão brandas que o mosaicismo sequer chega a ser identificado.

6.3 - MUTAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS

Nesse tipo de mutação, a estrutura de um ou alguns cromossomos está alterada. Podemos dividir essas alterações cromossômicas estruturais em dois grupos: I) balanceadas, nas quais todo o material genético está presente, mas 'embalado' de outra maneira (exemplo: inversão) e II) não balanceadas, aquelas em que se observa material genético adicional ou ausente (exemplo: deleção) (figura 6.9). Assim como observado para as mutações cromossômicas numéricas, tais alterações podem estar presentes em todas as células de um organismo ou na forma de mosaico.

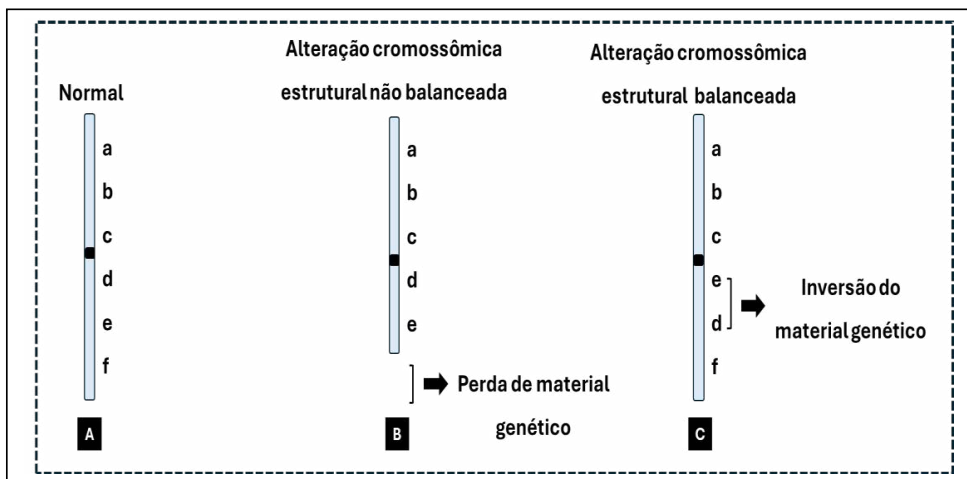


Figura 6.9: A) Ilustração de um cromossomo normal; B) Cromossomo apresentando uma alteração cromossômica estrutural não balanceada e C) Cromossomo com uma alteração cromossômica estrutural balanceada.

MUTAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS NÃO BALANCEADAS.

Nessa categoria temos como exemplos: deleção, duplicação e isocromossomos. Vamos conhecer cada um deles a partir de agora.

Deleção e duplicação

A deleção é uma situação em que há perda de um segmento cromossômico, ou seja, uma parte do cromossomo foi perdida. Por outro lado, na duplicação uma região do cromossomo está duplicada.

A causa de tais eventos pode ser um '*crossing over*' desigual entre cromossomos homólogos mal pareados durante a meiose. Mas como isso ocorre, afinal de contas? Bem, lembre-se que no pareamento dos cromossomos homólogos as regiões iguais ficam lado a lado e em seguida acontece a troca entre os cromossomos materno e paterno. Quando esse pareamento está incorreto e a troca acontece, a região envolvida na troca é diferente, resultando em um cromossomo com material genético ausente (deleção) e outro apresentando uma duplicação. Além disso, a deleção pode ter sido causada por uma quebra cromossômica que acabou resultando na perda de material genético (figura 6.10). Embora as consequências variem de acordo com os genes presentes na região envolvida, lembre-se que quando se trata de material genético, a perda é mais grave que o ganho.

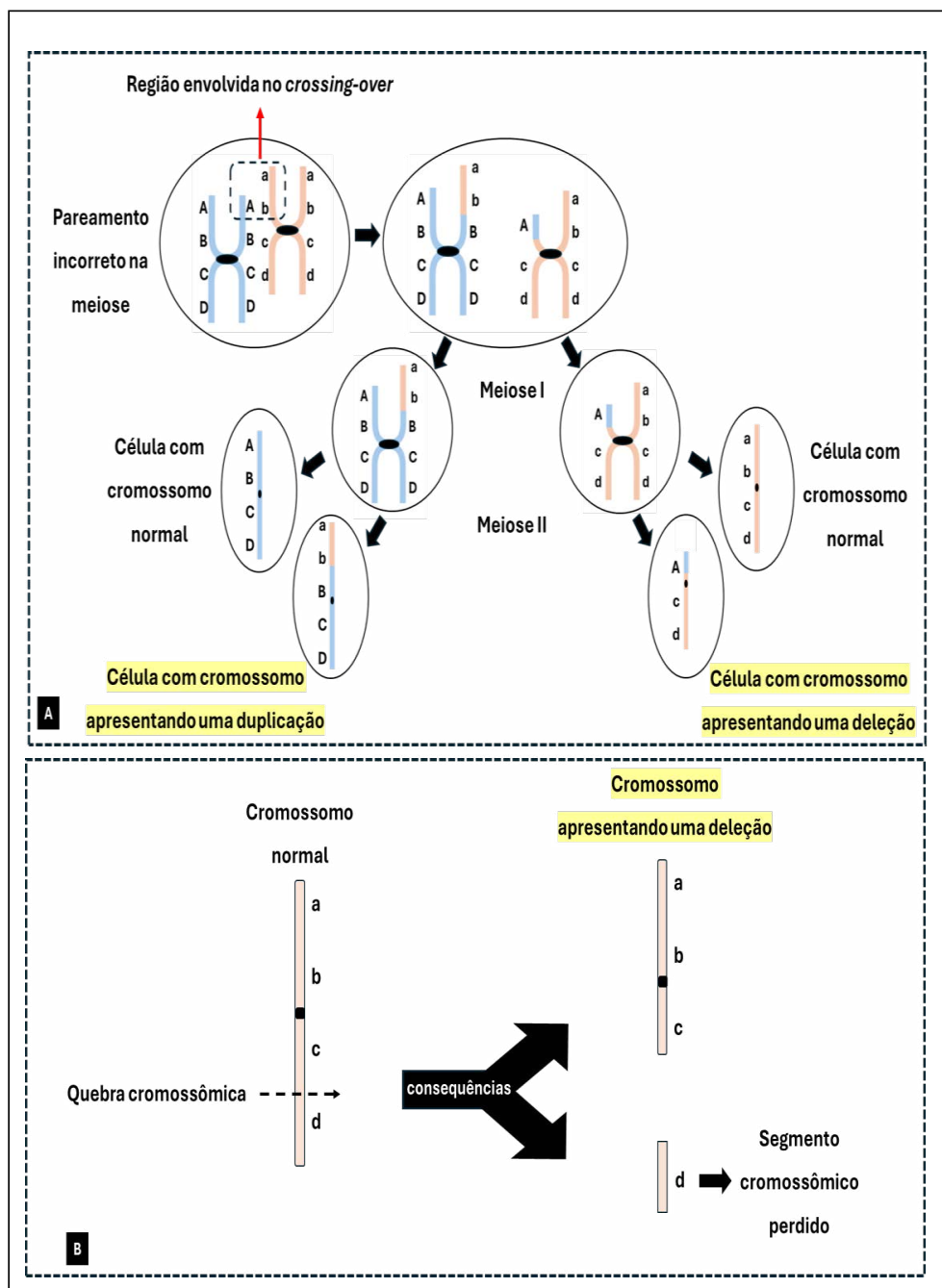


Figura 6.10: Ilustração mostrando o surgimento de algumas alterações cromossômicas estruturais não balanceadas. A) O pareamento incorreto na meiose seguido de *crossing-over* desigual causa tanto deleção quanto duplicação e B) A quebra cromossômica levando a uma deleção.

Isocromossomos

Trata-se de um cromossomo no qual um braço está duplicado e o outro está ausente. Portanto, teremos tanto uma deleção quanto uma duplicação (figura 6.11).

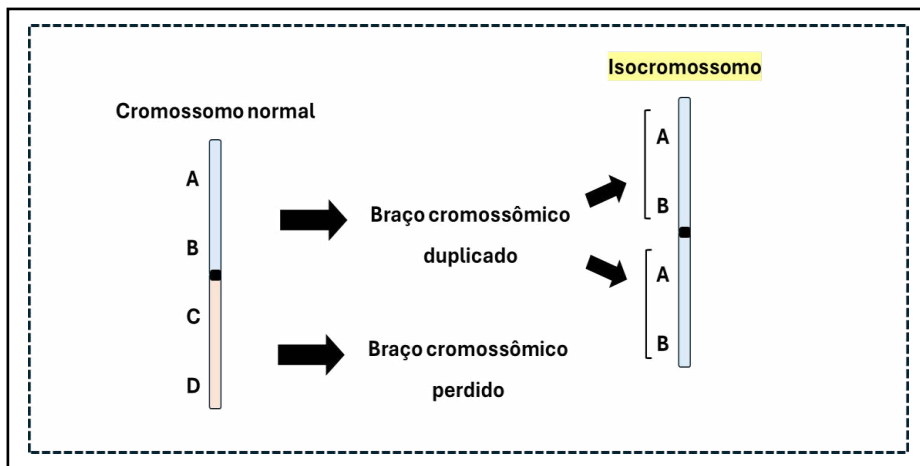


Figura 6.11: Ilustração mostrando um isocromossomo (que apresenta um braço cromossômico duplicado e outro ausente).

MUTAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS BALANCEADAS.

Considerando que nessas mutações todo o material genético está presente, apenas organizado de maneira diferente, os indivíduos portadores de tais alterações geralmente são normais. No entanto, haverá um risco maior de produzir gametas desbalanceados (pois o pareamento na meiose foi comprometido). Além disso, caso a quebra que originou a mutação tenha acontecido no meio de um gene, levando a perda de sua função, isso poderá trazer algumas consequências para o portador dessa alteração de acordo com a função que o gene

exercia na célula.

Nessa categoria temos como exemplos as translocações e inversões, as quais são causadas por quebras cromossômicas seguidas de uma 'recombinação anormal' do segmento genético, as quais serão descritas a partir de agora.

Translocação

É uma alteração cromossômica causada pela troca de material genético entre cromossomos não homólogos. Existem 3 tipos: recíprocas, não recíprocas (ou inserção) e Robertsonianas).

I) Recíprocas, nas quais ocorre a troca recíproca de material genético entre cromossomos não homólogos (figura 6.12).

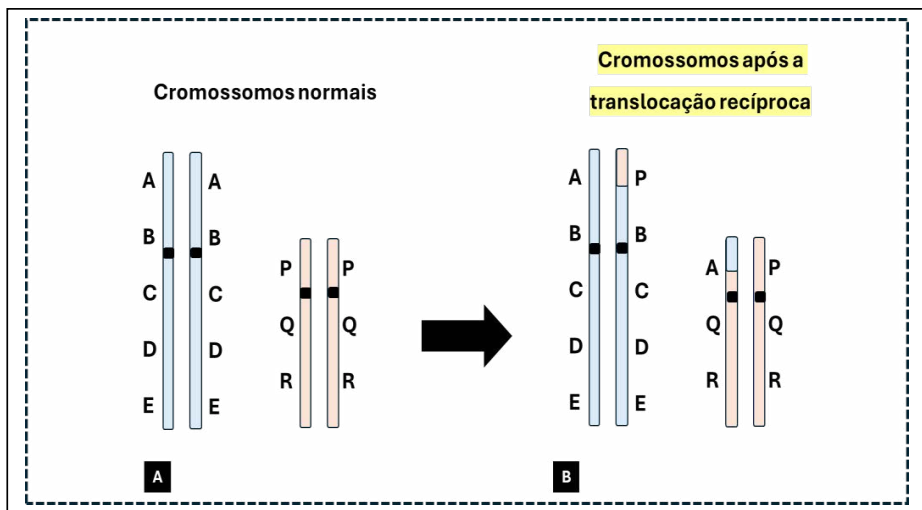


Figura 6.12: Ilustração mostrando um exemplo de translocação recíproca.

II) Não recíprocas (ou inserções), quando a troca não é recíproca (figura 6.13)

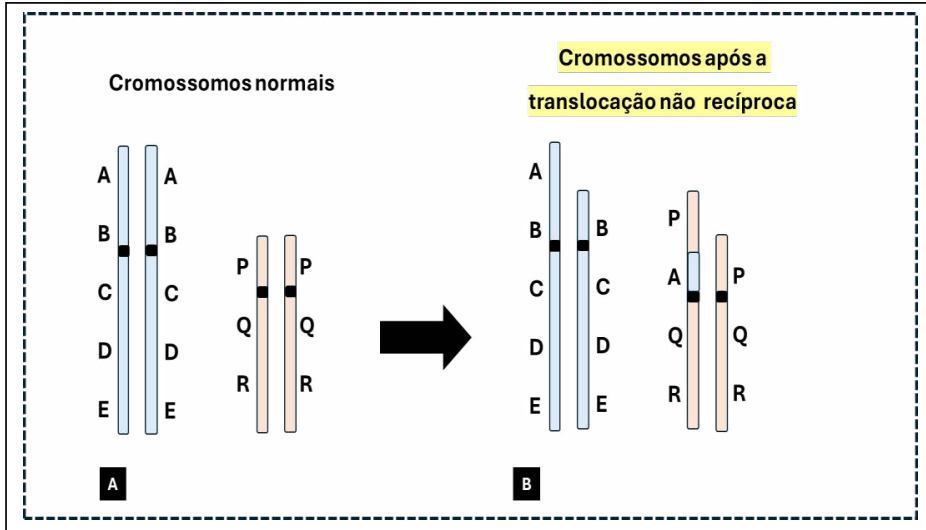


Figura 6.13: Ilustração mostrando um exemplo de translocação não recíproca.

III) Robertsonianas, são as que ocorrem somente entre cromossomos acrocêntricos (em humanos, os cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22). Nesse caso, ocorre a quebra de dois cromossomos em seus centrômeros ou perto deles. Em seguida, os braços longos se fundem formando um único cromossomo maior, e os braços curtos acabam sendo eliminados. A perda dessa região não trará nenhuma consequência ao indivíduo, pois o material genético ali presente não é essencial. Além disso, o cariótipo de um portador dessa translocação apresentará apenas 45 cromossomos (pois os braços longos se uniram em um cromossomo) (figura 6.14). Embora não haja nenhuma consequência para o portador de tal alteração cromossômica, existe o risco de se produzir gametas

desbalanceados (portadores de monossomias ou trissomias) e, caso essa translocação envolva o cromossomo 21, os riscos de um descendente portador da síndrome de Down serão maiores (figura 6.15).

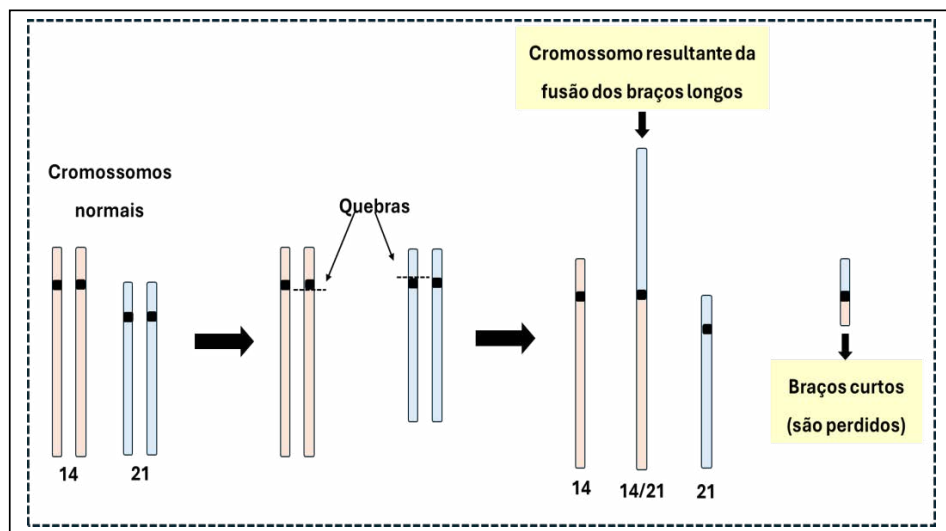


Figura 6.14: Ilustração mostrando o surgimento de uma translocação Robertsoniana.

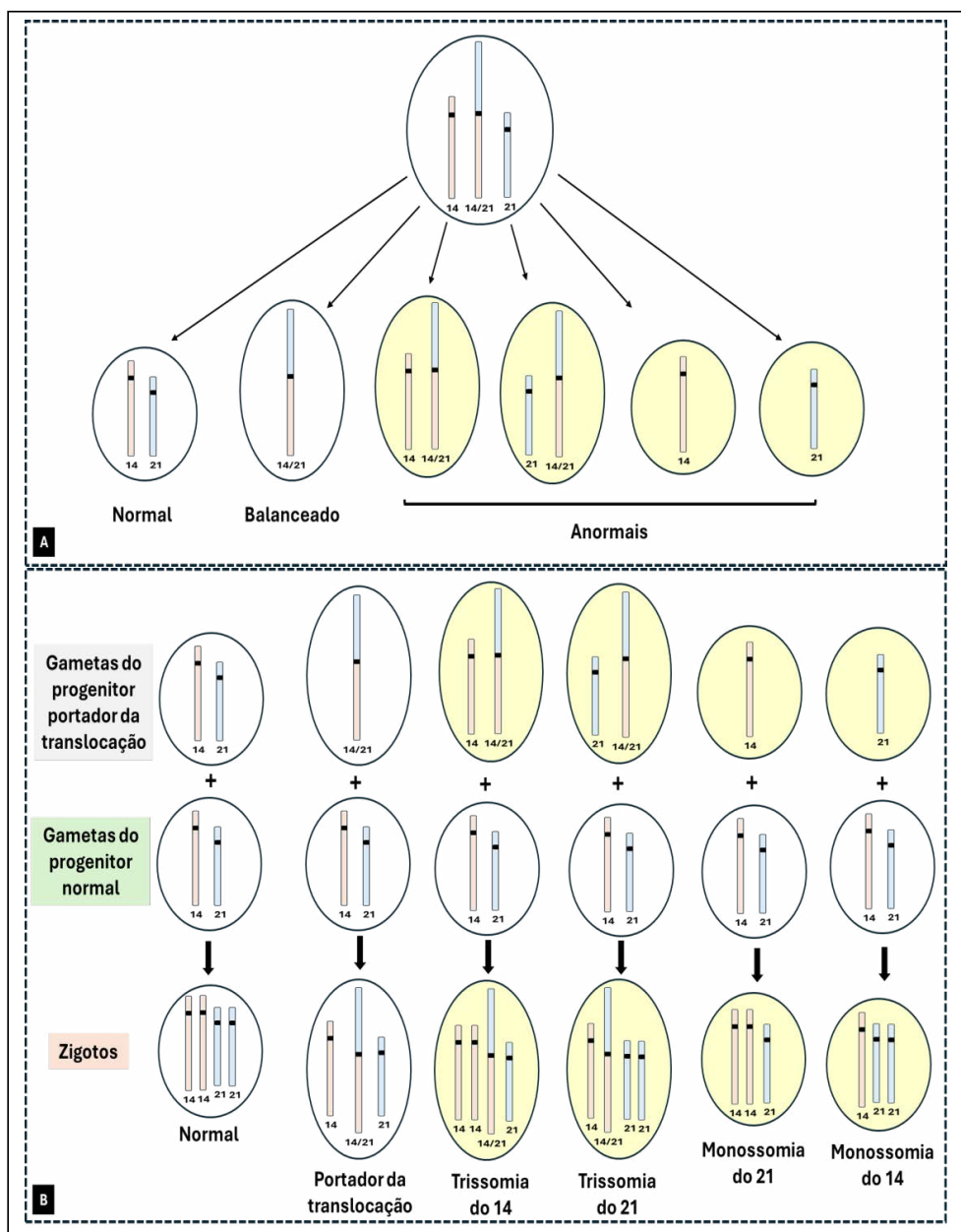


Figura 6.15: A) Possíveis gametas formados por um portador de uma translocação Robertsoniana; B) Resultado da fecundação dos gametas de um portador da translocação Robertsoniana e um genitor normal.

Inversão

Nesse caso, um cromossomo sofre 2 quebras e é reconstituído com o segmento entre as quebras invertido (figura 6.16).

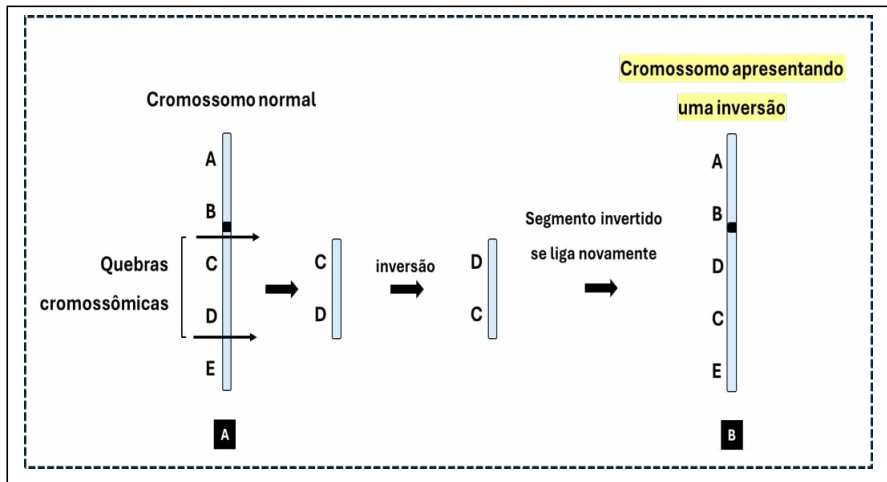


Figura 6.16: Ilustração mostrando o surgimento de uma inversão.

6.4 - ANEUPLOIDIAS ENVOLVENDO OS CROMOSSOMOS AUTOSSÔMICOS EM HUMANOS

Quando analisamos as consequências de uma alteração numérica que envolve um ou alguns cromossomos humanos, é importante considerar separadamente as que envolvem os cromossomos autossômicos (do 1 ao 22) daquelas nas quais os cromossomos sexuais (X e Y) estão envolvidos.

Com relação aos distúrbios autossômicos, embora as altera-

ções possam ocorrer em qualquer cromossomo, existem 3 distúrbios que são mais frequentes e portanto estão bem caracterizados: as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21. Embora nos três casos se observem 47 cromossomos, as consequências em cada trissomia será diferente. Isso acontece porque cada cromossomo apresenta um conjunto específico de genes que, em dose extra, levam a um conjunto de alterações diferente para cada caso. Vamos considerar as principais características de cada uma a partir de agora.

TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 21: SÍNDROME DE DOWN.

Esse é o distúrbio cromossômico mais comum e mais conhecido, cuja incidência é de 1 a cada 850 crianças. Os fatores de risco para o nascimento de uma criança portadora dessa síndrome são a idade materna e a presença de uma translocação envolvendo o cromossomo 21 no cariótipo dos genitores.

As principais características dos portadores dessa síndrome estão listadas abaixo e apresentadas na figura 6.17.

- ✓ Características faciais dismórficas
- ✓ Baixa estatura
- ✓ Pescoço curto (pele frouxa na nuca)
- ✓ Língua grande e cheia de sulcos
- ✓ Pregas das fendas palpebrais elevadas

- ✓ Mãos curtas e largas (uma única prega palmar)
- ✓ Deficiência intelectual (moderada a branda)
- ✓ Defeitos cardíacos (frequentemente)
- ✓ Expectativa de vida: 55 anos

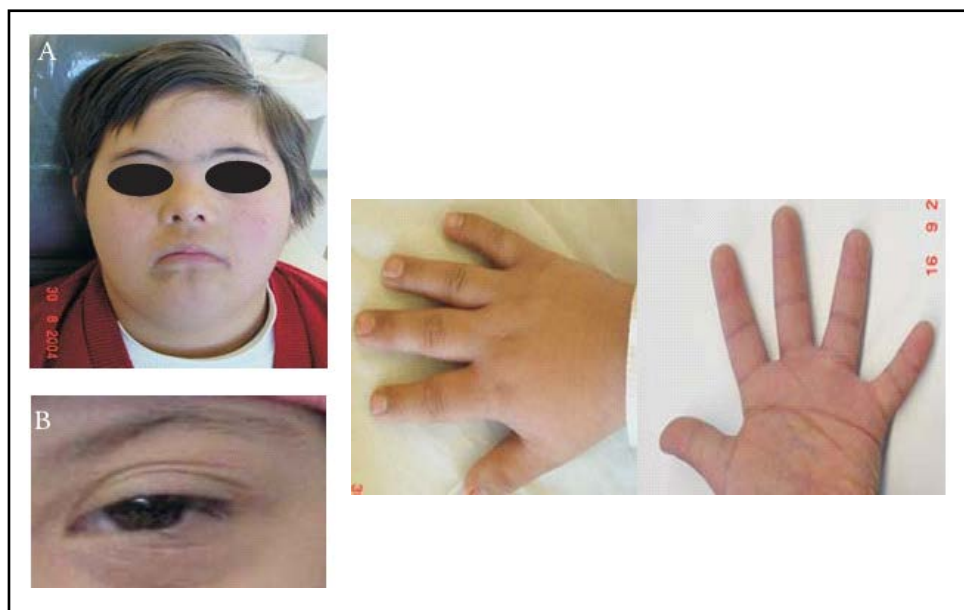


Figura 6.17: Características de um indivíduo com síndrome de Down. Fonte: Berthold, T. B., Araujo, V. P. de, Robinson, W. M., & Hellwig, I. (2004). Síndrome de Down: aspectos gerais e odontológicos. Revista De Ciências Médicas E Biológicas, 3(2), 252–260. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v3i2.4430>.

Na maioria dos casos, o cariótipo dos portadores dessa síndrome apresenta um cromossomo 21 inteiro em dose extra (figura 6.18). Em aproximadamente 5% dos casos, nota-se a presença de uma translocação robertsoniana envolvendo o cromossomo 21.

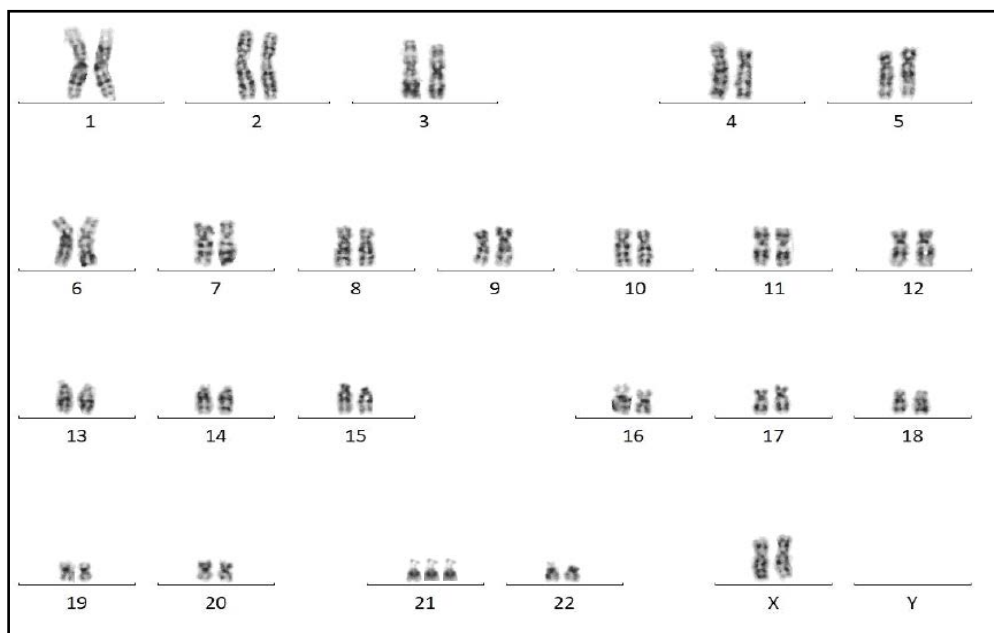


Figura 6.18: Cariótipo feminino apresentando uma trissomia do cromossomo 21 (47, XX, +21). Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibeles Cristina Castilho.

Aproximadamente 2% dos casos de síndrome de Down são mosaicos (a falha na separação dos cromossomos aconteceu na mitose), portanto o portador apresenta células normais com 46 cromossomos e células com 47 cromossomos (sendo '21' o que se encontra em dose extra). O fenótipo nesses casos é variável, pois depende da proporção de células normais e anormais presentes no organismo.

TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 18: SÍNDROME DE EDWARDS.

Essa síndrome tem uma incidência de 1 a cada 6000 a 8000 crianças. Na realidade a incidência é maior, mas infelizmente 95%

dos casos são abortados espontaneamente. Os fatores de risco para o nascimento de uma criança portadora são a idade materna e a presença de translocações envolvendo o cromossomo 18.

As alterações observadas nessa síndrome estão listadas abaixo e apresentadas na figura 6.19.

- ✓ Deficiência de crescimento pré-natal
- ✓ Punho fechado típico
- ✓ Mandíbula recuada
- ✓ Orelhas com implantação baixa
- ✓ Deficiência intelectual severa
- ✓ Malformações cardíacas graves
- ✓ Dificuldades de alimentação
- ✓ Expectativa de vida: tipicamente menos que alguns meses.

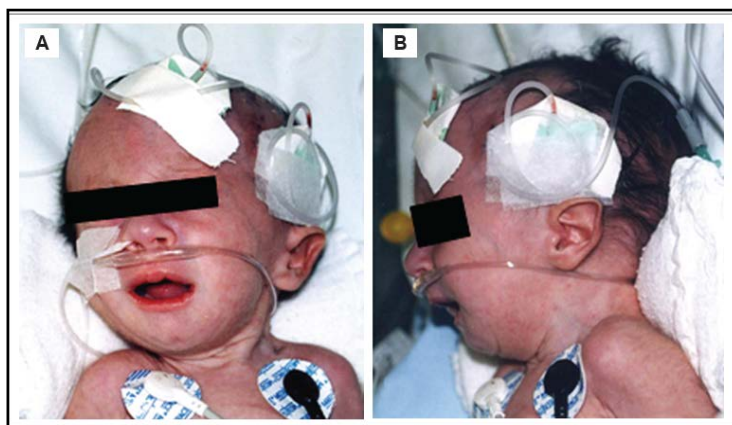


Figura 6.19: Aspectos craniofaciais observados na síndrome de Edwards. Fonte: Rosa RF, Rosa RC, Lorenzen MB, Zen PR, Graziadio C, Paskulin GA. Craniofacial abnormalities among patients with Edwards Syndrome. Rev Paul Pediatr. 2013 Sep;31(3):293-8. doi: 10.1590/S0103-05822013000300004. PMID: 24142310; PMCID: PMC4182981.

Embora na maioria dos casos a expectativa de vida dos portadores dessa síndrome seja restrita a alguns meses, em alguns casos pontuais eles podem viver por mais tempo. O cariótipo típico dessa síndrome é apresentado na figura 6.20 abaixo.

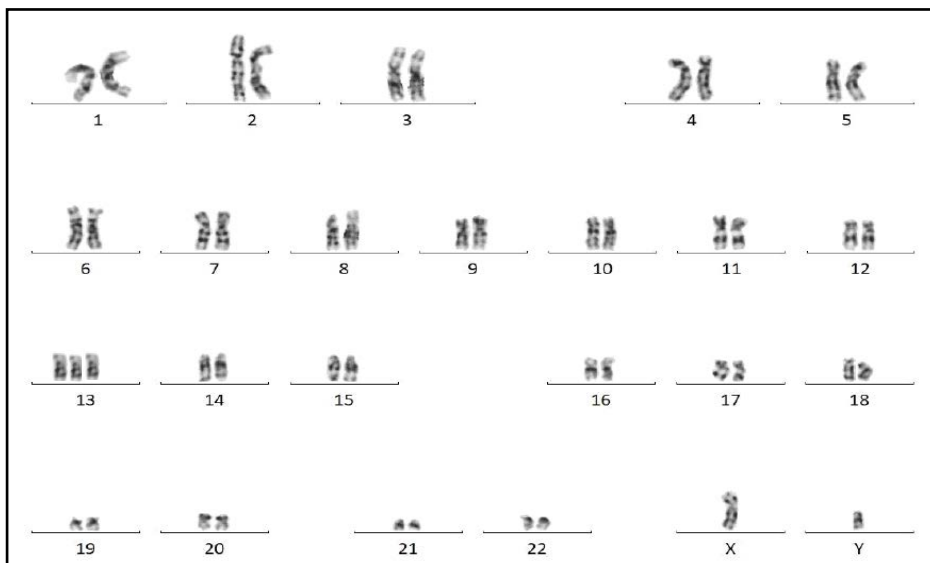


Figura 6.20: Cariótipo masculino apresentando uma trissomia do cromossomo 18 (47, XY, +18). Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibele Cristina Castilho.

TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 13: SÍNDROME DE PATAU.

Essa síndrome tem uma incidência de 1 a cada 12.000 a 20.000 crianças. Assim como observado na síndrome de Edwards, a incidência é maior, visto que a maioria dos casos em que se observa essa trissomia resulta em um aborto espontâneo. Os fatores de risco para o nascimento de uma criança portadora dessa síndrome envolvem a idade materna e a presença de translocações envolvendo o cromossomo 13.

As alterações observadas nos portadores da síndrome de Patau estão listadas abaixo e apresentadas na figura 6.21.

- ✓ Retardo no crescimento
- ✓ Deficiência intelectual severa
- ✓ Microcefalia, testa inclinada
- ✓ Punhos fechados típicos
- ✓ Defeitos cardíacos congênitos
- ✓ Fissuras labial e palatina (frequentemente)
- ✓ Anormalidades oculares
- ✓ Polidactilia
- ✓ Expectativa de vida: 50% morrem dentro de primeiro mês (> 90% dentro do primeiro ano). No entanto, alguns casos pontuais eles podem viver por mais tempo.

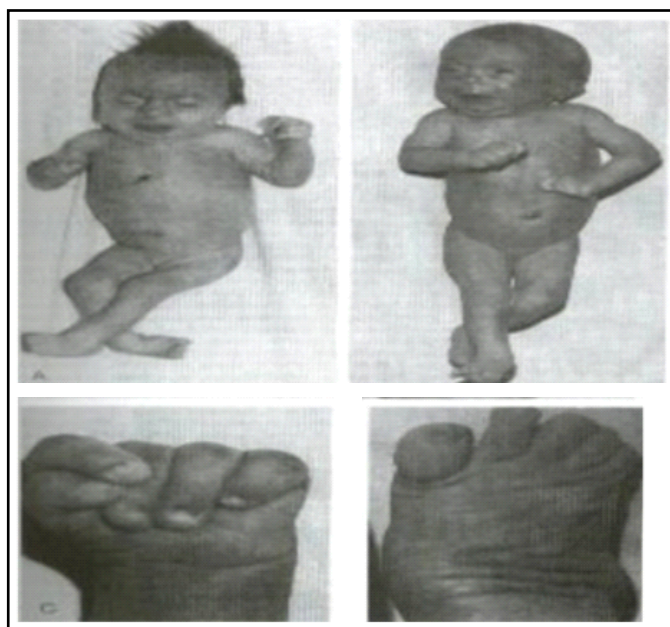


Figura 6.21: Características de um indivíduo com síndrome de Patau. Fonte: Lais Nunes Alves G, Patricia De Oliveira J, Viana C, Thomé da Silva R, Temóteo Galhardo A. SÍNDROME DE PATAU. EASN [Internet]. 24º de fevereiro de 2024 [citado 13º de março de 2025];17. Disponível em: <https://www.periodicojs.com.br/index.php/easn/article/view/1902>

O cariótipo típico dessa síndrome é apresentado na figura 6.22 abaixo.

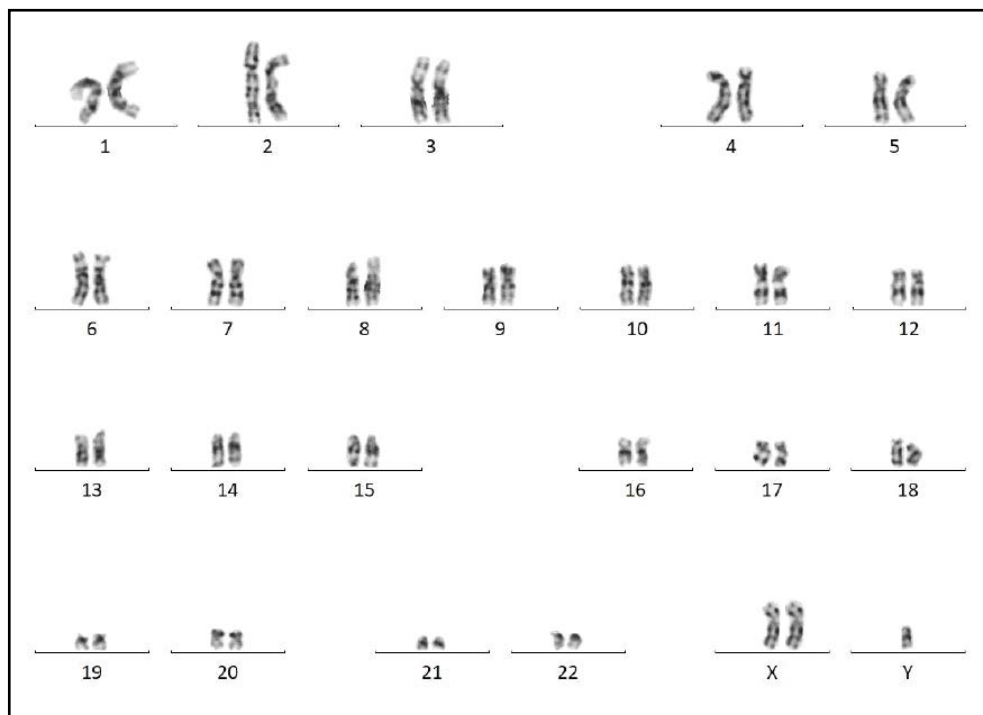


Figura 6.22: Cariótipo masculino apresentando uma trissomia do cromossomo 13 (47, XY, +13). Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibeles Cristina Castilho

6.5 - ANEUPLOIDIAS ENVOLVENDO CROMOSSOMOS SEXUAIS HUMANOS.

ANEUPLOIDIAS ENVOLVENDO O CROMOSSOMO X

São uma das anomalias citogenéticas mais comuns e nota-se uma tolerância relativa a essas anomalias, o que pode ser explicado

pela inativação do cromossomo X (evento descrito no capítulo 5). Apenas reforçando, vale lembrar que a inativação do cromossomo X é um evento normal que ocorre em cariótipos femininos normais (46, XX), onde todo cromossomo X além de um será inativado. Dessa maneira, em homens normais (46, XY), nenhum cromossomo é inativado.

No entanto, a regra da inativação é válida para todas as células, tanto femininas quanto masculinas. Dessa maneira, cariótipos masculinos e femininos anormais que apresentam cromossomos X extras, também apresentarão a inativação desse cromossomo, conforme apresentado na tabela 6.2 abaixo.

Tabela 6.2: Inativação do cromossomo X.

Fenótipo sexual	Cariótipo	Corpúsculo de Barr *
Homem	46, XY; 47, XYY	0
	47, XXY	1
	48, XXXY	2
	49, XXXXY	3
Mulher	45, X	0
	46, XX	1
	47, XXX	2
	48, XXXX	3
	49, XXXXX	4

* nome dado ao cromossomo X inativado

A partir de agora, vamos analisar as principais características das diferentes síndromes que envolvem o cromossomo X em humanos.

SÍNDROME DE KLINEFELTER (47, XXY)

A incidência estimada para essa síndrome é de 1 em até 600 nascimentos do sexo masculino. No entanto, como as alterações apresentadas pelos portadores são brandas, supõe-se que muitos casos não sejam detectados. Nesses indivíduos 47, XXY um dos cromossomos X é inativado.

As principais características apresentadas nessa síndrome estão listadas abaixo e apresentadas na figura 6.23:

- ✓ Pacientes altos
- ✓ Braços e pernas desproporcionalmente longos
- ✓ Fisicamente normais até a puberdade
- ✓ Características sexuais secundárias permanecem subdesenvolvidas
- ✓ Ginecomastia (pode estar presente)
- ✓ Testículos pequenos
- ✓ Maioria é estéril.



Figura 6.23: Características de um indivíduo com síndrome de Klinefelter. Fonte: Sutedja EK, Maharani RH, Sugiri U, Achdiat PA. Chronic Venous Leg Ulcer in Klinefelter Syndrome Treated with Platelet-Rich Fibrin: A Case Report. Int Med Case Rep J. 2021 Nov 25;14:809-814. doi: 10.2147/IMCRJ.S337738. PMID: 34858066; PMCID: PMC8630374.

Um cariótipo típico dessa síndrome é apresentado na figura 6.24 abaixo.

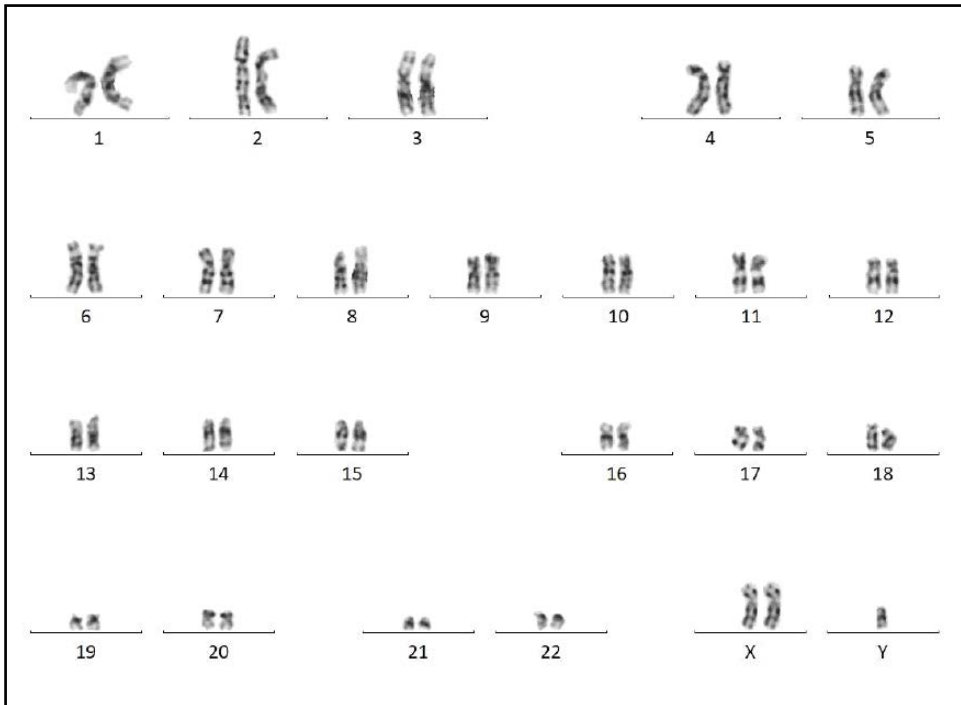


Figura 6.24: Cariótipo de um indivíduo portador da síndrome de Klinefelter (47, XY, +X). Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibele Cristina Castilho

MULHERES 47, XXX (SÍNDROME XXX)

Essa síndrome tem uma incidência estimada de 1 em 1000 nascimentos do sexo feminino. Novamente, as alterações apresentadas são muito brandas. Isso é explicado pelo fato do cromossomo X extra ser inativado. Nesse caso, como a mulher é 47, XXX ela terá dois cromossomos X inativados. O cariótipo característico dessa síndrome é apresentado na figura 6.25.

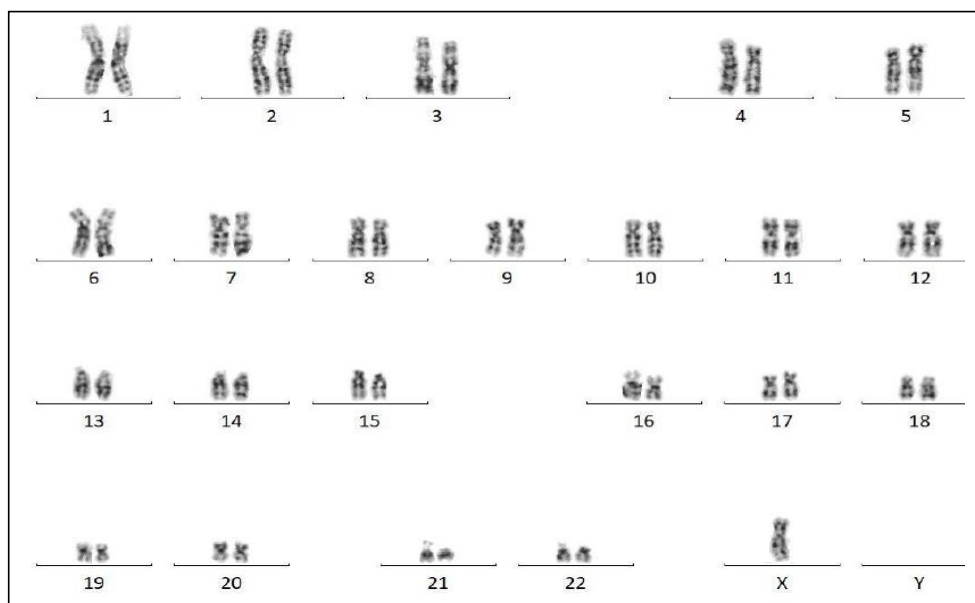


Figura 6.25: Cariótipo feminino apresentando trissomia do cromossomo X (47, XX, +X). Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibele Cristina Castilho

As principais características dessa síndrome estão listadas abaixo.

- ✓ Estatura um pouco acima da média
- ✓ Características normais
- ✓ Desenvolve as mudanças da puberdade na idade apropriada
- ✓ Em geral são férteis
- ✓ Podem apresentar: deficiência no aprendizado, deficiência de desenvolvimento, problemas de comportamento, descoordenação e esterilidade.

As variações dessa síndrome são mulheres 48, XXXX (que

apresentam 3 cromossomos X inativos) e mulheres 49, XXXXX (que apresentam 4 cromossomos X inativos). Nos dois casos, cada X adicional vem acompanhado de maior gravidade da deficiência intelectual e de anormalidades físicas. Isso pode ser explicado pela presença em doses adicionais da região que ‘escapa’ da inativação do X que foi inativado.

SÍNDROME DE TURNER (45, X)

Essa é a única síndrome em que se observa a perda de um cromossomo. Sua incidência é de 1 em 2.500-4.000 nascimentos do sexo feminino. No entanto, ela ocorre com uma frequência muito maior, mas infelizmente a maioria (acima de 99%) das concepções 45, X é perdida no período pré-natal. Entre as concepções que evoluem a termo, muitas são mosaicos (30 a 40%).

Acredita-se que as alterações dessa síndrome são devidas a ausência dos genes que ‘escapam da inativação’. As principais características dessa síndrome estão listadas abaixo e apresentadas na figura 6.26:

- ✓ Baixa estatura
- ✓ Pescoço largo e alado
- ✓ Linfedema
- ✓ Risco de anomalias cardíacas

- ✓ Cognição / inteligência tipicamente normais
- ✓ Fenótipo comportamental normal (mas ajuste social comprometido)
- ✓ Infertilidade



Figura 6.26: Características de uma portadora da síndrome de Turner. Fonte: Torres, L. H. S., Cavalcante, M. B., Uchôa, C. P., Rocha, C. B. S., Silva, J. de Ângelis A., Lessa, T. C. S., Macêdo, L. F. C. de, Ferreira Neto, J. J., & Pereira Filho, V. A. (2020). Síndrome de Turner: características clínicas e relato de uma abordagem cirúrgica. ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION, 8(9). <https://doi.org/10.21270/archi.v8i9.4641>.

O cariótipo de uma portadora dessa síndrome é apresentado na figura 6.27

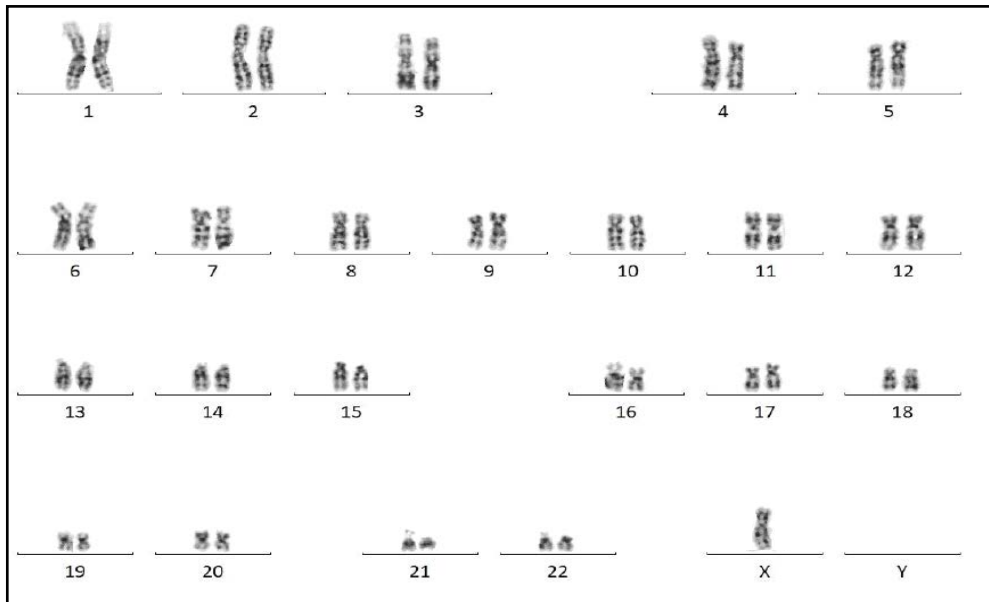


Figura 6.27: Cariótipo feminino de uma portadora da síndrome de Turner (45, X). Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibele Cristina Castilho

ANEUPLOIDIA ENVOLVENDO O CROMOSSOMO Y: HOMENS 47, XYY

Essa síndrome apresenta uma incidência de 1 em cada 700 a 1000 nascimentos do sexo masculino e não está associada a nenhum fenótipo anormal. Não é possível fazer uma clara distinção entre homens 46, XY e 47, XYY. A fertilidade é normal, mas pode haver dificuldade de linguagem e leitura (50%). Esses homens não apresentarão nenhum cromossomo inativado. A explicação para ausência de alte-

rações é que o cromossomo Y é pequeno e possui poucos genes (a maioria envolvida em características masculinas). A figura 6.28 apresenta um cariótipo 47 XYY.

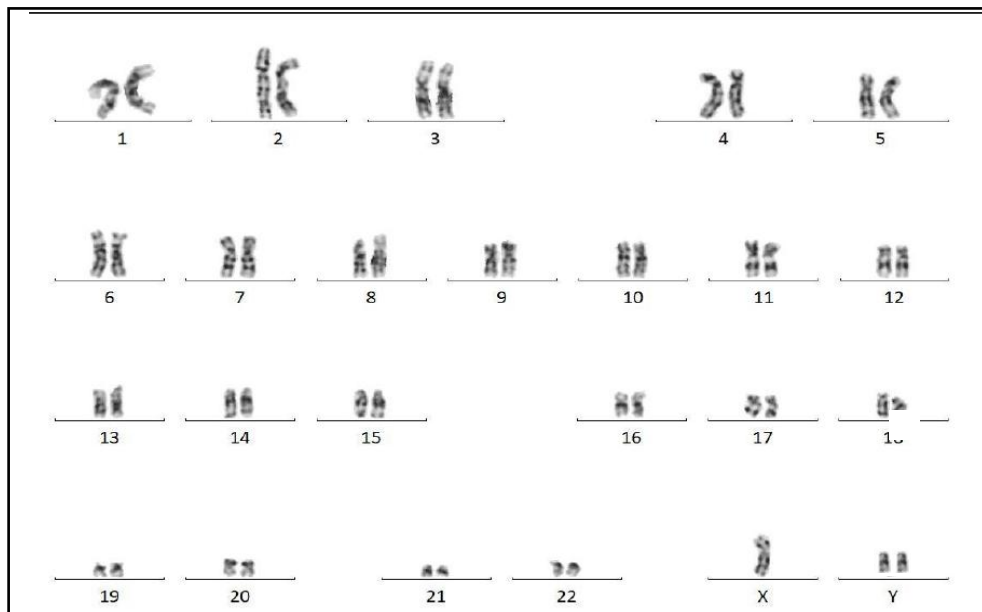


Figura 6.28: Cariótipo masculino 47, XY+Y. Imagem gentilmente cedida pela Dra. Cibele Cristina Castilho

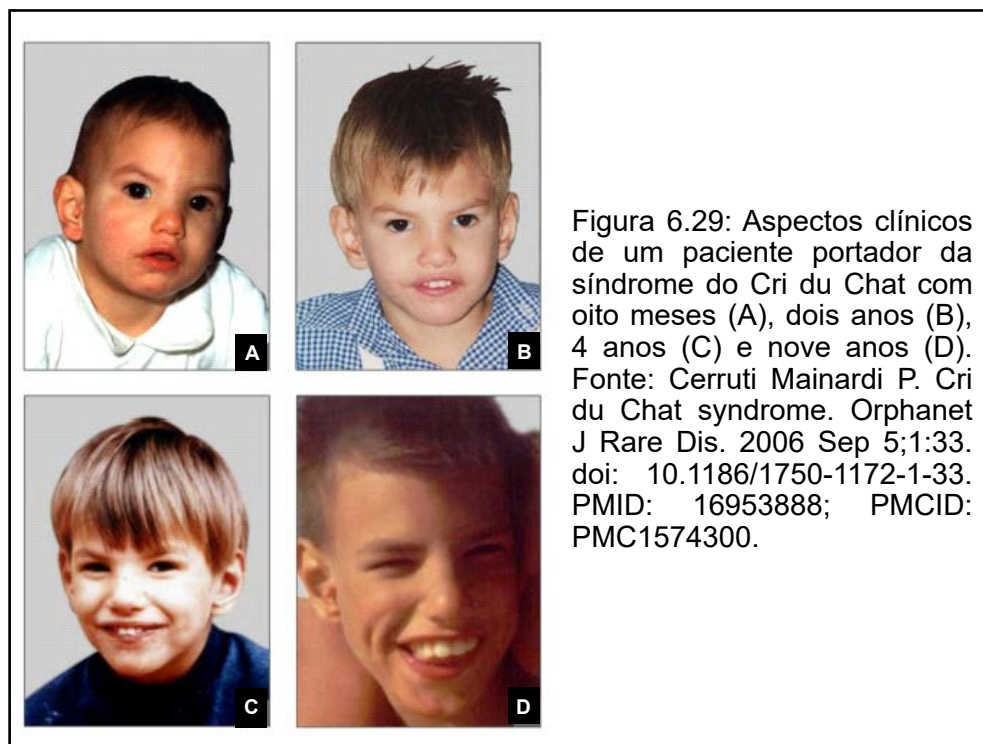
6.6 - EXEMPLO DE DISTÚRBO CAUSADO POR UMA ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA ESTRUTURAL NÃO BALANCEADA

SÍNDROME DE *CRI DU CHAT* (SÍNDROME DO MIADO DE GATO)

Essa síndrome é causada pela perda de uma parte do braço curto do cromossomo 5 (5p) e sua incidência é de 1 em 15.000 nativos.

Algumas alterações típicas para essa síndrome estão listadas abaixo e apresentadas na figura 6.29.

- ✓ Choro semelhante ao miado de um gato
- ✓ Baixo peso ao nascer
- ✓ Microcefalia
- ✓ Deficiência intelectual
- ✓ Falha no crescimento
- ✓ Baixa implantação das orelhas



O fenótipo dessa síndrome muda com a idade, de forma que suas principais características clínicas se tornam mais brandas, portanto, é fundamental a sua identificação em uma fase precoce.

REFERÊNCIAS

Berthold, T. B., Araujo, V. P. de, Robinson, W. M., & Hellwig, I. (2004). Síndrome de Down: aspectos gerais e odontológicos. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 3(2), 252–260. <https://doi.org/10.9771/cm-bio.v3i2.4430>.

Cerruti Mainardi P. Cri du Chat syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Sep 5;1:33. doi: 10.1186/1750-1172-1-33. PMID: 16953888; PMCID: PMC1574300.

Griffiths, Anthony J., F. et al. *Introdução à Genética*. Disponível em: Minha Biblioteca, (12th edição). Grupo GEN, 2022.

Jorde, Lynn B. *Genética Médica*. Disponível em: Minha Biblioteca, (5th edição). Grupo GEN, 2017.

McInnes, Roderick R. Thompson & Thompson *Genética Médica*. Disponível em: Minha Biblioteca, (8th edição). Grupo GEN, 2016.

Ribeiro EM, Carneiro RCCP, Carneiro LJP, Matos EMSS, Albuquerque LS. A síndrome de Cri Du Chat em adolescentes. *J Health Biol Sci*. 2020 J; 8(1):1-3.

Robertis, Edward M., D. e José Hib. De Robertis Biologia Celular e Molecular. Disponível em: Minha Biblioteca, (16th edição). Grupo GEN, 2014.

Rosa RF, Rosa RC, Lorenzen MB, Zen PR, Graziadio C, Paskulin GA. Craniofacial abnormalities among patients with Edwards Syndrome. Rev Paul Pediatr. 2013 Sep;31(3):293-8. doi: 10.1590/S0103-05822013000300004. PMID: 24142310; PMCID: PMC4182981.

Sutedja EK, Maharani RH, Sugiri U, Achdiat PA. Chronic Venous Leg Ulcer in Klinefelter Syndrome Treated with Platelet-Rich Fibrin: A Case Report. Int Med Case Rep J. 2021 Nov 25;14:809-814. doi: 10.2147/IMCRJ.S337738. PMID: 34858066; PMCID: PMC8630374.

Torres, L. H. S., Cavalcante, M. B., Uchôa, C. P., Rocha, C. B. S., Silva, J. de Ângelis A., Lessa, T. C. S., Macêdo, L. F. C. de, Ferreira Neto, J. J., & Pereira Filho, V. A. (2020). Síndrome de Turner: características clínicas e relato de uma abordagem cirúrgica. ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION, 8(9). <https://doi.org/10.21270/archi.v8i9.4641>



BIOLOGIA MOLECULAR

Análise do DNA

Você certamente já ouviu falar sobre sequenciamento de DNA, teste de paternidade, diagnóstico molecular etc. Mas você alguma vez já parou para pensar como cada um deles é realizado? Nesse capítulo, vamos conhecer algumas ferramentas moleculares que permitem a análise do DNA e têm trazido uma enorme contribuição para a área da saúde!

As últimas décadas foram marcadas por um grande avanço científico em diversas áreas do conhecimento, em especial no que diz respeito ao desenvolvimento de técnicas para análise e manipulação do DNA. Mas como isso é feito, afinal de contas? Vamos abordar esse tema a partir de agora. A proposta desse capítulo é trazer uma visão geral sobre algumas ferramentas moleculares e o seu uso no diagnóstico de doenças genéticas ou em um teste de paternidade, por exemplo. Vamos lá!

7.1 - OBTENÇÃO DO DNA QUE SERÁ ANALISADO

Se vamos analisar as diferentes técnicas para análise e manipulação do DNA, é preciso ter em mente que é fundamental conseguir extrair essa molécula da célula. Existem diferentes protocolos que permitem a obtenção de DNA, e um ponto determinante é a amostra a partir da qual a molécula será extraída: sangue, saliva, tecido conjuntivo, tecido ósseo etc. Cada um dos exemplos citados anteriormente tem características únicas, portanto para cada um existem protocolos específicos. Além disso, existem também vários '*kits* comerciais' desenvolvidos por empresas que tornam a obtenção do DNA mais fácil, rápida e eficaz. No entanto, isso tem um custo e nem sempre no laboratório há orçamento suficiente para a aquisição de tais materiais. Dessa maneira, é importante ter em mente que para toda amostra você poderá obter DNA utilizando um *kit* comercial ou

seguindo um protocolo, uma ‘receita caseira’ cujo custo é bem menor, mas que ainda assim permite a obtenção da molécula.

De um modo geral, a extração do DNA envolve as seguintes etapas:

- a) ‘Macerar’ a amostra, o que permite ‘destruir’ o tecido, separando suas células. Isso é importante pois facilita o acesso dos reagentes utilizados na etapa seguinte às células isoladas.
- b) ‘Desorganizar’ as membranas celulares, o que é possível utilizando um detergente (lembre-se da bicamada lipídica das membranas, ok?). Isso permite a liberação do DNA do interior do núcleo e da célula como um todo (visto que tanto as membranas do envoltório nuclear quanto a plasmática serão desorganizadas).
- c) ‘Remover’ restos celulares, proteínas e RNA. Nessa etapa, pode-se utilizar solventes orgânicos como fenol e clorofórmio, por exemplo. Além disso, a amostra também pode ser centrifugada, o que ajuda a separar os diferentes componentes presentes na solução de extração.
- d) ‘Precipitar’ o DNA, que nada mais é que separar o DNA do restante da solução. Pode-se utilizar etanol gelado (ou outro álcool), pois o DNA é insolúvel em álcool e se ‘separa’ do restante da solução.
- e) ‘Dissolver’ DNA obtido em água ultrapura ou em um tampão

específico e manter a amostra a -20°C até o momento do uso.

Uma vez que o protocolo para extração do DNA foi finalizado, é preciso fazer uma análise do resultado para analisar se: I) obtivemos de fato DNA? II) a molécula está íntegra ou degradada? Isso porque a molécula degradada (fragmentada) pode até ser utilizada para algumas análises, mas não é o ideal e III) há alguma contaminação por RNA em nossa amostra? Nessa etapa do nosso trabalho, podemos realizar uma ‘eletroforese de ácidos nucleicos’, então vamos conhecer um pouco mais sobre esse assunto, ok?

7.2 - ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEICOS (DNA E RNA).

Uma vez que o DNA foi extraído das células de nossa amostra, não será possível observá-lo ao microscópio, já que a estrutura celular foi toda desfeita. Para analisar os resultados obtidos a partir da extração do DNA e de várias outras ferramentas que permitem manipulação dessa molécula, vamos utilizar a ‘eletroforese de ácidos nucleicos’.

Nessa técnica, as amostras são aplicadas em um suporte físico (um gel de agarose ou de poliacrilamida) e são submetidas a uma corrente elétrica que as ‘empurra’, de modo que elas ‘migram’ através do gel e os fragmentos de DNA com tamanhos diferentes são separados. Mas o que interfere nesse processo?

a) A carga da molécula. No caso dos ácidos nucleicos (DNA e

RNA), a carga é negativa devido ao grupo fosfato presente nos nucleotídeos. No aparelho onde a corrida de eletroforese acontece há dois pólos: um positivo (cor vermelha) e um negativo (cor preta). Portanto, a amostra de DNA deve ser aplicada no pólo negativo, de forma que a corrente elétrica a empurrará para o pólo com carga oposta (positivo) (figura 7.1).

- b) Tamanho. Como já mencionado, a separação das moléculas acontece em um 'suporte sólido', um gel de agarose (que será descrito mais detalhadamente nesse capítulo) ou de poliacrilamida. Nesse 'gel', a agarose, por exemplo, cria uma 'rede' por onde a molécula deve passar, portanto fragmentos menores conseguem passar por ela mais facilmente e sempre 'ganham' em uma corrida de eletroforese (figura 7.1).

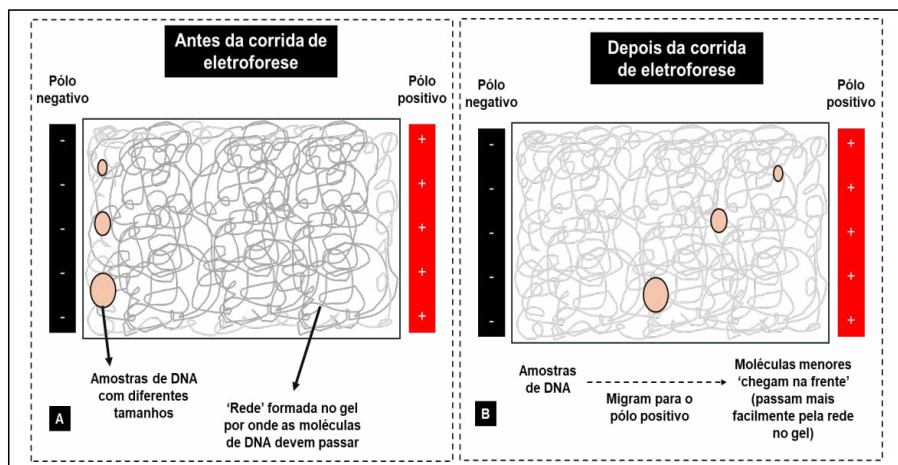


Figura 7.1: Ilustração sobre características fundamentais da eletroforese. A) As mostras são aplicadas no pólo negativo e devem passar por uma 'rede' que se forma no gel. B) Ao final da eletroforese, nota-se que as amostras foram 'empurradas' pela corrente elétrica em direção ao pólo positivo, e que as moléculas menores sempre chegam na frente.

PREPARO DE UM GEL DE AGAROSE PARA ELETROFERESE DE DNA E APLICAÇÃO DA AMOSTRA.

Espera aí: o DNA será empurrado por uma corrente elétrica através de um gel onde se forma uma ‘rede’? Como assim? Vamos falar sobre a ‘preparo do gel’ e aplicação da amostra de DNA para esclarecer qualquer dúvida, ok?

O preparo de um gel de agarose é muito simples, muito parecido com o preparo de uma gelatina, na verdade. A agarose é um pó que só é dissolvido através do aquecimento. Para isso, adicionamos a quantidade necessária de um tampão apropriado, geralmente tris-acetato EDTA (TAE) ou tris-borato EDTA (TBE) à agarose e aquecemos até a agarose dissolver por completo.

Conforme esfria, a agarose solidifica. Portanto, enquanto ainda está dissolvida, ela será colocada em um suporte apropriado que permita a aplicação das amostras de DNA: uma bandeja (previamente vedada com fita crepe, por exemplo) contendo um ‘pente’. Quando a agarose estiver completamente solidificada, o ‘pente’ é cuidadosamente removido e será possível notar a presença de ‘poços’ onde as amostras de DNA serão aplicadas (figura 7.2).

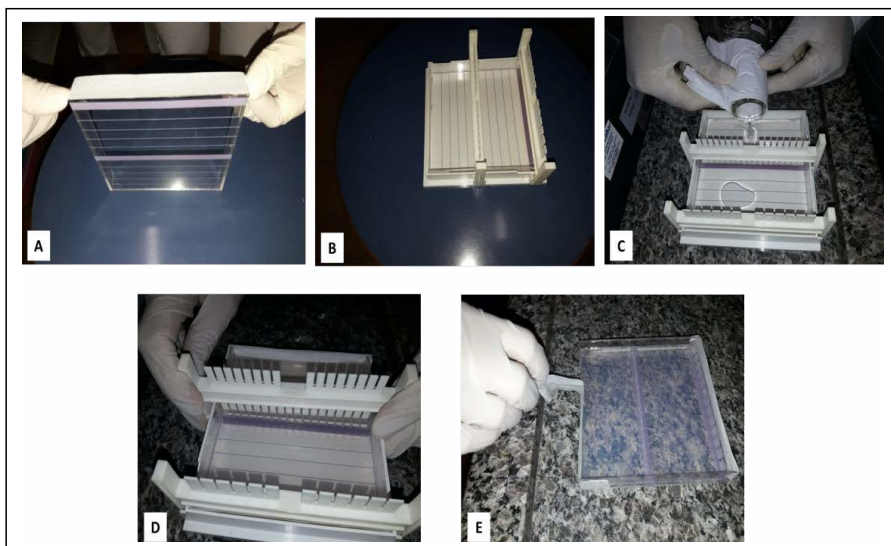


Figura 7.2: Etapas do preparo de um gel de agarose. A) Inicialmente é importante vedar a bandeja (nesse caso com fita crepe); B) Bandeja já vedada com os pentes de eletroforese; C) A agarose já derretida é 'vertida' na bandeja; D) Após o resfriamento, o gel solidifica e os pentes são cuidadosamente removidos (note a presença de 'poços' onde as amostras serão aplicadas) e E) A fita crepe usada para vedar a bandeja também é removida.

Em seguida, o gel será transferido para uma cuba de eletroforese e será adicionado o mesmo tampão usado no preparo do gel até que esse esteja completamente submerso (figura 7.3).

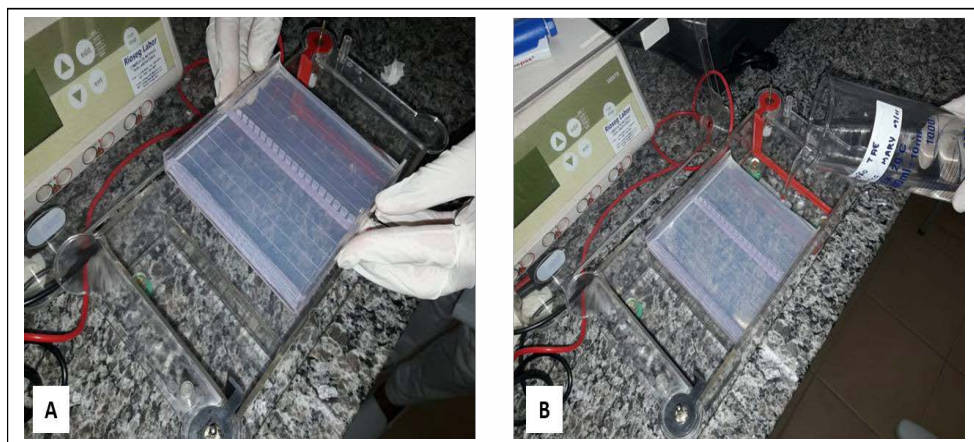


Figura 7.3: A) Transferência do gel para uma cuba de eletroforese e B) A cuba será preenchida com tampão TAE 1X (o mesmo usado no preparo do gel).

Agora só falta aplicar a amostra!!! Para isso, será preciso adicionar uma pequena quantidade do ‘tampão da amostra’ que tem dois objetivos: 1) Permitir a visualização da amostra após a sua aplicação (tanto a amostra quanto o gel são incolores, e esse corante tem cor azul) e 2) Garantir que a amostra fique ‘no fundo do poço’. Isso mesmo, lembre-se que a amostra é líquida e o gel está recoberto por tampão! Esse corante contém glicerol, por exemplo, que é ‘pesado’ e faz com que a amostra ‘afunde’ quando aplicada no gel. É fundamental ressaltar que o tampão da amostra nos permite visualizar a amostra em si, mas não o DNA. Para visualizarmos o DNA, será preciso outro corante, mais precisamente um corante fluorescente, normalmente agentes intercalantes (que se ligam a dupla fita de DNA) como ‘brometo de etídeo’ ou ‘Sybr green’, por exemplo. O uso do brometo de etídeo é muito comum, mas trata-se de um agente mutagênico, portanto siga cuidadosamente as normas de segurança do laboratório para manipulação e descarte desse material, ok? (figura 7.4).



Figura 7.4: Aplicação das amostras nos poços presentes no gel de agarose. No que elas estão azuis devido ao azul de bromofenol presente no tampão da amostra.

Como será a visualização do DNA? Bem, após a separação das amostras do gel será cuidadosamente transferido para outro aparelho chamado ‘transiluminador’ (figura 7.4).

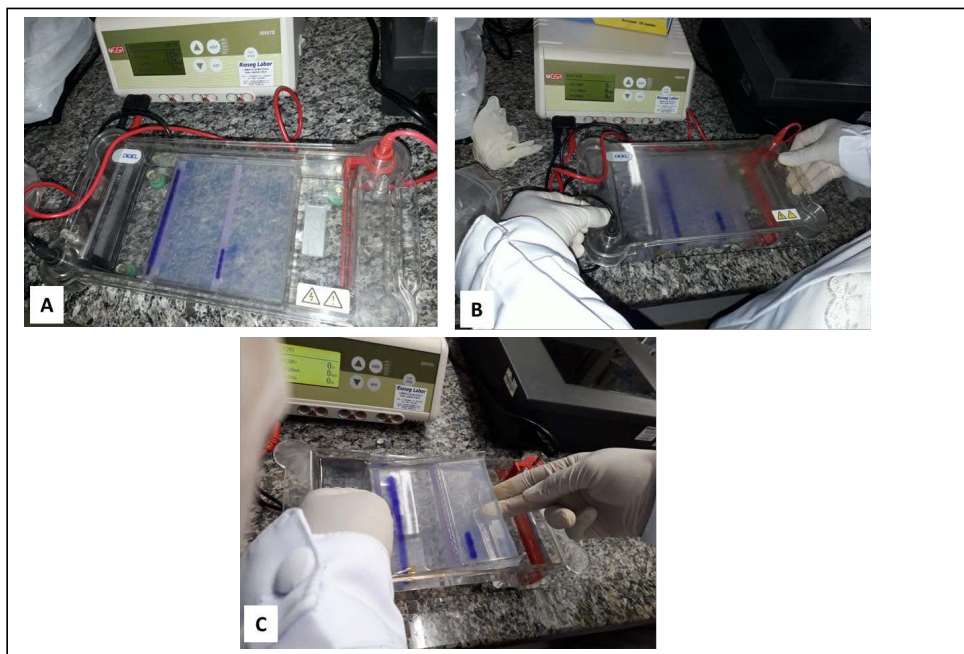


Figura 7.4: A) Início da eletroforese (note que as amostras ainda se encontram nos pocinhos); B) Amostras já migraram pelo gel (note que elas já saíram dos pocinhos) e C) Remoção do gel da cuba de eletroforese e posterior transferência para um transiluminador (onde de fato se observará ou não a presença das ‘bandas’ de DNA).

O transiluminador quando ligado emite luz UV, dessa maneira, se houver DNA em nossa amostra, o corante se associou a ele e emitirá sua fluorescência, evidenciando a presença de ‘bandas’ que apresentam o mesmo formato do poço onde foram aplicadas no gel (figura 7.5).

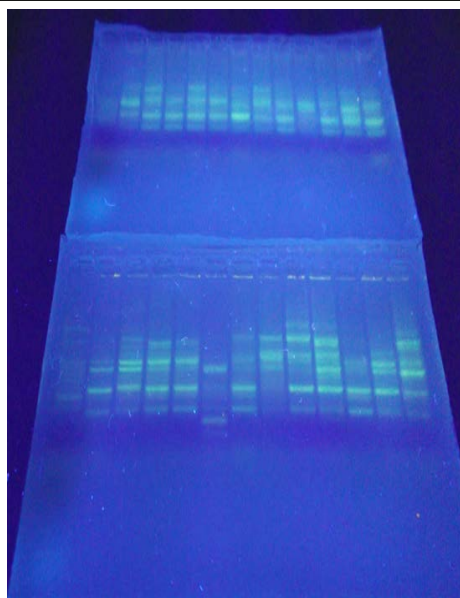


Figura 7.5: Imagem de um gel de agarose apresentando várias 'bandas' de DNA quando observado ao transiluminador. Observação: Esse não é o mesmo gel das imagens anteriores, ok?

ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ELETROFORESE

A eletroforese nos permite analisar o resultado obtido na extração do DNA e em outras técnicas em que ocorre a manipulação da molécula, onde possivelmente teremos fragmentos (visualizados como bandas) de diferentes tamanhos. Nesse caso, é possível saber o tamanho de cada um deles a partir do uso de 'marcadores de peso molecular'. Esses 'marcadores' são adquiridos comercialmente e são amostras de DNA que apresentam diferentes fragmentos, cada um bem caracterizado e com tamanho já descrito pela empresa que o comercializa. Dessa maneira, no momento da análise aplicamos o 'marcador' e as demais amostras no gel e só então ligamos a fonte de eletroforese para dar início à separação dos fragmentos de DNA. Ao final do processo, já na etapa de visualização, o tamanho dos frag-

mentos de cada amostra é determinado a partir da comparação com os fragmentos presentes no marcador de peso molecular, conforme exemplificado na figura 7.6.

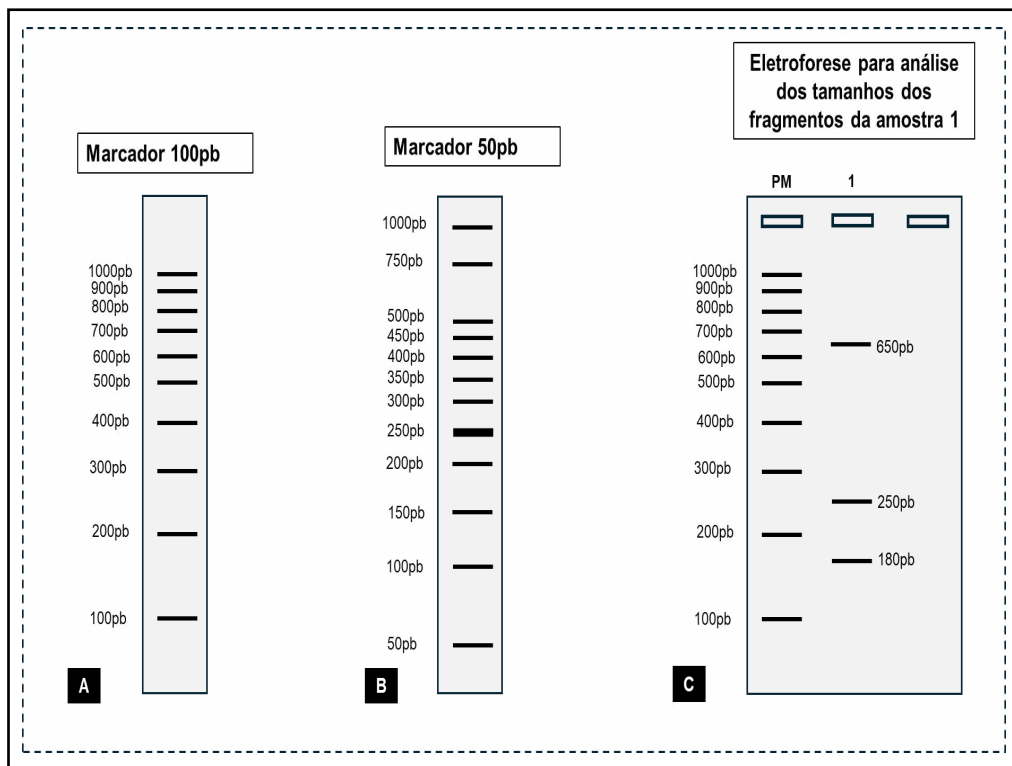


Figura 7.6: Como analisar o tamanho de um fragmento de DNA em um gel de agarose. A e B) Padrões de peso molecular 100pb e 50pb respectivamente (cada um apresenta diferentes fragmentos de DNA com tamanho já conhecido). C) Análise dos tamanhos dos fragmentos presentes na amostra 1: 180pb, 250 e 650pb. PM = padrão de peso molecular 100pb.

Agora que já sabemos como analisar um gel de eletroforese de DNA, vamos conhecer algumas ferramentas moleculares que nos permitem manipular essa molécula!

7.3 - HIBRIDIZAÇÃO DE DNA

A hibridização de DNA é um evento que acontece em diferentes técnicas de biologia molecular e nos permite ‘procurar’ por uma região de interesse na amostra de DNA que está sendo analisada. Mas como isso pode ser feito? Vamos compreender as principais características desse processo a partir de agora!

Em laboratório, é possível separar as cadeias de nucleotídeos do DNA, o que é conhecido como ‘desnaturação’ através de aquecimento a 94°C, por exemplo. O interessante é que, conforme a temperatura abaixa, as cadeias podem se unir novamente (se reanelar), refazendo os pares de bases complementares (como guanina com citosina, por exemplo). Esse ‘reanelamento’ ocorre sempre que as cadeias de nucleotídeos são complementares, não importando a sua origem. Portanto, é possível que cadeias de nucleotídeos na forma de fita simples, complementares, porém de origens diferentes se associem, formam um ‘híbrido molecular’ através da ‘hibridização’ (figura 7.7).

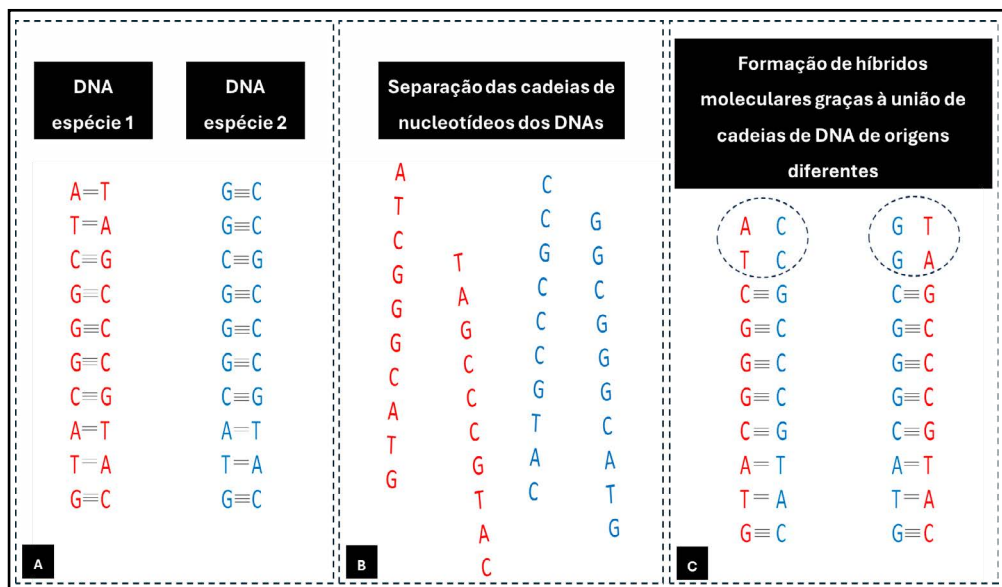


Figura 7.7: Ilustração representando em ‘A’, ‘B’ e ‘C’ algumas etapas envolvidas na formação de híbridos moleculares. As regiões destacadas pelos círculos pontilhados representam locais onde as cadeias não são complementares (note que não se formam pontes de hidrogênio entre elas).

Se o objetivo é determinar se o DNA da amostra em análise apresenta ou não a região de interesse, outra molécula usada na hibridização será uma ‘sonda’, um fragmento de DNA já conhecido (no caso, ele corresponde a uma parte da região de interesse). Nessas condições, quando a hibridização ocorre, significa que nossa amostra possui a região de interesse, ao passo que a não formação do híbrido molecular indica que o DNA em análise não possui a região de interesse (figura 7.8).

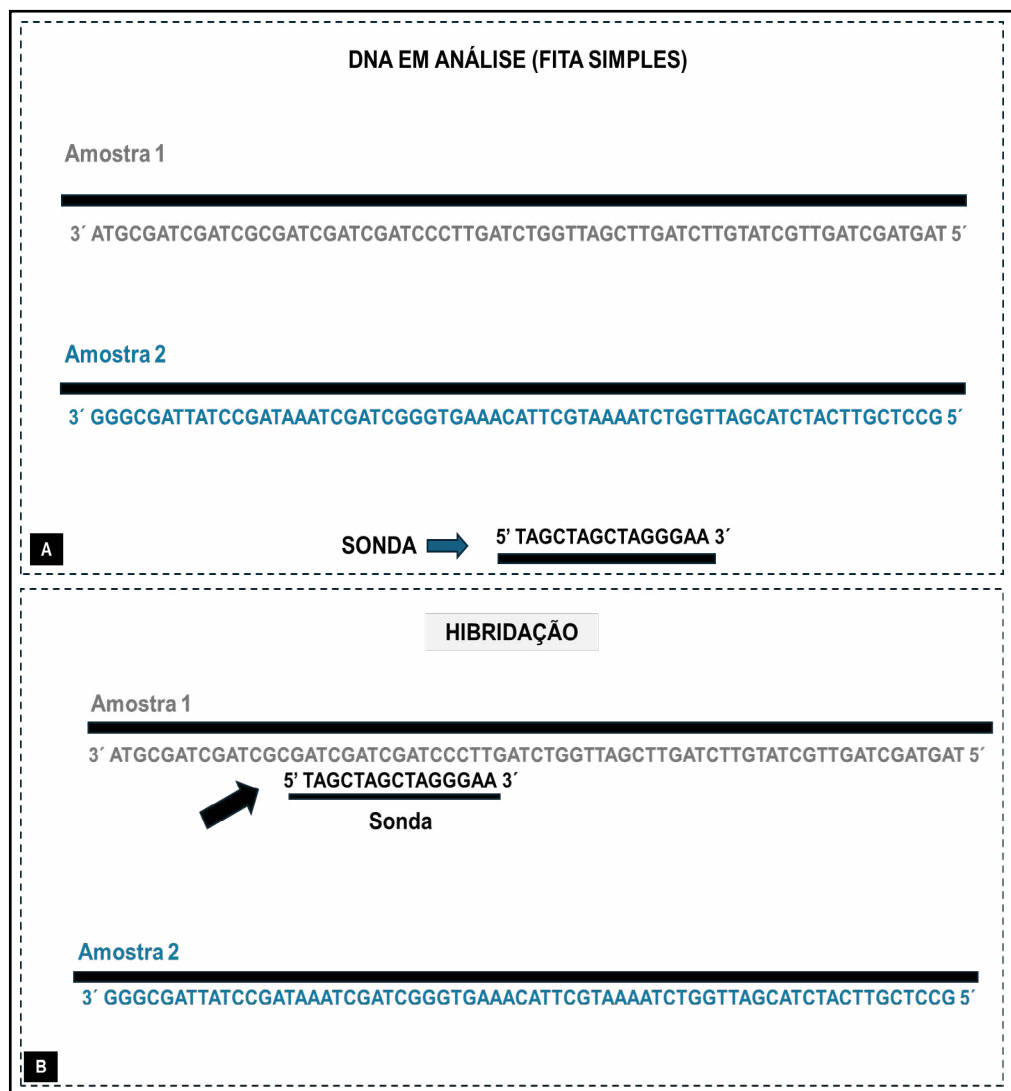


Figura 7.8: Ilustração mostrando que uma sonda pode ser usada na busca de uma região de interesse em diferentes amostras de DNA. No exemplo acima, a sonda se ligou apenas na amostra 1 (portanto apenas ela possui essa região).

Uma vez que esse híbrido molecular se forma ele precisa ser estável, pois isso indica que o resultado obtido é de fato confiável. Um dos fatores que interfere nessa estabilidade é o grau de complementariedade entre as duas cadeias de nucleotídeos. Isso porque, quan-

do os pares de bases não são complementares, não há formação de pontes de hidrogênio entre eles. Se isso ocorre com grande frequência em um híbrido molecular, ele poderá ser desfeito facilmente. Nas técnicas moleculares onde há uma etapa de hibridização, essa estabilidade também é ‘testada’, de forma que apenas as cadeias que de fato são complementares permanecem unidas (figura 7.9).

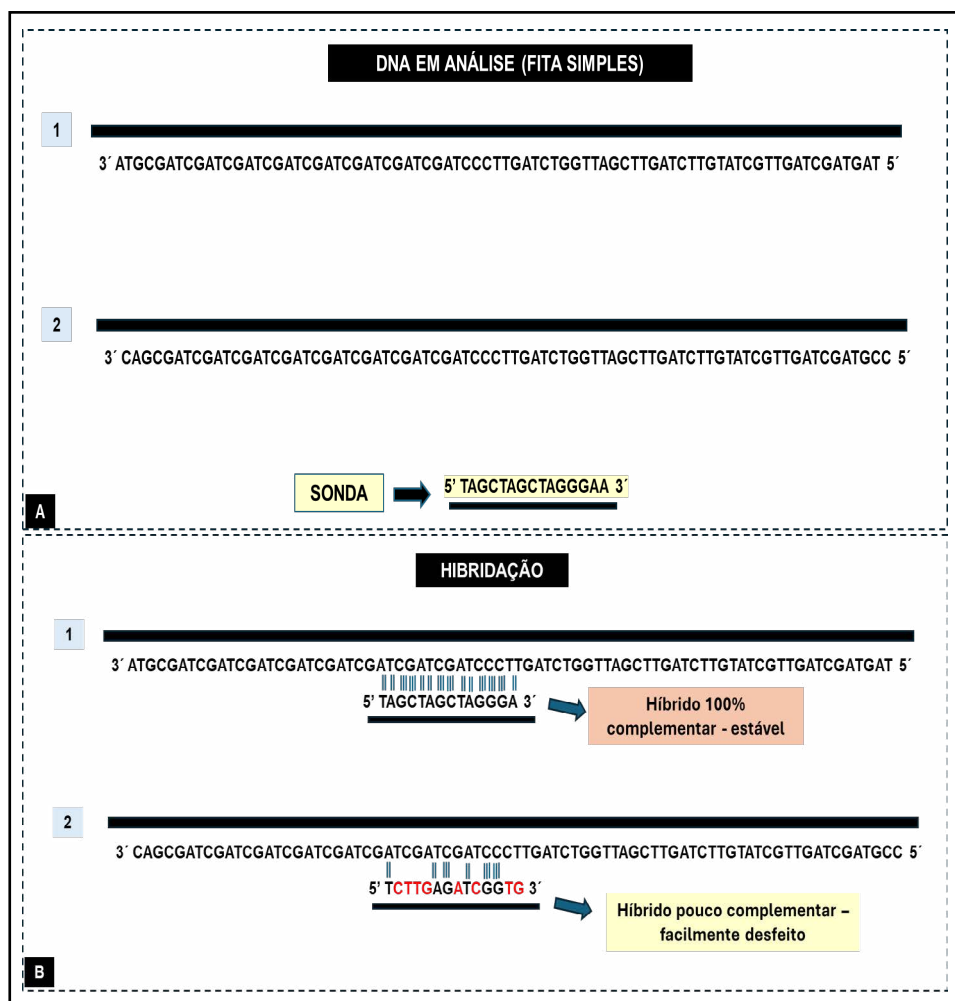


Figura 7.9: Ilustração mostrando que o grau de complementariedade entre a sonda e o DNA em análise interfere na estabilidade do híbrido molecular. Quando eles são pouco complementares, o híbrido pode ser facilmente desfeito (conforme observado na amostra 2), o que é importante para evitar ‘falsos positivos’.

7.4 - ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (AS ‘TESOURAS’ DA BIOLOGIA MOLECULAR)

Você já se imaginou ‘cortando’ o DNA? Pois saiba que isso é possível, aliás, feito com grande precisão nos laboratórios de Biologia Molecular. Vamos entender como isso funciona!

Uma vez que já temos o DNA devidamente extraído, podemos cortá-lo utilizando as ‘enzimas de restrição’. Essas enzimas existem naturalmente em bactérias e são um importante mecanismo de defesa contra vírus. A bactéria ‘marca’ o seu DNA colocando grupamentos químicos (faz a metilação do seu DNA), que não são encontrados no DNA invasor, que será cortado em vários pedaços. Dessa forma, a bactéria consegue proteger o seu DNA e destruir apenas o que é diferente, o que representa uma estratégia muito eficiente de proteção! Atualmente, há empresas que produzem e comercializam essas enzimas.

Uma vez que as enzimas de restrição foram obtidas a partir de uma determinada espécie de bactéria, o seu nome está associado à sua origem. Por exemplo, a enzima *EcoRI* deriva da bactéria *Escherichia coli*, cepa *RY13*, enzima *1*, já a *BamHI* de *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa *H* enzima *1*. Não se preocupe em decorar esses nomes, mas sim o modo de ação dessas enzimas!

Já sabemos que elas são capazes de cortar o DNA, mas como

esse corte é realizado? Uma característica muito importante das enzimas de restrição é que elas são específicas, ou seja, só agem após reconhecerem uma determinada sequência de nucleotídeos, chamada sítio de restrição. Vamos abordar as principais características dessa sequência:

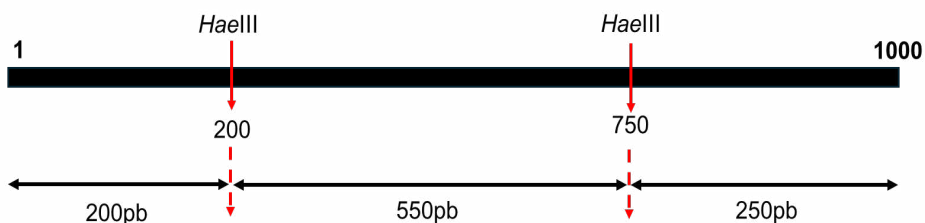
- I) Tamanho varia de 4 a 8 pares de bases (quanto menor, maior a frequência com que a enzima cortará o DNA) (figura 7.10).
- II) Geralmente é uma sequência palindrômica (aquela que pode ser lida em qualquer sentido que sempre será a mesma palavra, como o nome Ana ou a palavra ovo, por exemplo) (figura 7.10).
- III) O corte do DNA é realizado dentro do sítio de restrição, e pode ser feito no mesmo eixo de simetria, criando extremidades cegas / abruptas ('blunt' em inglês) ou fora do eixo de simetria, criando extremidades coesivas (figura 7.10).

Nome da enzima de restrição	Sequência alvo (as setas indicam o local do corte)
<i>EcoRI</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' (Red arrows point to the G in GAATTC and the A in CTTAAG)
<i>TaqI</i>	5' TCGA 3' 3' AGCT 5' (Red arrows point to the G in TCGA and the A in AGCT)
<i>SmaI</i>	5' CCCGGG 3' 3' GGGCCC 5' (Red arrows point to the G in CCCGGG and the C in GGGCCC)
<i>HaeIII</i>	5' GGCC 3' 3' CCGG 5' (Red arrows point to the G in GGCC and the C in CCGG)
<i>NotI</i>	5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5' (Red arrows point to the G in GCGGCCGC and the C in CGCCGGCG)

Figura 7.10: Ilustração demonstrando diferentes características das enzimas de restrição. A) alguns exemplos mostrando que cada enzima reconhece e corta uma sequência específica de nucleotídeos; B) Corte fora do eixo de simetria, gerando extremidades coesivas e C) Corte no eixo de simetria, gerando extremidades cegas.

Após o corte do DNA com a enzima de restrição de escolha, o resultado obtido será analisado através da eletroforese, conforme observado na figura 7.11.

Na amostra abaixo, em uma sequência de 1000pb a enzima *HaeIII* cortará o DNA duas vezes, nas posições 200 e 750. Com isso, serão gerados 3 fragmentos, com 200pb, 550pb e 250pb, que poderão ser visualizados em um gel de eletroforese.



Análise dos resultados: eletroforese

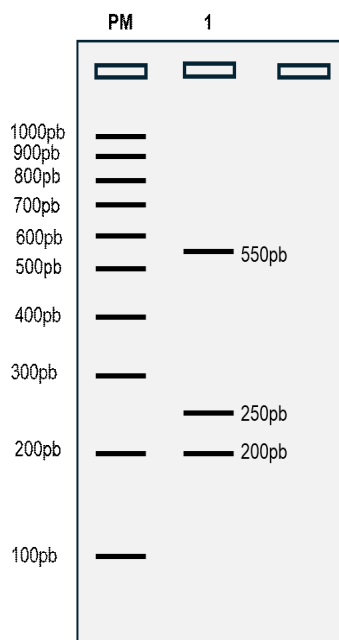


Figura7.11: Ilustração demonstrando o corte de uma sequência de nucleotídeos de DNA pela enzima *HaeIII* e a análise dos resultados obtidos em um gel de eletroforese. PM = marcador de peso molecular 100pb e 1 = local onde a amostra foi aplicada.

Alguns ‘sites’ na internet são muito úteis pois nos permitem fazer o ‘mapa de restrição virtual’ da sequência de DNA em análise, o que ajuda muito na escolha pela enzima de restrição mais apropriada para obter a região de interesse na amostra de DNA. Nesses ‘sites’, basta colocar a sequência de DNA de interesse e escolher por uma determinada enzima de restrição ou optar para que seja feita uma análise com todas as enzimas, que em poucos segundos o padrão de corte de cada uma delas será apresentado. Alguns exemplos:

 **Restriction Mapper**

 **Bio Informatics**

 **Gen Script**

A descoberta das enzimas de restrição representou um grande avanço pois permitiu o desenvolvimento de ‘moléculas de DNA recombinante’, quando regiões do DNA de diferentes espécies são unidas em uma só molécula. Nesse caso, além do corte da molécula para obter as regiões de interesse, também é preciso unir esses fragmentos, o que é possível graças ao uso de uma outra enzima chamada DNA ligase. É importante ter em mente que a união entre fragmentos de DNA será possível sempre que ambos tiverem extremidades ‘cegas’, ou, no caso das extremidades coesivas, elas devem ser complementares. No entanto, há situações em que será preciso unir fragmentos com extremidades coesivas cujas extremidades não

são complementares. Como resolver esse problema? Nesse caso, teremos uma etapa adicional: a enzima Klenow preenche regiões de fita simples das extremidades coesivas, tornando-as cegas. Em seguida, a união dos fragmentos com a enzima DNA ligase pode ser feita (figura 7.12).

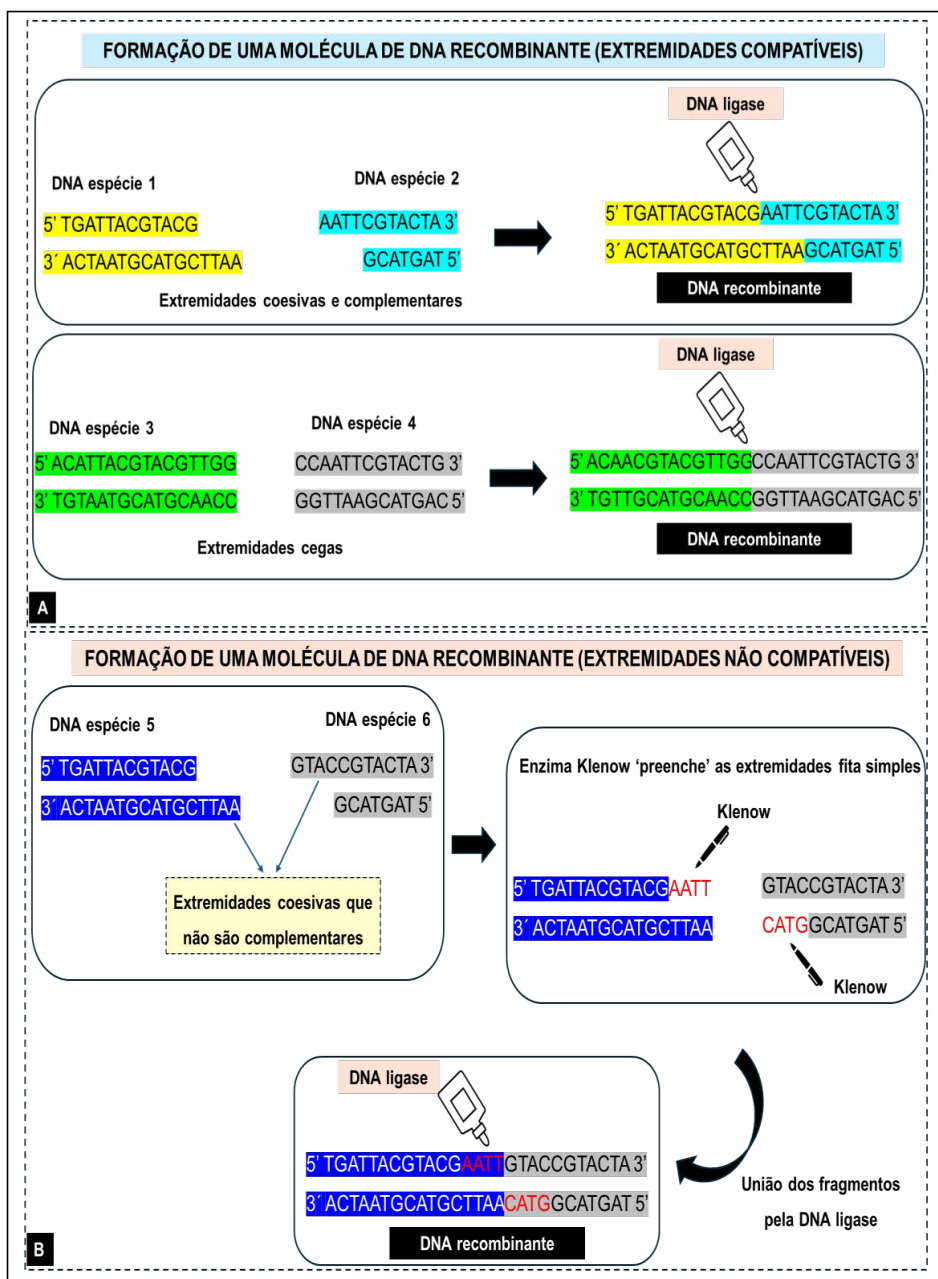


Figura 7.11: Formação de uma molécula de DNA recombinante. A) Quando as extremidades são coesivas (e compatíveis) ou abruptas, os fragmentos são unidos pela DNA ligase (que restaura a união entre os nucleotídeos). B) Quando as extremidades são coesivas e não compatíveis, há uma etapa adicional: a enzima Klenow preenche as extremidades fita simples e em seguida a DNA ligase une os fragmentos.

Além disso, as enzimas de restrição também se mostraram úteis na identificação de mutações associadas a doenças genéticas ou ainda na comparação da variabilidade genética entre diferentes indivíduos. Lembre-se que a mutação altera a sequência de nucleotídeos no DNA e, se isso ocorre justamente na região reconhecida por uma enzima de restrição, o corte será feito na sequência original, mas não na mutante, tornando possível a diferenciação entre ambas (o mesmo princípio vale para a análise das variações genéticas que não estão associadas a doenças entre indivíduos). O fato é: o tamanho dos fragmentos obtidos em cada caso (normal e mutante) será diferente (figura 7.12).

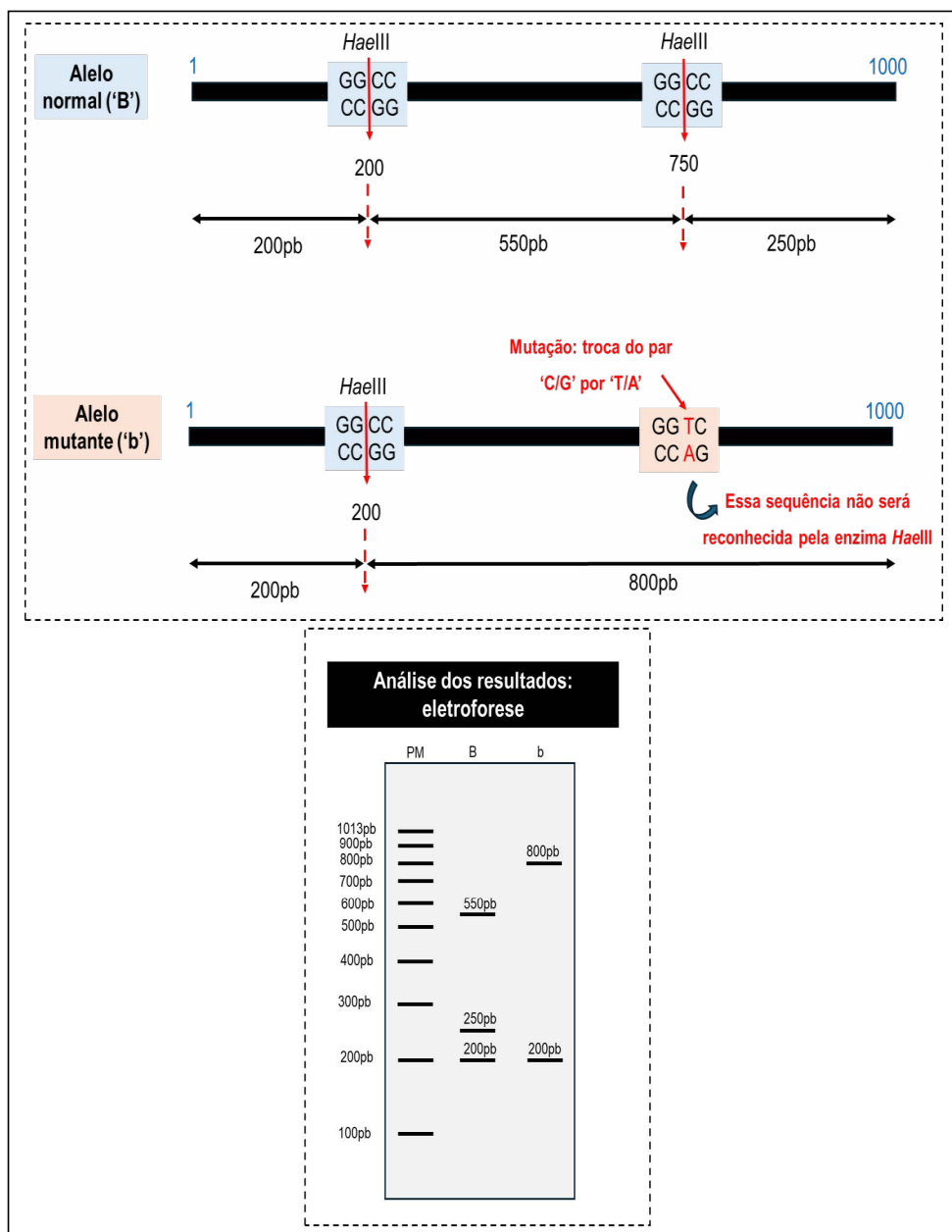


Figura 7.12: Esquema mostrando o uso das enzimas de restrição no diagnóstico molecular. A presença de uma mutação pode abolir um sítio de restrição, fazendo com que o padrão de restrição dos alelos normal e mutante sejam diferentes. No exemplo acima, o alelo 'B' terá 3 fragmentos, com 200pb, 250pb e 550pb, enquanto o 'b' apenas dois: 200pb e 800pb.

7.5 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (OU PCR DO INGLÊS *POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Essa técnica foi desenvolvida em 1983 e representou um enorme avanço na análise do DNA. Isso porque ela nos permite ‘copiar’ o DNA em laboratório a partir de uma pequena quantidade de amostra. Podemos fazer uma comparação: para conseguirmos a cópia de um documento, por exemplo, basta uma versão original e a partir dela é possível fazer milhares de réplicas se necessário. Com o PCR também é assim: basta uma pequena quantidade de amostra, que a partir dela milhares de cópias são obtidas em laboratório! A capacidade de multiplicar o DNA é muito importante, por exemplo, na análise do DNA de amostras de sangue, saliva ou sêmen que se encontram em pequenas quantidades no local de um crime, ou no caso do DNA presente em uma pequena amostra obtida a partir de uma biópsia.

Vamos discutir como essa técnica funciona. Um ponto fundamental é que apenas uma região de interesse será copiada e não a molécula toda, ok?

O conhecimento dos mecanismos utilizados pelas células para copiar o seu DNA foi fundamental para o desenvolvimento do PCR, pois vamos ‘imitar’ o que as células fazem naturalmente e com muita eficiência. Portanto, se você não se lembra como esse processo acontece, dê uma revisada no capítulo 1 para rever alguns aspectos importantes da replicação.

Para uma reação, serão necessários os seguintes reagentes: 1) DNA molde (a partir do qual as cópias serão obtidas); 2) enzima Taq DNA polimerase, uma enzima termoestável responsável pela cópia do DNA (ela foi isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, uma bactéria capaz de tolerar altas temperaturas, por isso 'Taq'); 3) nucleotídeos livres (adenina, timina, citosina e guanina) que serão usados para produção das novas cadeias de nucleotídeos e 4) oligonucleotídeos ('primers' ou iniciadores), uma pequena sequência de nucleotídeos, complementar ao início da região que se deseja copiar (são eles que determinam a região do DNA que será copiada). Mas como saber como serão os *primers*? Bem, lembre-se que vamos produzir cópias do DNA que deverão manter as características básicas da molécula: presença de duas cadeias de nucleotídeos que são complementares e antiparalelas. Outro ponto fundamental: a síntese de DNA só ocorre de 5' para 3'! Portanto, quando você for 'desenhar' um *primer* analise a cadeia de nucleotídeos que será usada como molde, considere apenas a região de interesse que será copiada, vá até a região mais 3' e use essa informação para determinar a sequência de nucleotídeos do *primer* (figura 7.13).

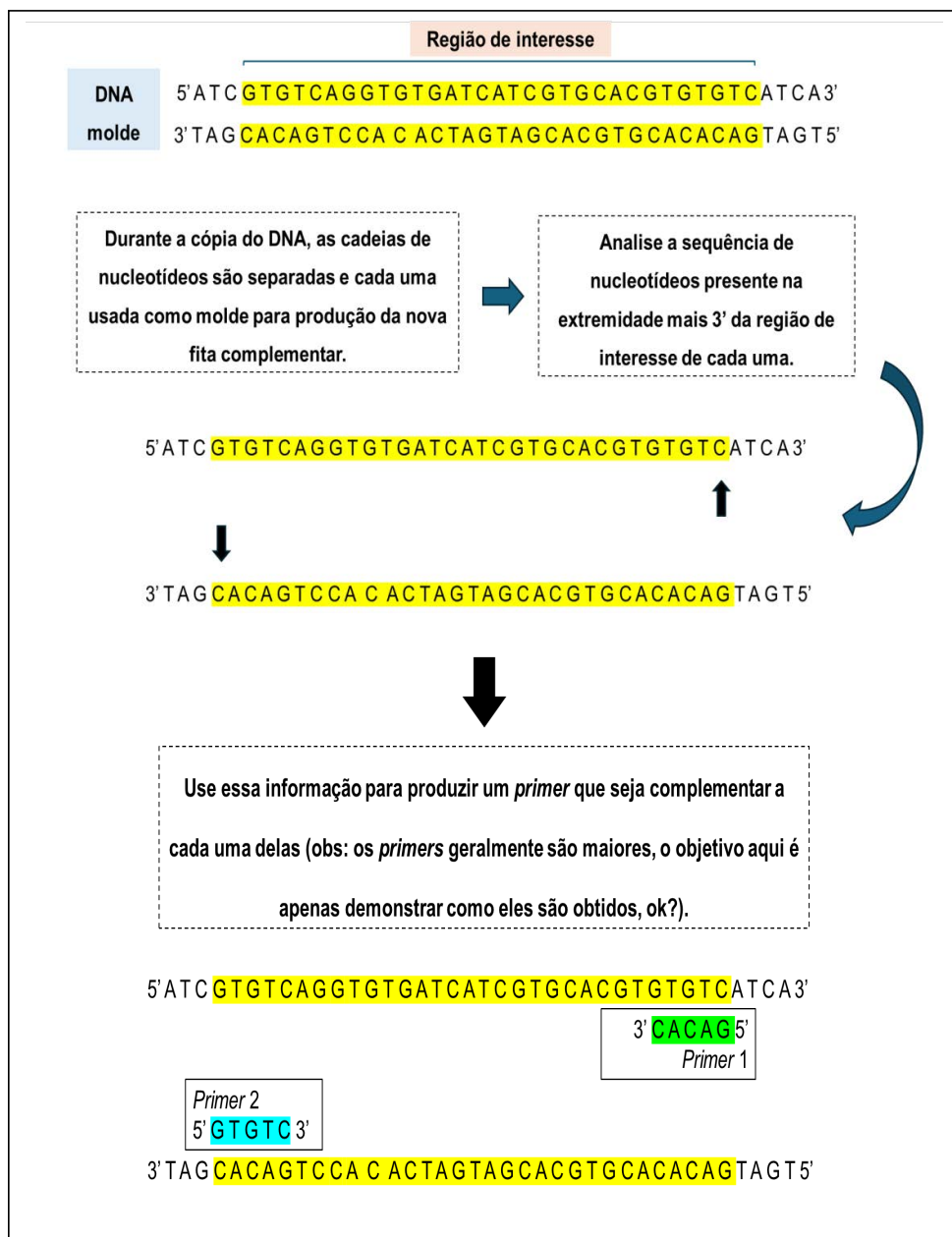


Figura 7.13: Ilustração demonstrando como analisar a sequência presente na região de interesse do DNA molde para determinar como serão os *primers* usados na reação de PCR.

A cópia acontece em um aparelho chamado termociclador, que é capaz de mudar a temperatura de acordo com o que for previamente programado (na verdade, não apenas a temperatura, mas também por quanto tempo ela deve ser mantida) . Uma reação de PCR tem em média 35 ciclos, e cada um deles tem as seguintes etapas: I) desnaturação, onde ocorre a separação das cadeias de nucleotídeos graças a uma elevação na temperatura (94° ou 95°C); II) anelamento (ou hibridação), quando os oligonucleotídeos (*primers*) se ligam às regiões complementares (a temperatura dessa etapa varia de acordo com os oligonucleotídeos utilizados); III) extensão, etapa em que a enzima *Taq* DNA polimerase faz a cópia do DNA a partir do ponto em que os primers se ligaram (ocorre a 72°C, que é a temperatura ótima para atividade dessa enzima) e IV) volte para etapa 'I' 35 vezes (o que fará com que esse ciclo se repita por 35 vezes, gerando milhares de cópias ao final do processo) (figura 7.14).

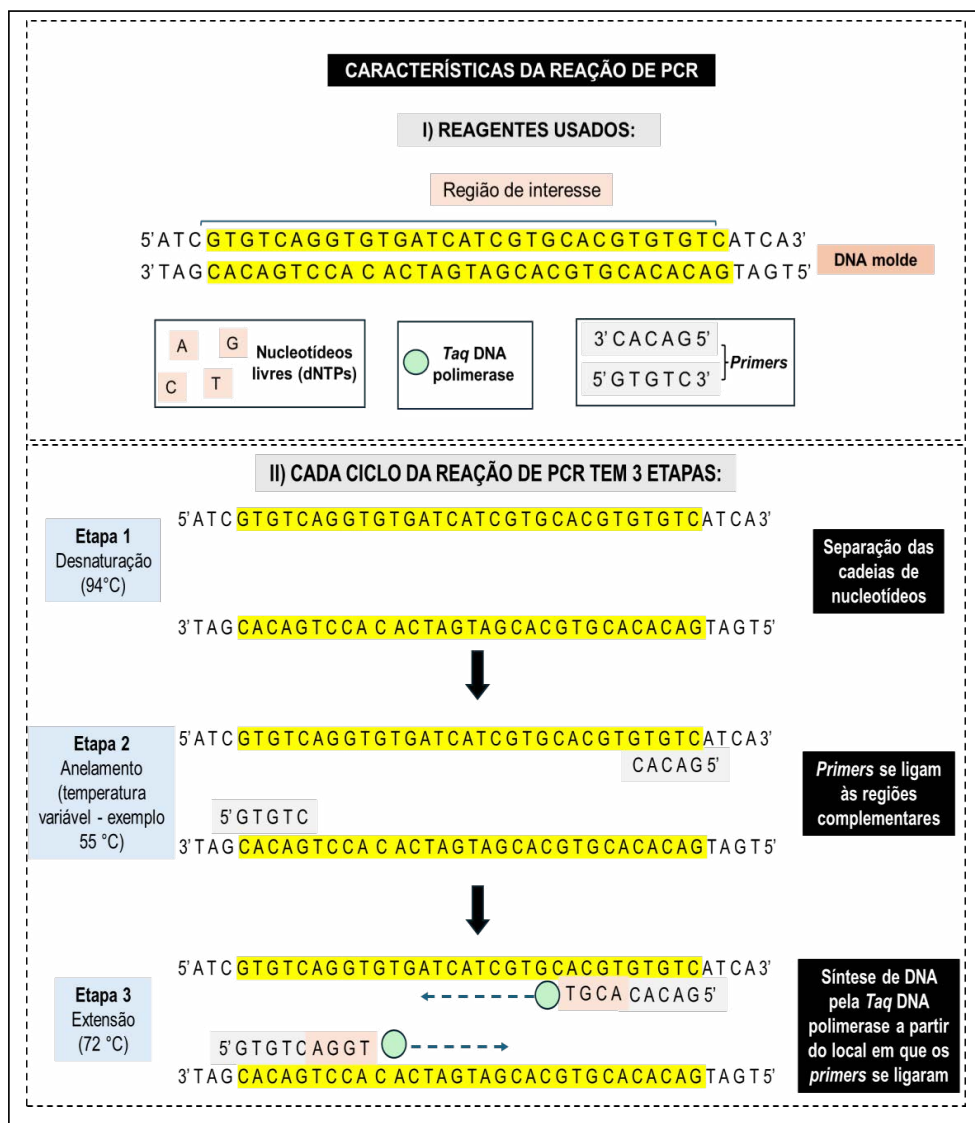


Figura 7.14: Ilustração sobre as principais características de uma reação de PCR: os reagentes usados e as 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

Finalizada a reação, o resultado será analisado em um gel de eletroforese. É importante analisar se a cópia de fato ocorreu e se o fragmento copiado tem o tamanho correto (como o local onde os oli-

gonucleotídeos se ligam é conhecido, é possível saber o tamanho da região do DNA que será copiada) (figura 7.15).

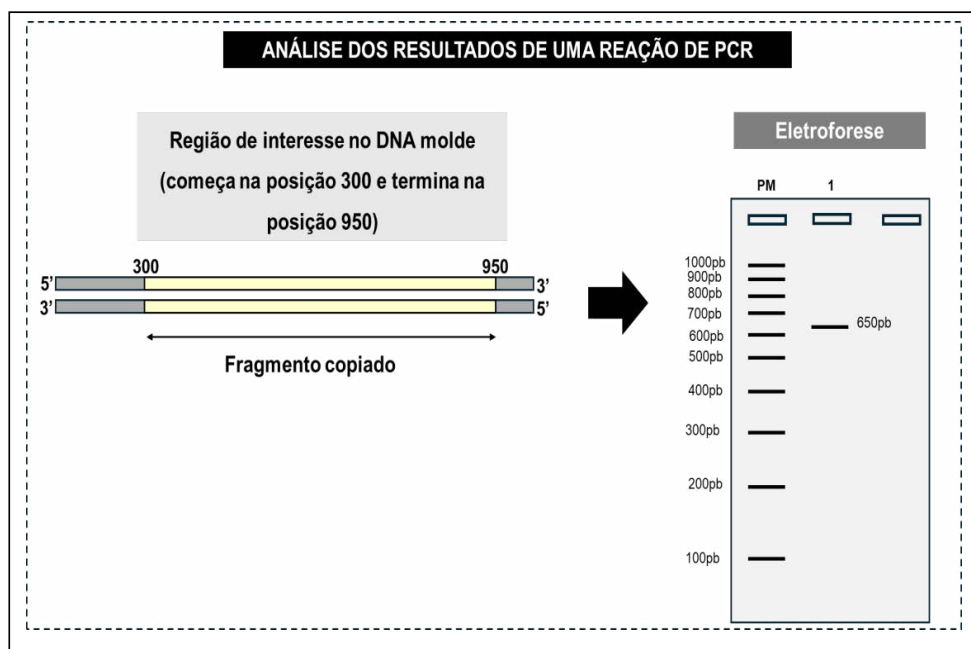


Figura 7.15: Ilustração mostrando como é a análise dos resultados de uma reação de PCR. Como a região onde os primers se ligam é conhecida, é possível saber o tamanho do fragmento que será copiado e seu tamanho pode ser observado em um gel de eletroforese. PM = marcador de peso molecular 100 pb e 1 = amostra em análise.

O PCR ainda hoje é muito utilizado. Um exemplo é a sexagem fetal, um exame para saber o sexo do bebê que pode ser realizado a partir da oitava semana de gestação. Nesse exame, uma amostra de sangue materno é usada para extração de DNA. Como no sangue da mãe também existem algumas células do feto, o DNA obtido será uma mistura entre o materno e o fetal. Em seguida, esse DNA é usado em uma reação de PCR que usa oligonucleotídeos específicos para o cromossomo Y. Quando a amplificação ocorre, o feto é XY, portanto

um menino, ao passo que na ausência de amplificação o feto é XX, uma menina.

Essa técnica também pode ser usada na determinação da ‘impressão digital de DNA’ de um indivíduo, o que é muito útil em testes de paternidade e na análise do DNA de um suposto criminoso, por exemplo. Nesses casos, serão analisados diferentes microssatélites, que são pequenas repetições presentes em várias espécies, inclusive em humanos (maiores detalhes sobre essas regiões estão descritos no capítulo 3). Vamos apenas rever alguns aspectos fundamentais dessas sequências aqui: cada microssatélite é formado por um tipo de repetição (exemplo: CACACA ou GCCGCC) e o número de vezes que essa repetição aparece em cada um é variável. Dessa forma, um microssatélite pode ter diferentes alelos, mas cada ser humano terá apenas duas cópias: uma de origem materna e outra de origem paterna). Como cada alelo apresenta um número de repetições diferente, haverá uma diferença no tamanho deles. Numa reação de PCR, é justamente essa variação de tamanho que será analisada. Para isso, serão usados oligonucleotídeos (*primers*) que se ligam às regiões vizinhas de um microssatélite (figura 7.16).

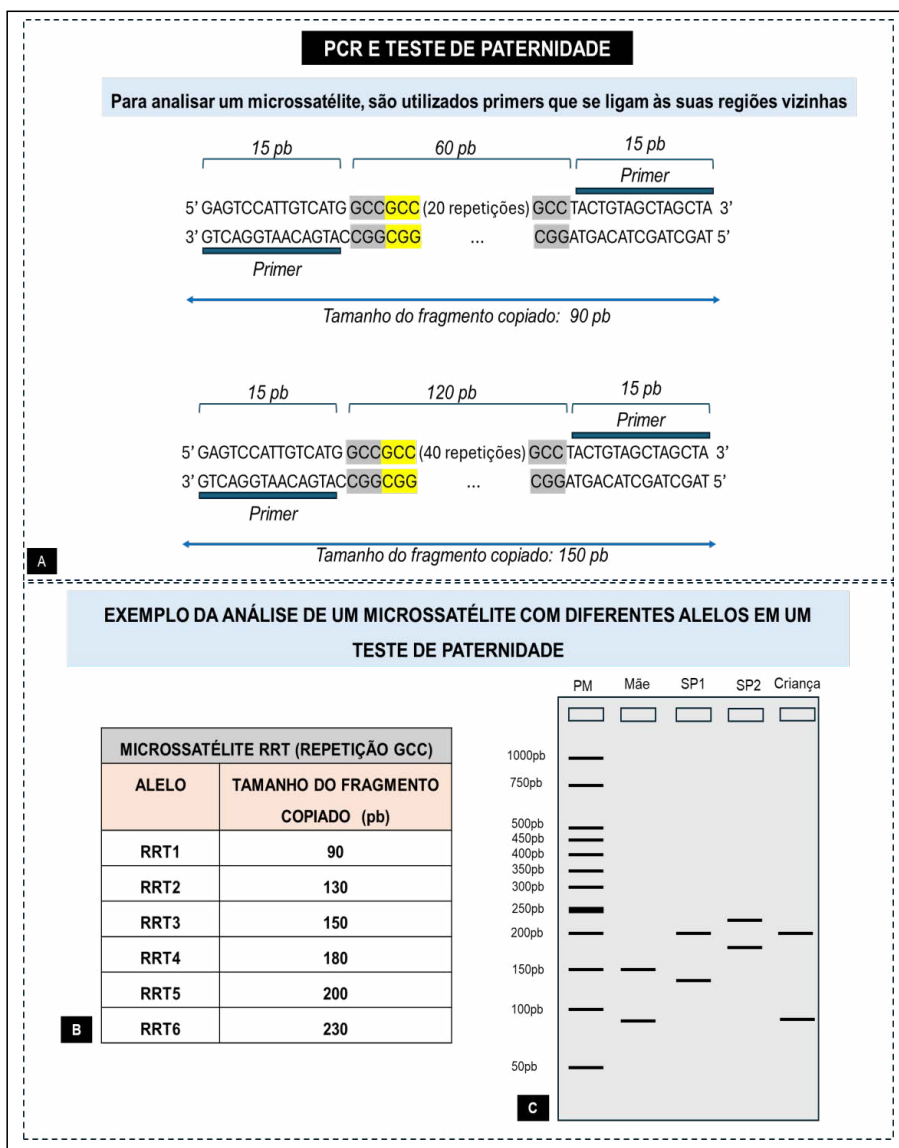


Figura 7.16: Ilustração mostrando o uso do PCR em um teste de paternidade. A) Para analisar o tamanho de cada alelo de um microsatélite, são utilizados primers que se ligam às regiões vizinhas (note que quando o número de repetições é diferente, essa diferença é observada no tamanho do fragmento copiado). B) Exemplo de um microsatélite chamado 'RRT' com seis diferentes alelos e C) Análise do microsatélite RRT em um teste de paternidade (PM = marcador de peso molecular 50pb; SP1 = suposto pai 1 e SP2 = suposto pai 2). Nesse caso SP1 é de fato o pai da criança. Observação: a ilustração acima é apenas um exemplo criado para demonstrar como a análise é realizada, mas em um teste real vários microsatélites são analisados, o que aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos.

Além disso, existem variações dessa técnica, como o PCR tempo real e outras ferramentas moleculares, como o sequenciamento do DNA e os ‘microarrays’, por exemplo, em que existe uma etapa de síntese de DNA. Vamos analisar cada uma delas a partir de agora.

7.6 - PCR TEMPO REAL

É uma das variações do PCR, que nesse caso tem a vantagem adicional de quantificar simultaneamente a amostra enquanto ela é copiada. Nesse caso, além dos reagentes de um PCR convencional, será adicionado um fluorocromo (corante que emite um sinal de fluorescência quando excitado por um *laser*). Conforme a quantidade de fragmentos de DNA aumenta durante a reação, a intensidade da fluorescência emitida também aumentará, permitindo a visualização do resultado em tempo real. A reação de PCR em si será específica, uma vez que as regiões onde os oligonucleotídeos se ligarão são conhecidas. No entanto, a detecção feita pelo fluorocromo pode ser específica ou não específica.

Na detecção não específica, será utilizado um fluorocromo que se liga a dupla fita de DNA (um agente intercalante), como o *SYBR® green*, por exemplo. Note que ele não apresentará especificidade por nenhuma sequência específica de nucleotídeos, mas se ligará qualquer dupla fita de DNA presente na reação. Nesse caso, o cuidado deve ser no sentido de se certificar que o fragmento copiado (e quan-

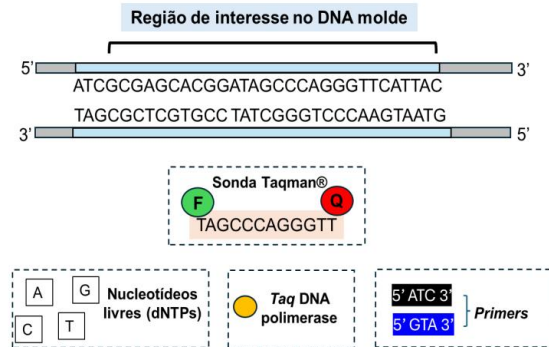
tificado) corresponde realmente a região de interesse. Isso pode ser feito através de uma eletroforese para analisar os tamanhos dos produtos de amplificação presentes em cada amostra ao final da reação.

Na detecção específica, além dos reagentes de uma reação de PCR convencional, será usada uma sonda TaqMan®, uma pequena sequência de nucleotídeos já conhecida, complementar a uma região interna ao fragmento que será copiado durante a reação. Além disso, ela apresenta na sua extremidade 5' um fluorocromo e na 3' um quencher (silenciador). Enquanto o fluorocromo e o quencher estiverem próximos, não haverá emissão de sinal fluorescente. Vamos entender melhor como essa sonda funciona.

Durante um ciclo da reação de PCR tempo real, inicialmente ocorre a separação das cadeias de nucleotídeos. A etapa seguinte será a de anelamento, quando tanto os oligonucleotídeos quanto a sonda TaqMan® se ligam às regiões complementares. Na fase de extensão, a enzima Taq DNA polimerase fará a cópia do DNA a partir do local em que o oligonucleotídeo se ligou. No entanto, em um dado momento ela se deparará com a sonda à sua frente e começa a removê-la, um nucleotídeo de cada vez. Quando isso acontece, o fluorocromo que está ligado na extremidade 5' se distancia do quencher e emite sua fluorescência. Caso a sonda não encontre a região complementar na amostra, ela não se ligará ao DNA molde e não emitirá seu sinal fluorescente (figura 7.17).

CARACTERÍSTICAS DA REAÇÃO DE PCR TEMPO REAL (USO DE SONDAS TAQMAN®)

I) REAGENTES USADOS:



II) ETAPAS DA REAÇÃO:

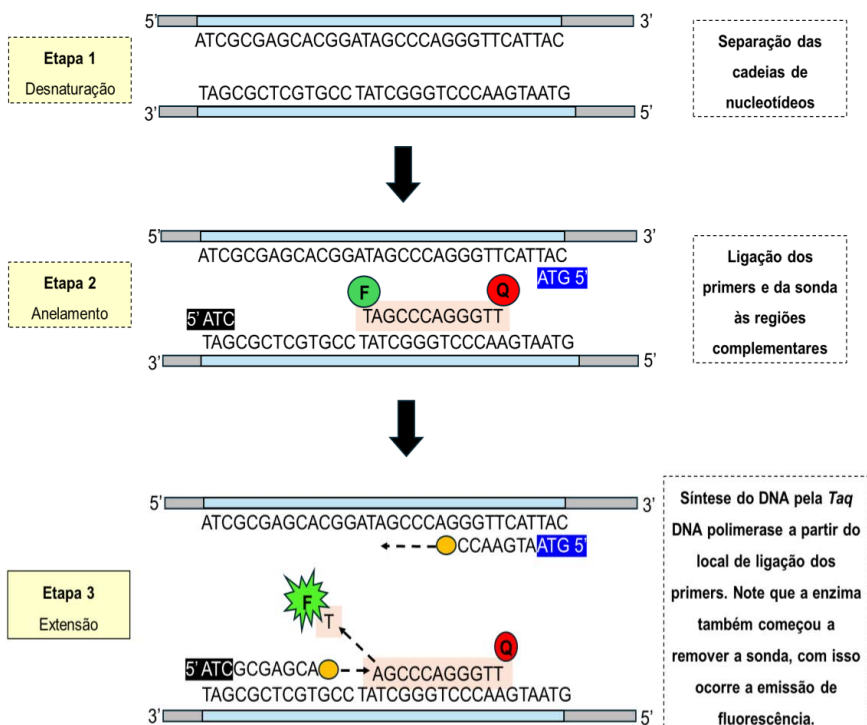


Figura 7.17: Ilustração demonstrando as principais características de um PCR tempo real (reagentes usados e as etapas de cada ciclo, evidenciando a emissão do sinal fluorescente).

7.7 - SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento é uma ferramenta incrível que nos permite ‘ler’ o DNA, conhecendo assim toda a sua sequência de nucleotídeos. O primeiro método desenvolvido foi o ‘sequenciamento manual’, o que representou um avanço incrível, mas apresentava algumas limitações. Em seguida, surgiu o ‘sequenciamento automático’ que permitiu a análise de uma grande quantidade de amostras simultaneamente, o que levou ao desenvolvimento de vários projetos genoma, que sequenciaram todo o DNA da espécie de interesse, como o humano, por exemplo. Por fim, os sequenciadores de nova geração apresentam diferentes estratégias para determinação da sequência do DNA, o que varia de acordo com a empresa que desenvolveu o equipamento. De uma maneira geral, a velocidade com que as informações são geradas é muito maior, e o custo menor. Vamos conhecer algumas dessas metodologias incríveis a partir de agora!

SEQUENCIAMENTO MANUAL (MÉTODO SANGER)

Desenvolvido pelo bioquímico britânico chamado Fred Sanger e seus colaboradores, esse método de sequenciamento se baseia no uso de terminadores, nucleotídeos quimicamente modificados que, quando inseridos na nova fita de DNA, interrompem a síntese de DNA (figura 7.17).

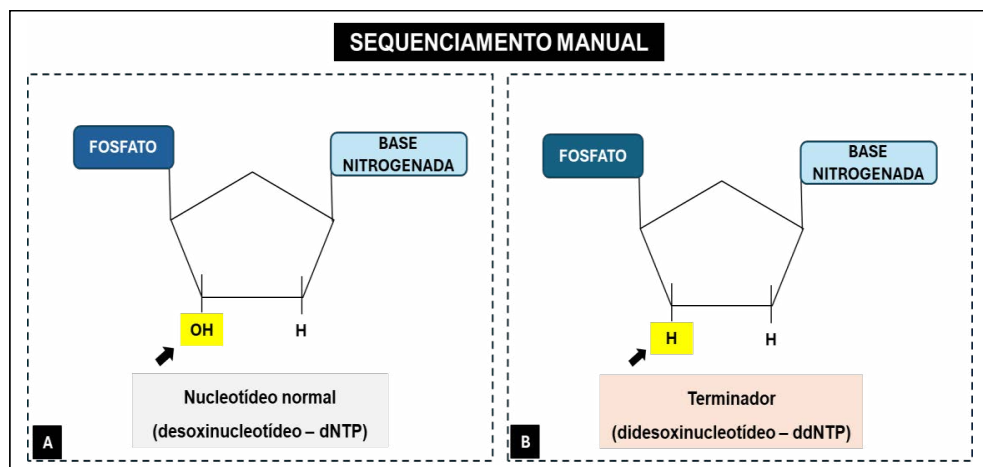


Figura 7.17: Ilustração mostrando a diferença entre um nucleotídeo normal (A) e um terminador (B) usados no sequenciamento que usa o método Sanger (princípio da terminação da cadeia).

Em alguns aspectos, o sequenciamento manual é muito parecido com a técnica de PCR, portanto é fundamental que você já tenha em mente como ocorre a cópia do DNA em laboratório (leia o tópico ‘PCR’ nesse capítulo). Nesse caso, cada reação deverá conter: DNA molde, DNA polimerase, *primer* (apenas um), nucleotídeos livres (que nesse caso estarão marcados com P^{32} , por exemplo, o que será importante na análise dos resultados) e um terminador.

Para sequenciar uma amostra de DNA, são necessárias 4 reações: tubos A, G, C e T. Cada um deles contém todos os reagentes acima mencionados e apenas um tipo de terminador. No ‘tubo A’ será adicionado como terminador a adenina, no ‘tubo C’ a citosina e assim por diante. Note que no ‘tubo A’ por exemplo, teremos o nucleotídeo adenina normal e o ‘terminador’ adenina. Portanto, sempre que uma

adenina for inserida na nova fita de DNA, teremos 50% de chance de colocar o nucleotídeo normal (e a síntese continua) e 50% de colocar o terminador (interrompendo a síntese). Considerando que na reação teremos vários ciclos e que a quantidade de amostra de DNA duplica em cada um deles, ao final teremos um 'terminador adenina' inserido em todos os locais em que é necessário colocar esse nucleotídeo. Isso vale para citosina, timina e guanina. Assim, em cada tubo teremos vários fragmentos com tamanhos diferentes e sabemos que o último nucleotídeo inserido corresponde ao terminador usado na reação. Por exemplo, no 'tubo T' todos os fragmentos terminam com timina. Por fim, cada reação será aplicada em um gel de eletroforese, separando os fragmentos de acordo com o seu tamanho (nesse caso, será usado um gel de acrilamida, que consegue separar fragmentos que diferem entre si em apenas um nucleotídeo) (figuras 7.18).

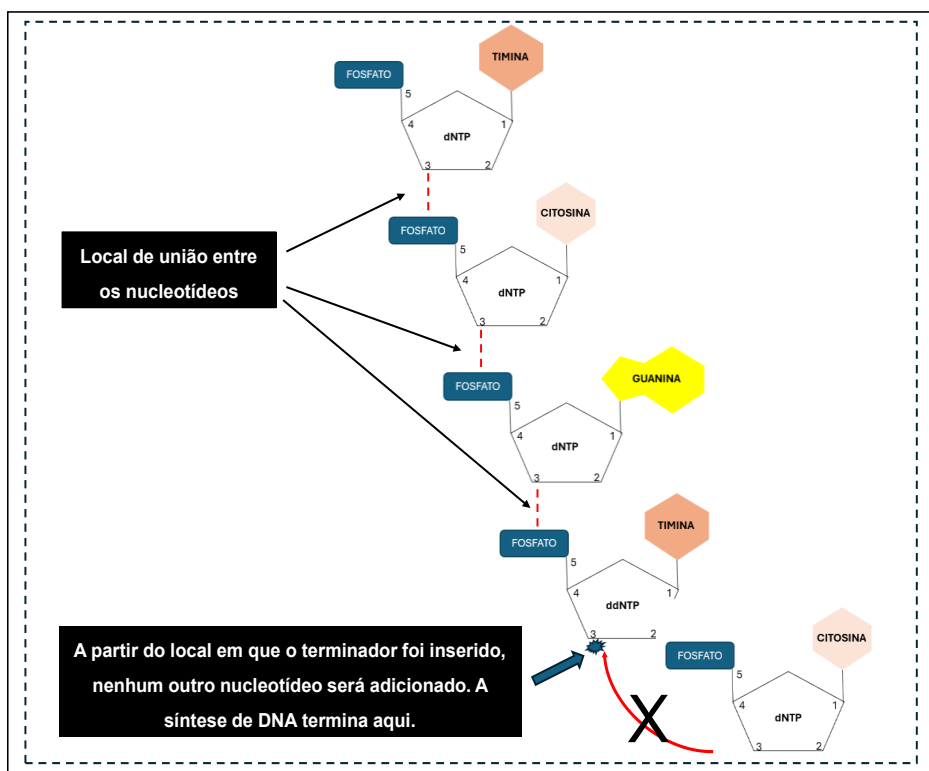


Figura 7.18: Ilustração demonstrando que a síntese de DNA é interrompida quando um terminador é inserido na cadeia de nucleotídeos. dNTP: desoxiribonucleotídeos e ddNTP: dideoxiribonucleotídeo (terminador).

Para 'leitura' dos resultados obtidos a partir do sequenciamento manual, considere que o menor fragmento é aquele que possui apenas um nucleotídeo, portanto o que 'chegou primeiro' na corrida de eletroforese. Ele representa o primeiro nucleotídeo da sequência. O segundo menor fragmento representa o segundo nucleotídeo da sequência e assim sucessivamente. Portanto, a análise dos dados começa no menor fragmento e vai avançando até chegar no maior, com uma capacidade de gerar uma sequência de até 300 pb (figura 7.19).

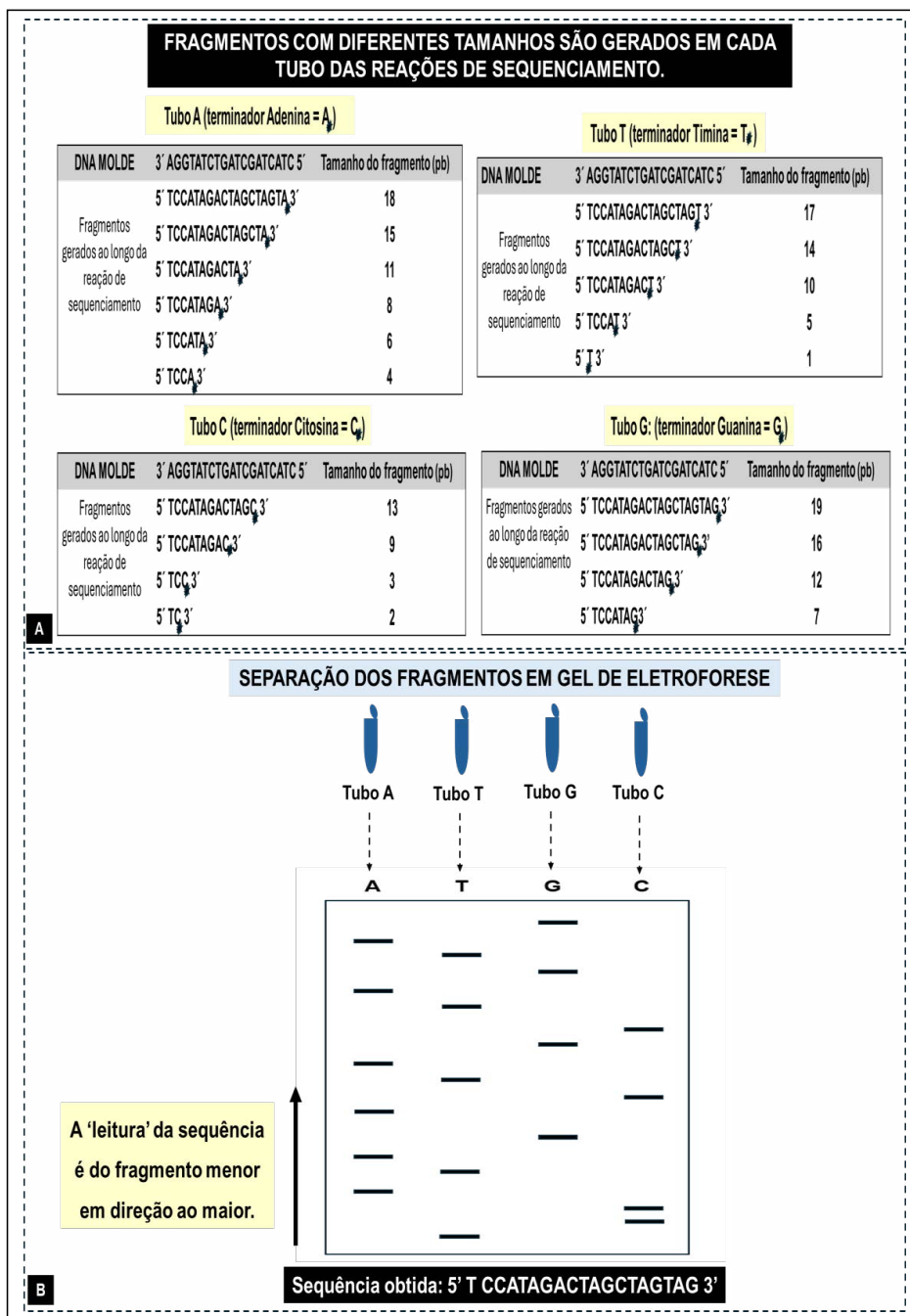


Figura 7.19: A) Demonstração dos diferentes fragmentos gerados em cada tubo durante o sequenciamento manual (note que em cada tubo, o último nucleotídeo sempre corresponde ao terminador usado). B) Gel de sequenciamento manual e a sequência obtida (a leitura deve ser feita do 'menor fragmento para o maior').

SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO (MÉTODO SANGER)

Essa estratégia de sequenciamento também se baseia no método de Sanger. A diferença é que, nesse caso, cada terminador está associado a um fluorocromo (um corante fluorescente) que emite cor diferente: adenina (verde), citosina (azul), guanina (preto) e timina (vermelho). Ao contrário do sequenciamento manual onde 4 reações diferentes eram realizadas, nesse caso a reação é feita em um único tubo. A análise dos resultados também se baseia na separação dos fragmentos através de uma eletroforese. No entanto, no aparelho de sequenciamento automático há um laser que excita os fluorocromos presentes em cada banda, e um computador detecta a luz resultante emitida. De acordo com o tipo de terminador detectado naquele ciclo, a cor da fluorescência emitida será diferente. Esse resultado é captado simultaneamente pelo computador, que analisa os dados e já disponibiliza a sequência final da amostra. Nesse caso, os custos envolvidos são muito maiores pois utiliza-se um sequenciador automático e outros reagentes que são mais caros. Por outro lado, a capacidade de leitura é maior (até 700 nucleotídeos em uma única reação) e como o resultado final (a sequência de nucleotídeos), já é disponibilizado pelo próprio sequenciador, não há riscos de erros humanos na determinação da sequência (figura 7.20).

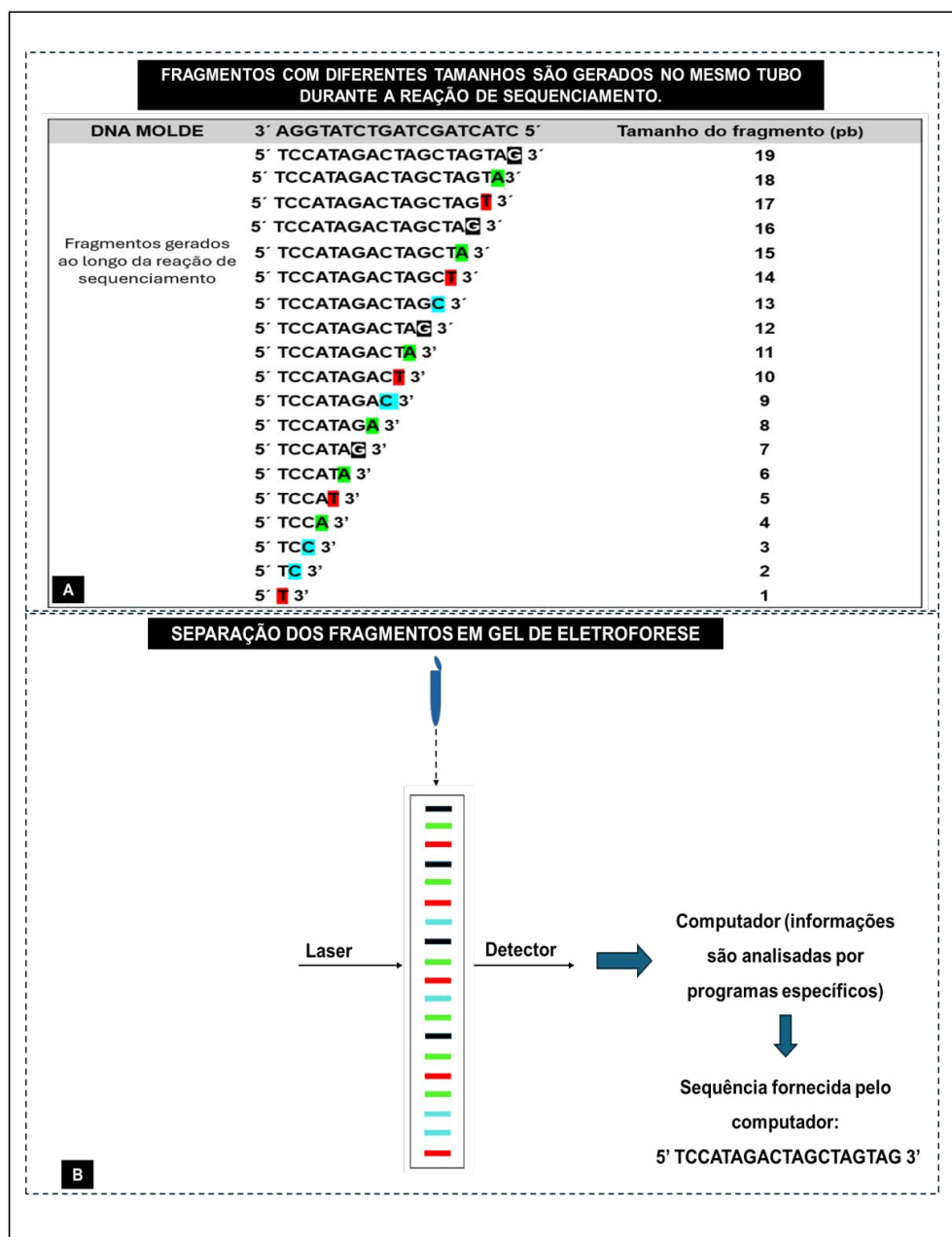


Figura 7.20: Ilustração das diferentes etapas do sequenciamento automático. A) Fragmentos com diferentes tamanhos e associados a diferentes terminadores são gerados na mesma reação. B) Separação dos fragmentos em eletroforese, detecção da fluorescência e interpretação dos dados obtidos por programas específicos de computador.

SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

Esses sequenciadores representaram um grande avanço na Biologia Molecular, uma vez que são capazes de sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA simultaneamente. Para se ter uma ideia, o projeto genoma humano foi desenvolvido em sequenciadores automáticos que usavam o método Sanger (uso de terminadores) e levou aproximadamente 13 anos para ser concluído. Com o uso dos NGS, o genoma humano pode ser sequenciado duas ou 3 semanas e a um custo muito, muito menor! Isso facilitou o acesso a esse tipo de análise, e atualmente essa ferramenta molecular é usada no diagnóstico de doenças genéticas, tais como câncer, distrofias musculares e transtorno do espectro autista (TEA), por exemplo.

Embora a protocolo exato de como o sequenciamento ocorre varia de acordo com a empresa que desenvolveu o sequenciador, de uma forma geral o que se observa nos NGS é que ao invés de usar o método de terminação da cadeia realiza-se a síntese de DNA, sendo que em cada ciclo apenas um tipo de nucleotídeo é adicionado à reação. Se ele for incorporado, um sinal fluorescente será emitido (por outro lado, se naquele ciclo ele não for usado, não há liberação de fluorescência). Por exemplo, se no ciclo atual uma guanina for adicionada à reação e um sinal fluorescente for liberado, isso significa que naquela posição da nova cadeia de nucleotídeos do DNA o que existe é uma guanina. Toda informação é captada e interpretada por um computador, o que facilita e agiliza muito toda análise de dados. A capacidade de leitura nesse caso é de 200 a 250pb.

7.8 - MICROARRANJOS OU *CHIPS* DE DNA (MICROARRAYS)

A partir do conhecimento do genoma de várias espécies, incluindo o humano, houve um grande avanço metodológico no qual novas metodologias para análise do DNA foram desenvolvidas. Dentre elas, podemos citar os microarranjos, que podem ser usados tanto na análise da expressão gênica quanto na 'genotipagem' de uma amostra de interesse. Vamos entender melhor como isso funciona.

Em um *chip* de DNA, várias sequências curtas e já conhecidas são ligadas em pontos específicos (também chamados *spots*) de uma superfície sólida, geralmente uma lâmina de vidro. Em cada ponto existirão várias cópias da mesma sequência, e um aspecto fundamental é que as amostras estão na forma de fita simples (figura 7.21).

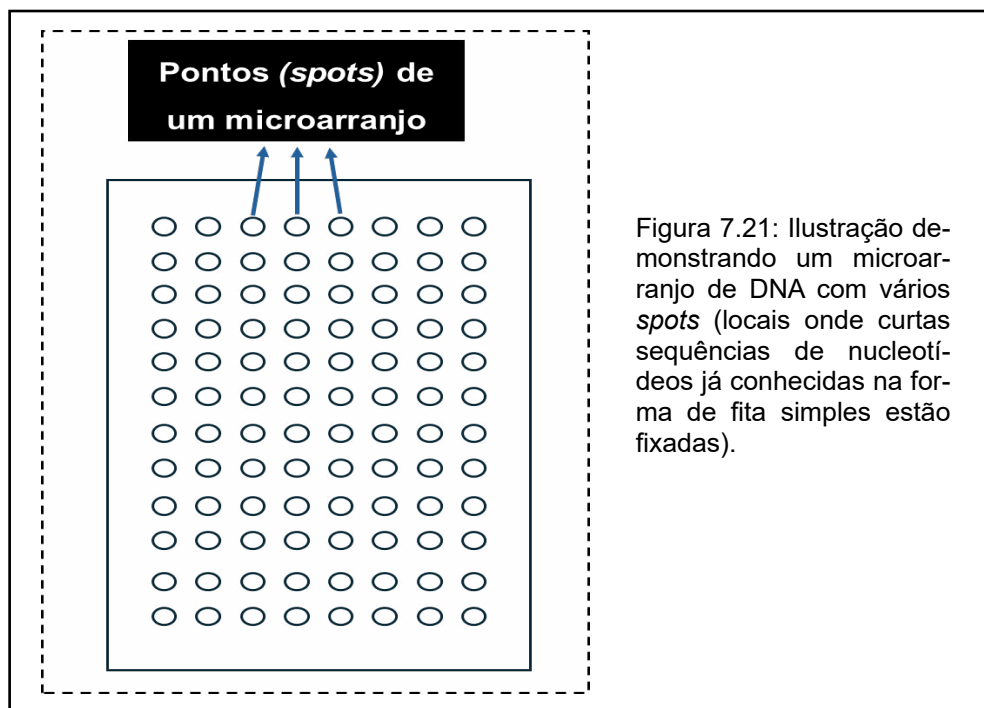


Figura 7.21: Ilustração demonstrando um microarranjo de DNA com vários *spots* (loais onde curtas sequências de nucleotídeos já conhecidas na forma de fita simples estão fixadas).

Na análise da expressão gênica, as sequências presentes em cada *spot* correspondem a diferentes genes da espécie de interesse. Nesse caso, é possível comparar o padrão de expressão gênica em duas amostras: uma composta por células tumorais e outra por células normais. Além disso, será preciso obter o RNAm total de cada uma delas, que será transformado em cDNA e por fim será associado a fluorocromos diferentes (por exemplo, o das células tumorais será vermelho e o das células normais será verde). Na etapa seguinte, ocorre a hibridação das moléculas de cDNA com as sondas presente no microarranjo (lembre-se que, sempre que as cadeias simples forem complementares, haverá formação de um híbrido molecular). Por fim, a lâmina é exposta a um laser e quando houver um híbrido, um sinal fluorescente será emitido (verde ou vermelho). Isso mostra quais genes são expressos em células normais ou unicamente em células tumorais, além de mostrar aqueles que se expressam nas duas amostras (cor amarela) (figura 7.22).

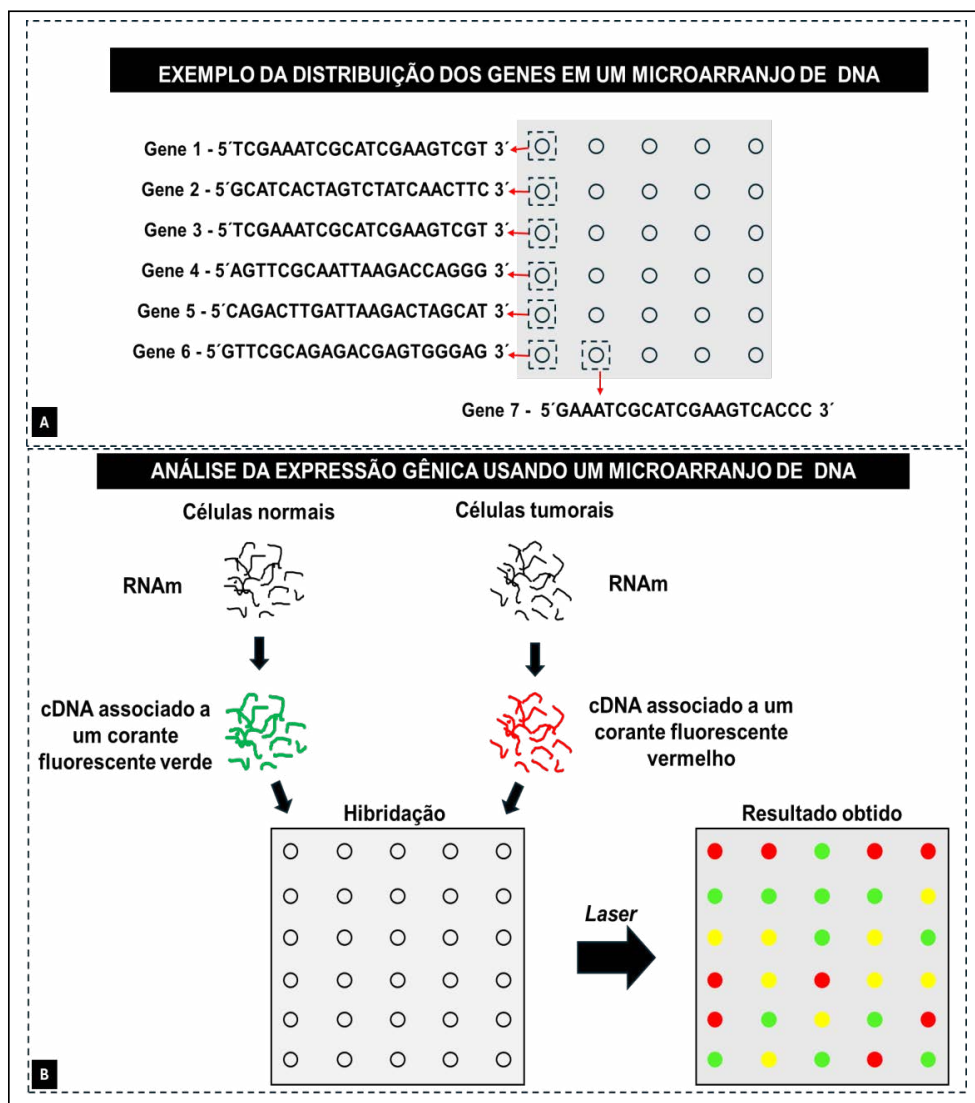


Figura 7.22: A) Organização de um *chip* de DNA contendo seqüências de diferentes genes (todos em duplicada, que podem estar próximos, como no exemplo acima, ou espalhados pelo microarranjo). B) Ilustração simplificada das etapas da análise de expressão gênica usando um microarranjo. Na análise dos resultados, os *spots* vermelhos são aqueles cujos genes expressos somente nas células tumorais, aqueles em verde somente nas células normais, e os amarelos são expressos em ambas.

Por outro lado, diferentes protocolos têm sido estabelecidos para uso dos microarranjos na genotipagem de uma amostra. Em um exemplo cada a sequência presente em cada *spot* corresponde a um alelo de um gene, e o DNA da amostra é então marcado com fluorescentes. Após a hibridização, a cor vermelha corresponde aos homozigotos para um alelo (exemplo AA), a verde os homozigotos para outro alelo (exemplo aa) e a amarela aos heterozigotos (exemplo Aa).

Além disso, um microarranjo pode conter sequências correspondentes a diferentes subtipos de vírus, por exemplo. Para análise da amostra de interesse, após a extração do DNA, ele será multiplicado por PCR, associado a um determinado fluorocromo e colocado para hibridar com as sondas presentes no microarranjo. Na análise dos resultados obtidos, a presença de um sinal fluorescente em um ou alguns *spots* indica que o material em análise possui aquele determinado subtipo de vírus. Essa metodologia já é usada no diagnóstico do vírus HPV (sigla em inglês para Papilomavírus Humano), o qual é associado ao câncer do colo de útero, e tem se mostrado muito útil pois além de permitir a detecção precoce, é possível identificar o(s) subtipo(s) presente(s) em uma única reação. O exemplo de um protocolo usado é apresentado na figura 7.23.

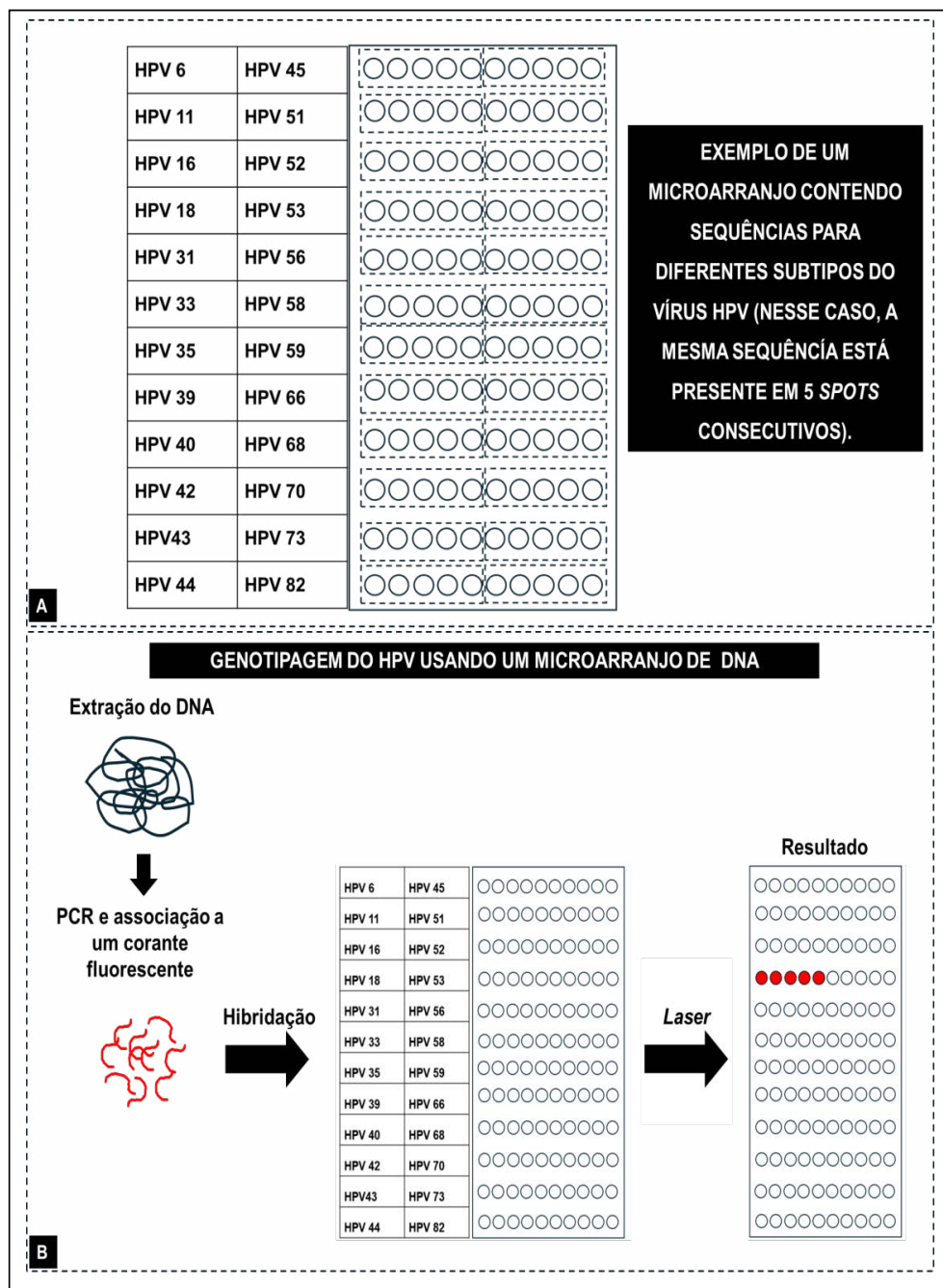


Figura 7.23: A) Microarranjo contendo sequências para diferentes subtipos do vírus HPV. B) Ilustração simplificada das etapas do uso dos microarranjos na genotipagem do HPV, evidenciando a presença do subtipo 18 na amostra.

REFERÊNCIAS

Griffiths, Anthony J., F. et al. Introdução à Genética. Disponível em: Minha Biblioteca, (12th edição). Grupo GEN, 2022.

Menck, Carlos F., M. e Marie-Anne Van Sluys. Genética molecular básica: dos genes ao genoma. Disponível em: Minha Biblioteca, Grupo GEN, 2017.

McInnes, Roderick R. Thompson & Thompson Genética Médica. Disponível em: Minha Biblioteca, (8th edição). Grupo GEN, 2016.

Pimentel, Márcia Mattos, G. et al. Genética Essencial. Disponível em: Minha Biblioteca, Grupo GEN, 2013.

Watson, James, D. et al. Biologia Molecular do Gene. Disponível em: Minha Biblioteca, (7th edição). Grupo A, 2015.



SUPERANDO O DIAGNÓSTICO GENÉTICO:

Relatos de casos reais

Atualmente, existem diferentes técnicas que permitem um diagnóstico preciso para muitas doenças genéticas. Infelizmente, a ciência ainda não avançou o suficiente para que a alteração responsável pela condição em análise seja 'corrigida', o que permitiria a sua cura. Como lidar com um diagnóstico genético? Esse capítulo apresenta 3 casos reais de superação.

Ao longo desse livro abordamos aspectos relativos à estrutura e função do DNA, bem como suas possíveis alterações, as mutações gênicas e cromossômicas e alguns exemplos de suas consequências. Esse capítulo apresenta relatos reais de pacientes que tiveram o diagnóstico de uma doença, síndrome ou transtorno Genético e como, junto com seus familiares, lidaram com essa situação. O que fazer diante de um laudo tão definitivo? Como lidar com uma ‘sentença genética’? Serão 3 relatos, elaborados a partir de um questionário direcionado para as mães, as quais tiveram total liberdade de colocar aqui tudo que vivenciaram com seus filhos. Vamos conhecer cada um deles a partir de agora.

8.1 - RELATO I - AMIOTROFIA ESPINHAL PROGRESSIVA (APE) (CAUSADA POR UMA MUTAÇÃO – DELEÇÃO – NO GENE SMN)

A INCRÍVEL HISTÓRIA DO ENZO!

1. Como foi a descoberta da doença? O que a levou a suspeitar que havia algo diferente com seu filho?

De início não suspeitávamos de nada errado em relação a saúde do Enzo e muito menos o pediatra que na época o acompanhava. Minha irmã mais velha é que suspeitou e me indicou o pediatra que acompanhava os seus filhos. O médico logo que o consultou pediu um exame e um parecer de um Neurologista. Assim, nos orientou a procurar uma Neurologista pediatra em São Paulo.

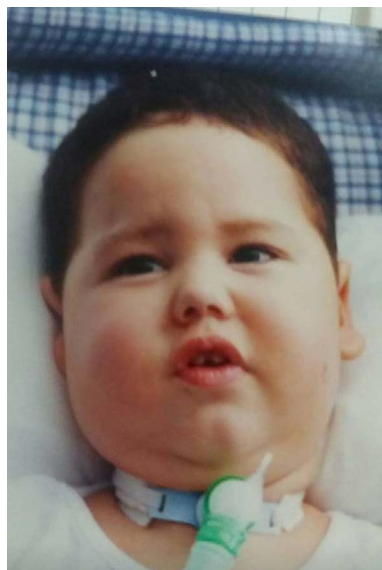


2. Como e com que idade o diagnóstico foi realizado?



O diagnóstico foi confirmado por um médico (neurologista pediatra), após resultado do exame de Eletroneurologia (02/06/1999). Para que fosse confirmado com exatidão, ele requereu o exame de DNA (13/07/1999),

que confirmou a deleção nos exons 7 e 8 do gene SMN e o diagnóstico de AEP (AME). Enzo nasceu em 23/12/1998, portanto com aproximadamente 5 (cinco) meses e meio tivemos o primeiro diagnóstico.



3. Qual o prognóstico médico?

Na época o prognóstico era de no máximo 7(sete) meses de vida. Hoje a média é de 2(dois) anos de vida. Contudo, existe a necessidade, já logo nos primeiros meses de vida, de equipamentos de suporte a vida como respiradores mecânicos.

4. Como a família lidou com isso?

No momento que tivemos o diagnóstico foi muito dolorido, mas meu marido falou: “Se ficarmos pensando que ele não vai andar, falar e morrer ainda no primeiro ano, isso vai acontecer. Vamos viver cada dia e cuidar com todo amor”. Assim, sempre oferecemos tudo de melhor e principalmente amor e segurança. Também não havia referências de casos reais que pudéssemos nos basear. Isso trouxe a necessidade de buscar orientações na literatura médica fora do Brasil e, muitas vezes, aprendemos o que seriam as melhores condutas por “tentativa e erro”.



5. Como foi (ainda é) o tratamento / acompanhamento?

A doença é progressiva, mas temos mantido, com a graça de Deus e os cuidados necessários, uma excelente qualidade de vida. Com 1 (um) ano e dois meses ele entrou em falência respiratória, após uma pneumonia. Ficou 1(um) mês na UTI de São José do Rio Preto, onde fez traqueostomia e passou a fazer uso de respirador. Após, retornamos para a Santa Casa de nossa cidade onde permaneceu internado por 1 (um) ano e 1 (um) mês. Nesse tempo teve que fazer outra intervenção cirúrgica para fazer uma gastrostomia. Passado esse tempo voltamos a viver em casa com auxílio de Home Care. Em 2016 teve um derrame pleural e ficou 3(três) meses internado. Também faz uso de fisioterapia diariamente, acompanhamento com fonoaudiologia, avaliação nutricional e cuidados 24 horas de enfermagem, além do acompanhamento médico. Contudo, tem um excelente desenvolvimento intelectual, social e afetivo. Com o uso de uma tabela, que criei, ele se comunica com sinais usando os movimentos da face.

6. Qual a idade do seu filho(a) atualmente? Houve alguma melhora / superação

Atualmente ele está com 26 anos. Enzo não possui os movimentos dos membros inferiores e superiores, não possui capacidade de sustentação do tronco e pescoço, porém, felizmente, os movimentos de face não foram paralisados, visto que a doença é progressiva.



7. O que você diria para outras famílias que vivenciam a mesma situação?

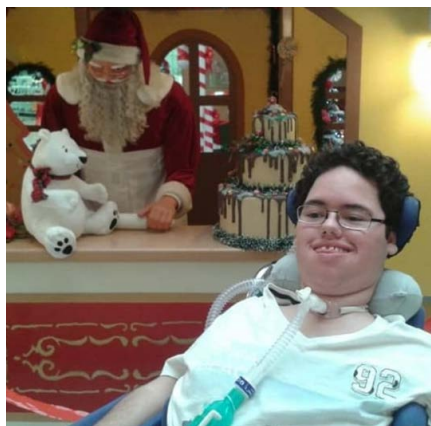
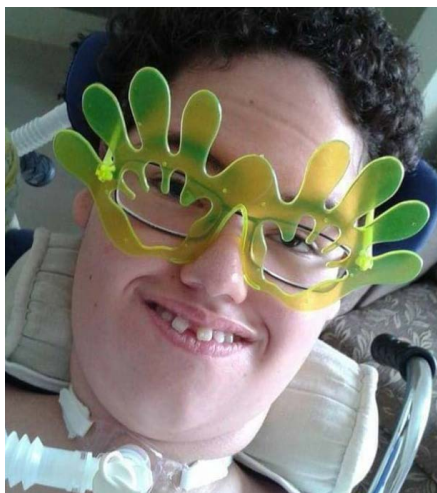
Diria que não é fácil dedicar todas suas forças para ser cuidador, abrindo mão de todos seus projetos e sonhos. Negar isso é hipocrisia! Porém, o retorno é maravilhoso. Ver que seu filho, que ia viver apenas 7(sete) meses, hoje tem 26 anos. Hoje, ele é o portador de AME tipo 1



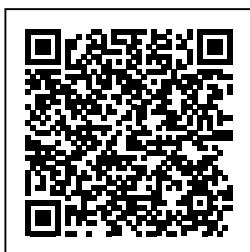
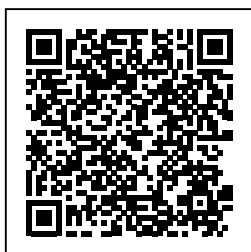
mais velho no Brasil e o segundo no mundo. Ver que seu filho venceu todas as barreiras e transformou tudo que ensinamos e dedicamos. Ver que seu filho é um ser humano feliz, senhor de si, extremamente inteligente e gentil, nos faz confiantes que cumprimos nossa função de pais e educadores. Meu marido e eu temos o coração e alma cheia de gratidão a ele, por receber todos os dias sorrisos, vários “eu te amo” e palavras amorosas e gentis. Acho que quando se aceita verdadeiramente um filho como ele é, e se entrega com amor e dedicação, tudo se transforma e se faz leve e prazeroso.

As fotos abaixo mostram diferentes momentos da vida do Enzo, que é um rapaz que teve o direito de viver cada fase da sua vida com plenitude.





Acesse o QR Code e mergulhe nessa história inspiradora de superação e conquista da autonomia.



Nos vídeos acima, é possível ver Enzo se comunicando com os pais pelo método que eles mesmos desenvolveram quando ele ainda era criança. Esse método foi fundamental para alfabetizar Enzo e garantir sua autonomia na comunicação. Hoje, já crescido, ele utiliza essa habilidade para expressar seus pensamentos e sentimentos com segurança e independência.

8.2 - RELATO II – SÍNDROME DE DOWN (SÍNDROME CAUSADA POR UMA TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 21)

AS CONQUISTAS DO CAUÊ!

1. O que a levou a suspeitar da presença de uma alteração Genética?

Foi diagnosticado no momento do parto, pelo pediatra, através do fenótipo do recém-nascido. O mesmo não apresentou nenhuma complicação de saúde. Sua estatura (51 cm) e peso (4 kg) estavam acima dos padrões para a síndrome de Down, não apresentou cardiopatia, o que fez com que não fosse identificado durante a gravidez.



2. Como e com que idade o diagnóstico foi realizado?

Recém-nascido.

3. Qual o prognóstico médico?

Cauê nasceu em 1999. Naquela época o estereótipo de um indivíduo com Síndrome de Down (SD) ainda era muito equivocado e baseado em teorias e não em evidências. Os indivíduos ainda não

tinham oportunidade de inclusão social. Poucos se viam participando da sociedade.

O prognóstico do pediatra de plantão (não era o pediatra dele), poderia ter sido desesperador, porém foi revoltante. Como eu e meu marido já tínhamos conhecimentos sobre a SD, a primeira preocupação foi



com a cardiopatia. Porém, o pediatra, teve uma postura muito impetuosa e fria, no momento da notícia.

Eu fui a primeira a receber a notícia, quando me trouxe o Cauê, ainda na sala de parto e me perguntou o que eu achava do meu filho. Se eu não estava notando nada de diferente nele. Então, em uma breve observação, respondi que não via nada de diferente, mas que ele tinha traços dos meus sobrinhos quando recém-nascidos.

O mesmo riu, e disse: “Seu filho tem síndrome de Down. Ele pode ter complicações de saúde, durar meses, ou anos, vai andar por volta dos 4 anos, vai demorar para falar, isso vai depender de uma avaliação mais completa”. Neste momento, eu passei muito mal e me colocaram para dormir.

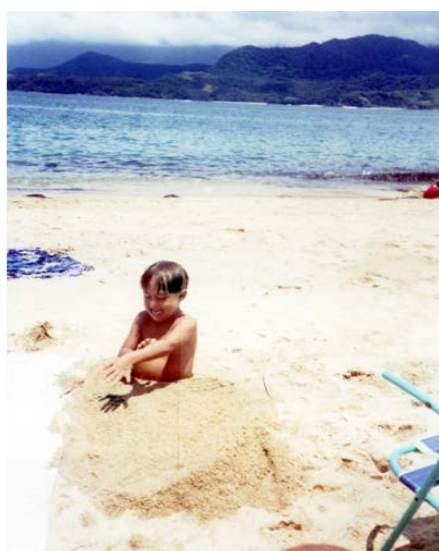
Quando o mesmo deu a notícia para meu marido, foi a mesma coisa e acrescentou que: “Se vocês treinarem bem ele, talvez ele consiga ser um guardador de livros em alguma biblioteca” (choro até hoje

em lembrar). No meu ponto de vista, totalmente sem compaixão ou até mesmo, ética. Pois apesar de ser um FATO, deveria ter conversado conosco após o parto e em tom de acolhimento e esclarecimento sobre as perspectivas teóricas dele.



4. Como a família lidou com isso?

A notícia nos causou preocupação com a saúde e qualidade de vida dele. Em nenhum momento, nos desesperamos. Imediatamente após a notícia, ainda estávamos internados, meu marido procurou o centro de reabilitação em Piracicaba e com 15 dias de vida Cauê iniciou sua estimulação precoce.



Quando saímos do hospital, levamos ele ao pediatra da nossa filha mais velha e o mesmo observou que não havia um grau severo de comprometimento após exame clínico. Orientando que iniciássemos a estimulação precoce e dentro dos limites dele, oferecêssemos os mesmos estímulos que oferecemos a nossa filha

mais velha, inclusive regras e limites. Se é que existe normalidade, faltava 1% para ele ser normal.

5. Como foi (ainda é) o tratamento / acompanhamento?



Cauê ficou no centro de reabilitação até os 30 meses de idade, com terapia ocupacional e fonoaudióloga, três vezes na semana e diariamente com estimulações orientadas pelos profissionais, em casa. O desenvolvimento dele estava acompanhando os marcos do desenvolvimento infantil de forma limítrofe para fala, porém no geral sempre dentro da média superior.

Com este quadro evolutivo, fomos orientados matriculá-lo em uma escola regular de educação infantil. E assim o fizemos. Só mantivemos o acompanhamento fonoaudiológico até os 6 anos.



A inserção na rede regular de ensino foi um grande desafio, porém foi muito importante para a socialização, autonomia e desenvolvimen-



to cognitivo dele. A partir desta etapa ele seguiu estudando em rede regular de ensino, praticando esporte (natação, judô, atletismo) e tendo uma rotina organizada. Sempre foi acompanhado pelo pediatra e atualmente por um endocrinologista,

para monitoramento dos hormônios da tireoide, os quais nunca foram alterados, mas sempre monitorados a título de prevenção.

6. Qual a idade do seu filho(a) atualmente? Houve alguma melhora / superação?

Melhora, não! SUPERAÇÃO SIM! Hoje Cauê tem 26 anos. Podemos dizer que tudo deu certo! O seu desenvolvimento foi excelente, dentro de seus limites o seu desenvolvimento cognitivo vem se mantendo muito satisfatório. Ele fez curso de informática, de fotografia profissional e concluiu a graduação em Educação Física. Trabalha em uma rede de farmácias como Assistente





operacional e é totalmente autônomo.

Podemos dizer que ele é uma evidência da importância do conjunto de estudos científicos, estímulos e emoções para o desenvolvimento integral do ser humano.

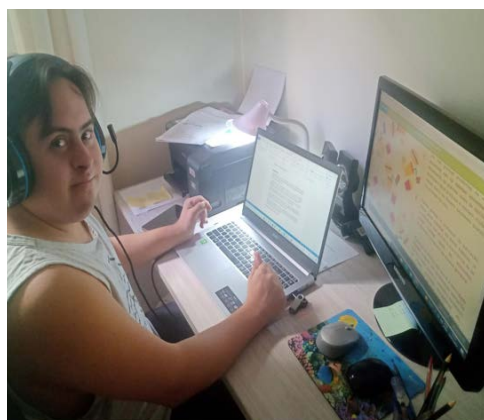
7. O que você diria para outras famílias que vivenciam a mesma situação?

Acolham com amor. Não existe receita para nada que envolva o ser humano. Cada um é único. Mesmo que dentro de uma realidade adversa. Procurem se informar com especialistas no assunto, tomem como base de informação dados científicos e adaptem as necessidades do indivíduo.



Eduquem. Ensinem regras e coloquem limites, não vitimizem a situação. Promovam a socialização. Não criem expectativas, mas lutem por eles. Vivam um dia de cada vez.

Nas fotos abaixo, vamos conhecer mais um pouco sobre o Cauê e sua incrível trajetória.



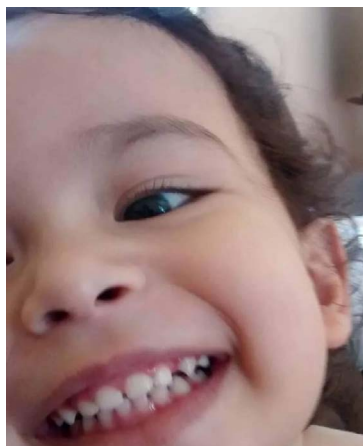
8.3 - RELATO III - TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (CONDIÇÃO COM CAUSA MULTIFATORIAL: COMPONENTES GENÉTICOS – MAIS DE 100 GENES JÁ FORAM DESCRITOS COMO ENVOLVIDOS NO TEA - E FATORES AMBIENTAIS)

A INCRÍVEL SUPERAÇÃO DO THÉO!

Observação: nesse relato, tive um ‘bate papo’ por telefone com a mãe e o Théo, então o ‘formato geral’ está diferente porque ele me relatou experiências importantes que gostaria que fossem incluídas aqui (e assim foi feito!).

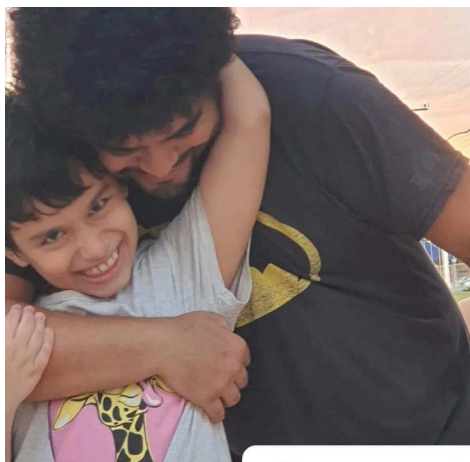
1. O que a levou a suspeitar que havia algo diferente em seu filho?

Isso começou durante a gestação, notei que o Théo era mais quietinho... mexeu tarde e mexeu pouco. Na 26ª semana de gestação entrei em trabalho de parto, mas tive um bom atendimento e a gestação seguiu. Apresentou o desen-



volvimento no que os desenvolvimentistas da Psicologia consideram dentro do que é esperado até, em média, média até 1 ano. Porém, como mãe eu já percebia algumas diferenças, como rolar após os 4 meses, comportamentos diferentes dos esperados para a idade, não falava nem sílabas e nem frases com aproximadamente 18 me-

ses, o que já é esperado nessa fase do desenvolvimento. Nessa época já frequentava a escola no maternal, pois sempre trabalhei muito e estava no mestrado na FMUSP em São Paulo, o que me ausentava bastante já do convívio diário com o Théo. Tive muita



parceria e rede com minha mãe, meu filho mais velho, na época com 16 anos e o pai. Théo, até aproximadamente 2 ou 3 anos, andava na ponta dos pés, gostava de seriar objetos e tinha um encantamento por tudo o que girava. Aos 12 meses, estudando as possibilidades de um possível diagnóstico (como mãe e Psicóloga) identifiquei que essas características se encaixavam no diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista, porém, em 2014 não haviam tecnologias psicodiagnostics como temos hoje, para um diagnóstico precoce. Conversei com a coordenação da escola e, como muitas mães, escola, familiares e amigos diziam que meu filho, por conviver com adultos tinha esses comportamentos e que eu “estava inventando diagnóstico”. Procurei outros colegas psicólogos, uma psicomotricista e a fala foi a mesma. Aos 18 meses a escola me pediu uma conversa e referiu que meu filho, de fato tinha características marcantes de TEA, como eu havia apontado 6 meses antes e pediu um parecer médico. Então comecei a busca por um profissional especializado, o que era muito caro e difí-

cil naquela época, mas encontrei o Dr. Caio Abujad, psiquiatra infantil, especialista em TEA e iniciei as consultas com a ajuda inicialmente do pai que acompanhava as idas à São Paulo.

2. Como e com que idade o diagnóstico foi realizado?

Dr. Caio Abujad, nos inferiu um diagnóstico de autismo de moderado a grave, como era classificado há 10 anos pelos médicos, afirmando ainda que era possível que fosse não verbal.

3. Como foi (ainda é) o tratamento / acompanhamento? Houve alguma evolução?

O Dr. Caio Abujad acompanhou meu filho por um ano, e a expectativa inicial era que ele seria não verbal, o que de fato se observou até os 3 anos de idade. Nessa época, Théo já não se alimentava adequadamente, devido a alta seletividade alimentar e era silábico (falava “Dá”, “QUé”, “Mã”, “Pa”). A partir dos 2 anos as crises de auto e hetero agressão (ao menos uma por



dia) começaram e ele não dormia a noite quase toda, além de iniciar um pouco de comportamento de isolamento na socialização. No Brasil, segundo os estudos, de fato meu filho seria uma pessoa não ver-



bal, porém, nos estudos no exterior eu já começava a descobrir casos de crianças que passavam silábicas à verbais através da estimulação adequada estudando sobre o assunto, encontrei

um artigo científico que relatava que crianças silábicas não seriam não verbais. A partir disso, foquei o acompanhamento dele em nossa cidade (interior de São Paulo) e começamos com sessões sistemáticas com uma fonoaudióloga especializada em TEA e, em 6 meses, Théo iniciou as primeiras frases e passou a ser verbal, embora muito houvesse que trabalhar ainda para que esta linguagem fosse funcional.

Em seguida, consegui uma vaga no programa TEA da APAE, o que foi um grande diferencial para evolução



do meu filho. Ele passou a ter acompanhamento com psicóloga, fonoaudióloga, psicomotricista, fisioterapeuta e, também iniciou um trabalho na equoterapia. As crises de agressão foram diminuindo e hoje não acontecem mais. O autismo passou de 'moderado a grave' para

nível de suporte 1 nessa época (3 a 4 anos de idade). Aos 8 anos, ele teve alta da APAE.

Sempre frequentou a escolarização regular, sem necessidade de acompanhante, mas com atendimento em AEE, o que foi fundamental para a compreensão da escola no fundamental 1 para lidar com meu filho. Na pandemia do COVID- 19, quando ele



iria para o 1º ano do ensino fundamental eu e a equipe que estava cuidando dele, entendemos que ele não estava emocionalmente preparado para a volta à escola quando fosse possível. Então passei a alfabetizá-lo em casa, inicialmente sozinha e com a ajuda do meu filho mais velho, Heitor que sempre foi meu parceiro incondicional nesse caminho com o Théo (não sei o que seria dessa história aqui contada se o Heitor não estivesse comigo). Tive muito apoio também e



uma rede familiar e de amigos que a maioria das mães não tem, pois como houve a separação do pai dele quando Théo tinha 2 anos, passei à mãe solo como é a realidade e de uma porcentagem imensa de mães de crianças que recebem o diagnóstico.



Hoje o Théo está no 6º ano do ensino fundamental 2, tem 11 anos, apresenta muita seletividade alimentar, por isso é acompanhado por uma nutricionista especializada, ainda é acompanhado por psiquiatra infantil (embora nunca tenha tomado medicação, mesmo nas fases mais difíceis, por escolha minha, visto que a medicalização pode

ser evitada se a família e a rede de apoio assim decidem junto com a equipe). Também faz psicoterapia, aulas de natação e bateria semanalmente, o que é um diferencial na existência de qualquer criança, no espectro ou não. Por isso, considero nossa família muito privilegiada. Vale lembrar também do apoio que sempre tive de colegas, coordenadores (sobretudo a minha coordenadora da Psicologia) e da Reitoria da Universidade que ministro aulas há 24 anos (UniSALESIANO de Araçatuba).

Um dia quero escrever um livro sobre o apoio e a rede para mães de crianças no espectro.



Participação especial do Théo

Eu perguntei o que ele gostaria que as pessoas soubessem sobre a sua história, eventos importantes da sua vida etc. Vamos lá!

A vida na escola:

‘O primeiro dia de aula... eu gostei, fui para o primeiro ano, mas como fui alfabetizado pela minha mãe antes de ir para escola fiz uma prova de nivelamento para saber em qual série eu iria que, no início foi o segundo ano, mas no segundo dia fiquei só uns minutinhos e já fui para o terceiro ano’.



Conhecendo outros lugares:

Eu já fui para São Paulo de ‘buzão’ com minha mãe duas vezes porque a gente gosta de viajar juntos. Na primeira, ela ainda era gestante, então eu não me lembro. Na segunda, fomos ficar com os tios Fábio e Sandro e eu fui ao bairro Liberdade... eu não gostei, eu amei!!!! Mas só gosto das comidas salgadas.

O dia do acidente (acidente de carro em meados de 2024):

Antes do acidente, eu, minha mãe e minha avó estávamos indo tomar sorvete. Tomamos sorvete e fomos dar uma volta. Minha avó,

que é deficiente visual, sem querer abriu o vidro da janela do carro e começou a bater no ombro da minha mãe que estava operada de um melanoma... a mãe foi ajudar a fechar e aconteceu um acidente. Fiquei muito assustado. A vó machucou, o SAMU chegou e esqueceram meu chinelo (mas voltamos lá depois e pegamos).

Coisas que eu também gosto:

Gosto de jogos, de microbiologia e história... gosto de saber das coisas e sei ler inglês bem facinho.

Para um menino que seria 'não verbal', tinha dificuldade de socialização e crises de agressão, a superação que ele apresenta é incrível! Abaixo, algumas fotos que retratam diferentes fases da sua vida.





8.4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse capítulo não tem como objetivo discutir a fundo a base genética de cada caso aqui apresentado e uma possível explicação para uma realidade tão diferente do que se esperava a princípio (felizmente!). Isso certamente nos levaria a uma incrível análise sobre o que a literatura científica tem de mais recente sobre cada um deles e, no momento, não é nosso foco. Quem sabe num próximo livro?

No entanto, acredito ser importante apresentá-los a cada aluno da área da saúde ou mesmo a um familiar para que se prepare para lidar com situações como essas. Além disso, é preciso ressaltar a necessidade de um cuidado especial por parte do profissional ao relatar aos familiares o resultado de um diagnóstico genético que pode soar como uma ‘sentença’.

Recentemente li uma frase muito interessante (infelizmente não anotei a autoria) que dizia mais ou menos o seguinte: ‘existe Genética, existe Epigenética e existe uma escolha’. É exatamente isso que os 3 casos apresentam em comum: a escolha de não se conformar e lutar por uma vida incrível diante de diagnóstico tão difícil. Que as histórias aqui apresentadas sejam uma inspiração para que, quando tudo parecer contrário e tão definitivo, desistir nunca seja uma opção.

Descubra os segredos do DNA e o fascinante mundo da Genética!

Neste livro, você vai entender como funciona a molécula que carrega toda a informação da vida: o DNA. De forma clara, acessível e envolvente, são explorados temas como estrutura e replicação do DNA, síntese de proteínas, controle da expressão gênica, epigenética, engenharia genética e muito mais.

Ideal para estudantes e apaixonados por ciência, “**Genética: Ciência da Vida**” é o ponto de partida perfeito para quem deseja compreender os mecanismos que nos tornam únicos — e, quem sabe, se apaixonar por essa área tanto quanto a autora.



ISBN: 978-65-87577-13-5

