



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Genética Molecular e Citogenética (GMC) 2010/2011

Ana Cristina Ribeiro Gomes

CITOGÉNÉTICA – Teoria Cromossómica da Hereditariedade

Teoria Cromossómica da Hereditariedade

Citogenética – área da genética que faz a ligação com a citologia.

Cromossoma – sede física das informações hereditárias. Corresponde, assim, a um corpúsculo corado (por definição).

Os loci:

- Estão dispostos linearmente ao longo de cada cromossoma.
- De cromossomas diferentes, transmitem-se independentemente.
- Situados no mesmo cromossoma transmitem-se com um grau de dependência mútua que resulta da sua maior ou menor vizinhança.

Provas da Teoria

Núcleo – possui cromossomas, nos quais se encontra toda e qualquer informação hereditária de um indivíduo.

Ocorre a sobreposição dos postulados mendelianos com a teoria cromossómica da hereditariedade (grau de dependência).

O número de cromossomas corresponde ao número de grupos de ligação.

O número e os tipos de cromossomas estão associados a uma determinada espécie, ou seja, existe uma correspondência entre o cariótipo, o número e os tipos de cromossomas associados a determinada espécie.

Uma alteração ao nível dos cromossomas implica alterações fenotípicas.

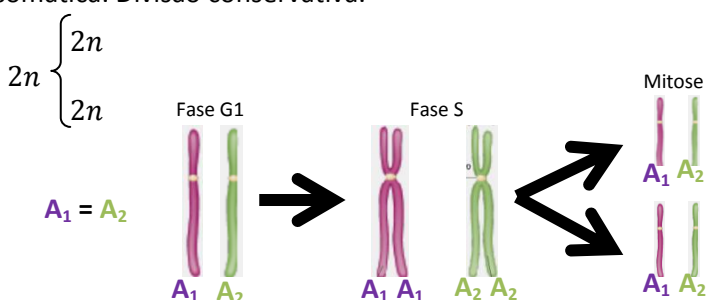
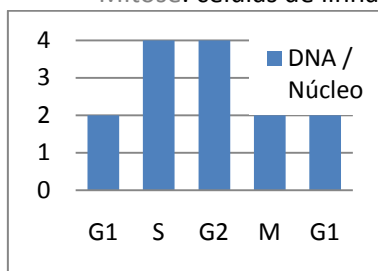
O fenótipo de portadores de mutações cromossómicas é diferente do fenótipo dos indivíduos da mesma espécie.

A transmissão ligada ao sexo corresponde à transmissão feita através dos cromossomas sexuais.

CITOGÉNÉTICA – Cromatina e Cromossoma

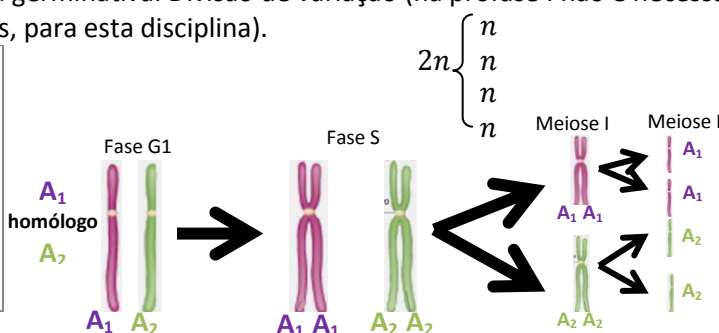
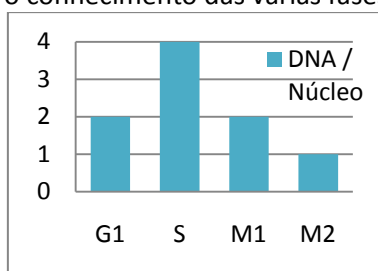
Mitose e Meiose

Mitose: células de linha somática. Divisão conservativa.



Meiose: células de linha germinativa. Divisão de variação (na profase I não é necessário o conhecimento das várias fases, para esta disciplina).

Em G1 encontram-se células como oogónias ou espermatogónias.



Meiose I – existem 2 cópias das 2 cromátides, logo continua um diplóide
Meiose II – Haplóide

Mitose	Meiose
Não emparelhamento de homólogos	Sinapse dos cromossomas homólogos em Profase I
Não ocorrência de entrecruzamentos	Entrecruzamentos entre pares de homólogos
Divisão de centrómeros em anáfase	Divisão de centrómeros apenas em anáfase II
Conservação	Variação

Fases da Mitose

Profase – início da condensação dos cromossomas. O núcleo desorganiza-se e a síntese proteica pára. Fora do núcleo, a rede de microtúbulos que existia em interfase é substituída pelo fuso mitótico.

Prometafase – ruptura abrupta do invólucro nuclear, com o desaparecimento da lâmina nuclear (fosforilação das laminas). Continuação da condensação dos cromossomas.

Metafase – cromossomas alinham-se no centro da célula, formando a placa equatorial. É o momento onde há a condensação máxima dos cromossomas, e onde cada um dos cromátídios se liga a microtúbulos pólos opostos do fuso. Nesta fase existem forças bipolares equilibradas que mantêm os cromossomas na placa equatorial.

Anáfase – separação dos cromátídios que são arrastados para os pólos. No fim desta fase inicia-se a citocinese.

→ **Anáfase A** – encurtamento dos microtúbulos do cinetocoro e movimento dos cromátídios para os pólos;

→ **Anáfase B** – afastamento dos pólos provocada pelo alongamento dos microtúbulos polares.

Telofase – invólucro nuclear reorganiza-se e os cromossomas começam a descondensar-se.

Fases da Meiose

Profase I – cromossomas duplicados começam a condensar-se; início da sinapse e ocorre o crossing-over; desaparecimento do complexo sinaptonémico; pontos de quiasmata visíveis; bivalentes prontos para a metafase.

Metafase I – cromossomas homólogos alinham-se na placa equatorial, através dos pontos de quiasmata.

Anafase I – pares homólogos separam-se com os cromatídios ainda juntos. Ou seja, migram 2 cromatídios (1 cromossoma), com constituições diferentes, para cada um dos pólos.

Telofase I – formam-se duas células-filhas, cada uma contendo 1 cromossoma do par de homólogos.

Profase II – não há replicação do DNA. É uma fase que pode não ocorrer para não existirem grandes gastos de energia. Recondensação dos cromossomas.

Metafase II – cromossomas alinham-se na placa equatorial, através dos centrómeros. Cada par de cromatídios alinha-se na placa equatorial, de cada célula.

Anafase II – dividem-se os centrómeros e cada cromatídio, do mesmo cromossoma, migra separadamente para cada pólo. Os cromatídios são separados, originando células com arranjos genéticos diferentes devido ao crossing-over ocorrido na profase I.

Telofase II – conclusão da divisão da célula. Originam-se 4 células-filhas. Existe a organização nuclear de cada célula, originando-se 4 células com um núcleo que possui um número haplóide de cromossomas.

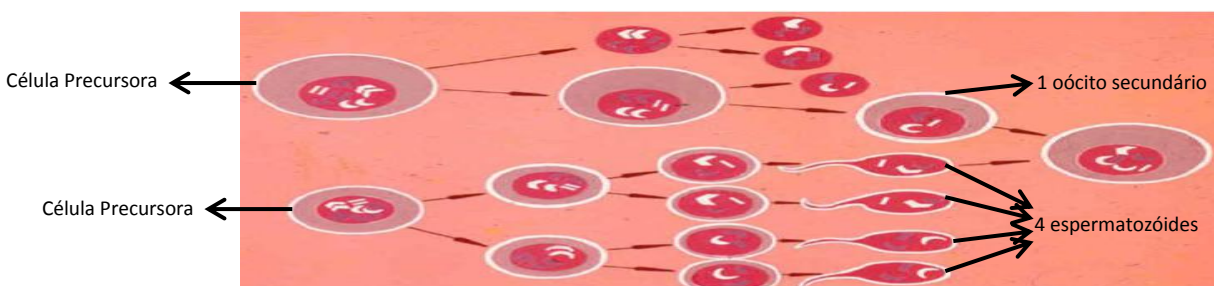
Meiose em Mamíferos

A meiose para a formação dos gametas femininos e masculinos, constitui uma exceção ao processo de meiose normal.

Os **precursores dos espermatozoides** formam 4 espermátides, onde cada uma delas evolui para um espermatozoide. Assim, este é um processo de meiose normal pois de 1 célula, de $2n$ cromossomas, vão ser formadas 4 células, de n cromossomas, possuindo este mecanismo um alto rendimento.

No entanto, nas fêmeas (cuja meiose começa no estado embrionário) durante a primeira divisão meiótica, da sua **oogénese**, formam-se duas células: uma delas constitui o **primeiro glóbulo polar** (que pode sofrer mitose) e a outra constitui uma célula que vai continuar para a segunda divisão meiótica. Essa célula então vai passar pela segunda divisão meiótica, originando um **ócito II** e o **segundo glóbulo polar** (apenas quando ocorre a fecundação).

Assim, na formação de gametas femininos apenas se forma, no final, uma única célula, que na realidade nunca chega realmente a ficar haplóide (necessita da fecundação de um espermatozoide para completar a meiose). Os glóbulos polares acabam por degenerar.



Cromatina

Cromatina – possui dois tipos consoante o seu grau de condensação, que têm como base a actividade de transcrição do mRNA.

- **Eucromatina** – cromatina activa, descondensada, que corresponde às regiões do genoma capazes de realizar transcrição. É uma zona sensível à DNase.
- **Heterocromatina** – mantém o grau de condensação durante todo o ciclo celular. É visível no núcleo em interfase (**cromómeros** – heterocromatina na interfase que continua bastante condensada). As suas funções estão ainda mal estudadas, mas pensa-se que poderão participar no emparelhamento, recombinação, segregação e, também, na estabilização e protecção de certas regiões cromossómicas.

Na heterocromatina ainda se consideram outros dois tipos:

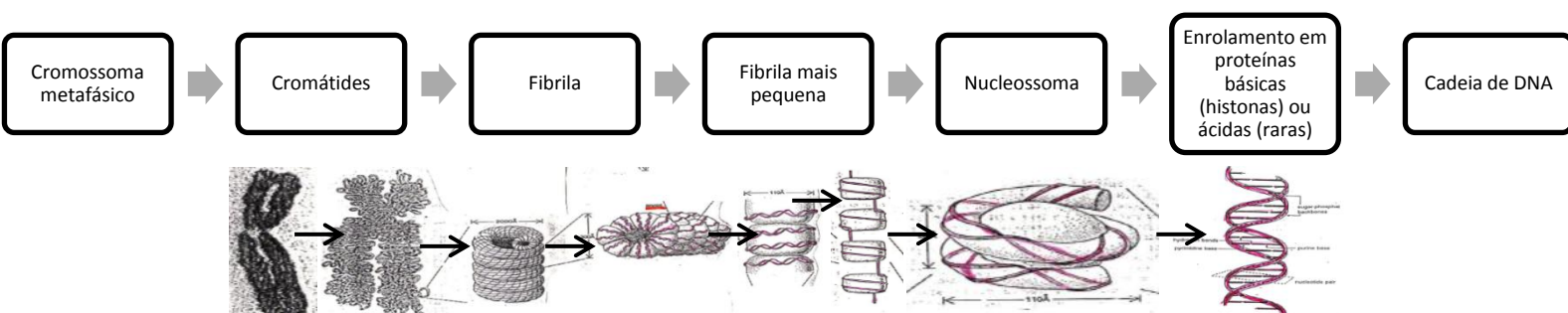
- **Facultativa** – estado de condensação variável em tipos diferentes de células e durante a fase precoce do desenvolvimento, ou seja, não está sempre ultracondensada. Pensa-se que poderá ter origem em eucromatina que se inactivou. Os mamíferos, pelo menos, até ao sexto mês de vida têm este tipo de heterocromatina.
- **Constitutiva** – localizada em posições idênticas, nos cromossomas homólogos, de todas as células e de forma permanente, ou seja, aparece sempre ultraconcentrada. O DNA é muito repetitivo e muito rico em adenina-timina. Dentro de uma mesma espécie este tipo de heterocromatina é igual de indivíduo para indivíduo.

Cromossoma Metafásico

É necessário que os cromossomas estejam condensados, para os conseguirem estudar, uma vez que é o momento onde os cromossomas não se encontram tão repulsivos entre eles e é a altura em que se encontram mais condensados.

Desta forma, pode-se estudar a sua constituição, forma e anomalias que, eventualmente, possam surgir.

O cromossoma metafásico possui uma forma muito típica, constituído por 2 cromátides, 1 centrómero (que se dividem longitudinalmente na Anáfase) e 2 telómeros. Para além de DNA, na sua constituição, possuem, também, algumas proteínas ácidas (muito raras) e algum RNA mensageiro.



Cromossoma – conjunto de fibras de DNA com proteínas, as quais se enrolam, por sucessivos empacotamentos / enrolamentos, sobre si mesmo.

Estrutura Molecular do Centrómero

O **centrómero** possui uma variação considerável conforme as espécies. Esta estrutura tem de possuir a capacidade de reconhecimento dos microtúbulos para que consiga ocorrer a ascensão de material, para os pólos.

Cromossomas holocêntricos – sequências centroméricas dispersas ao longo do cromossoma (centrómero difuso), ou seja, possuem vários pontos de ligação. Os microtúbulos unem-se ao longo de todo o comprimento, de cada cromátide (fragmentação com raios X).

Centrómeros localizados – com uma única região que se une aos microtúbulos. Podem ser constituídos por centenas de Kb de DNA (**centrómeros regionais**) ou por um reduzido número de pares de bases (**centrómeros pontuais**).

Os eucariotas superiores possuem regiões centroméricas que contêm grandes quantidades de heterocromatina.

Estrutura Molecular do Telómero

Telómero – extremidade de cada cromátide que está associada à morte celular programada. São regiões terminais do cromossoma que formam uma espécie de cápsula, porque contêm sequências específicas repetitivas (ricas em guanina). São importantes para determinar a vida da célula, pois decide quantas vezes se replica.

O DNA telomérico nos **vertebrados** possui uma repetição em tandem de 5'-TTAGGG-3'.

Em cada divisão celular, o telómero vai ficando mais pequeno o que induz a sua própria morte, nas células normais, ocorrendo uma perda de 50 – 200 nucleótidos / ciclo mitótico. Isto ocorre pois a telomerase está ausente nas células somáticas normais, no entanto, expressa a sua actividade em células tumorais.

Assim, em células cancerosas a existência de telomerase faz com que as extremidades, que se vão perdendo em cada ciclo, sejam acrescentadas pela mesma, impedindo que ocorra essa morte programada das células, permitindo a sua multiplicação indefinida.

Tipos de Cromossomas Metafásicos

Os cromossomas metafásicos classificam-se consoante a posição do centrómero em relação aos telómeros.



Cromossoma metacêntrico – o centrómero encontra-se no centro do cromossoma (centrómero ao meio). Os braços do cromossoma possuem o mesmo tamanho.



Cromossoma submetacêntrico – o centrómero encontra-se acima do centro do cromossoma, ou seja, está mais perto de uma das extremidades. O cromossoma possui 2 braços grandes mas de diferente tamanho entre si, sendo um dos braços mais curto que o outro.



Cromossoma acrocêntrico – o centrómero encontra-se muito acima do centro do cromossoma, estando praticamente na sua extremidade. O cromossoma possui 1 braço mesmo muito pequeno (extremamente pequeno) e outro muito grande.



Cromossoma telocêntrico – o centrómero constitui um dos centrómeros. O cromossoma só possui um braço, ou seja, o telómero e o centrómero constituem uma das extremidades do cromossoma.

Identificação de Cromossomas Metafásicos

Existem técnicas para as bandas escuras e claras, dos cromossomas, serem identificadas.

Existe, então, uma nomenclatura para reconhecer esses cromossomas. Simbologia:

- p (braço curto);
- q (braço longo).

Banda – as regiões dividem-se em bandas. Quando o número de uma banda é 0, então essa região constitui um marco.

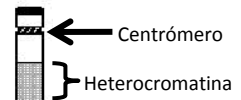
Marco – local onde se dividem as regiões, logo vai pertencer a 2 regiões em simultâneo, pois é o limite de ambas. Podem ser telómeros, centrómeros, constrições e, por vezes, certas bandas que são mais escuras e que se vêem facilmente. Assim sendo, são os locais do cromossoma que se conseguem identificar com mais facilidade.

Região – espaço de cromatina situado entre 2 bandas seguidas. As várias regiões distinguem-se em reuniões internacionais.

8	q	2	4	.	2
Número do cromossoma	Braço	Região	Banda		Sub-Banda

O número de pares de cromossomas não está relacionado com a escala de evolução, logo varia muito consoante espécies diferentes, e por vezes no mesmo grupo, podendo ser apresentados “saltos” devido a duplicações do número de cromossomas, o que dá origem a seres muito diferentes, que constituem uma nova espécie (híbridos que se tornam férteis).

Cromossoma Y – na sua maioria é constituído por heterocromatina não codificante:



Cromossomas Sexuais

Sistemas cromossómicos de determinação do sexo:

- ♀ XX (homozigótico), ♂ XY (heterozigótico) – *Drosophila*, Mamíferos;
- ♀ WZ (heterozigótico), ♂ WW (homozigótico) – aves, alguns peixes, traça;
- ♀ XX (homozigótico), ♂ XO (hemizigótico) – muitas espécies de insectos.

Cromossoma Y – no Homem, é constituído por 2 regiões pseudo-autossómicas (homólogas ao cromossoma X e que são importante no emparelhamento).

Cromatina Sexual

Estudando o sistema nervoso dos gatos, descobriu-se a **cromatina sexual** (Barr, 1949). Verificou-se que, no sexo feminino, aparecem estruturas (cromatina sexual / corpúsculos de Barr). Desta forma, a investigação foi expandida a células sexuais.

Esta cromatina sexual é um tipo de **heterocromatina facultativa**.

Hipótese de Lyon:

- Fêmeas de mamíferos – mosaicos na expressão dos 2 cromossomas X.
- Até cerca do 16º dia, os dois cromossomas X estão funcionais. A cerca do 16º dia ocorre a precipitação de 1 dos cromossomas X;
- Durante a gametogénese ocorre a reactivação do cromossoma X condensado (heterocromatina facultativa).

Na presença de 2 cromossomas X, ocorre a precipitação de determinadas zonas, que inactivam essas regiões, e assim, apenas 1 cromossoma é que se encontra activo. Os 2 cromossomas X apenas estão activos, em simultâneo, no momento do zigoto.

A escolha da inactivação é aleatória, logo a precipitação é feita tanto do X materno como do X paterno. Assim, haverá células nas quais é o X materno que está activo e outras nas quais é o X paterno o activo.

Exemplos:

- **Hemofilia** – existe apenas metade da produção da proteína, em mulheres heterozigóticas (Hh apenas ½ da proteína antihemofílica – esta proteína é suficiente para que se mantenha o equilíbrio, promovendo assim a ausência de mulheres hemofílicas).
- **G-6-PD** – em cultura existem clones com produção de uma variante e outros clones com a produção da outra variante.
- **Mula** – o cavalo e o burro possuem G-6-PD diferentes. Existem clones produzindo apenas a enzima típica de uma das espécies, de cada vez.

Este fenómeno de inactivação também acontece quando um indivíduo possui 3 cromossomas sexuais, onde existem 2 corpúsculos de Barr, favorecendo a conclusão de que em todas as fêmeas, apenas existe 1 único cromossoma X activo, independentemente da situação cromossómica, desde que possua 2 ou mais cromossomas X.

Quando apenas existe 1 cromossoma X (como nos genótipos XO, XY, XYY) não há formação de cromatina sexual.

“Lei” de Ohno

O cromossoma Y foi miniaturizado, variando apreciavelmente entre 2 espécies próximas evolutivamente.

No entanto, a evolução do cromossoma X tem sido muito mais conservativa, devido ao seu mecanismo de inactivação que o preservou intacto, ao longo da evolução dos mamíferos.

Nem todo o cromossoma X permanece inactivo. Alguns genes localizados na extremidade do braço curto estão sempre activos. Há portanto uma inactivação selectiva.

Cromossoma Y

O cromossoma Y (com poucas regiões codificantes) possui o gene TDF no braço curto.

TDF – zona do cromossoma Y que é bastante importante para o desenvolvimento do sexo masculino. Induz a produção de testosterona, que leva à produção dos ductos Wolfianos, originando, assim, o desenvolvimento de um embrião do sexo masculino.

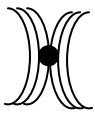
Na ausência do cromossoma Y, não existe o inibidor Mülleriano, e logo desenvolve-se um embrião do sexo feminino.

Este gene constitui a única diferença entre sexos, sendo a única porção, muito pequena, que faz toda a diferença no desenvolvimento embrionário.

Quando não existe esta região, no cromossoma Y, desenvolve-se um embrião do sexo feminino, por muito que o seu cariótipo seja XY.

Quando o X tem essa região, desenvolve-se um embrião do sexo masculino, por muito que o seu cariótipo seja XX.

Cromossomas Politénicos (Gigantes)



Os cromossomas politénicos são grandes em comprimento e espessura. Estes formam-se quando as cromátides, em determinadas divisões, não se separam totalmente, e vão sendo duplicadas sucessivamente, ou seja, não ocorre divisão celular nem nuclear completa.

Cada cromossoma está fortemente ligado ao homólogo e o DNA é replicado diversas vezes, excepto no centrómero e telómero. As bandas existentes são diferentes das bandas dos cromossomas humanos pois não necessitam de qualquer tipo de coloração para serem observadas. Correspondem, na realidade, a regiões mais condensadas (escuras) e mais laxas de cromatina (clara).

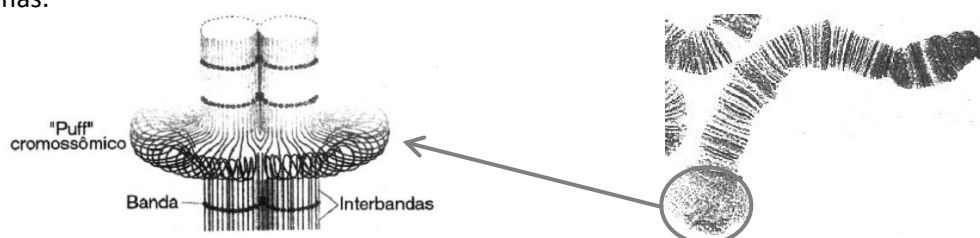
Forma-se, assim, um padrão de bandas e inter-bandas (escuras e claras, respectivamente) devido à forma como o DNA se encontra compactado e descompactado, ao longo de todo o seu comprimento.

Constituem numerosas fibrilas (cromátides) até 2000 ciclos de endorreduplicação.

O padrão de bandas (alternância de bandas) formado é específico para cada cromossoma, devido à concentração desigual de fibrilas de cromatina, ao longo de um cromossoma.

Os “puffs” (zonas de dilatação associadas à síntese de RNA) ou anéis de Balbiani são expansões do cromossoma, comuns de se observar nas biopsias de determinados carcinomas, assim, os “puffs” estão associados à activação génica diferencial (síntese de RNA).

Aparecem em glândulas de *Drosophila*, angiospérmicas, protozoários, dípteros e carcinomas.



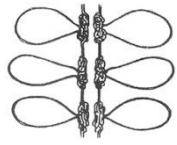
Cromossomas Plumosos

Cromossomas plumosos – muito activos na síntese de RNA. Quando a laçada está exposta, significa que está a ocorrer a sua transcrição. Estes cromossomas são revestidos por complexos de RNA e proteínas

Formam-se quando a fibrila de cromatina sai e volta a entrar no cromossoma, formando uma laçada. Esta estrutura é contínua, logo permanece sempre intacta.

Aparece em núcleos de oócitos I de vertebrados (anfíbios) e invertebrados durante o prolongado estado de diplóteno, e, ocasionalmente, em espermatócitos de *Drosophila*.

As expansões da maioria dos cromómeros em forma de laços, são muito ricas em RNA.

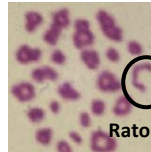


Técnicas de Observação de Cromossomas Metafásicos

Técnicas directas – observam-se cromossomas a partir do tecido. Por exemplo, medula óssea, mucosa intestinal, endométrio, neoplasias, testículo, ovário...



Humano



Rato



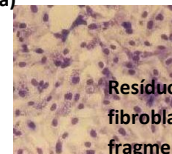
Humano

Emparelhamento
típico dos
cromossomas X e Y

Técnicas indirectas – observam-se cromossomas a partir de uma cultura celular. Por exemplo, sangue periférico, medula óssea, líquido amniótico, vilosidades do córion, pele, tumores sólidos / líquidos... Nesta técnica a quantidade do cariótipo é muito maior, logo mais definida. As culturas têm de ser feitas em meios assépticos.



Linfócito

Estudo dos crossing-over
(pontos de quiasmata)Estudo dos crossing-over
(pontos de quiasmata)
AmpliadoResíduo sólido (tumor)
fibroblastos que se dividem
do fragmento inicial – peleResíduo sólido (tumor)
fibroblastos que se dividem do
fragmento inicial – âmnio

Métodos de Coloração das Bandas

Houve uma evolução desde os métodos que englobavam colorações uniformes ao longo de todo o cromossoma, para técnicas cuja coloração induz uma alternância de bandas.

Este desenvolvimento fez com que seja mais simples a realização de determinados diagnósticos, pelo que é muito mais fácil o seu estudo.

Métodos diferenciais – alternância de regiões claras com regiões escuras.

Métodos selectivos – marcação de regiões específicas, com corantes fluorescentes.

Métodos de Coloração das Bandas – Bandas G

Bandas G – nome proveniente do nome Giemsa, que é o corante utilizado.

Esta técnica consegue, através da utilização de enzimas proteolíticas, provocar a alternância de bandas claras e escuras, quando este corante é diluído. Faz com que as bandas correspondam à disposição das proteínas, formando bandas positivas ou negativas.

→ Bandas positivas – bandas mais escuras, ricas em adenina-timina.

→ Bandas negativas – bandas mais claras.

Enzimas proteolíticas:

→ Distribuição de proteínas;

→ Bandas positivas – histonas ricas em arg e proteínas ricas em grupos dissulfetos

→ Bandas negativas – proteínas ricas em grupos sulfidril.

É muito utilizado na detecção de anomalias, como por exemplo mutações. Permitindo observar os protótipos dos cariótipos das espécies.

Nesta técnica, os cromossomas são sujeitos a um aquecimento moderado ou a uma breve proteólise, e corados com Giemsa.

Métodos de Coloração das Bandas – Bandas Q

Quinacrina – corante fluorescente:

- Zonas mais brilhantes – 75% adenina-timina;
- Zonas brilhantes – mais de 5% de guanina-citocina.

Métodos de Coloração das Bandas – Bandas R

Bandas R – nome vem da palavra “reverse”.

Esta técnica baseia-se na desnaturação, da cromatina, a altas temperaturas. Quando se colocam numa solução alcalina, sofrem uma renaturação de apenas algumas partes do cromossoma, logo considera-se a ocorrência de uma renaturação selectiva.

Correspondem a bandas inversas das bandas G, pois as bandas G claras são bandas R escuras, enquanto as bandas G escuras são bandas R claras.

Assim, constituem bandas complementares das bandas G, e aparecem em conjunto nas legendas dos protótipos dos cariótipos.

Os cromossomas são tratados com uma solução alcalina, a quente, e coradas com Giemsa. Formam barras claras, ricas em guanina-citosina.

Métodos de Coloração das Bandas – Bandas C

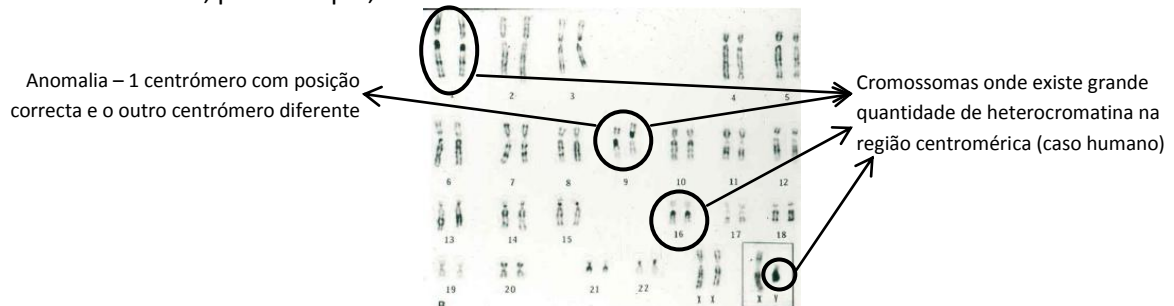
Este é um tipo de tecnologia que não faz aparecer uma forma de bandas contínua em todo o cromossoma. Na realidade faz com que determinadas zonas do cromossoma apareçam mais evidenciadas.

Assim, não se estuda o cariótipo de um indivíduo, mas estudam-se determinadas zonas que se pretendem analisar.

Nesta técnica há uma desnaturação, com tratamento alcalino, ocorrendo, posteriormente, a renaturação das sequências mais repetitivas.

Bandas C – o seu nome vem de centrómero.

Evidencia, por exemplo, a heterocromatina constitutiva.



Métodos de Coloração das Bandas – Bandas NOR

Bandas NOR – o seu nome vem de “nucleolo organizing region”.

Existem determinadas regiões da cromatina que estão relacionadas com o nucléolo, ou seja, não produzem proteínas mas são as responsáveis pela produção de 2 tipos de RNA ribossómico.

Utiliza-se um tampão a elevadas temperaturas e adiciona-se nitrato de prata que vai precipitar determinadas regiões. Depositam-se em zonas dos cromossomas acrocêntricos, que produzem RNA ribossómico. São então estas as zonas que se evidenciam.

As proteínas associadas ao DNA ribossómico, no nucléolo (RNA ribossómico 18s e 28s) são abundantes, nos braços curtos dos cromossomas.

Métodos de Coloração das Bandas – Bandas SCE

Bandas SCE – o seu nome provem de “sister chromatide Exchange”.

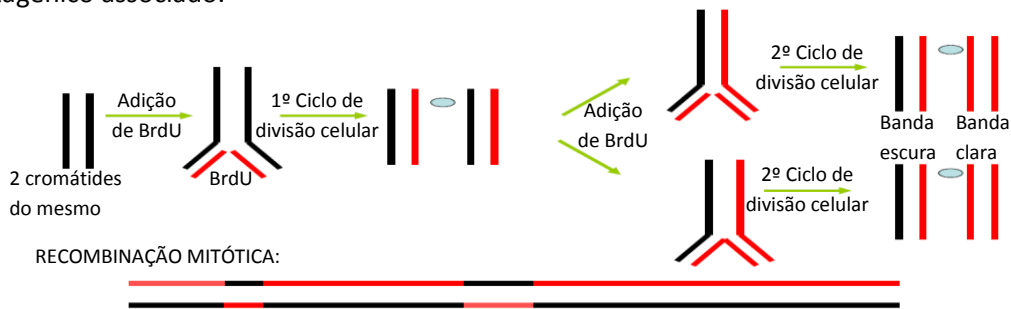
São necessários 2 ciclo mitóticos para que seja evidenciada a imagem. Assim, BrdU (droga que bloqueia a metafase) após 2 ciclo consecutivos a competir com a timina:

- 2 BrdU – cromátide clara;
- BrdU + Timina – cromátide escura.

Este corante é um composto que compete com a timina aquando da fase S, em cultura celular.

Produz uma imagem do crossing-over, permite então visualizar o entrecruzamento (cruzamento entre cromátides irmãs), através da identificação de 1 cromátide clara e 1 cromátide escura.

É possível que ocorra raramente um aumento do crossing-over mitótico, devido a um mutagénico associado.



Métodos de Coloração das Bandas – Bandas Alta Resolução

Esta técnica permite aumentar, em bandas, a resolução de um cromossoma. Assim, consegue-se distinguir um maior número de bandas e também de sub-bandas, pois “esticam-se os cromossomas”. A coquicina pára a metafase, logo deixa de existir a divisão celular.

A coquicina deixa de ser útil perante o metatraxato (droga), que bloqueia a fase do novo material genético. Esta divisão é interrompida numa profase tardia ou metafase precoce (desde que seja bem conhecido o tempo desde a fase S até à metafase) onde os cromossomas estão compactados o suficiente para se verem, mas não tão compactados para que possam aparecer esticados (em alta resolução).

Assim, passam-se de 300 bandas para 1000 bandas a observar, devido ao bloqueio da fase S pelo metatraxato, ficando cerca de 50% dos cromossomas em prometafase.

Isto é possível por se ter uma cultura sincronizada, onde todas as células se encontram na mesma fase.

Esta técnica constitui uma vantagem quando se tem pouco material cromossómico. Pode ser importante no estudo de cancro.

Métodos de Coloração das Bandas – Anticorpos Marcados

Anti-5 metilcitosina e anti-centroméricos.

A base desta técnica está no mecanismo de ligação dos anticorpos aos antígenos.

Permite detectar uma proteína específica numa cultura / extracto de proteínas, hibridadas por anticorpos (sonda), no qual o primário detecta a proteína e o secundário (que está marcado) detecta o anticorpo primário, servindo, desta forma, para tornar o sinal de detecção mais forte.

Métodos de Coloração das Bandas – Enzimas de Restrição

Enzimas de restrição / Endonucleases – enzimas que fragmentam o DNA por hidrólise em locais específicos. Reconhecem uma dada sequência de nucleotídeos / regiões específicas, fragmentando o DNA sempre que essa mesma sequência é encontrada.

Locais de restrição – nucleotídeos que as enzimas de restrição reconhecem, cortando o DNA nessa mesma sequência. A mesma enzima de restrição corta sempre perante a mesma sequência de nucleotídeos em qualquer DNA. No entanto, no mesmo organismo, cortam no mesmo local, originando sempre o mesmo conjunto de fragmentos, mas noutro indivíduo diferente originam fragmentos diferentes, pois cortam em regiões diferentes.

Ocorre a quebra se estiver presente a região específica, logo não ocorre a quebra se não estiver essa mesma região específica presente. O DNA nessas regiões específicas adquire uma determinada cor.

Métodos de Coloração das Bandas – Hibridização *in situ*

Hibridização *in situ* – envolve hibridação de um fragmento de ácido nucleico a uma preparação cromossómica de DNA desnaturado ou a uma secção de tecido de RNA.

Deteção de sequências de ácidos nucleicos, através de sondas de DNA/RNA.

As sondas hibridizam directamente com determinadas regiões de cromossoma, originando uma fluorescência, nessa mesma região.

Esta técnica é importante na análise da presença, ou ausência, de cromossomas em interfase.

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) – técnica citogenética utilizada para detectar e localizar a presença ou ausência de uma sequência de DNA específica ou um cromossoma.

Métodos de Coloração das Bandas – Pintura Cromossómica (Chromosome Painting)

Cromossomas provenientes de várias células (suspensão) são divididos em função do seu tamanho.

Há a hibridação com sondas de DNA ligadas a fluorocromos. Estes fluorocromos são específicos para determinadas sequências, podendo, desta forma, permitir a observação de anomalias cromossómicas, devido à presença de uma cor indesejada na análise.

Ocorre a extracção de DNA (que tem de ser purificado pela extracção de proteínas e sua desnaturação), através da primeira máquina, que corresponde a um determinado cromossoma, adicionando-se um corante flurescente.

Hibridização deste DNA com cromossomas parcialmente desnaturados.

A colocação dos cromossomas na máquina com os 24 tubos (para os 22 autossomas + X + Y) faz com que os cromossomas se distribuam por esses mesmos tubos (cromossoma 1 no tubo 1, cromossoma 2 no tubo 2, ...).

Permite a abertura dos cromossomas parcialmente desnaturados (cadeias abertas), obtendo-se homólogos com cores diferentes.

CITOGÉNÉTICA – Mutações Cromossómicas Numéricas e de Estrutura

Variação no Número de Cromossomas

Euploidia – número múltiplo de cromossomas, do conjunto monoplóide. Cariótipo com n cromossomas ou múltiplos de n cromossomas:

- **Monoploidia** – n cromossomas;
- **Diploidia** – $2n$ cromossomas;
- **Triploidia** – $3n$ cromossomas (os triploides são normalmente estéreis). $2n \times n$ cromossomas (se os triploides são férteis pode haver cruzamento de gametas);
- **Tetraploidia** – $4n$ cromossomas;
- **Poliploidia** – duplicação dos cromossomas sem subsequente divisão nuclear. Pode ocorrer devido a uma deficiência na anafase ou a uma endomitose. Origina células multinucleadas.

Auto... – descendentes de um cruzamento intra-específico, ou seja, de indivíduos da mesma espécie. É um cruzamento de indivíduos cujos gametas são da mesma espécie. Desta forma, todas as guarnições cromossómicas são iguais

Alo... – descendentes de um cruzamento inter-específico, ou seja, de indivíduos de espécies diferentes. Estes descendentes chamam-se de híbridos. É um cruzamento de indivíduos cujos gametas são provenientes de espécies diferentes. Desta forma, nenhum cromossoma tem homólogo.

Haplóide – com metade do número de cromossomas inicial.

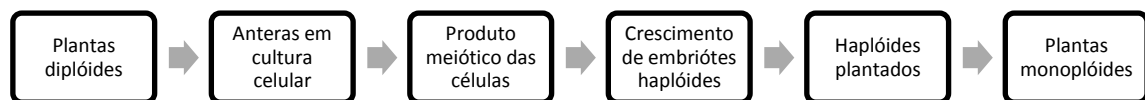
Euploidias – Monoploidias

As monoploidias são as euploidias mais simples a nível cromossómico. Podem ser:

- **Espontâneas** – abelhas, formigas e vespas machos.
- **Artificiais**:
 - Plântulas que surgem a partir de grãos de pólen, sendo portanto monoploides. Ocorre a diploidização com colquicina (linhas puras).
 - A fertilização com espécies diferentes leva à eliminação dos cromossomas de uma das espécies, por incompatibilidade genética, ocorrendo o desenvolvimento de um monoploide.

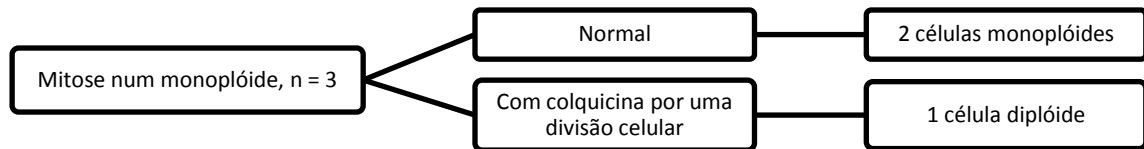
Euploidias – Monoploidias (Criação de Monoploides Artificiais)

Esta técnica é útil em processos de selecção de características favoráveis (plantas), para a posterior criação de plantas diplóides puras que sejam homozigóticas, para uma determinada característica: os fenótipos observados são o resultado directo da constituição genética destes indivíduos (uma só cópia para cada gene), evitando-se os efeitos de possível interacção entre alelos.



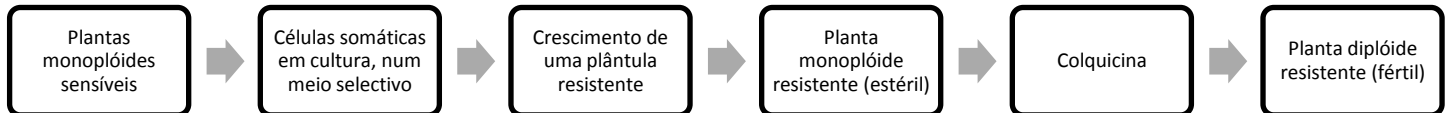
Formam-se **embriões** e não embriões, os quais possuem uma resistência muito mais baixa que uma planta diplóide.

Um dos processos de produção de plantas monoploides é através de uma cultura de células haplóides. Neste caso, os grãos de pólen são colocados em meios de cultura (agar) juntamente com algumas hormonas. O crescimento destas células dá origem a tecidos e, posteriormente, a plântulas haplóides.



Células monoplóides podem ser transformadas em diplóides através da aplicação da **colquicina**. Esta substância impede a formação do fuso acromático duplicando, assim, o número de cromossomas. É realizada, então, uma mitose não acabada (duas células que se unem com a informação genética de 2 monoplóides).

Estas células podem proliferar e dar origem a tecidos diplóides.



A colquicina não permite a polimerização do centro acromático, mas induz a duplicação, logo vai originar a fertilidade. O meio selectivo garante que apenas as células resistentes a determinado factor selectivo são aquelas capazes de se proliferar.

Consegue-se então de uma certa forma, manipular determinado número de cromossomas, para a planta ser mais rentável. Conseguindo-se induzir a diploidia (através da colquicina, que interrompe a mitose).

Este processo em nada está relacionado com o processo de formação dos organismos geneticamente modificados.

As plantas monoplóides podem ser utilizadas em programas de mutação-selecção utilizando técnicas de microbiologia.

Uma população de células monoplóides é isolada e as paredes celulares são destruídas enzimaticamente, sendo posteriormente sujeitas a um tratamento com um agente mutagénico.

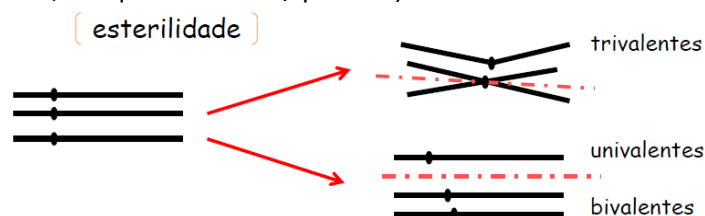
São em seguida colocadas num meio selectivo de cultura que apenas permite o crescimento do fenótipo desejado (exemplo, a resistência a determinada substância tóxica como um herbicida).

Através do tratamento com colquicina as plântulas monoplóides são transformadas em plantas diplóides (férteis).

Euploidias – Triploidias

Formam-se / originam-se através de:

- Tetraplóide × Diplóide (um tetraplóide, normalmente, produz gâmetas diplóides);
- Retenção do segundo glóbulo polar, que normalmente seria expulso (exemplo colquicina, choques térmicos / pressão).



Ocorre esterilidade (que normalmente está associada a triploides), pois a probabilidade de se formarem gâmetas não normais é muito baixa.

Os três cromossomas vão ser divididos em 2 combinações diferentes: trivalente ou univalente e bivalente.

Interrompe-se a meiose para ser retido o glóbulo polar.



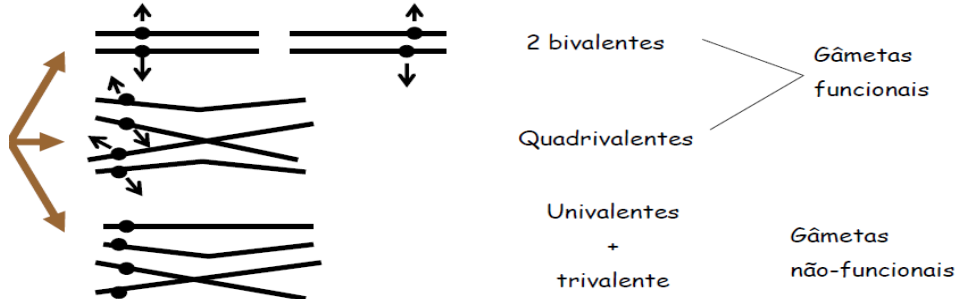
Euploidias – Tetraploidias

Interessantes para a produção de diplóides, pois do cruzamento entre tetraplóides e diplóides surge uma descendência consideravelmente diplóide, o que pode ser de interesse.

→ Espontaneamente, onde $2n$ desenvolve-se para $4n$.

→ Induzidos (exemplo colquicina, choques térmicos / pressão).

Ocorre a produção, ou não, de gametas equilibrados.



Euploidias – Alopoliploidias

Um indivíduo de $4n$ cromossomas que se cruza com uma das espécies originais, origina um alotriplóide estéril (por ser um híbrido e por ser tetraplóide).

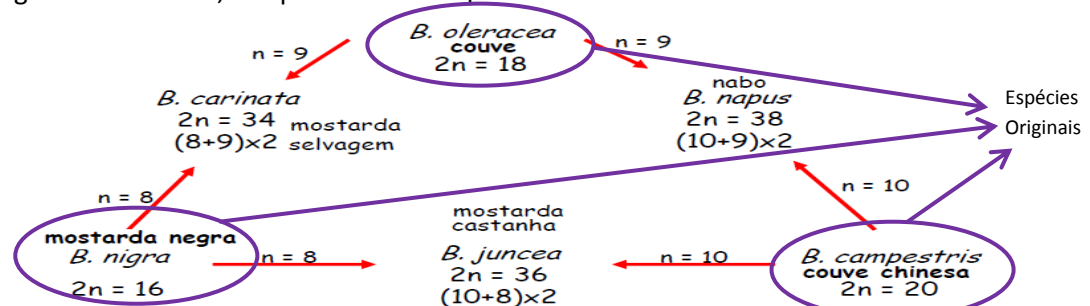
Este novo tipo de ser vivo pode ser bastante rentável.

Especiação – processo evolutivo pela qual as espécies vivas se formam. Pode constituir uma transformação gradual de uma espécie noutra ou pela divisão de uma espécie em duas. Pode ser induzida artificialmente através de cruzamentos seleccionados.

Hibridização celular – fusão de protoplastos.

Genogénese – processo muito raro, no qual existe a possibilidade de produção de seres vivos sem a necessidade da informação genética masculina, ou seja, origina-se um indivíduo apenas a partir da informação genética feminina. Origina seres com um grau de homozigotia elevadíssimo, o que é bastante perigoso para a variabilidade dessas espécies.

Não é nada semelhante ao processo de partenogénese (sem formação de gametas), pois há a formação do gameta feminino que origina as novas fêmeas. A informação provém toda do gameta feminino, o espermatozóide apenas contribui com o centróssoma.



O burro que nasceu de um burro coxo e de uma mãe mula, que por sua vez era filha de um burro e de uma égua (híbrida) deita por terra tudo o que foi estudado sobre a infertilidade dos híbridos inter-específicos.

Neste caso, houve provavelmente uma meiose que conseguiu chegar até ao fim, na híbrida (descendente do cruzamento inter-específico de um burro com uma égua), originando um gameta feminino que só possuía a informação da espécie burro. Esse gameta conseguiu ser fecundado por um espermatozóide de um burro.

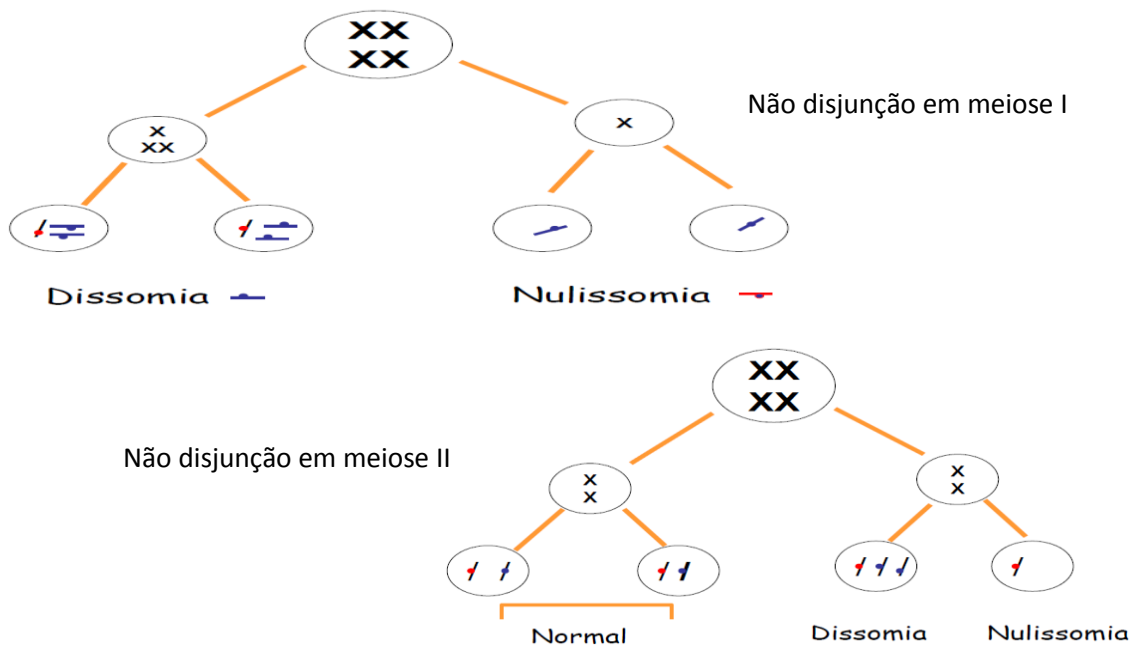
Este fenómeno é algo muitíssimo raro, sendo necessário muita coincidência e sorte para que aconteça.

Variação no Número – Aneuploidia

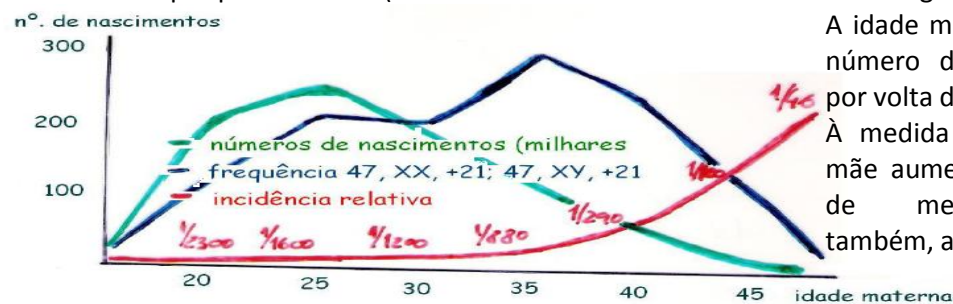
Aneuploidia – mudança de parte do número monoploide herdado (não disjunção).

Cariótipo com cromossomas a mais ou a menos:

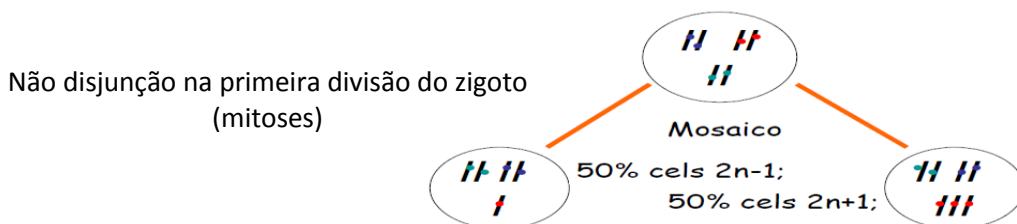
- Nulissomia – $(n-1)$ cromossomas, $(2n-2)$ cromossomas ... perda de um par de cromossomas homólogos;
- Monossomia – $(2n-1)$ cromossomas, $(3n-2)$ cromossomas... perda de um cromossoma;
- Dissomia – $(3n-1)$ cromossomas, $(n+1)$ cromossomas... ;
- Trissomia – $(n+2)$ cromossomas, $(2n+1)$ cromossomas... um cromossoma extra;
- Tetrassomia – $(n+3)$ cromossomas, $(2n+2)$ cromossomas...

Variação no Número – Aneuploidia (Causas)

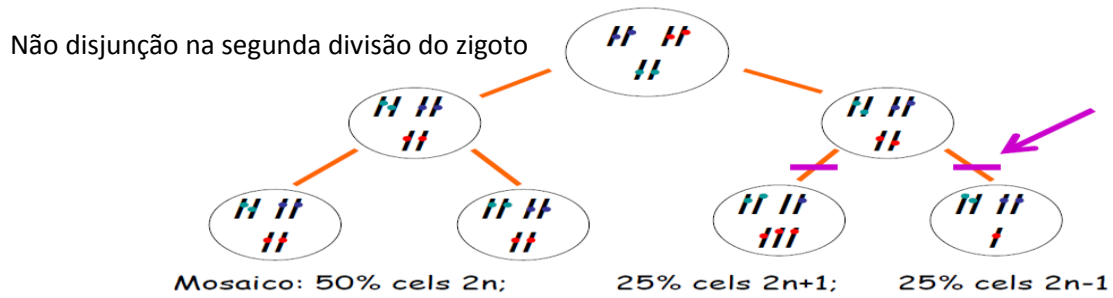
Síndrome de Down – fruto de não disjunção meiótica em meiose I ou meiose II, normalmente por parte da mãe (erros devido aos óvulos serem velhos numa gravidez tardia).



A idade materna com maior número de nascimentos é por volta dos 35 anos. À medida que a idade da mãe aumenta, a frequência de meioses erradas, também, aumenta.



Se a probabilidade das células se dividirem for a mesma, o indivíduo torna-se um mosaico (por vezes a capacidade das células de se dividir fica comprometida).



Estes mosaicos resultam em indivíduos que podem ter uma doença com menor gravidade.

Gâmetas

Trissomia A:

- n (50%);
- n + A (50%) ou n + 2A;
- n - A (muito mais raro).

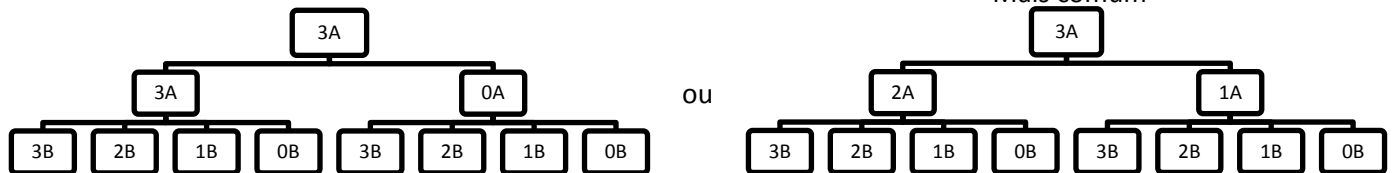
Monossomia A:

- n (50%);
- n - A (50%).

Tetrassomia A:

- n + A (100%) ou n + 3A;
- n - A ou n + 2A;
- n.

Dupla trissomia (A e B):



Variação na Estrutura

Delecção – falta de material genético. Excisão de uma porção de um cromossoma, ou seja, perda no material cromossômico. Estão associadas a grandes incapacidades:

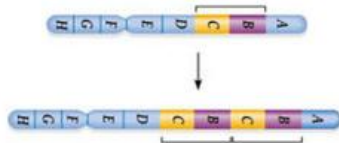
- **Terminal** – perda de material genético, numa das extremidades teloméricas do cromossoma. A extremidade (2) possui bastante instabilidade porque não tem a região cromossômica telomérica característica. O segmento (1) acaba por desaparecer ao longo das divisões celulares porque não tem centrômero e por isso não tem como se ligar ao fuso acromático. Este segmento (1) costuma conter DNA nobre pelo que a sua perda implica o desaparecimento de informação importante. O cromossoma não tem telômero e procura ligar-se a outro material genético (instabilidade).



- **Intersticial** – perda de material genético, no meio de uma sequência cromossômica. O segmento (1) acaba por desaparecer (pelas mesmas razões que o segmento na delecção terminal), se não englobar o centrômero, levando a alterações fenotípicas. Provoca uma função deficiente nos tecidos que contêm este material genético, podendo ditar a infertilidade.



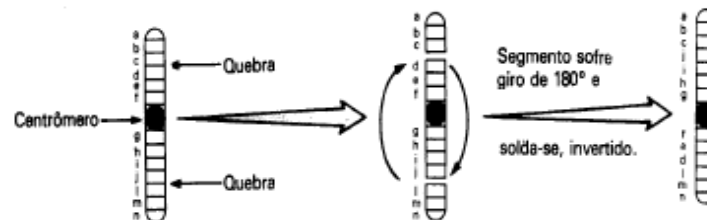
Duplicação – pode ocorrer devido a um erro na Fase S ou no emparelhamento dos cromossomas durante a meiose. Duplicação de uma porção de um cromossoma, ou seja, há repetição de uma porção de cromossoma. Fornecem uma informação genética complementar, potencialmente capaz de assumir novas funções.



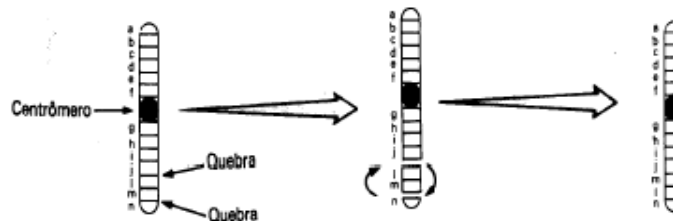
Quanto maior for o número de repetições e a sequência repetida, maior pode ser o grau de gravidade de certa doença.

Inversão – inversão de uma porção de um cromossoma, ou seja, há uma rotação, de um segmento cromossômico, em relação à posição normal, sem alterar a sua localização no cromossoma. Quando a inversão não ocorre a meio de uma sequência de um gene estrutural (zona não codificante), não ocorre nenhuma consequência maléfica, ou seja, o cromossoma continua funcional em termos somáticos. Estas rupturas em genes estruturais são as mais raras. Não há perda nem ganho de material genético.

→ **Pericêntrica** – tipo de inversão que envolve o centrômero. Com este tipo de inversão, há na mesma o emparelhamento das cadeias.

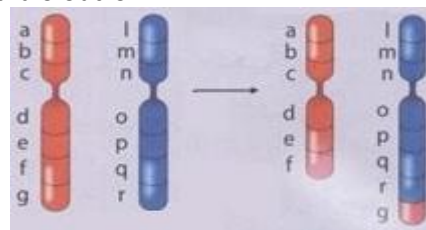


→ **Paracêntrica** – tipo de inversão que não envolve o centrômero. Causa maiores problemas.

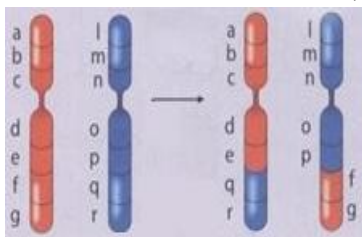


Translocação – troca de uma porção de um cromossoma por outra porção de outro cromossoma. Ocorre entre 2 cromossomas diferentes e não homólogos:

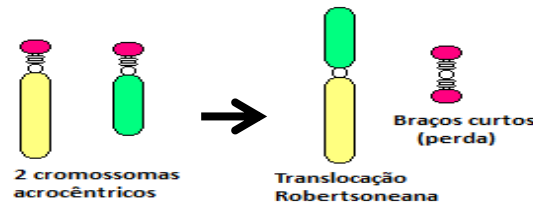
→ **Simple** – translocação em apenas 1 cromossoma. É o mesmo que inserção, de um cromossoma para o outro.



→ **Recíproca** – troca de segmentos entre 2 cromossomas não homólogos, ou seja, de um cromossoma para o outro e desse cromossoma para o primeiro. A sequência translocada pode conter o centrômero (ficando um dos cromossomas com 2 centrômeros e o outro cromossoma sem qualquer cromossoma, após a translocação: este fenómeno cria uma anomalia cromossômica secundária, pois a separação do cromossoma com 2 centrômeros provoca uma deficiência na informação genética das 2 células originadas) ou não conter o centrômero (cada um dos cromossomas fica com 1 centrômero após a translocação).

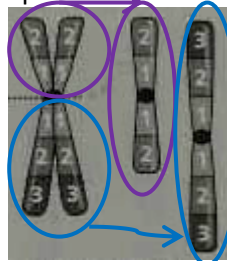


→ **Robertsoniana** – pode estender-se a qualquer espécie, tanto animal como vegetal. Ocorre quando, em cromossomas acrocêntricos, há uma ruptura na região do centrómero, ou acima do mesmo. Estes 2 cromossomas vão, então, sofrer uma tendência para se unir. Ou seja, vai ocorrer a fusão dos braços longos de ambos os cromossomas, sem os braços curtos que se perdem. Esta ruptura não possui precursores fenotípicos, uma vez que os braços curtos não codificam, praticamente, informação e os braços longos continuam a ser transcritos normalmente. No entanto existem repercussões graves a nível meiótico. É suficiente para o equilíbrio genético.

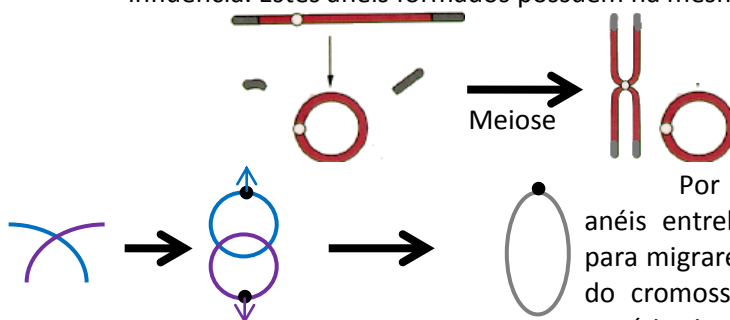


Os braços curtos podem persistir e formar um cromossoma marcador, ou então podem degenerar e desaparecer.

Isocromossoma – ocorre quando existe a duplicação de toda a cromatina, em cromossomas. Há uma divisão do centrómero horizontal, em vez de ser vertical. Esta anomalia pode ocorrer em qualquer tipo de cromossoma, formando-se, no fim, 2 cromossomas metacêntricos, por excelência (1 só dos genes do braço curto e outro só de genes do braço longo). Sem problemas meióticos mas com problemas a nível celular.



Anel – cromossoma com forma de um círculo. É um cromossoma normal no qual, por um motivo qualquer, surge uma ruptura, e as suas extremidades unem-se, ou seja, ocorre a junção de duas partes cromossómicas que sofrem deleções terminais. As implicações dependem do local onde ocorrem as rupturas, ou seja, existem reflexos fenotípicos quando a ruptura ocorre em locais codificantes importantes. Em termos meióticos possui uma grande influência. Estes anéis formados possuem na mesma um centrómero.



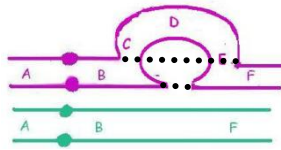
Por vezes, ocorre torção das duas cadeias, formando anéis entrelaçados, que quando se puxam os centrómeros, para migrarem para pólos opostos, ocorre algures uma ruptura do cromossoma, que pode levar a uma perda de material genético importante, e à formação de um supercromossoma.

Importância em Termos Evolutivos

A **inversão** (pericêntrica e paracêntrica) e a **translocação** (simples, recíproca e robertsoniana) são as variações mais importantes a nível evolutivo, pois favorecem a evolução (vantagem evolutiva).

De seguida está a **deleção** (terminal e intersticial) e a **duplicação**, pois a probabilidade de ocorrer um indivíduo de fenótipo normal é muito inferior.

Em último lugar, como variações menos importantes ao nível evolutivo, aparece o **isocromossoma** e o **anel**, pois ambos provocam anomalias na estrutura, as quais podem ser mais ou menos graves, consoante as rupturas que ocorreram.

Variação na Estrutura – Delecção

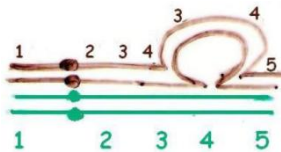
Para que os genes B e F se aproximem, e emparelhem correctamente, a cadeia normal de DNA (verde), tende a formar uma ansa.

Pode ocorrer uma ligação (a tracejado) devido à grande proximidade entre as extremidades das ansas. Estas ligações vão levar à formação de um microcromossoma circular e sem centrómero (CDE), que tende a desaparecer.

Assim, o cromossoma homólogo faz uma ansa para que exista emparelhamento.

A duplicação destes pares de cromossomas (CDE em anel e ABF linear) pode levar à sua duplicação e formação de mais 1 cromossoma de cada um deles.

As ansas também podem formar cromossomas em anel sem centrómero, provocando uma delecção no homólogo.

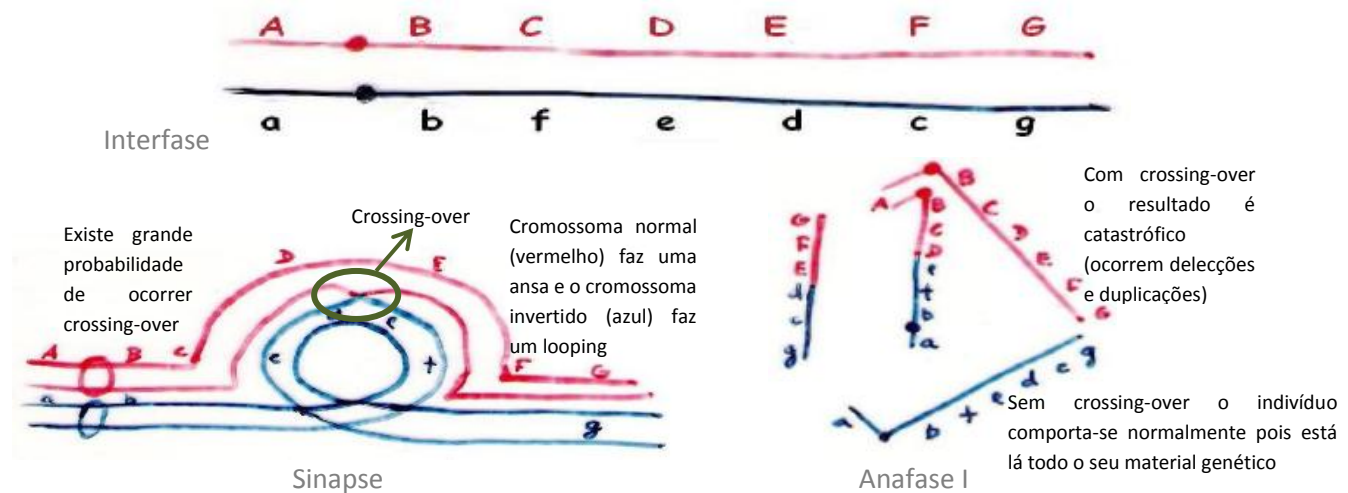
Variação na Estrutura – Duplicação

Este mecanismo é inverso ao mecanismo da delecção, no entanto a predisposição de ambos é semelhante.

Assim, pode formar, na mesma, um microcromossoma (3 4) juntamente com o cromossoma linear (1 2 3 4 5), mas ao contrário do anterior, a perda desse microcromossoma, não provoca implicações, uma vez que os genes perdidos (3 4) deixam uma cópia no cromossoma linear, pois foi duplicado.

Assim, o fragmento duplicado forma a ansa, e se ocorrer a delecção dessa ansa, torna-se uma vantagem selectiva, pois a duplicação é eliminada.

Esta perda constitui uma mais-valia para o cromossoma, pois elimina os genes em duplicado, quase que anulando a variação do cromossoma.

Variação na Estrutura – Inversão Paracêntrica

Segmentos C, D e F revertem por ruptura em dois pontos. O cromossoma sofre por mudanças radicais, de forma a conseguir emparelhar os segmentos correspondentes.

Em termos fenotípicos, são indivíduos normais, mas o grande problema ocorre na meiose. Pois no fim, vão ser obtidos cromossomas muito diversos e anormais, possuindo, por exemplo, 2 centrómeros no mesmo cromossoma, nenhum centrómeros ou com duplicações.

Produtos de um duplo cruzamento (recombinação dupla) numa zona invertida, envolvendo diferentes combinações de cromátides – existem 2 pontos de quiasmata na ansa, logo vão originar cromossomas 100% anormais:

→ Com recombinação dupla entre 2 cromátides:



→ Com dupla recombinação entre 3 cromátides:



→ Com dupla recombinação entre 4 cromátides:



Variação na Estrutura – Inversão Pericêntrica

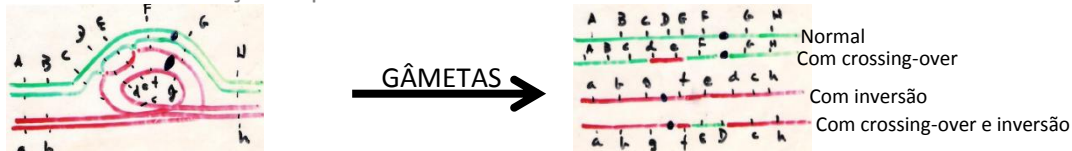
O centrómero aparece na região da ansa. É menos prejudicial que a situação quando o centrómero está fora da ansa / inversão, pois assim não existe o perigo de se formarem cromossomas com 2 centrómeros, na meiose.

A posição do centrómero atenua a gravidade da situação (se todos os cromossomas têm um centrómero cada, o caso é muito menos grave).

Recombinação:



Recombinação dupla:



Variação na Estrutura – Translocação Simples (Inserção)



A origem de uma ansa no gene inserido provoca a origem de uma ansa na sequência que emparelha com esse gene.

Os cromossomas emparelham desta forma pois o gene Y forma uma ansa para que todo o cromossoma normal (azul escuro) consiga emparelhar normalmente. Os genes X e Z vão emparelhar em forma de "V" para o lado oposto do plano.

Esta forma de emparelhamento faz com que seja possível formar um cromossoma em anel apenas com o gene Y.

Este tipo de transcrição não leva, normalmente, à condição de infertilidade mas em alguns casos pode levar a um estado de sub-fertilidade, pois a meiose estagna em determinada fase de divisão, não prosseguindo mais.

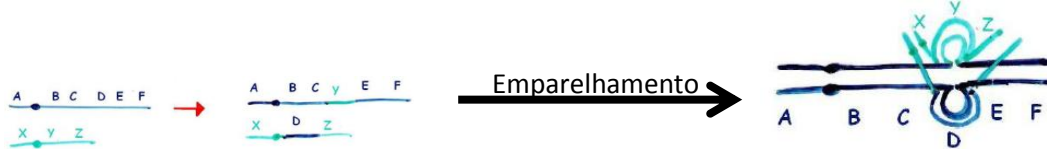
Variação na Estrutura – Translocação Recíproca

O mecanismo é semelhante ao da translocação simples, mas ocorre a formação de 2 ansas.

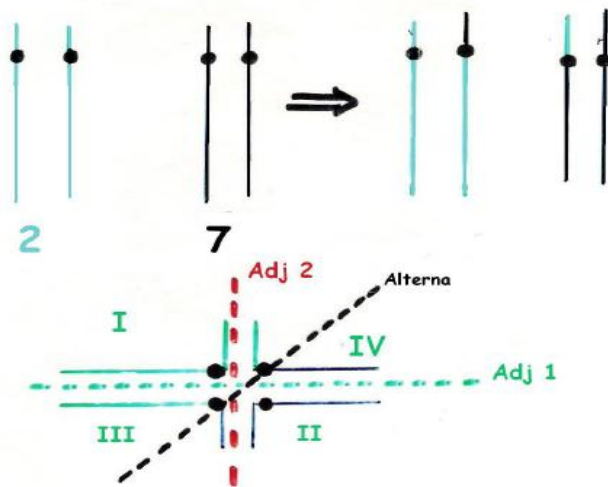
As ansas formam-se devido à necessidade do cromossoma (azul escuro) emparelhar correctamente.

Como no caso anterior, pode originar algumas células com sub-fertilidade, ou seja, originar células que parem a sua meiose, nunca a concluindo. No entanto, em alguns casos (raros) podem levar à infertilidade.

A selecção natural consegue identificar, seleccionar e eliminar estes casos.



Envolvendo os telómeros dos dois pares – ocorre um emparelhamento num sentido perfeito (neste nível), de região a região:



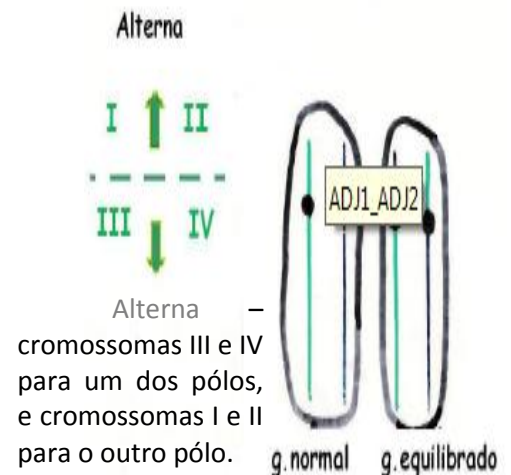
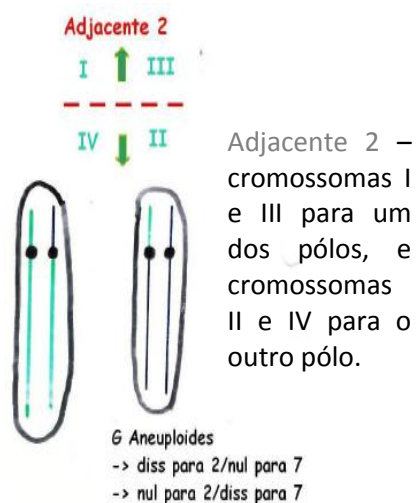
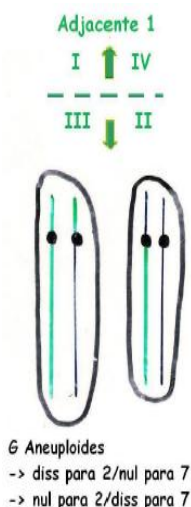
Existem 3 modos de segregação dos cromossomas (para se formarem gametas), para este caso (consoante as linhas a tracejado).

Nas várias células onde ocorre a meiose podem estar a ocorrer as diversas segregações, pois não é obrigatório todas as células (com este erro) em meiose, de um indivíduo, estarem / possuírem o mesmo tipo de segregação.

Assim os 3 tipos de segregação são:

- Adjacente 1 – para pólos opostos vão centrómeros homólogos;
- Adjacente 2 – para o mesmo pólo vão centrómeros homólogos;
- Alternativa – é a melhor segregação pois origina um gameta equilibrado já que tem todo o material genético e apenas a estrutura cromossómica trocada.

Segregações:



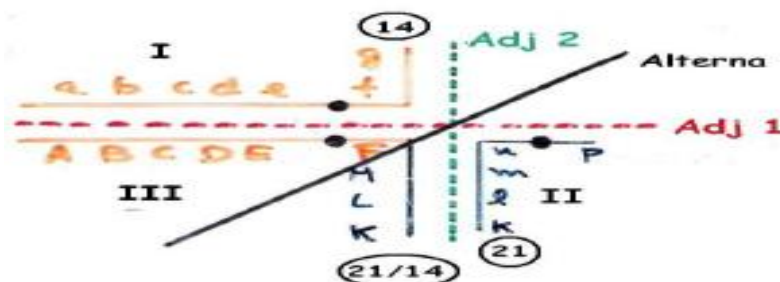
Resumindo:

Gâmetas	Dissomia parcial do 2 Nulissomia parcial do 7	Nulissomia parcial do 2 Dissomia parcial do 7	Dissomia parcial do 2 Nulissomia parcial do 7	Nulissomia parcial do 2 Dissomia parcial do 7	Normal	Equilibrado
	x	x	x	x	x	x
Gâmetas	2 ; 7	2 ; 7	2 ; 7	2 ; 7	2 ; 7	2 ; 7
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Zigotos	Trissomia parcial do 2 Monossomia parcial do 7	Monossomia parcial do 2 Trissomia parcial do 7	Trissomia parcial do 2 Monossomia parcial do 7	Trissomia parcial do 2 Monossomia parcial do 7	Normal	Equilibrado

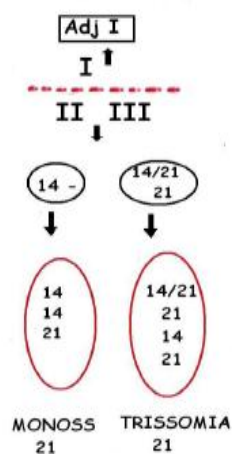
O resultado pode levar à formação de um indivíduo normal, equilibrado ou com alterações cromossômicas, considerando o seu cruzamento com indivíduos normais.

Gâmeta equilibrado – não é um gâmeta normal, mas é um gâmeta que não tem duplicações ou falta de material genético. Ou seja, é uma célula que apresenta um equilíbrio de material genético, que embora fora do local correcto, possui toda a informação genética respectiva. O problema deste gâmeta ocorrerá no início da fase germinativa ou do zigoto.

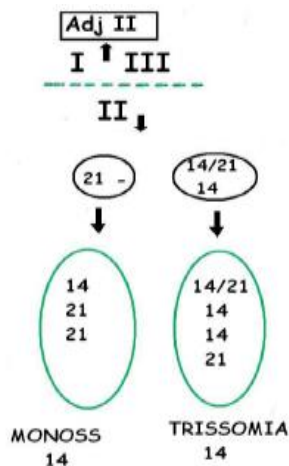
Variação na Estrutura – Translocação Robertsoniana



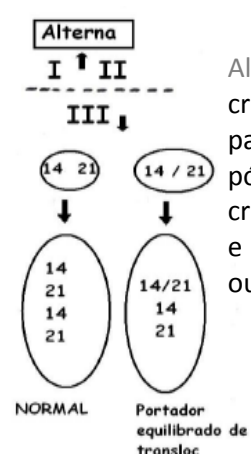
Segregações – segue o mesmo mecanismo que a translocação recíproca. Pode então ocorrer de 3 formas diferentes (adjacente 1, adjacente 2 e alterna):



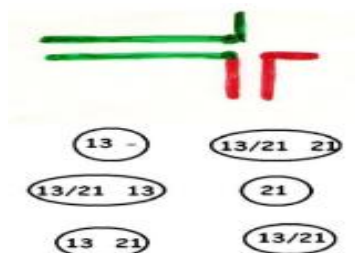
Adjacente 1 – cromossomas II e III para um dos pólos, e cromossoma I para o outro pólo.



Adjacente 2 – cromossomas I e III para um dos pólos, e cromossoma II para o outro pólo.



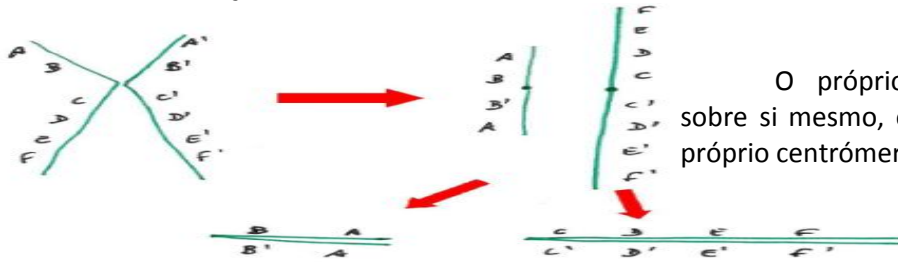
Alterna – cromossoma III para um dos pólos, e cromossomas I e II para o outro pólo.



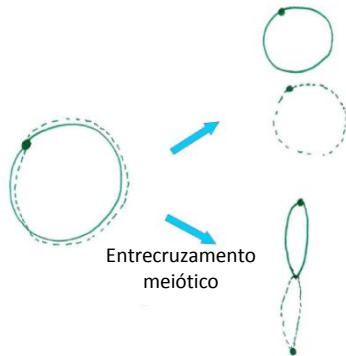
Esta trissomia 21 não é total, pois o que ocorre é a presença de 3 braços longos do cromossoma 21.

Leva a situações inviáveis à vida mas também, a outras situações perfeitamente aceitáveis.

Por definição de translocação robertsoniana, são os braços longos os translocados entre os 2 cromossomas.

Variação na Estrutura – Isocromossoma

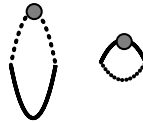
O próprio cromossoma emparelha-se sobre si mesmo, ou seja, dobra-se sobre o seu próprio centrómero e emparelha.

Variação na Estrutura – Anel

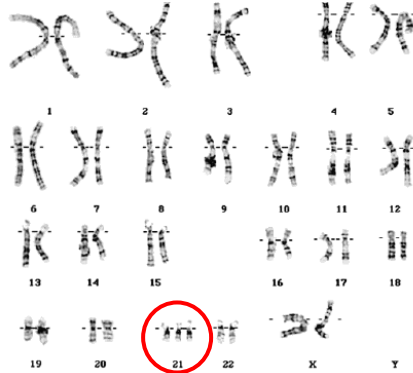
Entrecruzamento
meiótico

Aquando da duplicação do seu material genético e da meiose I, há uma grande predisposição para as cadeias se entrelaçarem, levando a uma ruptura, algures, durante a ascensão do cromossoma para os pólos opostos.

Origina 2 anéis completamente desproporcionais.



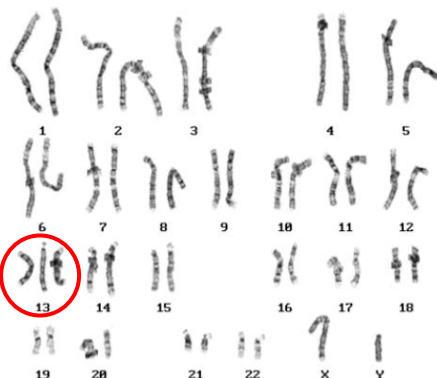
Pode então ocorrer a junção dos 2 anéis rompendo num ponto qualquer, e na anafase ocorrer um ganho de um dos pólos e perda do outro pólo.

CITOGENÉTICA – Organização e Evolução Cromossómicas**Trissomia 21 – Síndrome de Down**

O aparecimento da doença possui uma relação com a idade materna.

Características: diâmetro cerebral Antero posterior diminuído (braquicefalia); fissuras palpebrais oblíquas; distância interpupilar aumentada; estrabismo convergente; implantação baixa das orelhas; língua hipertrofiada; pescoço curto e largo; cardiopatia congénita; pés e mãos curtos e largos / sulco palmar; baixa estatura; baixo QI; os rapazes são estéreis mas as raparigas não.

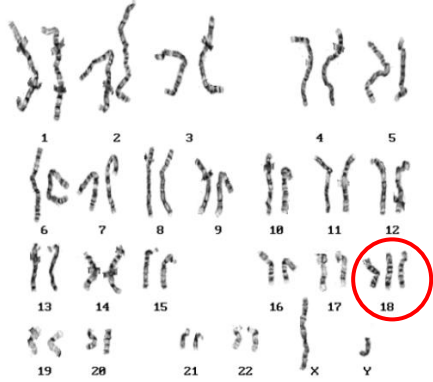
Esperança média de vida menor.

Trissomia 13 – Síndrome de Patau

Incidência de cerca 1/4600 (não conta com os abortamentos).

Características: micocefalia; microftalmia; lábio leporino (esporádica fissura do palato); anomalias oculares; tronco deformado; mãos e dedos flexionados; cardiopatia congénita; malformações renais e cerebrais.

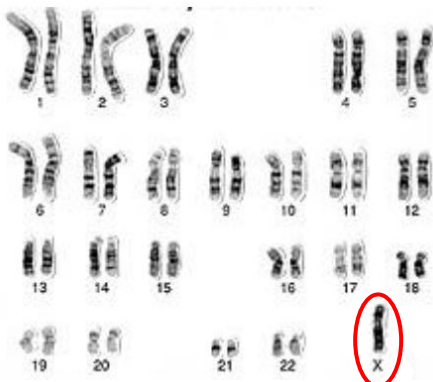
Cerca de 40% dos indivíduos **morrem** entre o primeiro mês e o primeiro ano.

Trissomia 18 – Síndrome de Edwards

Incidência de cerca 1/6700.

Características: baixo peso (inferior a 2,5 quilogramas); implantação baixa das orelhas; micro-retrognatismo; crânio alongado no sentido antero-posterior; pele laxa e abundante no pescoço; pélvis estreita; cardiopatia congénita; malformações renais; atraso mental marcado.

Cerca de 70% dos indivíduos morrem entre o primeiro e o décimo anos, pelo que possui uma elevada mortalidade.

Monossomia X – Síndrome de Turner

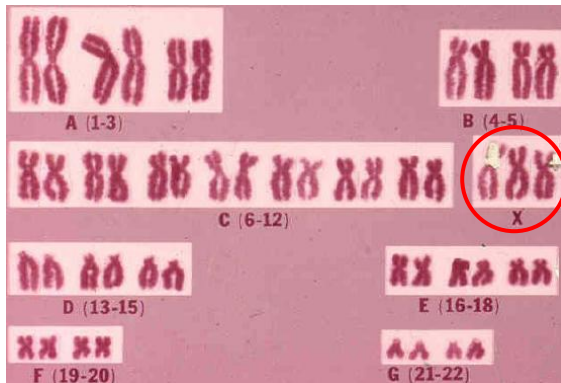
Única monossomia compatível com a vida.

Incidência de cerca 0,3/1000.

Características: “meninas eternas”; atraso no desenvolvimento (permanece infantil); *pterigium coli* (prega no pescoço); tórax alargado; amenorreia primária (não tem ovários mas tem útero, logo são estéreis); ausência de caracteres sexuais secundários; órgãos genitais internos imaturos e sem epitélio germinativo.

Como possuem útero, podem ter filhos não biológicos por implantação de um embrião.

Existem tratamentos para alguns casos, como administrar suplementos hormonais o que permite o desenvolvimento de caracteres sexuais.

Trissomia X

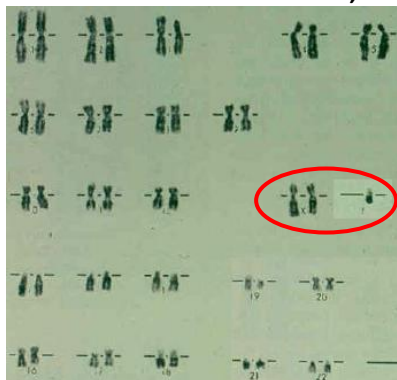
Anomalias nos cromossomas sexuais são bem toleradas nos mamíferos.

Incidência de cerca 1/1000.

Por vezes, as mulheres formadas podem ser férteis.

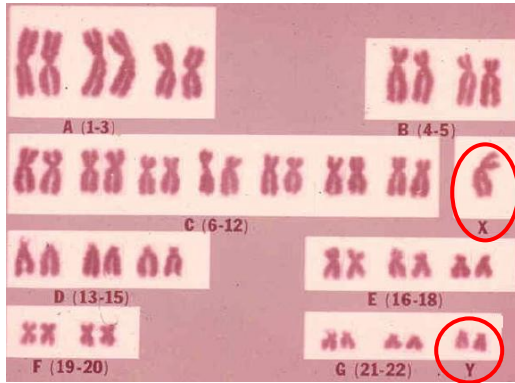
Características: amenorreia secundária; hipoplasia dos lábios vaginais; frequentes alterações neuro-psíquicas; ciclos menstruais irregulares.

Por vezes são férteis tendo grande probabilidade de terem filhos normais.

Síndrome de Klinefelter – 47, XXY

Incidência de cerca 1,4/1000.

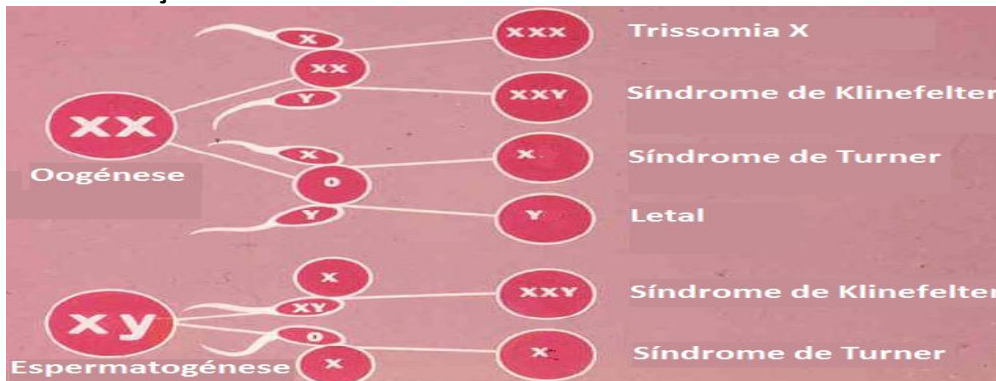
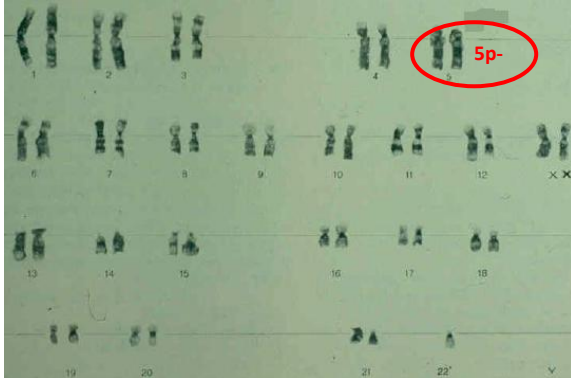
Características: hábito eunucóide; ginecomastia; hipogonadismo (gónadas pequenas) que afecta os caracteres sexuais secundários e a função testicular; pêlo púbico de implantação horizontal; azoospermia em mais de 95% dos casos; diminuição dos níveis de testosterona; elevação dos níveis das hormonas folículo-estimulantes (FSH) e luteoestimulantes (LH); indivíduos estéreis mas não impotentes que apresentam uma mistura de características masculinas e femininas.

47, XYY

Síndrome da super-masculinidade.

Incidência de cerca 1/2000.

Características: estatura elevada; ginecomastia; sub-fertilidade; pênis de dimensões reduzidas; por vezes ligeiro atraso mental; indivíduos com comportamentos agressivos.

Origem das Alterações Sexuais**Síndrome do Miar do Gato – Ausência do Braço Curto**

Delecção de uma região do braço curto do cromossoma 5.

Os recém nascidos possuem um choro semelhante ao mio de um gato (daí o nome da doença).

Origina crianças com bastantes defeitos de qualidade de vida.

Características: baixo peso ao nascimento; microcefalia; estrabismo; atraso psicomotor marcado; possível associação de malformações renais e cardíacas.

18 p- (Delecção do Braço Curto do Cromossoma 18)

Ocorre a delecção de uma região do braço curto do cromossoma 18.

Características: atraso mental acentuado; microcefalia; lábio leporino (esta fenda labial por vezes pode passar para o palato originando uma fenda palatina); pavilhões auriculares mal-formados.

X Frágil

Origina-se devido a uma constrição na parte distal (Xq27), ou seja, ocorre um estrangulamento na parte distal do braço longo do cromossoma X.

Características: baixo QI (50-60); mulheres com macro-orquidia; testa larga; palato muito arqueado.

CITOGÉNÉTICA – Reprodução Humana Assistida

Estudo do Casal

Em qualquer dificuldade de fertilidade que exista num casal, deve-se colocar a hipótese de se tratar de um problema cromossómico, num ou em ambos os indivíduos do casal, logo o estudo do seu cariótipo é importante para a despistagem de anomalias cromossómicas que causem essa mesma infertilidade.

Para além deste estudo do cariótipo, existem outros com base citogenética que averiguam a causa de tais problemas férteis.

Diagnóstico Genético Pré-Implantação (DGPI)

É um estudo de um conjunto de células do embrião, após a fertilização *in vitro*, e antes da implantação no útero, para se concluir se pode ser implantado, ou não. O conjunto de células é implantado se não existir qualquer problema cromossómico.

Assim, é realizado no início da gestação, quando ainda não se formou o feto, o que permite averiguar se há, ou não, alguma anomalia cromossómica nesse conjunto de células, sendo uma alternativa ao diagnóstico pré-natal.

Isto apenas se faz quando o casal é considerado de risco. Por isso, considera-se que o casal já foi estudado e esta análise faz-se mediante a sua condição. Principalmente, nos casos onde existe um risco de descendência com doença genética:

- Membro da família afectado / portador;
- Descendente afectado;
- Abortamento recorrente – pode ser devido a anomalias cromossómicas muito grandes e inviáveis à vida. Este acontecimento, na mulher, aparece como um período menstrual;
- Mulher com idade superior a 35 anos – considera-se que há uma probabilidade acrescida de ocorrer a não-disjunção de cromossomas, na meiose. Esta justificação é polémica;
- Três ou mais insucessos de fertilização *in vitro* – discutível pois o insucesso pode ser devido a erros humanos de implantação.

As células da granulosa, por possuírem núcleo, podem intervir no diagnóstico genético de pré-implantação.

Processo de Fertilização *In Vitro*

São necessários exames preliminares ao casal.

Ocorre a estimulação de ovócitos, num número superior a nove.

ICSI – não contaminação.

Biópsia

Estudo do primeiro e segundo glóbulos polares.

O estudo dos glóbulos polares apenas dá informação sobre a mãe e nunca sobre o pai, mas consegue-se aperceber o que se passa dentro do oócito (considerado quase como um espelho do interior do oócito).

A *biópsia* é feita a partir de um a dois blastómeros (embriões com 8 a 12 células), ao terceiro dia, ou então a partir de células da trofoectoderme de blastocistos, ao quinto dia.

Abertura da Zona Pelúcida

É necessário que exista um buraco na zona pelúcida para que a pipeta penetre dentro do oócito e recolha as células. Para tal, utilizam-se algumas técnicas / soluções que dissolvem a região em contacto:

- Solução ácida de Tyrod (pH 2,2);
- Laser;
- Dissecção parcial – microcirurgia. Pegam-se em pipetas para segurar o oócito, e com muita calma e vagar vão sendo retiradas células, sucessivamente, até se fazer um buraco na camada.

Para que esta abertura seja feita, os oócitos necessitam de se encontrar num meio especial, sem cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+})

Diagnóstico Unicelular

A célula retirada é a que vai ser estudada através de métodos citogenéticos.

FISH - técnica citogenética utilizada para detectar e localizar a presença ou ausência de uma sequência de DNA específica ou um cromossoma.

Possibilita o estudo a determinados cromossomas “problemáticos” através da hibridização *in situ*. Permite identificar anomalias cromossómicas:

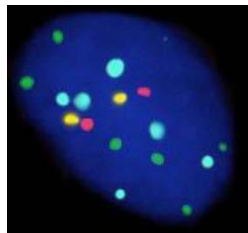
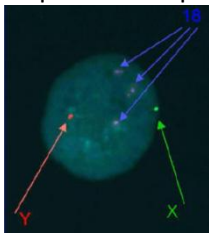
- Número;
- Translocações (recíprocas, inserções e robertsoneanas);
- Reconhecimento de XX e XY – em Portugal é ilegal a utilização deste método para serem implantadas as células apenas de um dos sexos por decisão de determinado casal. Este apenas se realiza no caso de existir na família alguma doença que esteja associada a qualquer um dos sexos.

São estudados, principalmente, os cromossomas 13, 16, 18, X, Y.

Sondas:

- Sequências repetitivas ou sondas α -satélite;
- Sondas *loci* específicas;
- Pintura cromossómica.

Através das cores originadas, sabe-se o número de cromossomas iguais, existente naquele cariótipo.



Existem 6 cópias do cromossoma azul, 5 cópias do cromossoma verde, e 2 cópias dos cromossomas a vermelho e a amarelo, o que se traduz em graves erros cromossómicos.

As 5 e 6 cópias do mesmo cromossoma provavelmente serão devidas a uma não-disjunção mitótica pós-zigóticas.

Transferência de Embriões

Ocorre no quarto ou quinto dia após a punção folicular.

Taxa de gravidez clínica em DGPI – 22,4 %.

GENÉTICA BIOQUÍMICA – Erros Inatos de Metabolismo

Genética Bioquímica

Capítulo importante que estuda processos bioquímicos dos metabolismos celulares e os relaciona com defeitos bioquímicos, que se traduzem na transcrição.

Constitui a ponte com a genética molecular.

Erros Inatos de Metabolismo

Corresponde a uma incapacidade hereditária de realizar uma determinada tarefa metabólica. É produzida por mutações recessivas.

Erros inatos – erros que nascem com uma pessoa e que são inerentes ao metabolismo.

GENÉTICA BIOQUÍMICA – Hipótese um Gene – uma Enzima

Hipótese “um Gene – uma Enzima”

Trabalhos com *Neurospora*. Mutantes dependentes da adição de arginina:

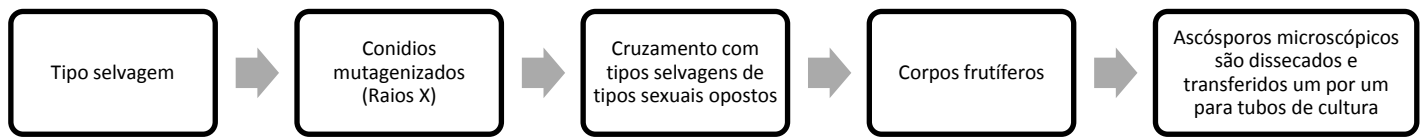
- Os processos bioquímicos, que ocorrem no organismo, são geneticamente determinados;
- As vias bioquímicas podem ser analisadas como um conjunto de passos discretos, cada um mediado por uma enzima;
- Cada enzima é normalmente codificada por um gene.

“um gene – uma enzima” – um gene é responsável pela produção de uma enzima. Esta hipótese, considerada por 2 biólogos (Beadle e Tatum) chegou a uma conclusão, numa altura onde a genética já estava estabelecida.

Concluiu-se, então, que um gene codificava uma enzima, e sem esta enzima não seriam iniciados determinados processos bioquímicos.

Na actualidade, sabe-se que não é bem assim, mas é muito semelhante a essa hipótese, pois apesar de uma enzima ser um polipeptídeo, existem enzimas que são codificadas por vários genes e não apenas um.

Logo foi desenvolvida a hipótese “um gene – um polipeptídeo”.

Experiência Elaborada por Beadle e Tatum

- Tubos de meio completo – inoculados com um único ascósporo.
- Tubos de meio mínimo (com poucos nutrientes) – sem crescimento. Identificação de um mutante nutricional.

Concluíram que haveria algo no tubo de meio completo favorável ao desenvolvimento do fungo.

Os esporos crescidos em meio completo são então inoculados em meio mínimo, com diferentes meios suplementares:

- Meio mínimo – controlo.
- Meio mínimo com aminoácidos – com crescimento. Obtiveram-se resultados importantes, pois nuns tubos havia o desenvolvimento do fungos, mas noutros tubos, isso não se verificava.
- Meio mínimo com vitaminas – sem crescimento;
- Meio completo – controlo.

Para se averiguar que aminoácido intervinha no crescimento do fungo, foram feitos vários testes de meio mínimo com 1 aminoácido de cada vez (glicina, alzinina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, prolina, arginina, lisina, ácido glutâmico, ácido aspártico, glutamina, asparagina, serina, treonina, cisteína).

A repetição desta experiência n vezes levou à conclusão de que há uma dependência da adição de arginina:

- ARG1 – desenvolvimento com ARG, CITR ou ORN;
- ARG2 – desenvolvimento com ARG ou CITR;
- ARG3 – desenvolvimento com ARG.

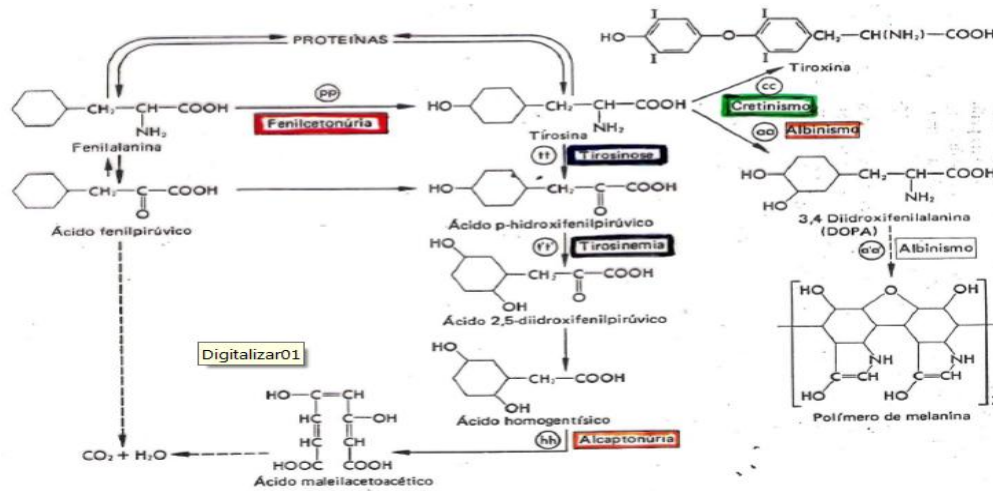


- ARG1 – deficiência da enzima X;
- ARG2 – deficiência da enzima Y;
- ARG3 – deficiência da enzima Z.

Esta sequência metabólica foi a razão de terem chegado à hipótese “um gene – uma enzima”.

GENÉTICA BIOQUÍMICA – Cadeias Metabólicas

Processo Metabólico



Num processo metabólico tão pequeno podem estar associados diversos erros, que levam a várias alterações fenotípicas.

Estrutura das Proteínas

Proteínas – sequências de aminoácidos com uma estrutura muito mais complexa e diversificada que o DNA, ou seja, são polímeros de aminoácidos em cadeia linear.

Diferentes níveis da estrutura de uma proteína:

- **Estrutura primária** – sequência linear de aminoácidos, ou seja, é a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica.
- **Estrutura secundária** – formação de cadeias alfa e beta através de pontes de hidrogénio. Há uma organização localizada em partes da cadeia polipeptídica, estabilizada por pontes de hidrogénio.
- **Estrutura terciária** – estrutura tridimensional. A conformação global da cadeia polipeptídica (arranjo tridimensional) é estabilizada por pontes de hidrogénio, ligações iónicas, interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto.
- **Estrutura quaternária** – ligação de várias cadeias polipeptídicas. O número e posição das subunidades de proteínas multiméricas são estabilizados por pontes de hidrogénio, ligações iónicas, interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto.

Modelo da Relação Genótipo – Fenótipo

As características de um organismo são determinadas pelo fenótipo das suas partes, que por sua vez são determinadas pelo fenótipo das células que o constituem.

O fenótipo de uma célula é determinado pelos processos bioquímicos controlados por enzimas que catalisam as reacções metabólicas.

As funções de uma enzima dependem da sua estrutura tridimensional, que por sua vez depende da sequência linear dos aminoácidos.

As enzimas presentes numa célula, bem como as proteínas estruturais, são determinadas pelo genótipo dessa célula.

Os genes determinam a sequência linear de aminoácidos na cadeia polipeptídica e, consequentemente, da proteína.

Assim, os genes determinam os fenótipos, a qualquer nível.

Proteínas

Isoenzimas – formas similares e funcionais de enzimas, que podem ser produzidas por *loci* diferentes ou por alelos diferentes do mesmo locus.

Aloenzimas – um subconjunto das isoenzimas, que são variantes de polipeptídeos representando diferentes alternativas alélicas do mesmo locus. São duas proteínas do mesmo locus que produzem enzimas diferentes, mas com a mesma função (exemplo: peptidases (PEP), esterases (EST), adenosina deaminase (ADA), creatinina quinase (CK), isocitrato desidrogenase (IDH), etc).

Proteínas plasmáticas e dos glóbulos vermelhos (exemplo: albumina (ALB), transferrina (TF), α -hemoglobina, β -hemoglobina, etc).

Proteínas monoméricas – possui uma cadeia polipeptídica. Considera-se apenas 1 subunidade.

Proteínas multiméricas – possui mais que uma cadeia polipeptídica. Consideram-se 2 subunidades.

Subunidades:

- **Homoméricas** – idênticas na sequência de aminoácidos;
- **Heteroméricas** – não idênticas na sequência de aminoácidos.

	Monómero	Dímero	Trímero	Tetrâmero
Homómero	L1	L1 L1	L1 L1 L1	L1 L1 L1 L1
Heterómero	-	L1 L2	L1 L1 L2 L1 L2 L2	L1 L1 L1 L2 L1 L1 L2 L2 L1 L2 L2 L2
Homómero	L2	L2 L2	L2 L2 L2	L2 L2 L2 L2













Electroforese

Electroforese – método de separação baseado nas diferenças de carga.

Electroforese de proteínas – utilizado na classificação dos aminoácidos:

- **Hidrofóbicos** – pouco solúveis, não têm grupos polares;
- **Polares** – possuem grupos polares, com elevada solubilidade:
 - **Neutros** – não são ionizáveis;
 - **Positivos** – comportam-se como bases e são ionizáveis, podendo ficar carregados positivamente (lisina e arginina, histidina);
 - **Negativos** – comportam-se como ácidos e são ionizáveis, podendo ficar negativamente carregados (ácido aspártico, ácido glutâmico).

Electroforese de Proteínas – Método Convencional

	Homozigótico	Heterozigótico	Homozigótico
Monómero			
Dímero			
Trímero			
Tetrâmero			

Geralmente realizadas em matriz de amido ou agarose.

Sistemas electroforéticos contínuos, a pH constante.

Por vezes, apresentam pouca resolução nas bandas dos diferentes alelos, principalmente quando a diferença de carga entre eles é muito pequena.

As bandas difundem-se e ficam arredondadas.

← Perfis electroforéticos

Electroforese de Proteínas – Focagem Isoeléctrica

Método altamente resolvente no qual as proteínas são separadas na presença de um gradiente de pH.

As proteínas migram de acordo com o seu ponto isoeléctrico (PI).

Baseada na utilização de substâncias sintéticas de carácter anfotérico que se designam por anfólitos. Os anfólitos diferem muito ligeiramente no seu ponto isoeléctrico.

Matriz de separação em gel (poliacrilamida ou agarose).

Os anfólitos criam um gradiente de pH no gel.

Utilizam-se soluções de eléctrodos (ácido para o ânodo e base para o cátodo).

Permite a separação de alelos com diferenças muito pequenas de pH, até 0,02 unidades de pH.

Métodos de Detecção

Directos – coloração de proteínas.

Indirectos – detecção funcional, imunológico ou por marcadores (radioactivos, fluorescentes, fosforescentes).

Hemoglobina

Possui 4 cadeias polipeptídicas: 2 cadeias α de 141 aminoácidos e 2 cadeias β de 146 de aminoácidos, codificadas por *loci* diferentes (cadeias α codificadas no cromossoma 16 e cadeias β codificadas no cromossoma 11).

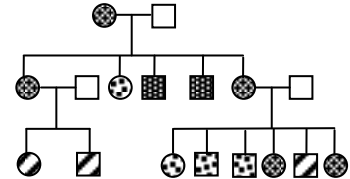
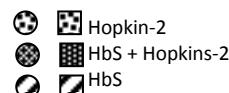
Hemoglobina A – na posição 6 da cadeia β existe ácido glutâmico.

Hemoglobina B – na posição 6 da cadeia β existe valina (causa da anemia falciforme).

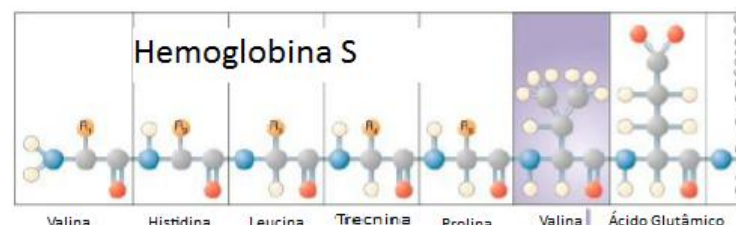
Segregação do tipo mendeliano:

→ HbS – anomalia na cadeia β ;

→ Hopkins-2 – anomalia na cadeia α .



Alteração aminoacídica envolvida na formação da hemoglobina S, no Homem, responsável pela anemia falciforme (posição 6 da cadeia β):



Algumas substituições aminoacídicas encontradas na hemoglobina humana. Cada mutação, que resulta na mudança do aminoácido indicado, provoca uma doença.

Posição do aminoácido	- 2 -	16 -	43 -	67 -	87 -	132 -	143
Normal	His	Gly	Glu	Val	Thr	Lys	His
Tokuchi	Tyr						
Baltimore		Asp					
Galveston			Ala				
Milwaukee				Glu			
Woolwich						Gln	
Kenwood							Asp

Arquitectura das proteínas – chave da função do gene.

Mutação – substituição de um ou mais aminoácidos:

- Proteína não funcional;
- Proteína funcional.

GENÉTICA BIOQUÍMICA – Colinearidade entre Gene e Proteína

Colinearidade do Gene e Proteína

A estrutura das proteínas está codificada na sequência linear de nucleotídeos no DNA.

De facto:

- a alteração de um par de nucleotídeos é responsável pela modificação de um aminoácido na proteína;
- a recombinação intragénica (seja a nível de intrões ou exões) pode também levar à modificação da estrutura da proteína.

Interpretação Molecular de uma Doença Condicionada por um Gene Dominante

Gene A – proteína anormal e tóxica.

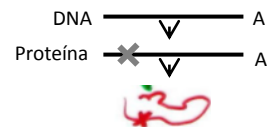
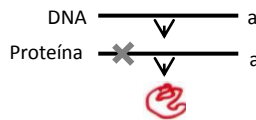
Gene a – proteína normal.

- Estrutura normal com tendência à deposição em certos órgãos :

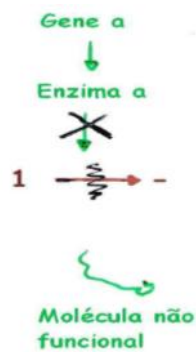
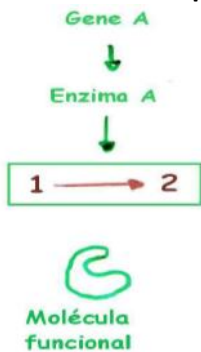
- AA e Aa – deposição.

- Estrutura normal :

- aa – não deposição.



Interpretação Molecular de uma Doença Condicionada por um Gene Recessivo



AA



Aa



aa



Fenótipo normal
(a reacção dá-se)

Fenótipo anormal
(a reacção não se dá)

GENÉTICA MOLECULAR – Estrutura e Organização do Material Genético

Electroforese

As diferentes mobilidades electroforéticas de uma determinada proteína podem ser explicadas através de mecanismos genéticos, isto é, por mutações (formas alélicas do mesmo gene).


A **electroforese** possibilitou o conhecimento da variabilidade e da diferenciação genética, mesmo da que não se traduzia em alterações visíveis do fenótipo (variabilidade neutral). Assim, os organismos podem ser considerados mais variáveis do que inicialmente se acreditava.

Através da **electroforese de proteínas** (genética bioquímica) iniciaram-se os primeiros trabalhos de diferenciação genética, relações filogenéticas, genética populacional, genética forense, etc...

Polimorfismo, frequências alélicas e frequências genotípicas:

→ Representação esquemática da separação electroforética de uma proteína com 2 alelos comuns, A e B.

→ AA, AB e BB correspondem aos genótipos observados nos 10 indivíduos estudados.


→ $f(AA) = 4$;
→ $f(AB) = 4$;
→ $f(BB) = 2$.

Da leitura deste gel, podem ser determinadas as frequências genotípicas e alélicas:

Frequências genotípicas:

$$\rightarrow f(AA) = \frac{4}{10} = 0,4 ;$$

$$\rightarrow f(AB) = \frac{4}{10} = 0,4 ;$$

$$\rightarrow f(BB) = \frac{2}{10} = 0,2 .$$

Frequências alélicas:

$$\rightarrow p(\text{frequência de A}) = 4 \times 2 + \frac{4}{20} = 0,6 ;$$

$$\rightarrow q(\text{frequência de B}) = 2 \times 2 + \frac{4}{20} = 0,4 .$$

A **electroforese** permitiu realizar estudos sobre os recursos genéticos animais e vegetais, possibilitando a análise de vários loci, localizadas em diferentes cromossomas.

No entanto, a variação genética que é detectada pela análise das proteínas representa apenas uma pequena proporção da realmente existente nas espécies, devido: à maioria dos aminoácidos serem neutros; a mutações que não provocam substituições de aminoácidos; e a variações para o mesmo aminoácido.

Para além disso, existe uma certa dificuldade na obtenção e preservação das amostras e na obtenção de técnicas padronizadas em diferentes laboratórios.

Bases Moleculares da Hereditariedade

O suporte material que contém os genes (material genético) deveria apresentar um conjunto importante de propriedades:

- Replicação – perpetuação do material genético;
- Armazenamento de informação – através de uma linguagem e léxico químicos que funcionassem como uma reposição de todas as características hereditárias
- Expressão da informação – base do conceito “fluxo de informação” dentro da célula;
- Alteração mutacional – fonte da variabilidade inter-individual.

Genes

Os genes ao longo da história:

- 1866 – Mendel propõe a existência de “factores de hereditariedade”.
- 1902 – Sutton relaciona os factores de Mendel com os cromossomas.
- 1909 – Ludvig aplica o termo “genes” pela primeira vez referindo-se aos factores de hereditariedade.

Os genes estão localizados nos cromossomas, os quais possuem como componentes estruturais, proteínas e DNA.

Definição possível de gene – unidade física, funcional e básica da hereditariedade, que contém e transfere informação de geração para geração.

Molecularmente, e numa aproximação simples, pode ser considerada como uma sequência de nucleótidos que codifica uma proteína ou um RNA.

DNA como Suporte da Informação Genética

Os genes considerados os “factores hereditários” descritos por Mendel que estavam associados a caracteres específicos, mas cuja natureza física era desconhecida (em 1953).

A teoria um gene – uma enzima, postulava que os genes controlavam a estrutura das proteínas. As investigações de Griffith e Avery apontavam para o facto de o DNA ser o material genético.

Todas as experiências demonstravam que as células bacterianas que expressavam um determinado fenótipo podiam ser transformadas em células com outro fenótipo e que o agente transformador era o DNA.

Assim, como conclusão, averigua-se que o material genético é o DNA.

Estrutura do DNA

A descoberta da estrutura em dupla hélice:

→ Chargaff – conclui que no DNA, o total de timina era sempre igual ao total de adenina, e o total de citosina era sempre igual ao de guanina, no entanto a quantidade de adenina com timina, não era igual à guanina com citosina, e a razão variava de espécie para espécie.

→ Rosalind Franklin – obteve fotos raio-X de DNA, que mostravam o DNA como uma molécula longa e helicoidal.

Os dados de raios X mostravam que o DNA era uma molécula longa e helicoidal (Franklin). No entanto, dos trabalho de Chargaff conclui-se que:

→ O total de nucleótidos pirimidina (timina e citosina) era sempre igual ao total de nucleótidos purina (adenina e guanina), em todos os organismos estudados, apesar de a razão variar de organismo para organismo.

→ O total de timina era sempre igual ao total de adenina, e o total d citosina era sempre igual ao de guanina. No entanto, a quantidade de adenina mais timina não é necessariamente igual a guanina mais citosina e esta razão variava de espécie para espécie.

Assim:

→ $Timina + Citosina = Adenina + Guanina$;

→ $Adenina + Timina \neq Guanina + Citosina$;

→ $Adenina = Timina$ e $Guanina = Citosina$.

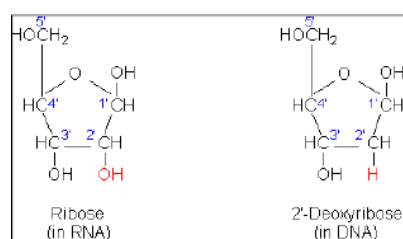
Cada cadeia de DNA é um longo polímero. Os monómeros são os nucleótidos. Nas cadeias anti-paralelas existe complementaridade de bases.

Nucleótidos – constituídos por uma pentose, uma base e um grupo fosfato. No DNA ou RNA a pentose está associada a um só fosfato, no entanto os nucleótidos celulares livres podem conter 2 / 3 fosfatos (ADP, ATP...).

→ Nucleosídeo = Base + Pentose;

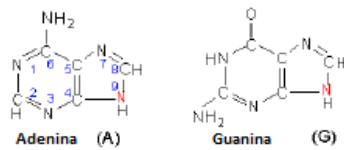
→ Nucleótido = Nucleosídeo + Fosfato.

Pentose:

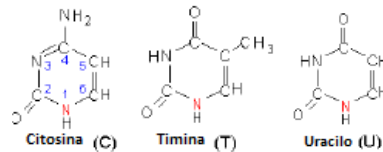


Bases:

→ Purinas – 2 anéis:

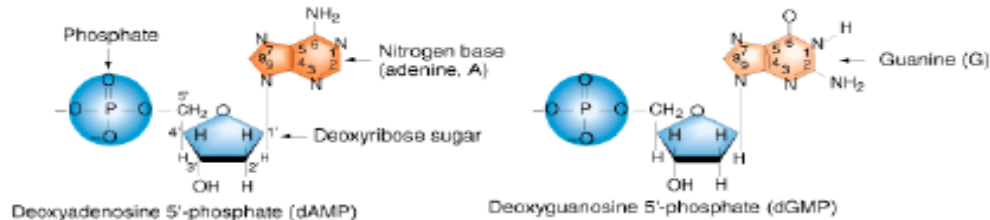


Pirimidinas – 1 anel:

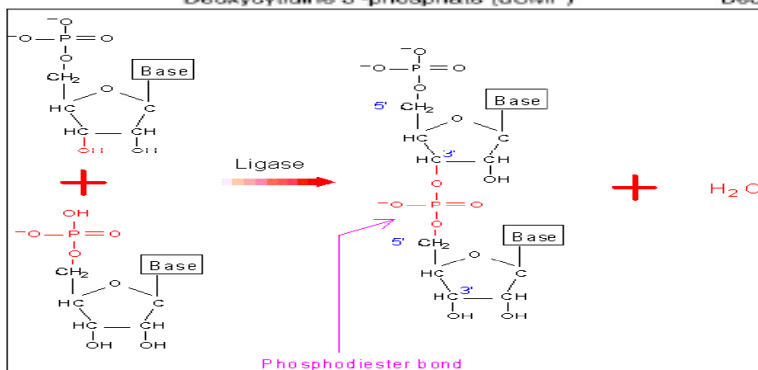
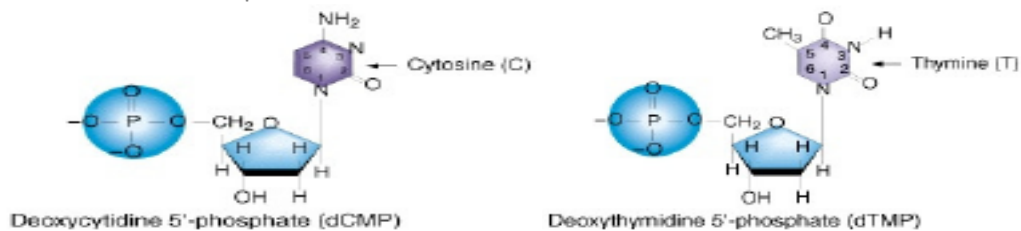


Nucleótidos:

→ Nucleótidos purinas – 2 anéis:



→ Nucleótidos pirimidinas – 1 anel:



Cadeia de ácidos nucleicos – numa cadeia, 2 nucleótidos estão unidos por uma ligação fosfodiéster.

Uma molécula de DNA possui 2 cadeias unidas por pontes de hidrogénio entre bases.

As cadeias são antiparalelas, logo têm polaridade oposta.

As cadeias têm orientação / polaridade:

- Extremidade 5' – grupo fosfato (PO₄) livre;
- Extremidade 3' – grupo hidroxil (OH) livre.

Regras de emparelhamento entre bases determinam que as duas cadeias sejam complementares. Adenina e timina ligam-se segundo 2 pontes de hidrogénio, enquanto guanina e citosina ligam-se através de 3 pontes de hidrogénio. Baseando-se nestas pistas, Watson e Crick propuseram uma estrutura de dupla hélice para o DNA:

- Cada hélice é uma cadeia de nucleotídeos ligados por pontes fosfodiésteres, nos quais o grupo fosfato forma uma ponte com o grupo hidróxido (OH).
- Cada cadeia tem uma polaridade: uma extremidade 5' do grupo fosfato e a outra 3' do grupo hidróxido.
- As cadeias da hélice de DNA são complementares e estão unidas por ligações de pontes de hidrogénio entre as bases. As ligações são muito específicas e apenas existem entre: adenina – timina e entre guanina – citosina (mais fortes por terem as 3 pontes de hidrogénio).

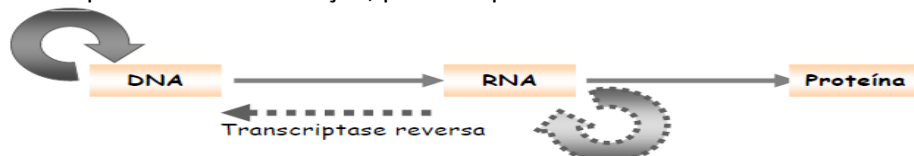
Dogma Central da Biologia Molecular



O diagrama (proposto por Crick) sumaria o processo básico de transferência unidireccional de informação numa célula. O fluxo de informação DNA → proteína, não tem retorno, pois o código de DNA é convertido em proteína mas não pode ser desconvertido.

Algumas descobertas posteriores não coincidiram com este Dogma:

- O RNA pode sofrer replicação em alguns vírus e plantas;
- O RNA viral, através de uma enzima denominada **transcriptase reversa**, pode ser transcrito em DNA;
- O DNA pode directamente traduzir proteínas específicas sem passar pelo processo de transcrição, porém o processo ainda não está bem claro.

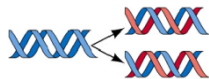


Os retrovírus (HIV) usam a enzima transcriptase reversa para, dentro de uma célula hospedeira, sintetizar DNA tendo como molde o seu próprio material genético – RNA.

O RNA ultrapassa muito o papel de mero intermediário que sugeria a formulação inicial do dogma central. A sua importante função no controlo da expressão génica tem vindo a ser cada vez mais evidenciada.

Replicação do DNA – manutenção da informação genética. Existem 3 modelos possíveis de replicação:

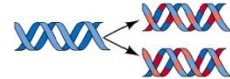
b. Semi-conservativo:



c. Conservativo:



b. Dispersivo:

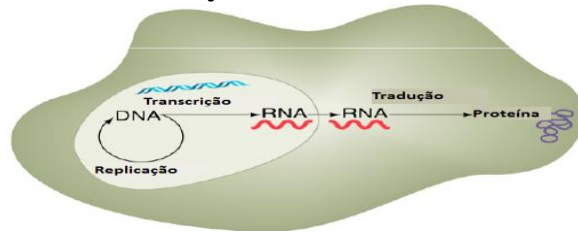


Replicação do DNA:

- Duplicação semi-conservativa;
- Cada uma das cadeias actua como molde para uma nova cadeia, originando assim 2 duplas hélices;
- Cada molécula de DNA contém uma cadeia nova e outra antiga.

GENÉTICA MOLECULAR – Replicação, Transcrição e Tradução

Transferência de Informação



Existem 3 processos de transferência de informação:

- Replicação;
- Transcrição;
- Tradução.

Replicação do DNA – Manutenção da informação Genética

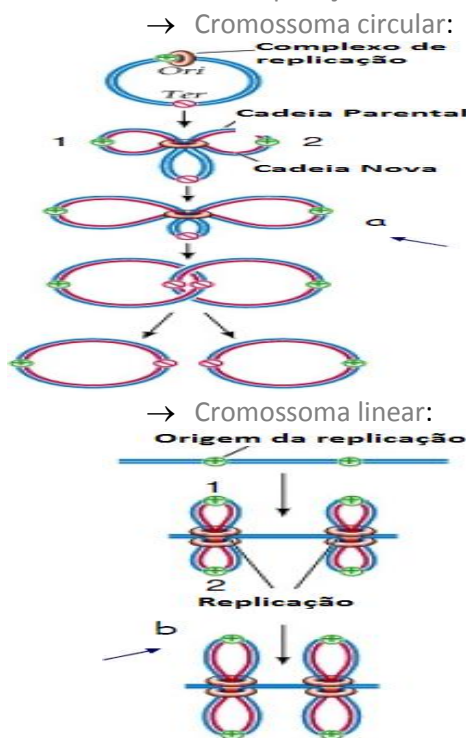
O processo de replicação do DNA é muito conservado, pois é basicamente o mesmo, desde *Escherichia coli*, em qualquer mamífero.

No entanto, nos mamíferos a complexidade é maior, o que se reflecte no aumento do número de polimerases ou de outros componentes proteicos intervenientes no processo.

Replicação – unidade de replicação.

Forquilha – durante a duplicação, as cadeias vão-se separando, formando uma “forquilha de duplicação” onde são adicionados nucleotídios livres, formando, por complementaridade, a nova cadeia.

Processo de replicação do DNA:



Bactérias (procariotas) – possuem um único cromossoma circular.

A replicação ocorre apenas a partir de um ponto de origem da replicação e ocorre nos 2 sentidos, até à região terminus (TER).

São necessários cerca de 40 minutos para completar a replicação, que ocorre a cerca de 1000 pares de base / segundo.

Ori – início da replicação. São regiões ricas e Ats.

Eucariotas – múltiplos pontos de origem de replicação, onde o processo pode ocorrer em simultâneo.

A célula de um mamífero pode conter entre 50 000 – 100 000 replicões, unidades de replicação

Polimerases

Polimerases – catalisam a ligação de nucleótidos livres a uma cadeia de DNA.

Procariotas:

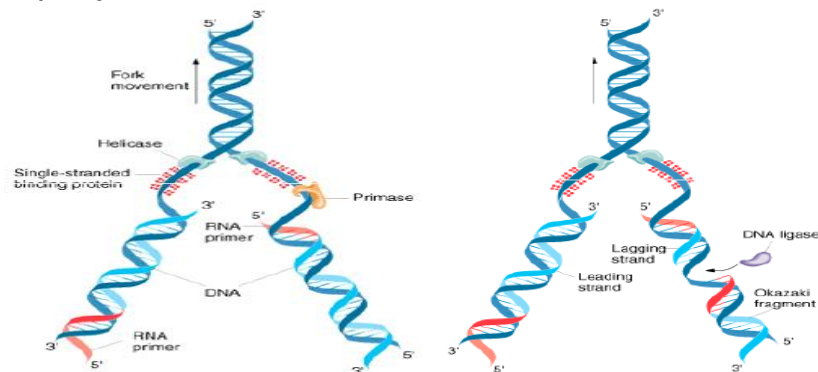
- Polimerase I – preenchimento de pequenos segmentos de DNA (replicação e reparação); actividade exonucleásica.
- Polimerase II – enzima de reparação.
- Polimerase III – função principal durante o processo de replicação; elevada processividade; actividade exonucleásica.

Eucariotas:

- Polimerase α – início da replicação; baixa processividade; actividade primase.
- Polimerase β – enzima de reparação.
- Polimerase δ – função principal durante o processo de replicação; elevada processividade; actividade exonucleásica.
- Polimerase ϵ – enzima de reparação.
- Polimerase γ - função principal durante o processo de replicação do DNA mitocondrial; elevada processividade; actividade exonucleásica.

As polimerases actuam sempre na direcção 5' → 3'.

Apenas conseguem catalisar a ligação entre um 5'-PO₄ de um nucleótido livre com 3'-OH de um nucleótido já inserido numa cadeia.

Processo de Replicação

Início da replicação – as polimerases não conseguem iniciar a síntese de novo a partir de um molde de cadeia simples. Precisam de um grupo 3'OH livre ao qual possam adicionar um dNTP. Este grupo 3'OH livre designa-se por primer, que é sintetizado por uma primase, que é uma polimerase de RNA.

A outra cadeia parental permanece em cadeia simples.

Replicação contínua ("leading strand").

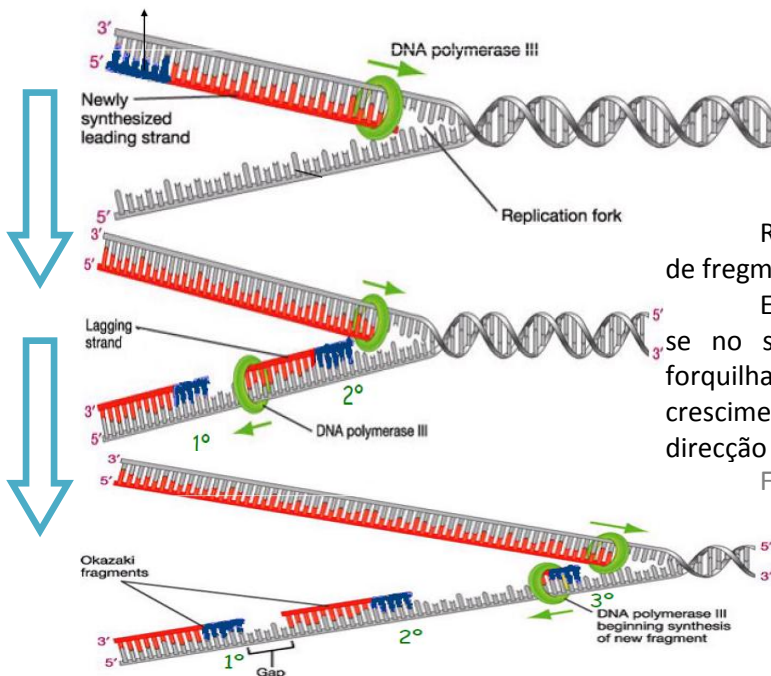
Síntese progride no sentido da replication fork.

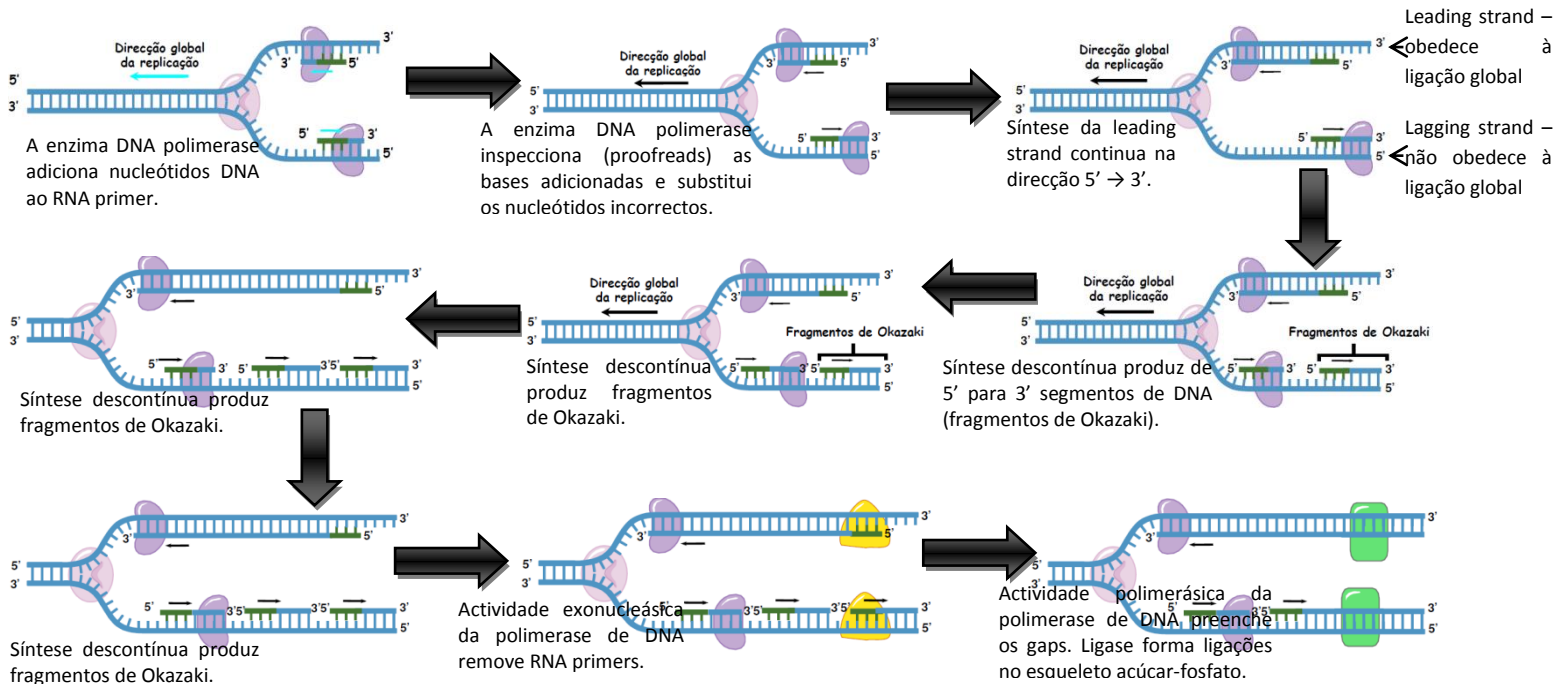
Replicação descontínua com formação de fragmentos Okazaki (Lagging strand).

Em cada fragmento a síntese processa-se no sentido contrário ao movimento da forquilha de replicação mas, no global, o crescimento da nova cadeia acompanha a direcção da abertura das cadeias.

Fragmentos Okazaki:

- Procariotas – cerca de 1500 pares de bases.
- Eucariotas – cerca de 150 pares de bases.

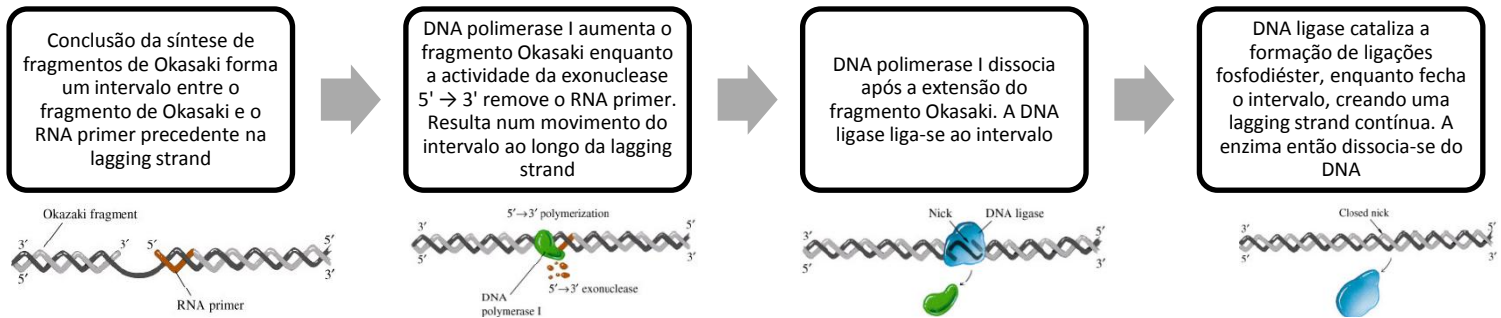




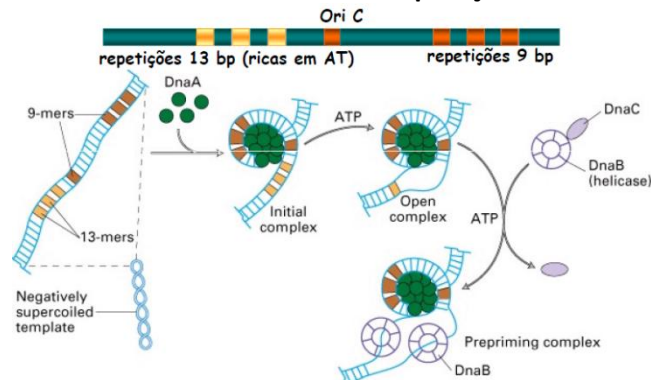
Fragmentos de Okazaki

Após a síntese de um fragmento de Okazaki, fica um gap na extremidade 3'. O segmento de Okazaki adjacente tem em 5' um primer de RNA.

Esta sequência é removida e o gap preenchido, ambas pela polimerase I. a ligação fosfodiéster final entre 2 fragmentos de Okazaki é formada pela ligase de DNA.



Intervenientes no Processo de Replicação



Início da replicação – proteínas iniciadoras da replicação que quebram pontes de hidrogénio no local de iniciação.

Topoisomerases – iniciam o processo de desdobramento do DNA quebrando uma das cadeias do DNA. Em consequência, o DNA liberta-se da tensão na hélice no estado de super-enrolamento.

→ **Girase** – topoisomerase que actua sobre o estado de super-enrolamento do DNA.

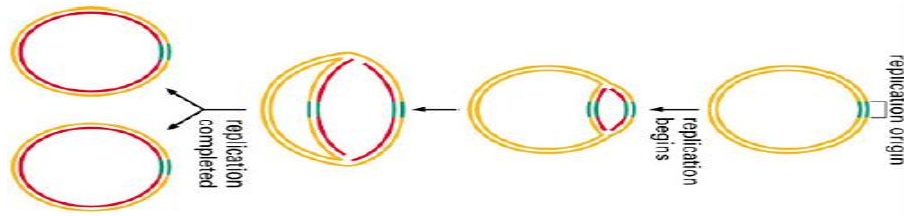
Helicases – ajudam a desdobrar o DNA de cadeia dupla, depois de eliminado o estado de super-enrolamento.

Single strand binding proteins (SSB) – estabilizam o DNA de cadeia simples.

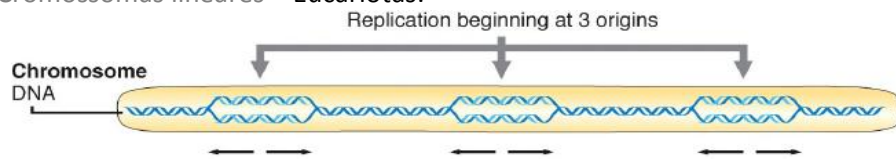
Inibidores da girase de DNA – inibidores da replicação bacteriana e têm actividade antibiótica.

Replicação em Eucariotas e Procariontes

Cromossomas circulares – Procariontes:



Cromossomas lineares – Eucariotas:

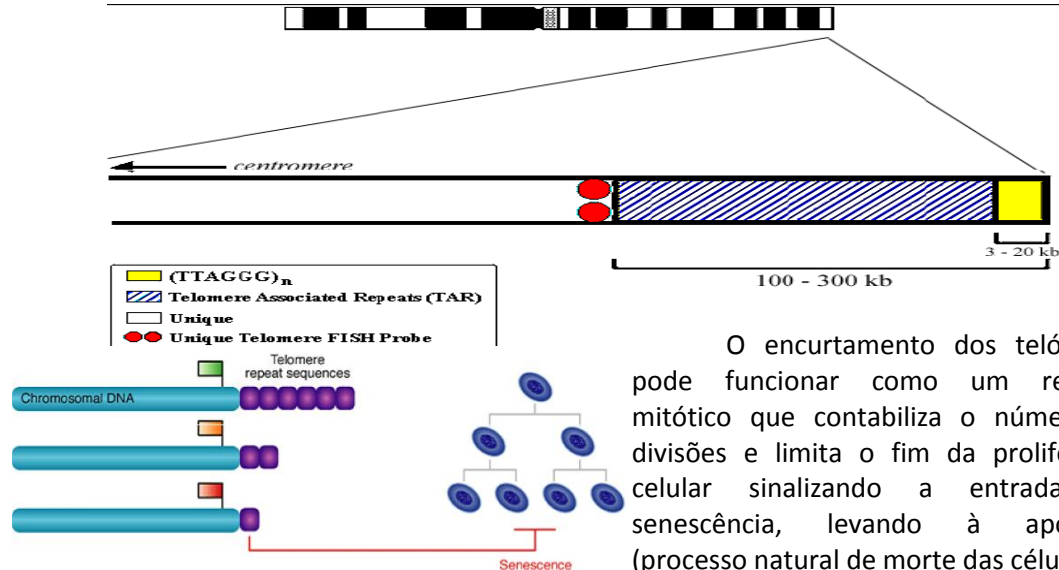


Replicação no Fim dos Telómeros

Na extremidade dos cromossomas (telómeros) há um problema com a replicação do DNA. Na leading strand a cadeia nova pode crescer até ao final, no entanto, o gap que fica após a remoção dos primers de RNA não consegue ser preenchido.

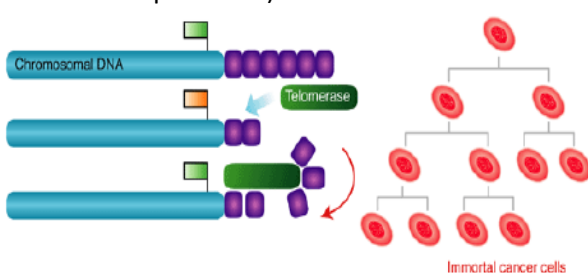
Em consequência os cromossomas encurtam em cada ciclo de replicação.

Estrutura dos telómeros:



O encurtamento dos telómeros pode funcionar como um relógio mitótico que contabiliza o número de divisões e limita o fim da proliferação celular sinalizando a entrada em senescência, levando à apoptose (processo natural de morte das células).

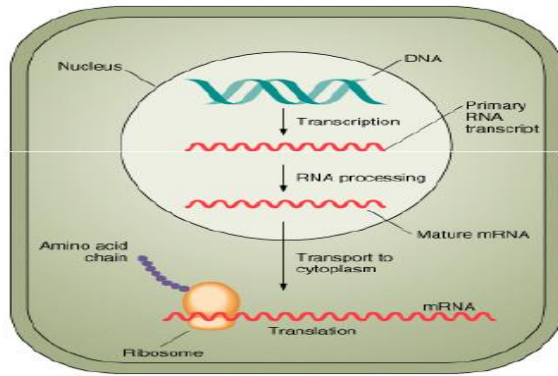
Modelo da telomerase é representado como um complexo ribonucleoproteico (RNA + proteínas) com actividade de transcriptase reversa.



A telomerase não se expressa na maioria das células somáticas, mas apresenta níveis reduzidos em células estaminais e está activa em células germinativas.

Nas células cancerígenas, a telomerase está activa – expressão de telomerase mantém os telómeros com o comprimento compatível com a proliferação celular, através da adição de sequências teloméricas de repetição. Assim, a célula cancerígena torna-se imortal.

Transcrição



Passagem da informação genética contida no DNA dos cromossomos no núcleo para o citoplasma, onde se encontram os ribossomos.

O RNA é processado no núcleo mas depois é transportado para o citoplasma.

RNA – Ácido Ribonucleico

Os produtos iniciais de todos os genes são os ácidos ribonucleicos (RNA).

O RNA é similar ao DNA, com excepção da molécula de açúcar ser a ribose (em vez de desoxirribose), ter a base uracilo em vez de timina e ser uma molécula de cadeia simples em vez de dupla. O RNA é produzido por um processo que se baseia numa cópia do DNA (processo de transcrição – síntese de RNA).

Tipos de RNA

RNA informativo:

- mRNA (RNA mensageiro) – intermediário no processo de decodificação dos genes em cadeias de polipeptídeos. Apresenta diferenças entre procariontes e eucariontes.

RNA funcional – nunca é traduzido em polipeptídeos, possuindo função ao nível do RNA. Existem 2 tipos de RNA funcional (tRNA e rRNA) e mais outros 2 tipos nos eucariontes (snRNA e scRNA):

- tRNA (RNA de transferência) – molécula que transporta os aminoácidos para o mRNA durante a síntese proteica.
- rRNA (RNA ribossómico) – forma os ribossomas em conjunto com umas proteínas específicas, são as máquinas usadas na síntese de proteínas.
- snRNA (RNA nuclear pequeno) – faz parte do processo de splicing no núcleo.
- scRNA (RNA citoplasmático pequeno) – tráfico das proteínas na célula.

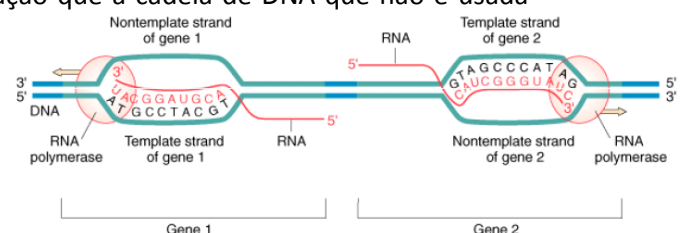
Processo de Transcrição

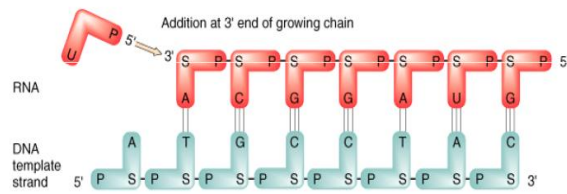
A transcrição é catalizada por uma enzima, a RNA polimerase, e segue regras similares à replicação. Apenas uma cadeia de DNA é usada como molde para a transcrição de um dado gene. O RNA é sintetizado na direcção 5' → 3', ou seja, um novo nucleótido encaixa sempre a extremidade 5' (do RNA) na extremidade 3' (do DNA) de um nucleótido de uma cadeia em crescimento.

- Novos nucleótidos apenas podem ser adicionados à extremidade 3' de uma cadeia;
- Na extremidade 5' de uma nova cadeia de RNA (com 3 grupos fosfato livres) a polimerase de RNA não consegue adicionar nucleótidos.

Uma cadeia de RNA tem a mesma orientação que a cadeia de DNA que não é usada como molde:

- Cadeia de DNA molde – antisense;
- Outra cadeia de DNA – sense.

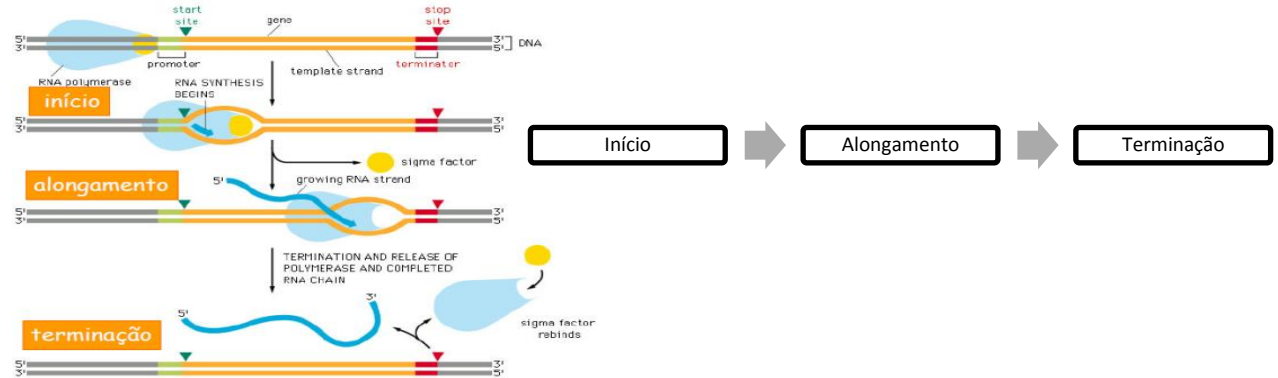




Na polimerização do RNA, nucleótidos novos são sempre adicionados na extremidade 3' da molécula em crescimento.

A RNA polimerase move-se a partir da extremidade 3' do molde do DNA, e o RNA forma-se na direcção 5' para 3'.

Passos Básicos do Processo de Transcrição

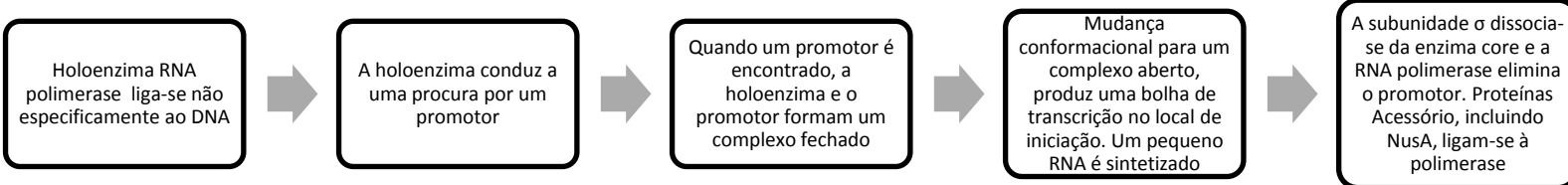


Transcrição em Procariotas

Nos procariotas, existe um único tipo de RNA polimerase que transcreve todos os tipos de RNA.

→ Enzima core (α, β) + Factor sigma (σ) → Holoenzima (3 subunidades α, β e σ).

A adição da subunidade sigma permite, então, a iniciação no local promotor.



Não é necessário um primer para iniciar a síntese de RNA.

Quando o factor σ se liberta da holoenzima, ocorre a ligação de um factor de alongamento (NusA) essencial para a progressão da síntese da cadeia de RNA.



→ Closed complex = polimerase + σ + região promotora.

→ Open complex = polimerase + NusA + cadeia separada.

Iniciação – região do DNA que dá o sinal de iniciação da transcrição (promotores).

Quando a transcrição inicia, o complexo σ sai.

Elongação:

→ O RNA é sempre sintetizado de 5' para 3'.

→ Logo após a iniciação o factor σ dissocia-se da RNA polimerase.

Terminação – a RNA polimerase reconhece sinais de terminação de 2 tipos.

Diferentes factores sigma reconhecem e são específicos de diferentes promotores.

Transcrição em Eucariotas

3 tipos de RNA polimerase:

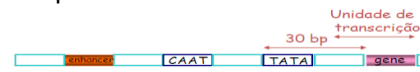
→ RNA polimerase I – sintetiza o rRNA.

→ RNA polimerase II – sintetiza o mRNA.

→ RNA polimerase III – sintetiza o tRNA e pequenas moléculas de RNA nuclear e citoplasmático.

Em função do que necessitam, diferentes células transcrevem diferentes segmentos de DNA, designados unidades de transcrição.

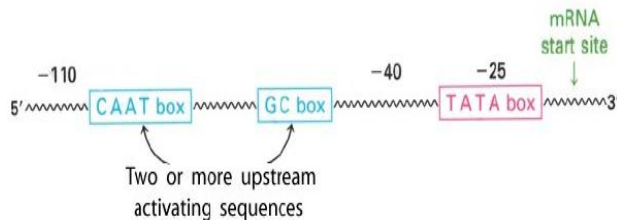
Unidade de transcrição – unidades discretas, espaçadas irregularmente no DNA, que consistem em genes e bases flangeadoras que regulam a sua expressão. Não estão presentes no produto proteico.



Nestes organismos, apenas uma fracção mínima do DNA total é transcrita.

Expressão genética nos eucariotas – o RNA é processado no núcleo mas depois + transportado para o citoplasma.

Promotores nos Eucariotas



Sequências de DNA localizadas a montante de um gene que sinalizam o início de transcrição. São reconhecidas por factores proteicos específicos (factores de transcrição) que aí se ligam despoletando a organização da maquinaria de transcrição.

TATA box – heptanucleótido composto por adeninas e timinas (TATATAA ou variantes) presente na maioria dos genes que levam à produção de mRNA. Mutações nesta sequência diminuem a eficiência do promotor e, consequentemente, a taxa de transcrição do gene. A maioria das mutações não impede o início da transcrição mas muitas alteram o ponto de partida do processo.

CAAT box – geralmente, a sequência com mais peso na eficiência do promotor.

Cada gene tem o seu promotor.

A complexidade dos promotores eucariotas é muito variável:

- Silencers – sequências que reprimem a actividade transcricional de um gene. Unidade de transcrição simples encontrada em eucariotas unicelulares (simples) como leveduras.
- Enhancers – sequências que aumentam a actividade transcricional de um gene. Podem localizar-se nas regiões reguladoras 3' ou 5', ou nos intrões. Módulos complexos de controlo da transcrição encontrados nos metazoa (eucariontes complexos). Esta organização elaborada do DNA regulador garante um controlo fino da expressão génica.

Factores de Transcrição

As RNA polimerases não têm autonomia para iniciar sozinhas o processo de transcrição. Necessitam da colaboração de uma série de factores de transcrição (TF) que se ligam a sequências sinalizadoras localizadas no promotores dos genes.

Factores de transcrição (TF) – factores proteicos que não fazem parte do complexo holoenzimático da RNA polimerase, mas são essenciais para o início da transcrição. Ligam-se ao DNA, com o qual interagem e desempenham um papel fundamental na regulação da expressão génica.

São trans-acting factores por estarem sob o controlo de genes com localizações diversas, mais ou menos afastados do gene cuja expressão regulam, e por terem de migrar para os seus locais de acção. Para além disso podem ser activados por factores intra ou extracelulares. Surgem diferentes categorias de factores de transcrição em função do domínio funcional que ligam ao DNA.

Elementos dos promotores – cis-acting factores porque a sua função está limitada ao DNA duplex onde se localizam.

TFs e RNA polimerases envolvem-se de forma complexa, acabando por despoletar o início da transcrição.

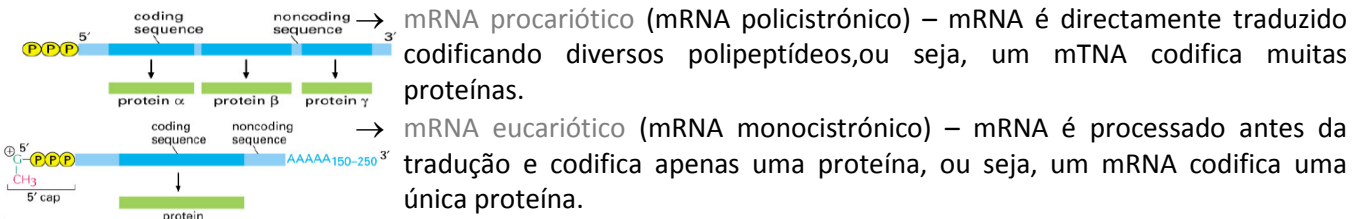
Processo de Transcrição em Eucariotas

O início é mais complexo e requer muitos intervenientes:

- TBT – TATA binding protein.
- CTD (“carboxy terminal domain” da subunidade maior da RNA polimerase II).
- TFs (“general transcription factors”).

Início de transcrição no promotor da transtirretina.

Diferenças entre a transcrição em procariotas e eucariotas:



Transcrição em Eucariotas

Processamento do RNA compreende várias modificações pós-transcrição:

- Adição de Cap no extremo 5' do pré-mRNA.
- Adição de cauda poli-A (adenílica) em 3';
- Splicing dos intrões.

O processo inicia-se ainda durante a fase de alongamento da transcrição.

Adição de 5' Cap – a primeira modificação acontece após a síntese dos primeiros 25 nt. Consiste, por exemplo, na adição de nucleótidos modificados, 7-metilguanósina, com direcção 5'-5'. Mas há diferentes tipos de CAPs.

Cap – sinal que ajuda o ribossoma a reconhecer o início do mRNA e que protege a extremidade do mRNA da acção de exonucleases.

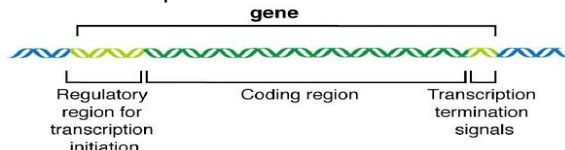
Poli-adenilação – adição de adenosinas na extremidade 3'. Sequência consenso de poli-adenilação. Após o corte, a denilação ocorre, nesse local de corte.

Possível papel da poli (A) – estabilidade e sobrevivência (remoção da poli A parece preceder a degradação de certos mRNAs, logo a poli (A) protege a degradação de mRNA).

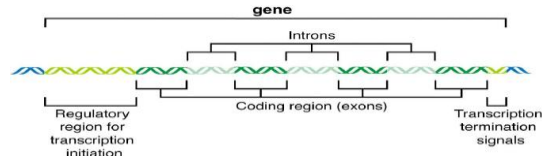
Adição de adenosinas na extremidade 3'. Poliadenilação em 3', sinal de corte. Splicing, remoção de partes internas do pré-mRNA, os intrões.

Diferenças entre os Genes

Gene procariótico – sem intrões:

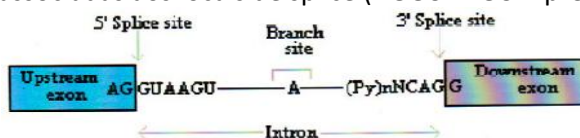


Gene eucariótico:



RNA Splicing

Distinguir exões de intrões – sequências consensuais (sinalizadoras) permitem que o spliceosoma identifique as terminações 5' e 3' do intrão. Cada espécie tem bases adicionais associadas aos locais de splice (AGGUAAGU – presente em todos os Vertebrados).



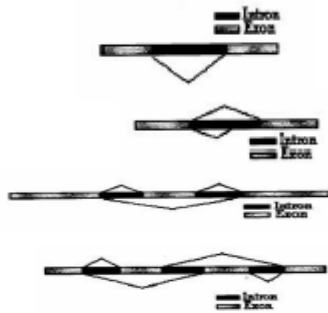
“branch site” – outra sequência sinalizadora. Cadeia de pirimidinas com adenina, localizadas a cerca de 50 pares de bases antes do local de splice 3'.

Maquinaria de splicing (spliceosoma) – 6 ou mais snRNP (complexo de RNA e proteínas):



Splicing Alternativo

Processo de origem de múltiplas variantes de splice a partir de uma cadeia de DNA:



→ **Splice / Don't splice** – um intrão pode ser cortado ou não: se o intrão contiver um codão stop, a variante roteica será mais curta e não funcional, resultando o corte do intrão no produto proteico normal; dois produtos proteicos diferentes podem ser originados (com ou sem funcionalidade alterada).

→ **Competing 5' ou 3' splice sites** – presença de 2 locais de splice em 5' (proximal e distal) competindo com um só local em 3', ou vice-versa.

→ **Exon splicing** – quando um exão deveria ser incluído no mRNA maduro é cortado juntamente com intrões vizinhos.

→ **Mutually exclusive exons** – quando o mRNA pode incluir os exões 1 ou 2, mas não os dois em simultâneo.

Outros Tipos de RNA

O mRNA, por si só não produz os polipeptídeos.

tRNA (RNA de transferência) – transporta os aminoácidos para o mRNA (nos ribossomas) durante a síntese proteica.

rRNA (RNA ribossómico) – forma os ribossomas em conjunto com uma proteínas específicas. São as máquinas usadas na síntese de proteínas.

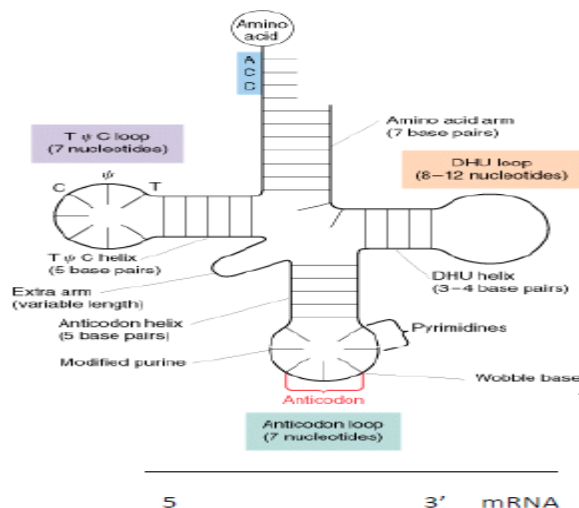
Tradução

Mecanismo que ocorre no citoplasma nas células eucarióticas. Durante a síntese proteica, o mRNA liga-se aos ribossomas. Os aminoácidos são levados para os ribossomas ligados ao tRNA.

Uma vez que apenas existem 4 bases, a sequência de uma ou duas bases não é suficiente para a codificação dos aminoácidos (20), sendo assim são necessárias pelo menos 3 bases. O código genético é lido em conjuntos de três bases do mRNA (os codões).

Os nucleotídeos do codão do mRNA são complementares com uma sequência de 3 bases no tRNA (o anticodão).

tRNA



Cada tRNA transporta um aminoácido específico. A especificidade do código genético é reconhecida pelo tRNA.

O aminoácido correcto é, então, ligado ao tRNA por um grupo de enzimas (amino-acyl-tRNA sintetases). Existindo uma amino-acyl-tRNA sintetase específica para cada aminoácido.

Mas, cada sintetase pode reconhecer mais do que um tRNA, uma vez que há mais tRNA (e codões, 64) do que aminoácidos (só 20).

O tRNA surge de regiões do DNA que produzem tRNA em vez de mRNA.

O tRNA tem loops que dão estabilidade à molécula, e possui bases diferentes nos seus nucleótidos.

Código Genético

		Second letter			
First letter		U	C	A	G
		U	C	A	G
U	UUU	Phenylalanine	UCU	Tyrosine	UGU
	UUC		UCC	UAC	Cysteine
	UUA	Leucine	UCA	UAA Stop codon	UGA Stop codon
C	CUU		CCU	Histidine	CGU
	CUC	Leucine	CCC	CAU	CGC
	CUA		CCA	CAA	CGA
A	AUU	Isoleucine	ACU	Asparagine	AGU
	AUC		ACC	AAC	AGC
	AUA		ACA	AAA	AGA
G	AUG	Methionine; start codon	ACG	Lysine	AGG
	GUU	Valine	GCU	Aspartate	GGU
	GUC		CCC	GAC	GGC
G	GUA		GCA	GAA	GGA
	GUG		GCG	GAG	GGG
				Glutamate	GGG

3 Nucleotídios consecutivos de DNA constituem o **codogene**, **triplete** que representa a mais pequena unidade de mensagem genética necessária à codificação de um aminoácido. São apenas sequências de 3 nucleotídios, mas a partir destes existem possibilidades suficientes para codificar os aminoácidos conhecidos. Essas sequências vão permitir codificar a ordenação de séries de aminoácidos que caracterizam diversas proteínas.

Assim, um código de **tripletos** forma 1 **codão**.

Há 3 grelhas de leitura possíveis para uma determinada sequência de DNA, no entanto, a única possível na realidade é determinada pelo **codão de iniciação (AUG)** e a sua localização.

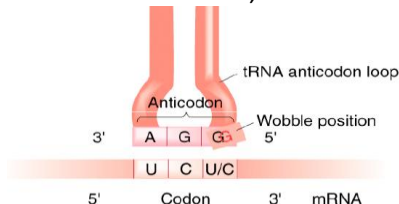
O código genético é degenerado, mas a sinonímia não é aleatória:

Relação da 3ª base	3ª base com igual significado	Número de codões
Irrelevante	U, C, A, G	32 (8 famílias)
Purinas	U ou C	14 (7 pares)
Pirimidinas	A ou G	12 (6 pares)
3 em 4	U, C, A	3 (AU... = Ile)
Únicas	G	2 (AUG = Met) (UGG = Trp)
	A	1 (UGA = fim)

O código genético: degenerado (contém redundâncias); universal; ambíguo; tem **codões de finalização**; tem **tripletos com dupla função**; o **terceiro nucleótido** de cada **codão** é o menos específico; **codões sinónimos** (codões que codificam proteínas iguais).

Fenómeno de Wobbling

Alguns aminoácidos podem ser transportados para o ribossoma por formas alternativas de tRNA, com diferentes anti-codões.



Alguns tRNA podem transportar o seu aminoácido específico em resposta a diferentes codões, devido a alterações no emparelhamento da última base do anti-codão (extremidade 5'). Esta flexibilidade designa-se de **fenómeno de wobbling**.

A **guanina** pode ter 2 posições, nomeadamente emparelhar com **uracilo** ou **citocina**. Isto significa que um único tRNA com um aminoácido (neste caso a **serina**) pode reconhecer 2 codões (UCU e UCC).

Codões STOP e Universalidade do Código Genético

Alguns codões não codificam aminoácidos. São chamados os **codões STOP** (codões sem sentido – nonsense codons): UAG (codão amber); UGA (codão opal); UAA (codão ocre).

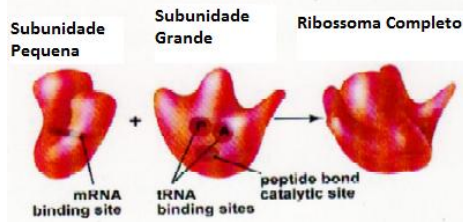
A universalidade do código genético está quebrada parcialmente nas mitocôndrias:

	Núcleo	Mitocôndria
UGA	STOP	Triptofano
AGG, AGA	Arginina	STOP
AUA	Isoleucina	Metionina

Ribossomas

RNA ribossómico (rRNA) – papel estrutural e funcional no ribossoma (cerca de 100-3000 pares de bases). Para uma tradução rápida do mRNA para proteína é requerida uma molécula capaz de migrar ao longo da cadeia de mRNA, capturar o tRNA complementar a cada codão e ligar os aminoácidos para formar uma cadeia, este processo é realizado pelo ribossomas.

Ribossoma – caixa de decodificação.



Estes ribossomas são constituídos por 2 subunidades, uma grande e outra pequena, que são construídas no núcleo e exportadas para o citoplasma, mais especificamente, estas subunidades são montadas no nucléolo e exportadas para o citoplasma onde se unem apenas quando estão a sintetizar uma proteína a partir da informação de um mRNA.

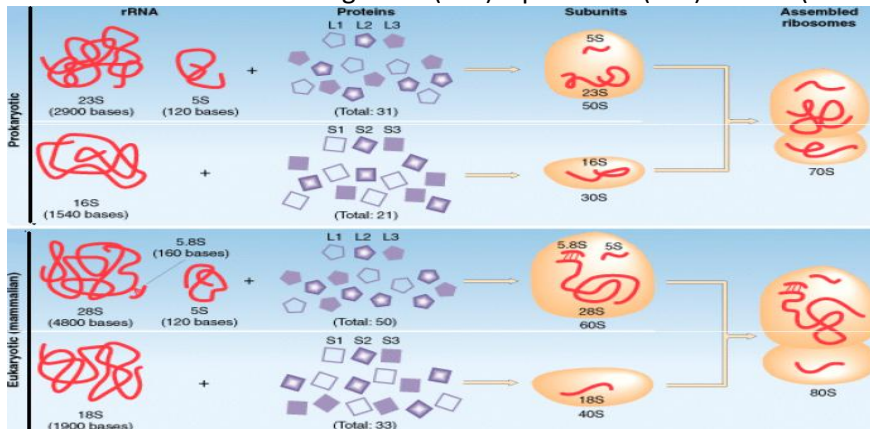
- Subunidade pequena – emparelha o tRNA com o codão do mRNA;
- Subunidade grande – catalisa a formação das ligações peptídicas.

Constituição em procariotas (70S):

- Subunidade pequena (30 S) – 21 proteínas + rRNA (16 S);
- Subunidade grande (50S) – 34 proteínas + rRNA (23S + 5S).

Constituição em eucariotas (80S):

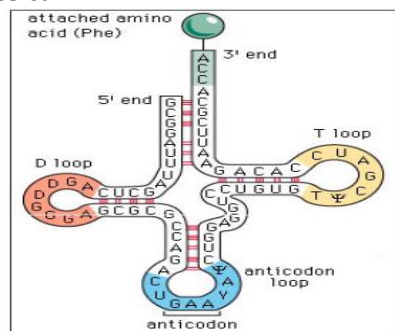
- Subunidade pequena (40S) – proteínas (30S) + rRNA (18S);
- Subunidade grande (60S) – proteínas (40S) + rRNA (5S + 5,8 S + 28 S).



RNA

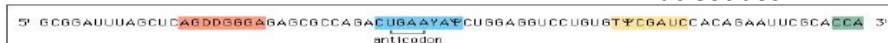
ribossômico – molécula com 100 – 3000 pares de bases que desempenham um papel estrutural e funcional essencial no ribossoma. Possuem estruturas secundárias com padrões complexos.

Síntese Proteica



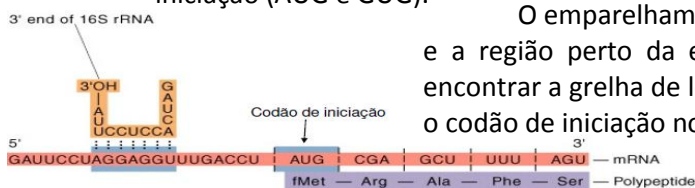
O mRNA liga-se à unidade pequena do ribossoma. O tRNA transportando o aminoácido entra pelo local A. O tRNA deixa o aminoácido, para se ligar ao polipeptídeo em formação, e passa para o local P. Pode-se dividir em: iniciação, alongação e terminação.

A estrutura em trevo decorre da composição de bases dos tRNA. As cadeias simples de tRNA contêm entre 73 a 94 nucleótidos.



Síntese Proteica - Iniciação

As sequências Shine-Dalgarno localizam-se imediatamente antes dos codões de iniciação (AUG e GUG).



Sequências Shine-Dalgarno

O emparelhamento complementar ocorre entre 3' de 16 S rRNA e a região perto da extremidade 5' do mRNA. Esta ligação ajuda a encontrar a grelha de leitura correcta durante a tradução, posicionando o codão de iniciação no local P.

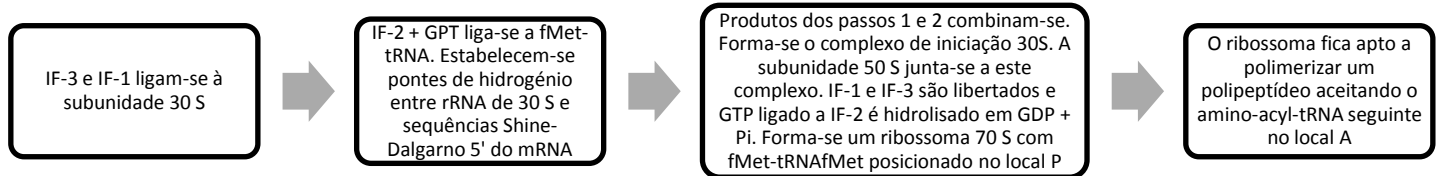
Assim, o primeiro aminoácido é a metionina.

← Sequências Shine-Dalgarno.

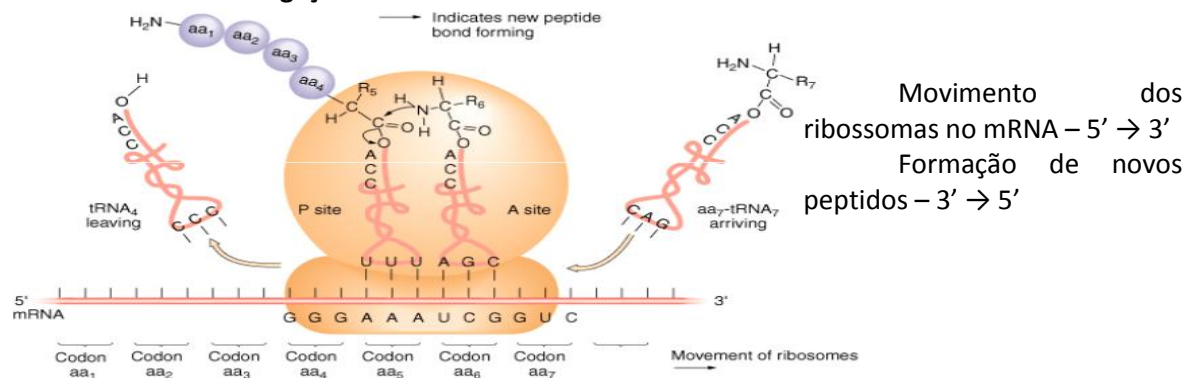
Eucariotas: codões de iniciação AUG. Numerosos IFs.

Procariotas – codões de iniciação AUG, GUG. Significado dependente da posição:

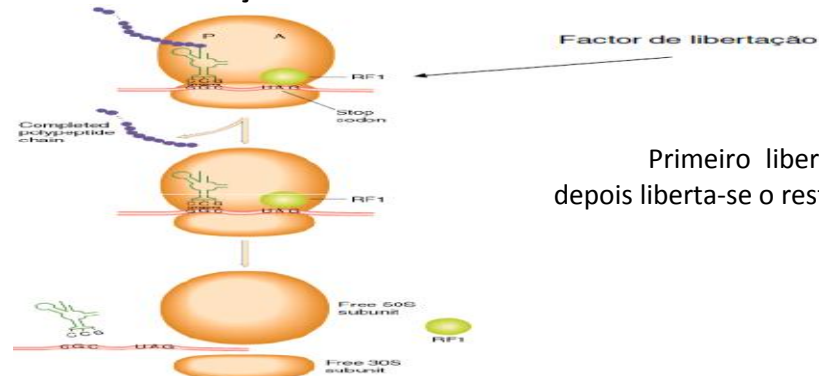
- AUG no início – tRNA fMet;
- AUG no interior – tRNA Met;
- GUG no início – tRNA fMet;
- GUG no interior – tRNA Val.



Síntese Proteica - Elongação



Síntese Proteica – Terminação



Primeiro liberta-se o polipeptídeo e depois liberta-se o resto.

GENÉTICA MOLECULAR – Mutação a Nível Génico

Lesões no DNA

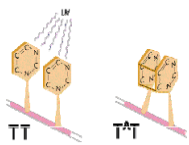
O DNA pode ser danificado por acção de agentes ambientais externos (químicos, genotóxicos, radiação ionizante, UVs, ...), por ser uma entidade dinâmica.

Dano à integridade do DNA por produtos do metabolismo celular: espécies reactivas de oxigénio como aniões superóxido, radicais hidroxil, peróxido de hidrogénio, etc, resultantes da respiração oxidativa e peroxidação de lípidos.

Desintegração espontânea de bases no DNA e erros de replicação.

Causas Exógenas

As pirimidinas são particularmente sensíveis à radiação ultra-violeta – sob efeito de ultra-violeta, 2 pirimidinas adjacentes numa cadeia de DNA tendem a formar ligações covalentes entre si, originando dímeros.



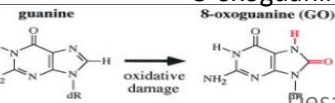
Os dímeros de timina são os que se formam mais frequentemente.

Dímeros não reparados impedem uma replicação correcta o que faz com que a célula morra ou se divida erráticamente.

Causas Endógenas

Tipos reactivos de oxigénio – processos metabólicos que ocorrem em todas as células levam à produção de intermediários reactivos capazes de interferir com o DNA ou dNTPs livres que depois podem ser incorporados durante a síntese de DNA.

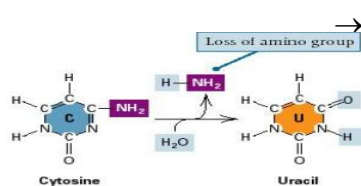
Os **tipos reactivos de oxigénio (ROS)** constituem um desses grupos de moléculas, sendo caracterizadas pela presença de um electrão não emparelhado num átomo de oxigénio, que pode reagir com DNA produzindo quebras de cadeia ou modificando bases como guanina em 8-oxoguanina. Consequências:



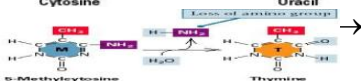
→ Quebras de cadeia são potencialmente letais para a célula;

→ Bases não corrigidas originam erros de emparelhamento durante a replicação.

Desaminação espontânea – perda do grupo NH₂.



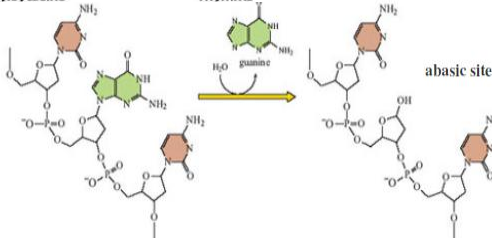
→ Da desaminação da citosina resulta uracilo (citosina → uracilo). Na replicação do DNA, o uracilo emparelha com adenina. Assim, o par de bases citosina-guanina será substituído por timina-adenina, originando uma mutação. Normalmente, no DNA está presente a timina e não o uracilo, o que facilita a identificação e, consequentemente, a correcção.



→ A desaminação da metilcitosina resulta em timina, que não é reconhecida como lesão no DNA (mutação).

Depurinação / Depirimidinação espontânea – perda de

base cria posição no DNA sem base. Hidrólise da ligação base-desoxirribose que resulta na perda de uma base purínica (mais frequente) ou pirimidínica (abasic site). A pH e temperaturas normais, a perda de bases é relativamente baixas. Durante a replicação pode ser introduzido um nucleótido errado na posição complementar à sem base (mutação).



Erros no processo de replicação ou reparação do DNA – a síntese de nucleótidos devido às várias divisões celulares vão originar cerca de uma mutação por divisão celular.

Erros de replicação especialmente frequentes em regiões de DNA repetitivo – em zonas de DNA repetitivo, replication slippage é frequente originando inserções ou deleções do motivo de repetição.

Consequências das Lesões no DNA

As lesões no DNA podem perturbar todo o seu metabolismo e despoletar uma paragem do ciclo celular ou morte celular (apoptose).

São respostas à detecção de lesões no genoma que impedem que se convertam em mutações permanentes.

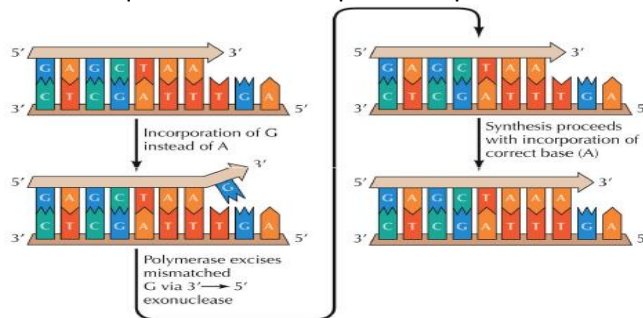
Mutação – alteração permanente numa sequência de DNA. As mutações irreversíveis contribuem para a oncogénese, envelhecimento, ...

As mutações são transmissíveis quando ocorrem em células germinativas. Para minimizar alguns efeitos do metabolismo celular, existem intrincados sistemas de defesa antioxidante (siperóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, etc).

Diversas enzimas celulares detoxificam potenciais agentes mutagénicos antes de exercerem qualquer acção.

Mecanismos de Reparação

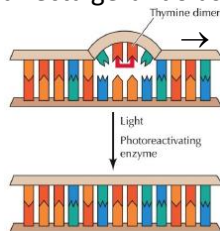
Os mecanismos de reparação são capazes de reverter as alterações no DNA (a única molécula que os seres vivos podem reparar em vez de substituir).



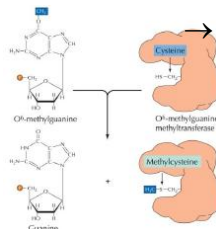
Correcção pelas polimerases – as polimerases têm capacidade de auto-correcção diminuindo a taxa de erro. Quando um nucleótido é mal incorporado, a enzima reconhece o erro, corta o nucleótido errado (capacidade exonucleásica) e prossegue a síntese da nova cadeia de DNA.

Principais Mecanismos de Reparação

Reversão directa – mecanismo de reparação de lesão que consiste na sua reversão directa gerando as bases normais:



Fotorreactivação – dímeros de timina podem ser quebrados por uma enzima activada pela luz, degenerando as bases originais (*Escherichia coli*).



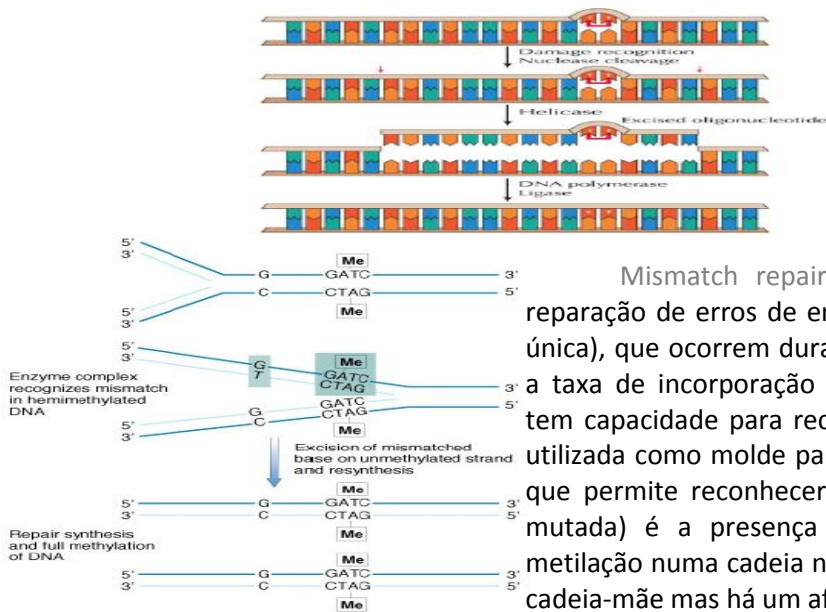
Remoção de grupos – uma metiltransferase pode transferir o grupo metil de uma O-6-metilguanina para um resíduo cisteína do local activo da enzima.

Base-excision repair (BER) – mecanismo de reparação para pequenas lesões envolvendo uma só base (metilação, desaminação, oxidação, perda espontânea de bases, ...). Lesões sujeitas a este método são maioritariamente provocadas por agentes endógenos. Envolve a intervenção de glicosilases de DNA que quebram ligações base-açúcar, libertando a base danificada e criando locais apurínicos ou apirimidínicos (AP). A enzima AP endonuclease corta a cadeia lesionada em AP e um desoxirribofosfodiesterase, limpa a região para que uma DNA polimerase possa preencher o local vazio com um nucleótido complementar ao da outra cadeia. Uma ligase faz a ligação final entre o 3'OH e 5' fosfato livre.

Nucleotide-excision repair (NER) – mecanismo de reparação para lesões de maior extensão, que distorcem o DNA ou segmentos geralmente com mais de uma base danificada. Se não forem corrigidos, bloqueiam a síntese de DNA ou a transcrição. Lesões sujeitas a este método são maioritariamente provocadas por agentes exógenos. É um processo versátil mas complexo, envolvendo dezenas de participantes proteicos que cooperam em 4 fases principais:

1. Reconhecimento da lesão;
2. Junção do complexo multiproteico no local;
3. Corte da cadeia danificada incluindo vários nucleótidos flaqueantes das bases lesadas;
4. Síntese do fragmento pela polimerase usando a outra cadeia como molde.

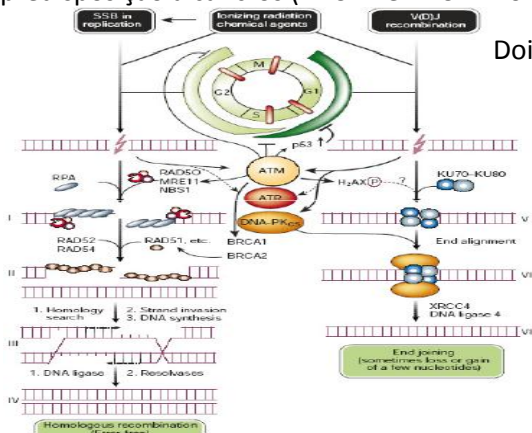
Falhas no mecanismo nucleotide-excision repair podem resultar em graves situações patológicas.



Mismatch repair (MMR) – principal mecanismo de reparação de erros de emparelhamento (substituição de base única), que ocorrem durante a replicação do DNA, diminuindo a taxa de incorporação nucleotídica incorrecta. Este sistema tem capacidade para reconhecer qual das 2 cadeias deve ser utilizada como molde para a correcção do erro. Um dos sinais que permite reconhecer a cadeia que serviu de molde (não mutada) é a presença de bases metiladas. O padrão de metilação numa cadeia nascente de DNA irá ser idêntico ao da cadeia-mãe mas há um afastamento temporal entre a síntese

de DNA e a metilação de algumas bases. Em regiões de DNA repetitivo, erros devidos a slippage durante a replicação são frequentes e podem ser corrigidos por este método. Alterações genéticas que afectam este sistema aumentam a taxa de mutação. Mutações em genes desta via estão associadas a cancro do colo-rectal hereditário não polipótico que se caracteriza por instabilidade de microssatélites.

Reparação de lesões que provocam quebras na cadeia dupla (DSB-double strand breaks) – podem ser provocadas por radiação ionizante, raios X, radicais livres, ... Algumas mutações em genes envolvidos nos seus mecanismos estão associados a aumento da predisposição a câncros (BRCA1 e BRCA2 no cancro da mama).

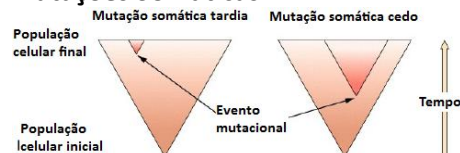


Dois mecanismos principais de reparação:

- **Recombinação homóloga** – o segmento de DNA danificado é excisado e o cromossoma homólogo é usado como molde para a síntese de novas cadeias.
- **Junção de extremidades** – mecanismo mais simples que consiste na ligação das extremidades sem recurso a qualquer molde. Frequentemente acompanhado de perda ou ganho de alguns nucleótidos.

Os sistemas de reparação não são infalíveis. Existem mutações somáticas e mutações germinativas. No entanto, apenas as mutações nas células germinativas se transmitem à descendência.

Mutações Somáticas



Durante o desenvolvimento somático, quanto mais cedo ocorrer a mutação, maior é a porção afectada de tecido do indivíduo.

Por exemplo – maçã red delicious e gold delicious (mutante de red delicious).

Mutações Germinativas

As mutações germinativas são mutações que ocorrem em células que dão origem a gametas. Se os gametas mutados participarem na fecundação, a mutação passará para a geração seguinte. Por exemplo – pétalas brancas de *Echium vulgare*.

Tipos de Pequenas Mutações – Nível do DNA

Substituições – substituição de bases, mutações pontuais, por vezes sem sentido (missense). Substituições nucleotídicas são muito frequentes:

→ **Transições** – pirimidina por pirimidina ou purina por purina:

- Adenina ↔ Guanina (purina ↔ purina);
- Citosina ↔ Timina (pirimidina ↔ pirimidina).

→ **Transversão**: purina ↔ pirimidina (por exemplo Adenina ↔ Citosina).

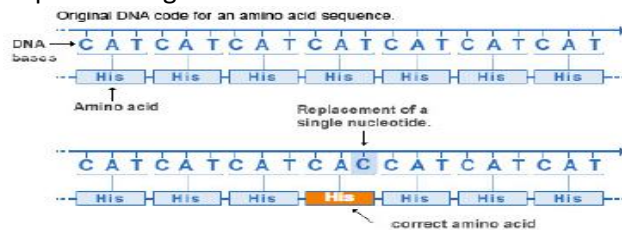
Adição ou deleção de nucleótidos: InDels (geralmente 1-10 pares de bases) – mudança na estrutura (frameshift mutations). Erro na replicação ou na recombinação. Ocorrem frequentemente em sequências repetitivas.

As transversões deveriam ser 2 vezes mais frequentes que as transições, mas tal não se verifica. Em regiões codificantes, as transições podem ser favorecidas porque em média induzem alterações menos drásticas quanto à estrutura química dos aminoácidos sendo, portanto, mais toleradas que as transversões.

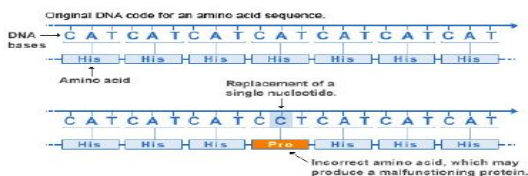
O excesso geral de transições pode estar relacionado com a elevada instabilidade em dinucleótidos CpG (a citosina está frequentemente metilada e 5-metilcitosina é muito susceptível a desaminação espontânea, originando timina). Há um aumento das frequências das transições quando CpG → TpG.

Tipos de Mutação – Nível de Proteína

Mutações ocorrem aleatoriamente no DNA. No entanto, as consequências mais graves verificam-se quando afectam DNA codificante ou outro muito conservado que inclui sequências reguladoras.



Mutação sinónima / silenciosa (silence mutation) – sem consequências na composição de um aminoácido de uma proteína. Deve-se à sinonímia do código genético logo não há alteração do aminoácido.

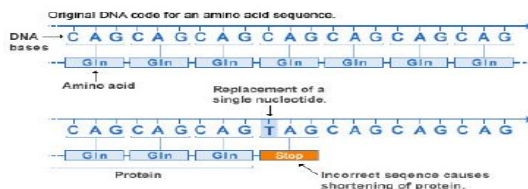


Mutação não sinónima (missense mutation) – substituição de um aminoácido por outro numa proteína.

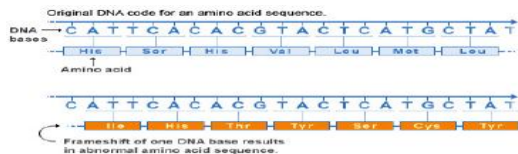
Substituição conservativa:
alteração por aminoácido
quimicamente semelhante

Previsivelmente com menor
impacto na estrutura e função
da proteína

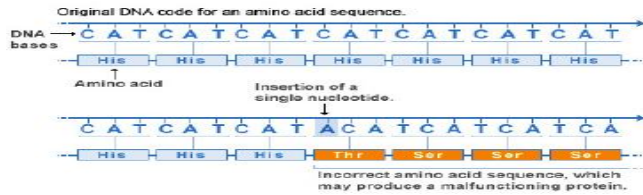
Substituição não-conservativa:
alteração por aminoácido
quimicamente diferente



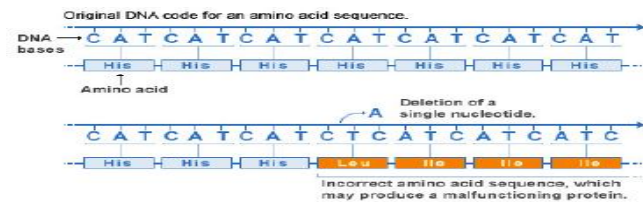
Mutação não sinónima (Nonsense mutation) – criação do codão STOP. Quanto mais próxima da 3' ORF (open reading frame) maior a probabilidade de a proteína manter alguma funcionalidade.



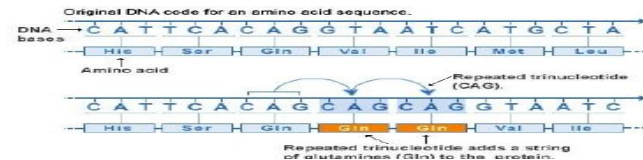
Frameshift mutation – alteração da grelha de leitura e da sequência de aminoácidos na proteína.



Insertion mutation – consequência da adição de um nucleótido, que provoca a alteração da sequência de aminoácidos na proteína, a partir da inserção.



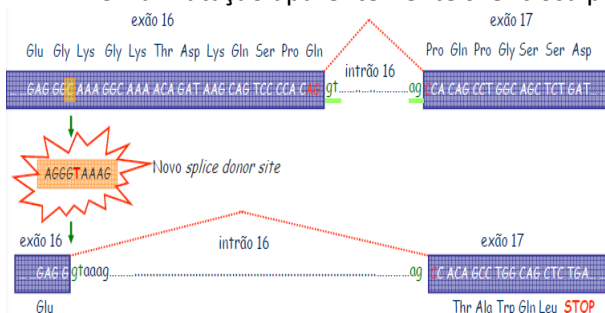
Deletion mutation – consequência da deleção de um nucleótido que provoca a alteração da sequência de aminoácidos na proteína, a partir da deleção.



Repeat expansion mutation – adição de aminoácidos na proteína.

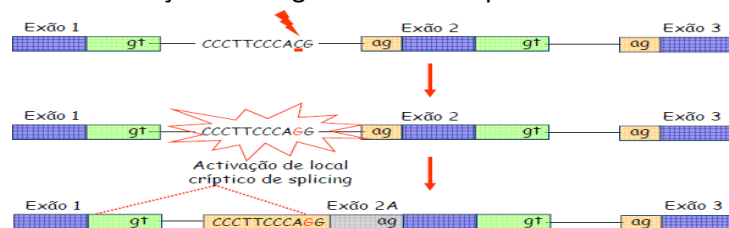
Mutações Silenciosas com Consequências Não-Silenciosas

Uma mutação aparentemente silenciosa pode ser patogénica.



A substituição activa uma sequência críptica de splicing no exão de que resulta splicing aberrante (vai ser lida como se fosse o intrão) com perda de sequências codificantes (deixa um nucleótido livre que vai formar um codão com o exão e alterar a sequência de aminoácidos) e introdução de frameshift no outro exão.

Mutações em regiões intrónicas podem induzir alteração do splicing.



A activação de sequências crípticas de splicing no interior de um intrão pode criar um local de splicing alternativo levando ao aparecimento de novos exões.

Taxas de Mutações

As taxas de mutações são muito variáveis. No entanto são geralmente superiores no sexo masculino.

Este facto deve-se às diferenças na maturação de óvulos e espermatozóides. Os espermatozóides passam por múltiplos ciclos de divisão mitótica que começam na puberdade e continuam durante toda a vida adulta. No entanto os oócitos concluem as divisões mitóticas durante a vida fetal. Ou seja, se não ocorre mutação na fase fetal, e muito raro que ocorra depois.

GENÉTICA MOLECULAR – Organização do Genoma

Mutações e Diversidade

Nem todas as mutações são patogénicas, aliás a maior parte das mutações não o são.

Mutações sem expressão fenotípica – selectivamente neutras.

Mutação – fonte de diversificação.

→ Mutações sinónimas – origina o mesmo aminoácido que é codificado por codões diferentes (mutação de troca de um nucleótido de uma sequência afectando um codão);

→ Mutações em regiões não-codificantes.

Mutações levam a variações genéticas, logo resultam em polimorfismos.

→ Alelo mais raro com frequência superior ou igual a 1 ou 5%.

Marcadores Genéticos

Marcador genético – região do genoma (pode ser um gene ou um qualquer fragmento do genoma) com propriedades de transmissão bem estabelecidas e, geralmente, com um nível de polimorfismo elevado numa população.

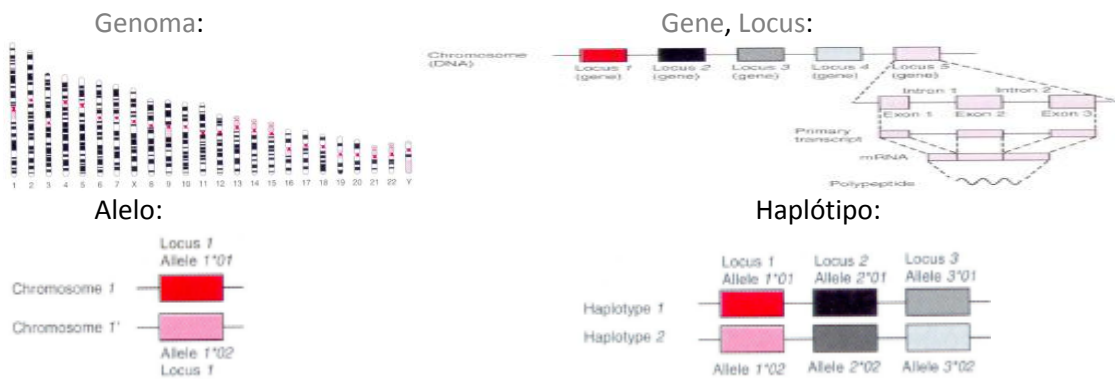
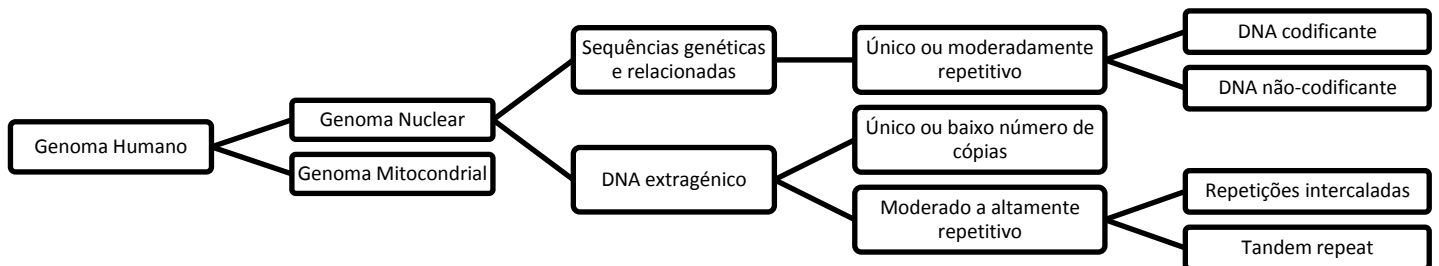
Os marcadores genéticos de maior interesse em investigação são os que conciliam:

→ Facilidade de detecção;

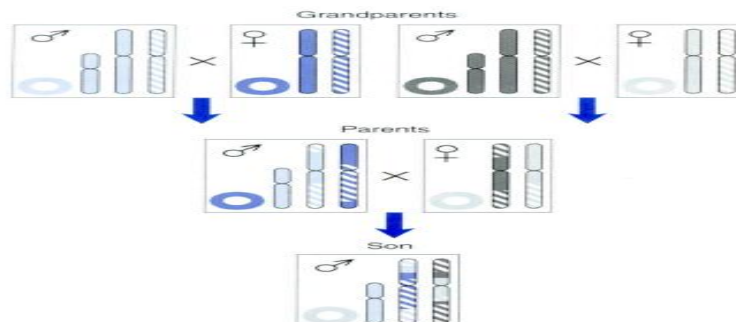
→ Modelo genético formal conhecido: transmissão regular e estabilidade;

→ Polimorfismo elevado.

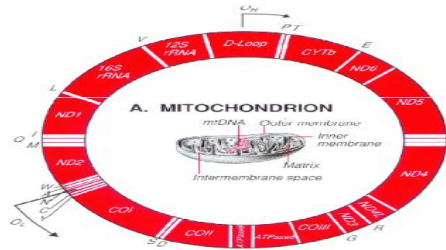
Genoma Humano



Organização do genoma nos mamíferos e sua transmissão:



DNA Mitochondrial



mtDNA – mais susceptível à deriva genética, uma vez que é só um haplótipo e só se passa através da mãe.

DNA nuclear é transmitido dos seus progenitores, no entanto o DNA mitocondrial é transmitido de uma única linhagem, a materna.

O DNA mitocondrial é haplóide de transmissão materna, e não possui recombinação.

Representa ¼ do tamanho efectivo populacional, possuindo uma grande deriva genética, com taxa de mutação variáveis. O seu tamanho atinge cerca de 16000 pares de bases e aparece em elevada quantidade nas células.



A região controlo, ou D-loop, é, em geral, a região mais variável do DNA mitocondrial, sendo composta por zonas variáveis, nos extremos, e uma mais conservada, central.

Transmissão uniparental de parte materna, podendo originar filhos e filhas afectados, mas só as filhas têm a capacidade de transmitir os genes à sua descendência.

Durante o processo de fecundação, o espermatozoide não contribui com mitocôndrias, pois, praticamente, só o núcleo deste é que penetra no oócito. O óvulo fecundado retém apenas as mitocôndrias que estavam presentes no oócito.

Esporadicamente, algumas mitocôndrias do espermatozóide entram no oócito, mas parece serem selectivamente destruídas, numa fase precoce da embriogénese. O impacto daquelas que escapam a este mecanismo é praticamente nulo face ao factor de diluição no conjunto de mitocôndrias de origem, esmagadoramente, materna.

DNA Nuclear

O DNA nuclear é diplóide (ou haplóide):

- Autossomas – 2 cópias (origem materna e paterna);
- Cromossomas sexuais – 1 ou 2 cópias (exemplo Y e X).

Possui maior número de genes, maior tamanho. Estão dispersos pelos diferentes cromossomos e sujeitos a recombinação. Constituído por zonas codificantes e não codificantes e zonas repetitivas e não repetitivas.

Genoma Animal e Vegetal

Animais – gene mitocondrial e nuclear.

Plantas – genoma mitocondrial, nuclear e cloroplastidial.

Nas plantas o genoma mitocondrial é muito maior do que o animal, e pode recombinar.

DNA dos Cloroplastos

O genoma cloroplastidial tem cerca de 150 kb (120-160) e está muito mais conservado do que o DNA mitocondrial animal. Tem zonas repetitivas mas não ocorre recombinação.

Preservação de Material Biológico e Métodos de Extração do DNA

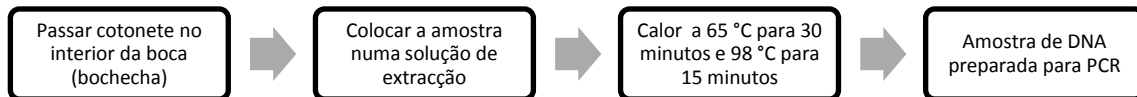
Extração de Material Biológico

DNA pode ser extraído a partir de tecidos frescos, congelados, secos, preservados em álcool ou outros conservantes, etc.

DNA pode ser extraído, praticamente, de todo o tipo de tecidos, desde sangue, músculo, pele, pêlos (foliculos pilosos), penas, ossos, células epiteliais, células sexuais, etc.

→ Amostragem por tecidos frescos;

→ Amostragem por esfregaços bucais:



Extração de DNA a partir de ossos, células em suporte de papel ou pêlos.

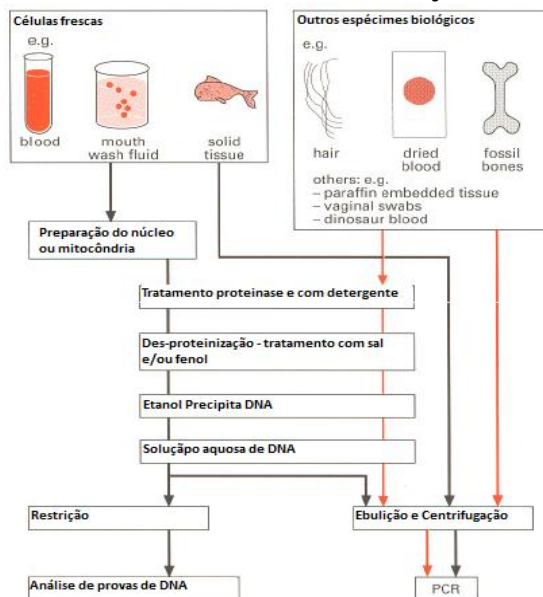
Extração de DNA de material em colecções museológicas (espécimes, peles, fósseis, múmias).

Preservação de Material Biológico

- Congelação;
- Desidratação;
- Métodos químicos;
- Álcool;
- DMSO – dimetilsulfoxido;
- Tampão lise.

A preservação de tecidos em formol provoca danos irreversíveis no DNA, pelo que pode haver grande dificuldade, ou mesmo impossibilidade, de extração do DNA.

Métodos de Extração do DNA



Alguns métodos são mais adequados quando existe uma grande quantidade de tecidos, outros a situações na qual existem pequenas quantidades de DNA.

Diferentes tipos de tecidos requerem diferentes métodos de extração de DNA.

Em geral, os métodos de extração de DNA baseiam-se:

- Na destruição física das células por homogeneização de tecidos (grandes quantidades de material biológico, gramas). Uso de uma enzima, proteinase K, para destruição de proteínas (fenol-clorofórmio e o método salino).
- No uso de resinas (Chelex) – aplicável a amostras com muita pequena quantidade de DNA (gotas de sangue em papel, pêlos, restos fósseis, ...). Utilizado em ciências forenses, investigação criminal. Necesita de cuidados redobrados para evitar contaminações.
- No uso de sílica, guanidina-tiocianeto.

Deteção do DNA

O DNA (genómico ou amplificado) pode ser detectado pelo seu tamanho e/ou conformação através de electroforese. A um pH neutro, o DNA tem carga negativa, migrando para o pólo positivo quando sujeito a um campo eléctrico.

O DNA migra através de uma matriz densa (gel de agarose ou de poliacrilamida) na qual os fragmentos de menor tamanho se movem mais rapidamente do que os maiores.

Fragmentos de tamanho conhecido (*ladders*) são utilizados juntamente com as amostras para facilitar a determinação do tamanho dos fragmentos de DNA.

O DNA pode ser visualizado sob a acção de luz ultra-violeta após coloração com Brometo de Etídio (ou após oxidação com nitrato de prata no caso dos géis de poliácridamida).

Amplificação do DNA – Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

Geralmente, a enzima que se utiliza nas reacções de PCR é a *Taq DNA polimerase*, extraída da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes hidrotermais e é resistente a temperaturas elevadas (96 °C). As suas enzimas, incluindo a polimerase, resistem às variações de temperatura, sendo apenas necessário adicionar a enzima no início da experiência pois esta resistirá a todos os ciclos de aquecimento e arrefecimento.

Conceito de PCR – amplificação de determinado fragmento de DNA relativamente pequeno (em geral menor que 1000 pares de bases) para manipulação ou sequenciação.

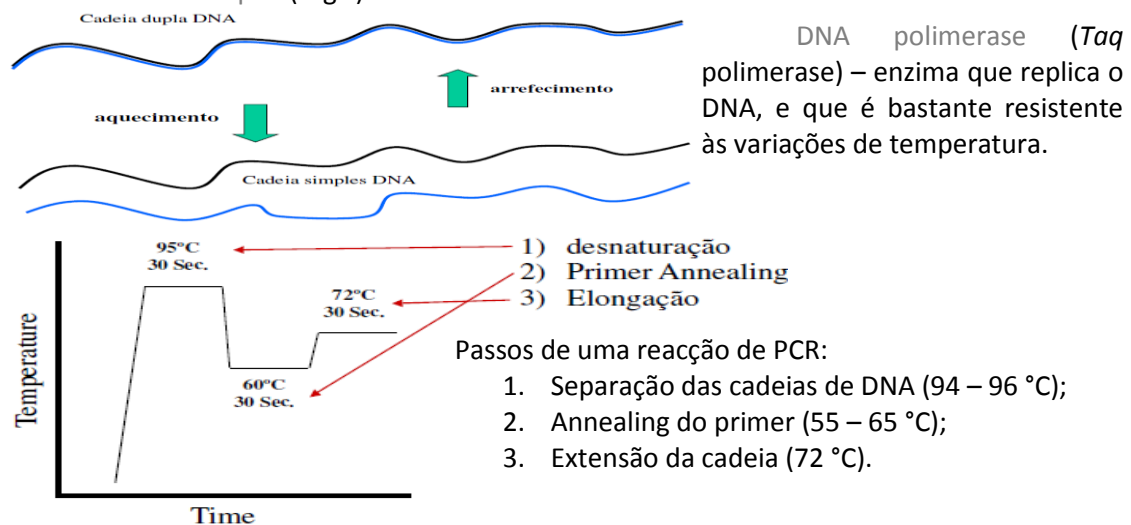
- **Desnaturação da dupla hélice** – é conseguido com a incubação do DNA a uma temperatura de 95 °C, formando 2 cadeias simples a partir da dupla hélice;
- **Emparelhamento dos iniciadores** – é necessário diminuir a temperatura (55 °C) para ocorrer a ligação dos pequenos fragmentos iniciadores (*primers* – delimitam a zona a copiar);
- **Polimerização (síntese) de DNA** – ocorre na temperatura óptima de actividade da *Taq polimerase* (70 °C). Esta liga-se na região dos iniciadores e promove a polimerização da cadeia de DNA, servindo a outra como molde.

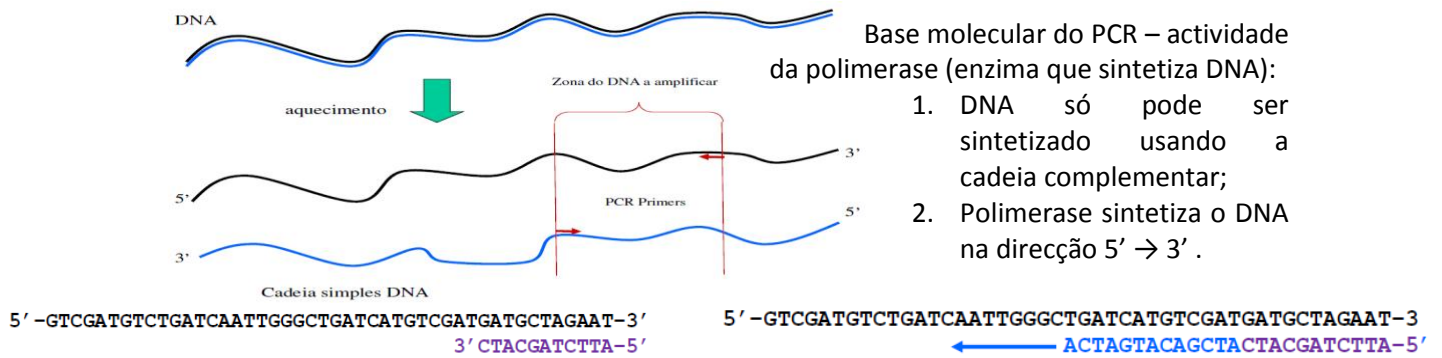
Principal fenómeno do PCR – aquecimento e arrefecimento do DNA:

- **Aquecimento** – a cadeia dupla de DNA separa-se. Também designado por desnaturação (*Melting*);
- **Arrefecimento** – as cadeias complementares do DNA juntam-se de novo. Renaturação, hibridação ou “*annealing*”.

Componentes necessários para a reacção em cadeia da polimerase:

- **DNA** – que serve de molde e se vai multiplicar. Pode ser extraída de qualquer parte do organismo, sem ser necessária a extracção de células vivas, mas quanto mais puro for, mais fácil é a sua multiplicação;
- **Oligonucleótidos de iniciação (*primers* F e R)** – permitem a ligação da DNA polimerase para efectuar a replicação;
- **Tampão (Mg^{2+})**

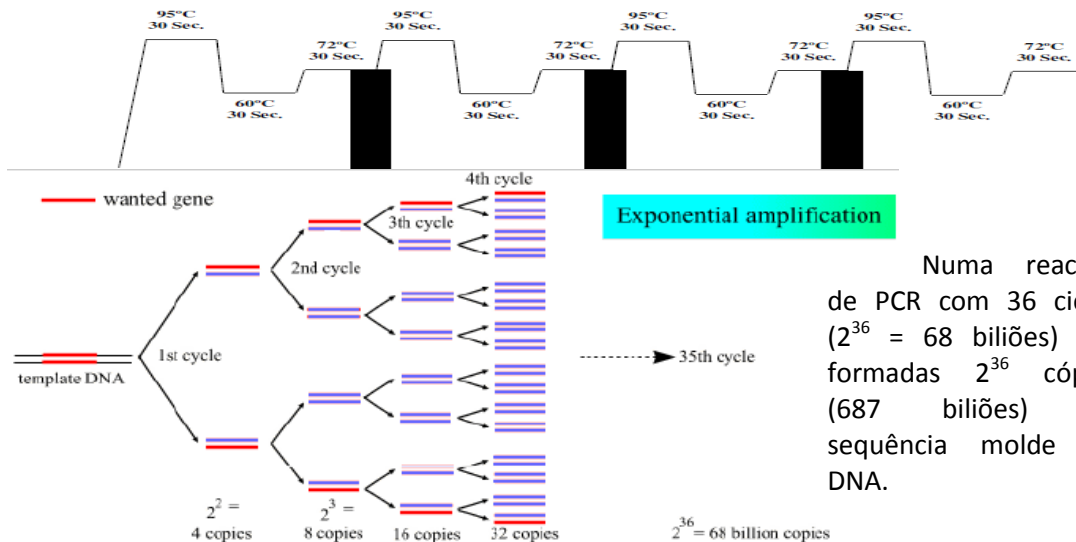




Uma reacção de PCR necessita dos seguintes componentes para amplificar os fragmentos de DNA pretendidos:

- DNA molde;
- Polimerase (Taq);
- Nucleotídeos livres (dNTP's que são incorporados durante a síntese de DNA);
- Primers – par de oligonucleotídeos que são complementares a uma zona do molde do DNA.

Termociclador:



Desenho dos Primers de PCR

Requer o conhecimento, total ou aproximado, da sequência alvo que se quer amplificar. Os primers deverão ter uma temperatura de renaturação (annealing) semelhante (60 °C por exemplo).

T_m (melting temperature) – temperatura à qual ocorre o desemparelhamento entre bases:

- T_m aumenta com o número de nucleótidos do primer.
- Primers muito grandes requerem temperaturas altas (mas acima de 80 °C interfere com a actividade da DNA polimerase).
- Os primers devem ter valores de T_m idênticos (2 a 4 °C de diferença).
- T_m ideal entre 55 a 70 °C.

$T_{annealing}$ (annealing temperatura) – temperatura à qual ocorre o emparelhamento entre o primer e a cadeia simples de DNA (temperatura determinada pela $T_m - 4$ °C).

- Deve ser baixa o suficiente para que ocorra hibridação e elevada o suficiente para evitar a formação de mismatches.

Cálculo da temperatura de melting – limitado a pequenas sequências:

$$T_m = 2(A + T) + 4(C + G)$$

Desenho de primers de PCR:

GGATGGAACACTGGGGG**GAGCCGATACCCAGGACAGG**SCAGTCCTGGAGGCAACCGTTATCCACCTCAGG
 GAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAAAC
 TCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCTCCATGGTGGT**GGCTGGGGACAGCCACAT**TTGGTGGCTGGGGACAG
 CCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTACCCACGGTCAATGGAACAAACCCAGTAAGCCAAAAA
 CCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCT
 GGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAGTGAATAT

Especificações dos primers pretendidos: $T_m = 60^\circ\text{C}$.

- 1) Forward Primer: GAGCCGATACCCAGGACAGG (20 bases, $T_m = 66$)
- 2) Reverse Primer: CCATGTGGCTGTCCCCAGCC (20 bases, $T_m = 68$)
- 1) Forward Primer: ~~G~~**G**AGCCGATACCCAGGACAGG (18 bases, $T_m = 60$)
- 2) Reverse Primer: ~~CC~~**A**TGTGGCTGTCCCCAGCC (18 bases, $T_m = 60$)

Região amplificada, que inclui as sequências dos primers:

5' - GGATGGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCAGGACAGGGCAGTCTCGAGGCAACCGTTATCCACCTCAGG - 3'
 3' - CCTCCGTTGGCAATAGGTGGAGT - 5'
 5' - **ATGGAACACTGGGGGGAGCC** - 3'
 3' - CCTACCTTGTGACCCCCCTCGGCTATGGGTCTGTCCCGTCAGGACCTCCGTTGGCAATAGGTGGAGTCC - 5'

Primers são escritos sempre na direcção 5' para 3':

- Forward primer: **ATGGAACACTGGGGGGAGCC**
- Reverse primer: **TGAGGTGGATAACGGTTGCCTCC**

Conteúdo em guanina-citocina:

- $GC\% = \frac{G+C}{\text{comprimento da sequência}} \times 100\%$;
- A composição de bases deverá estar na proporção de 45% GC para 55% AT.
- Poly Guaninas ou Citocinas podem resultar em ligações não específicas.

Se os primers emparelharem com eles mesmos, ou emparelharem um com o outro mais facilmente do que com o DNA molde, então a eficiência do PCR irá ser reduzida significativamente. Primers com estas características devem ser evitados.



Cross dimerization – os primers forward e reverse podem ligar-se formando um primer-dimer.

GENÉTICA MOLECULAR – Marcadores Genéticos e Marcadores Genéticos

Marcador Genético

Marcador genético – gene ou sequência de DNA, com propriedades de transmissão bem estabelecidas e com nível de polimorfismo elevado numa população.

Os de maior interesse em investigações genéticas são os que conciliam:

- Facilidade de detecção;
- Modelo genético formal conhecido (transmissão regular e estabilidade);
- Elevado polimorfismo.

Vantagens:

- Preservação das amostras é mais simples;
- Maior possibilidade de padronizar as técnicas de análise;
- Maior capacidade de detecção da variabilidade genética (toda a variação no DNA);
- Possibilidade de utilizar variadíssimos tipos de amostras, fósseis, tecidos secos, saliva, sangue, pêlos, etc.
- Possibilidade de se utilizar pequeníssimas quantidades de material biológico (gota de sangue, folículos ou de penas).

Detecção da Variabilidade no DNA

Detecção de polimorfismos do DNA – existem vários tipos de polimorfismos do DNA, por exemplo, variação numa única base (SNP), inserções e deleções, variação do número de repetições numa região, etc, e existem muitas técnicas para detectar essa variação.

Tem de se detectar os polimorfismos / mutações, pois apenas a diferença em nucleótidos (mesmo que seja num único nucleótido) pode distinguir 2 sequências.

“Marcadores Moleculares” – Detecção de Polimorfismos do DNA

RAPD (randomly amplified polymorphic DNA).

AFLP (amplified fragment length polymorphism).

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) – uso de enzimas de restrição, logo são enzimas que cortam o DNA em determinadas regiões, por exemplo, CCAA.

VNTRs (variable number of tandem repeats):

- Satélites – repetições de milhares de pares de bases.
- Minissatélites – repetições de 10 a 100 pares de bases.
- STR (short tandem repeat) – microssatélites, repetições de motivos de DNA, 2 a 9 pares de bases.

Inserções de elementos:

- SINEs – inserções de elementos curtos;
- LINEs – inserções de elementos longos.

SSCP (single strand conformation polymorphism) – polimorfismo que provoca uma alteração na conformação da cadeia de DNA simples, logo alteração da mobilidade electroforética.

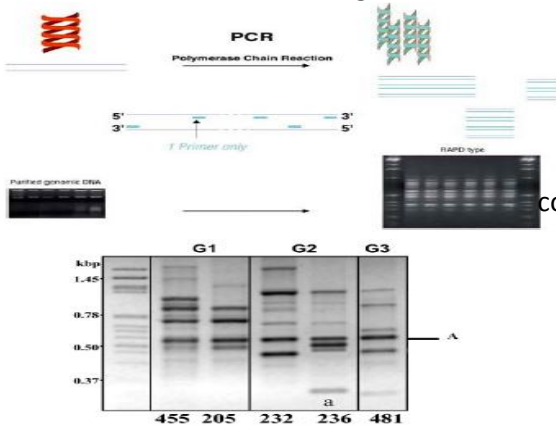
Sequenciação – SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

RAPDs

Pega-se em pequenos primers (menos específicos) com menor probabilidade de se ligar a determinada zona. Coloca-se no DNA e amplifica-se. Compara-se o padrão de bandas e se diferir, são diferentes. Forma mais simples. Bandas mais, ou menos, espessas consoante a quantidade amplificada.

É uma técnica com bastantes restrições pois colocam-se primers ao acaso e de várias quantidades sem preocupações do local onde se ligam e pois determinado primer pode ligar-se demais.

Não interessa de onde são os fragmentos que formaram as bandas, pois apenas se quer comparar. Uma banda a mais significa que esse primer, nesse indivíduo, teve a capacidade de formar um fragmento a mais (na zona onde se ligaram esses primers no outro indivíduo não se ligaram devido a uma variação / mutação).



Técnica:

- Uso de primers pequenos;
- Amplificação de vários fragmentos;
- Electroforese dos fragmentos amplificados.

Vantagens: método simples e útil quando não se conhece o genoma de determinada espécie.

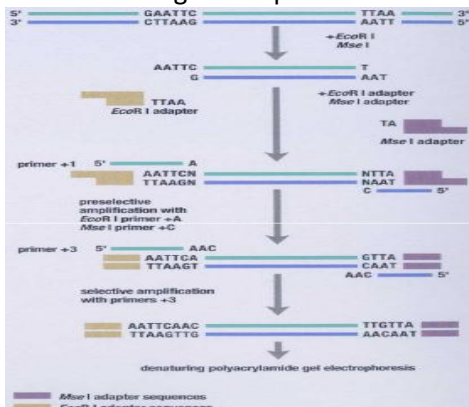
Desvantagens:

- Leitura muito complexa do gel (muitas bandas);
- Subjectivo e não específico – não se sabe o que se está a amplificar;
- Pouco reproduzível.

AFLPs

Antes de serem usados os primers, usam-se uma enzimas que vão actuar e cortar pequenos fragmentos de DNA. O primer, devido ao adaptador, vai-se ligar nas extremidades das zonas cortadas pelas enzimas de restrição utilizadas e permite amplificar o que está no fragmento. As extremidades são conhecidas.

O adaptador liga-se à extremidade e prolonga-se um pouco. Permite amplificar uma determinada sequência que se quer e se delimita com enzimas de restrição. Começa a existir alguma especificidade.



Técnica:

- Aplicação de enzimas de restrição;
- Aplicação de um adaptador que vai permitir a ligação dos primers;
- Electroforese e determinação dos tamanhos dos fragmentos amplificados;
- DNA-fingerprinting.

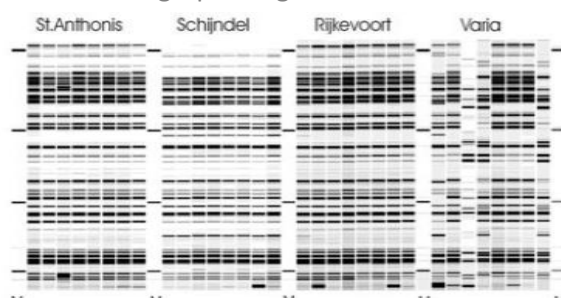
Vantagens:

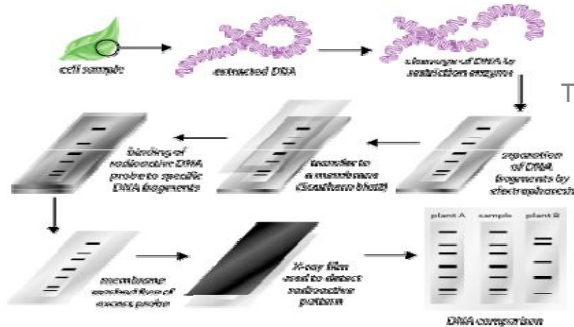
- Simples;
- Não é necessário conhecimento prévio do genoma da espécie;
- Há uma certa especificidade das zonas que se estão a amplificar, devido ao uso dos adaptadores.

Desvantagens:

- Padrões por vezes complexos (não tanto como os dos RAPDs);
- Dificuldade em se saber o que se está a amplificar.

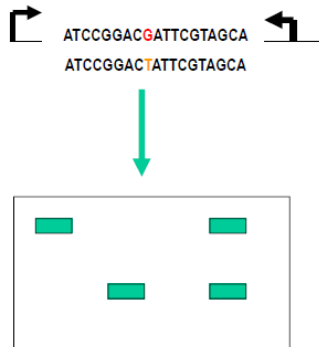
AFLP DNA fingerprinting:



RFLP

Técnica:

- Amplificação por PCR;
- Aplicação de enzimas de restrição que cortam determinadas sequências de DNA, originando fragmentos de diferentes tamanhos.



RFLP – polimorfismo de fragmentos de restrição, assenta na ideia de que cada indivíduo tem regiões em que há variação dos locais das zonas de restrição, logo origina perfis de restrição (bandas na electroforese) diferentes de indivíduo para indivíduo.

O DNA genómico de um eucarionte é muito grande, por isso, em vez de aparecerem bandas padrão, nos resultados da electroforese, aparece um arrastamento.

A sonda utilizada é um fragmento de DNA que reconhece a região em questão. Existe um polimorfismo devido aos múltiplos perfis que se originam.

Enzimas de restrição cortam o DNA de um modo consistente e reproduzível. As porções de genoma idênticas entre todos os indivíduos, originam perfis de DNA idênticos quando cortadas com enzimas de restrição. No entanto, se ocorre uma mutação (e desaparece um local de restrição na porção de DNA), originam-se fragmentos de tamanhos diferentes.

A técnica é designada por polimorfismo dos fragmentos de restrição devido à variação do tamanho desses múltiplos perfis.

PCR-RFLP

Usa-se as enzimas de restrição. Analisam-se os padrões.

Ladder – marcação das unidades (quantidade de pares de base).

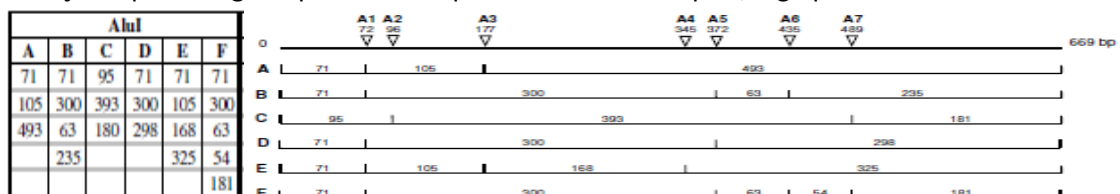
Técnica:

- Amplificação de determinado fragmento de DNA por PCR;
- Uso de enzimas de restrição;
- Electroforese e análise do tamanho de fragmentos.

Vantagens:

- Simples;
- Barato;
- Rápido – pode-se genotipar muitas amostras em pouco tempo).

Desvantagens – apenas se detectam as mutações nos locais de corte das enzimas de restrição e pode originar padrões complexos ou muito simples, logo pouco informativos.

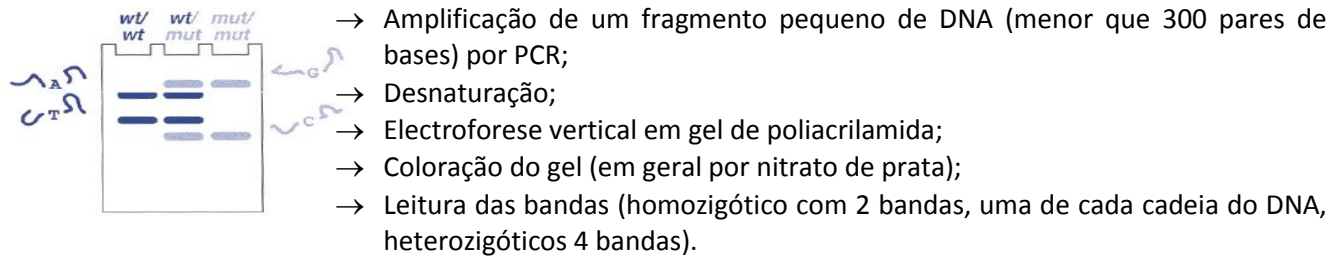
**SSCP**

Baseia-se no princípio que uma mutação numa base altera a conformação da cadeia de DNA. Amplificam-se fragmentos pequenos, desnatura-se (separa-se a cadeia de DNA), electroforese, coloração, desnaturação.

2 bandas não significa que seja heterozigótico, significa sim uma e outra cadeia pois o DNA está desnaturado.

Heterozigótico – 4 cadeias de DNA diferentes (2 cromossomas diferentes, logo 2 cadeias de DNA diferentes, e então 4 cadeias diferentes de DNA).

Técnica:

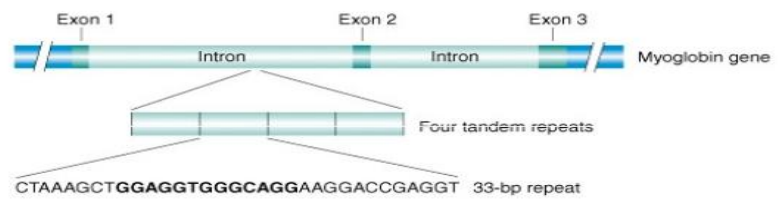
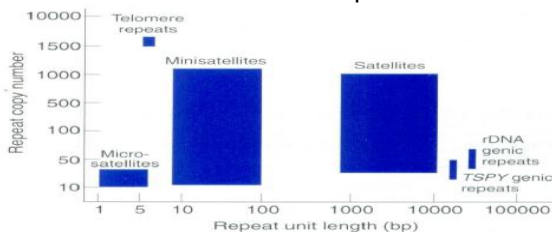


Detecção de Polimorfismos do DNA (os VNTRs)

VNTRs – variable number of tandem repeats:

- Satélites – repetições de milhares de pares de bases;
- Minissatélites – repetições de 10 a 100 pares de bases;
- STR (short tandem repeat) – microssatélites (repetições de motivos de DNA de 2 a 9 pares de bases).

Os VNTRs possuem um número variável de repetições:



VNTR / STR – zonas variáveis que se repetem no genoma de 1 indivíduo. A diferença entre os métodos está no número de Nucleótidos que as compõe. As repetições são obtidas dos pais e podem ser considerados como alelos.

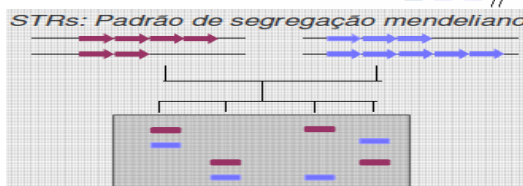
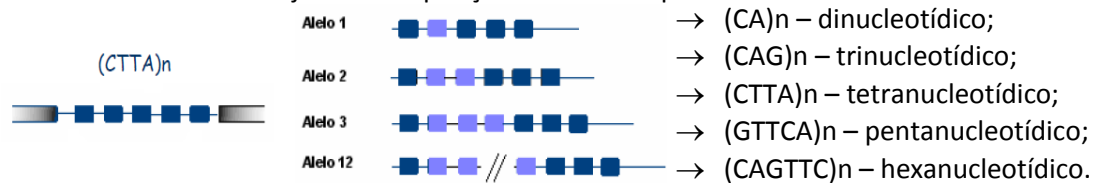
VNTR (minissatélites) / STR (microssatélites), o tamanho depende do número de pares de bases que o compõem e do número de vezes que estas se repetem.

Após o tratamento de uma região autossômica de um indivíduo heterozigótico com uma enzima de restrição, originam-se fragmentos de DNA mais pequeno e desiguais, que podem ser identificados por Southern-blotting (um de origem paternal e outro maternal).

Short Tandem Repeats (STRs) – Microssatélites

Motivo de repetição entre 2 – 6 pares de bases.

Tamanho do conjunto de repetições – 30 – 300 pares de bases.



Vários alelos / locus. Elevada heterozigotia. Taxa de mutação é cerca de 1×10^{-3} por locus por geração.

Minissatélites:

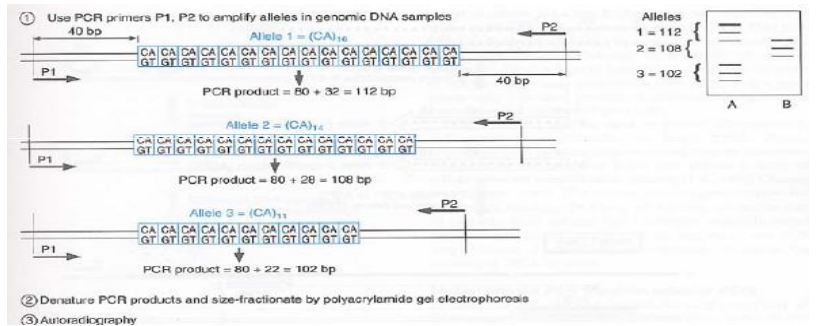
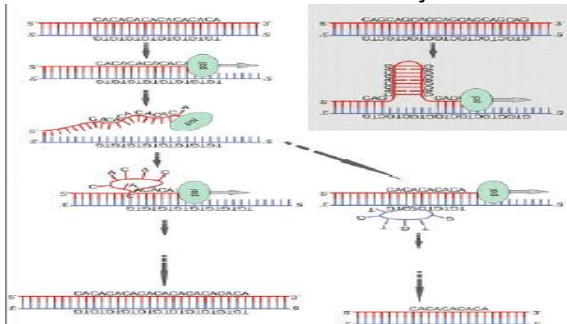
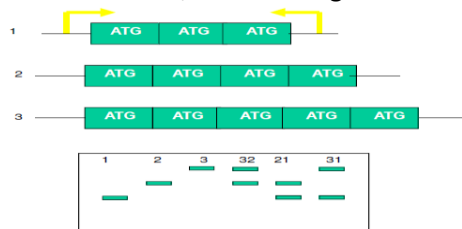
- Motivo de repetição superior a 9 pares de bases.
- Tamanho do conjunto de repetições – 1 – 20 kb.
- Grande heterozigotia devido a uma taxa de mutação muito elevada (recorrência frequente).
- Mecanismo mutacional mais complexo, por exemplo, recombinação intracromossômica igual ou desigual pode causar deleção ou duplicação de motivos.

Os STRs (microssatélites):

- Grande heterozigotia devido a uma elevada taxa de mutação (cerca de 1×10^{-3}) por locus por geração.
- Padrão de segregação mendeliano;

Bastante frequentes no genoma (genoma nuclear humano 1/cerca de 30 000 pares de bases). No STR o principal mecanismo mutacional resulta de replication slippage:

- Durante a síntese de DNA podem formar-se ansas resultando em expansões ou contracções do número de motivos de repetição.
- Certos motivos (por exemplo CAG) tendem a favorecer especialmente a formação de estruturas no DNA.

**Microssatélites, análise em gel:****Microssatélites – análise do polimorfismo em sequenciador automático:**

- Homozigótico:
- Heterozigótico:
- Heterozigótico:

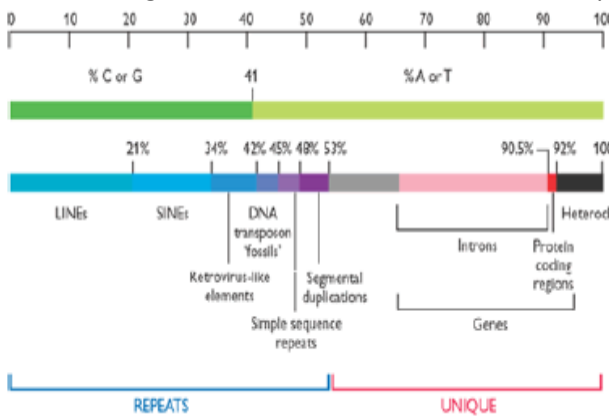
Microssatélites – marcadores muito utilizados em estudos de genética populacional, identificação individual, paternidades, etc.

Aplicações mais comuns:

- Determinação de estrutura populacional (quantas populações, isolamento, fragmentação, etc);
- História evolutiva e demografia;
- Filogeografia (relaciona a filogenia e a distribuição espacial das espécies / populações);
- Detecção de hibridação;
- Análises de paternidades;
- E outras múltiplas utilidades para os estudos de ecologia e conservação.

SINEs e LINEs

Porções de DNA, que em geral resultam da reversão do RNA, e se encontram dispersos pelo genoma. Não codificam proteínas, pelo que são considerados pseudogenes (cópias de genes sem actividade codificadora de proteínas).



SINEs – single interspersed elements:

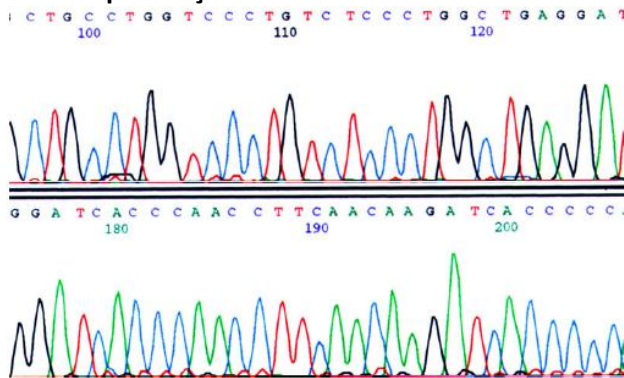
→ ALU, fragmento de cerca de 300 pares de bases que se encontra disperso pelo genoma. Comum no genoma Humano e usado como marcador genético. Pode estar associado a patologia.

LINEs – long interspersed elements:

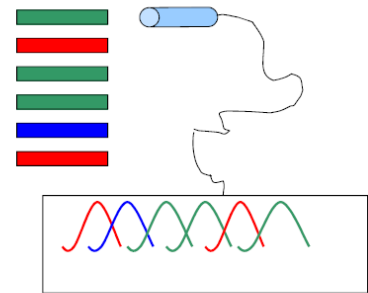
→ 45% do genoma é composto por elementos repetidos dispersos pelos vários cromossomas.

→ Estimam-se cerca de 868 000 LINEs e 1 558 000 SINEs.

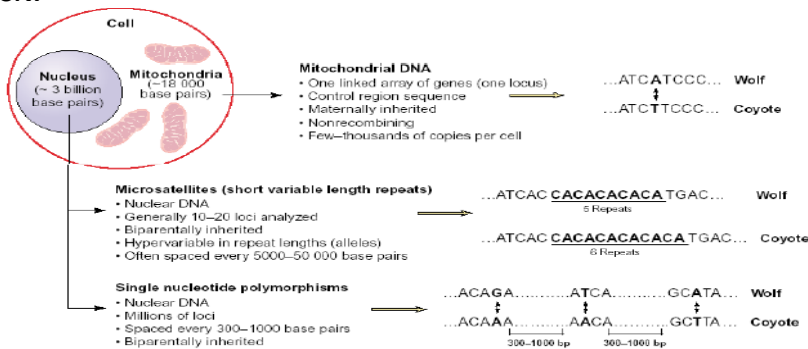
Sequenciação



TCAAGTA
AGTTCAT
T
AGTTCAT
TC
AGTTCAT
TCA
AGTTCA
TCAA
AGTTCAT
TCAAGT
AGTTCAT
TCAAGTA
AGTTCAT



SNP



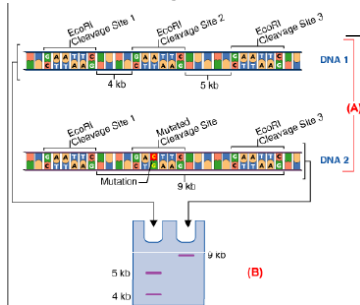
SNP (single

nucleotide polymorphism) – polimorfismo baseado na alteração de uma única base (por exemplo, Timina-Citosina).

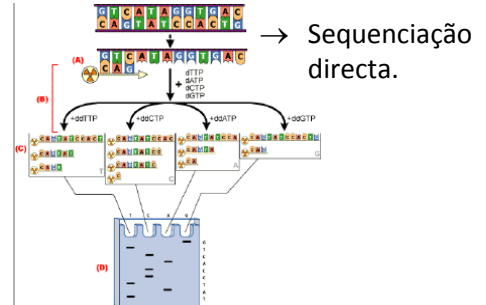
Tipos estruturais de marcadores genéticos usados em investigações genéticas (SNP):

- Marcadores bialélicos,
- Nível de polimorfismo relativamente baixo;
- Taxa de mutação baixa (acontecimentos únicos) - 1×10^{-9} por locus e geração.
- InDels de base única incluídos na categoria de SNP.

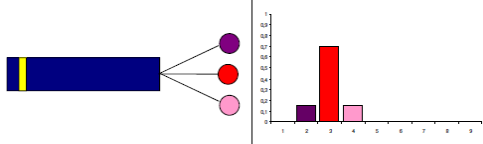
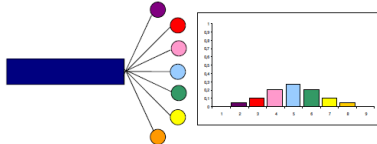
Detecção de SNPs:



Técnicas de RFLP (restriction fragment length polymorphism) são usadas para detectar mutações em sequências de DNA que são reconhecidas por enzimas de restrição específicas.



SNPSTRS – marcador molecular composto, formado por SNP e microssatélites, detectados num fragmento pequeno de DNA (marcadores ligados).



Aplicações dos Marcadores Moleculares

Determinação de estrutura populacional (quantas populações, isolamento, fragmentação, etc).

História evolutiva e demografia.

Relações filogenéticas – taxonomia molecular.

Filogeografia – relaciona a filogenia e a distribuição espacial das espécies / populações.

Determinação de unidades populacionais a conservar.

Detecção de hibridação.

Determinação do sexo.

Análises de paternidade.

Diagnóstico de doenças genéticas.

Genética forense.

Outros.

GENÉTICA MOLECULAR – Variabilidade Genética

Factores que Determinam a Variabilidade Genética

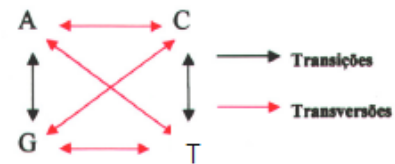
Variabilidade genética: Evolução – Diferenciação – Especiação.

Factores: Mutação; Recombinação; Selecção; Deriva genética; Consaguinidade; Migração.

Mutação

Dimensão da região afectada:

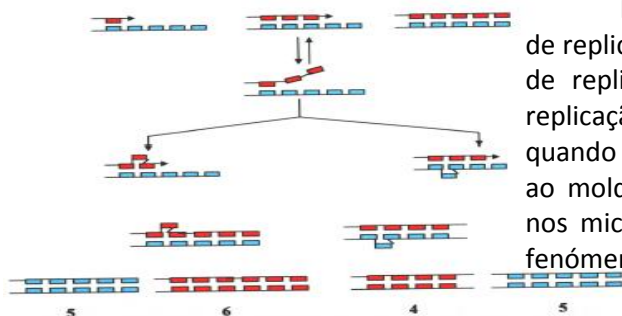
- Pontuais – um único nucleótido;
- Não pontuais – mais do que um nucleótido.



Substituições – mutações pontuais por vezes sem sentido. São mutações raras que muitas vezes ocorrem sem causarem efeito, pois levam à produção da mesma proteína, ou seja, pode não ter consequência nenhuma.

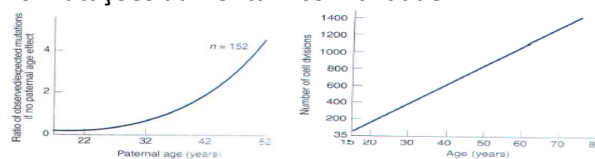
Delecção – mudança na estrutura (frameshift mutations), devido a uma perda no material cromossómico. Está associada a grandes incapacidades, pois altera completamente a mensagem, repercutindo-se em todos os codões existentes a partir daquele que foi alterado, ou seja, toda a sequência que aparece posteriormente a essa delecção, perde o significado / sentido. Ocorrem frequentemente em sequências repetitivas e devido a erros de replicação ou de recombinação.

Inserções – mudança na estrutura (frameshift mutations). Assim, toda a sequência que aparece posteriormente a essa inserção, perde o significado / sentido, ou seja, altera completamente a mensagem, pois vai repercutir-se em todos os codões existentes a partir daquele que foi alterado.



Mutação em microssatélites "slippage" – erros de replicação são a principal fonte de mutações. Um erro de replicação comum é a derrapagem "slippage" de replicação, que ocorre em sequências repetitivas, quando a nova sequência não se ajusta correctamente ao molde. A elevada taxa de polimorfismos observada nos microssatélites é causada essencialmente por este fenómeno durante a replicação.

As mutações aumentam com a idade:



Padrões de substituições em sequências não codificantes:

De	Para				Total
	A	T	C	G	
A	-	4.7	5.0	9.4	19.1
T	4.4	-	8.2	3.3	15.9
C	6.5	21.0	-	4.2	31.7
G	20.7	7.2	5.3	-	33.2
Total	31.6	32.9	18.5	16.9	

- Há mais transições que transversões.
- As transições mais comuns são: C → T e G → A.
- Há nucleotídeos que mudam mais que outros: G e C por exemplo.
- Há nucleotídeos que substituem outros mais frequentemente que o esperado – maior parte da percentagem das mutações resultam em A ou T.

Alteração da frequência alélica devido a mutação recorrente: A para a a uma taxa de mutação μ .

$$p_t = p_{t-1}(1 - \mu) = p_{t-2}(1 - \mu)^2 = \dots = p_0(1 - \mu)^t$$

$$q_f = q_0 + t\mu$$

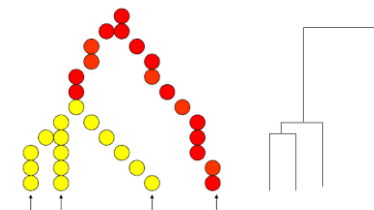
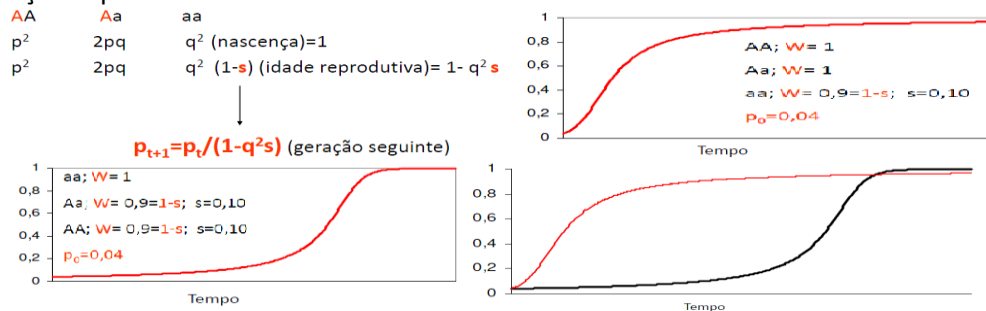
- μ - taxa de mutação;
- t - número de gerações;
- p_0 - frequência do alelo p na população original.

Tipos de substituições patogénicas:

Tipo de mutação	Número	Porcentagem
Substituição de bases	21 000	75% do total
Substituição de aminoácidos	14 756	52% das substituições de bases
Geração de codão STOP	3 198	11% das substituições de bases
Abolição de codão STOP	24	Menos que 1% das substituições de bases
Mutações em locais de processamento	2976	11% das substituições de bases
Mutações em locais de regulação	246	1% das substituições de bases
Pequenas deleções	5049	18% do total
Pequenas inserções	1922	7% do total

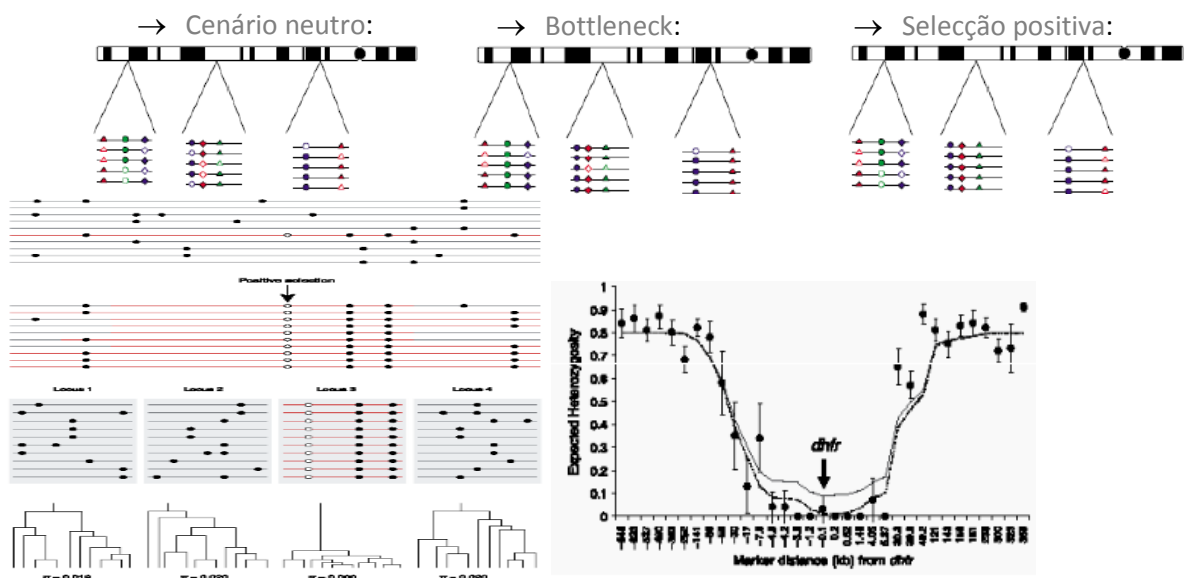
Seleção Positiva

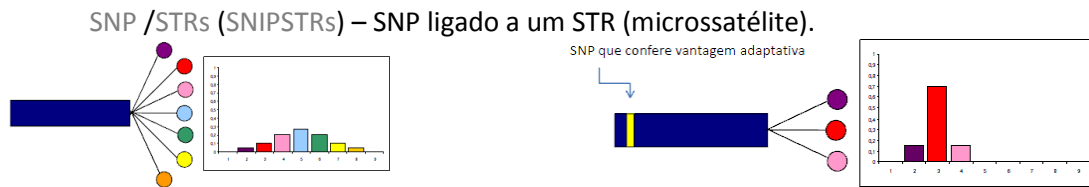
Evolução da frequência de um alelo que tenha uma probabilidade de ser escolhido em cada geração superior à de outros alelos.



Selective sweep – reduz a variabilidade genética dos locais neutrais que estão ligados aos loci sobre selecção.

Padrões de diversidade:





Seleção Equilibrada

Evolução da frequência de um alelo que tenha uma probabilidade de ser escolhido em cada geração caso ocorra em heterozigotia.

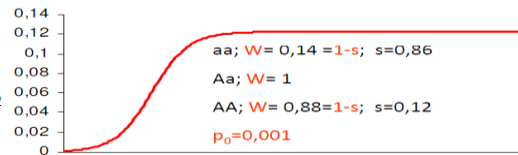
AA Aa aa

p^2 $2pq$ q^2 (nascença)=1

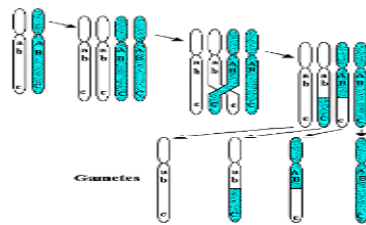
$p^2(1-s_1)$ $2pq$ $q^2(1-s_2)$ (idade reprodutiva)= $1-p^2s_1-q^2s_2$

$p_{t+1} = p_t / (1-p^2s_1-q^2s_2)$ (geração seguinte)

A malária e a anemia falciforme constituem um exemplo de mutação equilibrada.



Recombinação



Recombinação genética refere-se mais a uma rearranjo em larga-escala da molécula de DNA. Este processo envolve um emparelhamento entre duas cadeias complementares de dois progenitores ou da dupla cadeia de DNA, e resulta de uma mudança física do material cromossômico.

Gera novas combinações de alelos na mesma molécula de DNA, aumentando assim a diversidade haplotípica.

Não ocorre em marcadores haplóides.

Há regiões do cromossoma em que ocorre com maior frequência do que outras.

É muito mais frequente em zona teloméricas do cromossoma do que centroméricas.

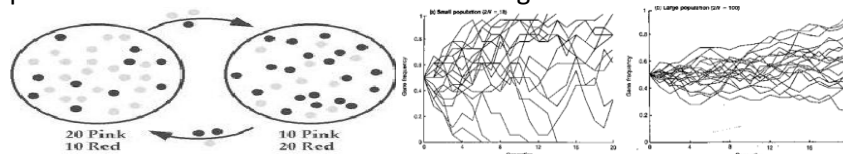
Provoca uma grande mistura de haplótipos.

Pode indicar a existência ancestral de hibridação entre espécies.

Deriva Genética

Deriva genética – processo estocástico, na medida em que é impossível prever a direcção das alterações em cada geração.

Quanto menor o efectivo populacional (N_e), maior é o efeito da deriva genética, isto é, maior a probabilidade de um alelo se fixar ou extinguir.



Nas populações grandes há uma certa alteração nas frequências corresponde alguma diferenciação, enquanto numa população pequena vão existir alelos que se distinguem e outros se fixam. Pode ser um caso grave quando ao alelo que se fixa é prejudicial ao organismo, podendo levar uma população à extinção.

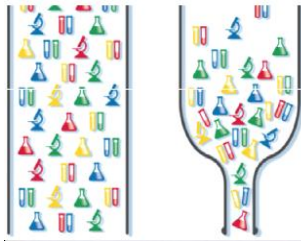
As populações podem, então, perder a sua diversidade, por meros efeitos do acaso, ou seja, há uma perda substancial da diversidade da população, por meros efeitos aleatórios.

Apenas nas situações em que há a perda total da variabilidade é que se deixa de verificar o fenómeno de deriva genética.

Em populações de tamanho grande, os efeitos de deriva genética são menos acentuados, ou seja, quanto menor o tamanho da população, maiores são os erros que podem ocorrer, logo, maior é a probabilidade da perda de factores, pela população.

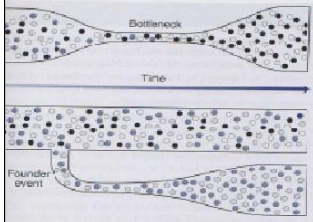
Bottleneck / Efeito Fundador

Perda de variabilidade e diferenciação populacional.



Bottleneck – a população ao longo do tempo sofrer uma diminuição drástica e os que sobrevivem (por mero acaso) vão continuar a população que é muito diferente na sua composição à população antes do efeito, podendo ser eliminados alelos e fixados outros.

Redução drástica do efectivo populacional, em consequências de fomes, epidemias, desastres naturais, ...

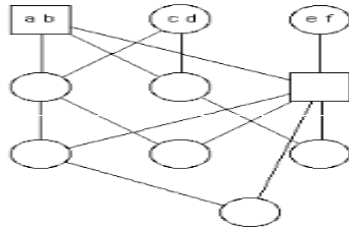


Efeito fundador – numa população muito grande ao longo do tempo, existe a determinado momento alguns indivíduos ao acaso que tomam uma via diferente e fundam uma nova população muito diferente da original, pois os alelos desses indivíduos são tão aleatórios que também podem levar à eliminação de alelos e fixação de outros.

Pode ocorrer ao acaso, devido a migrações sucessivas de uma população-mãe, que dão origem a sub-populações que diferem muito da população fundadora. Quando indivíduos abandonam a população-mãe para estabelecer a sua própria população, os erros de amostragem dessa população-mãe refletem-se em cada uma dessas novas populações.

Isto tudo origina a variabilidade encontrada, marcando a variabilidade genéticos.

Consanguinidade



Probabilidade de ser homozigótico para um alelo derivado do mesmo ancestral é maior que em casos normais.

Tem de existir ancestrais comuns, logo existe alguns um cruzamento de indivíduos aparentados.

Possíveis causas:

- Pelo número muito pequeno do tamanho efectivo da população (população reprodutora – N_e).
- Efeito de forte selecção.
- Cruzamentos não ao acaso.

Consequências:

- Aumenta a homozigotia.
- Diminui a heterozigotia.
- Desaparecimento dos alelos de menor frequência.
- Aumento de risco de doenças ou anomalias.

Migração

Não muda obrigatoriamente as frequências dos alelos dentro das grandes populações (por exemplo espécies), nem forma novos alelos, mas pode provocar alterações significativas das frequências alélicas dentro das subpopulações.

Provoca o fluxo génico o que contraria a diferenciação populacional.

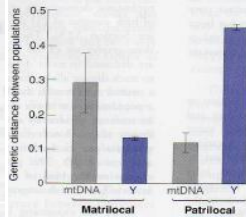
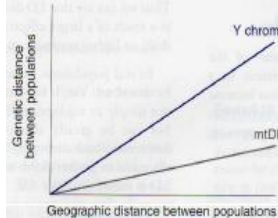
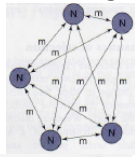
A migração de poucos indivíduos, desde que se reproduzam e tenham descendentes férteis, é suficiente para contrariar a diferenciação populacional.

Assim, não forma propriamente novos alelos, mas muda significativamente a frequência dos alelos.

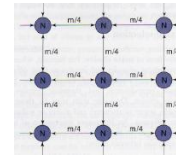
Quando um indivíduo de uma população entra em contacto com outra população diferentes, mas entanto se se reproduz é porque deixa lá o seu gene e isso já é importante. Para existir um fluxo basta uma pouca quantidade do indivíduo.

Fluxo génico – modelos:

→ Ilha – migração radical



→ Steping stone – ponto a ponto

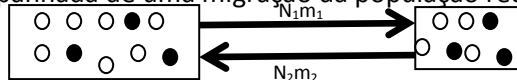


Diferencial entre os sexos – em teoria, os machos migram mais que as fêmeas. Numa população matrilocal a diferenciação é encontrada a nível de marcadores genéticos, no entanto numa patrilocal essas diferenciações são apenas no Y.

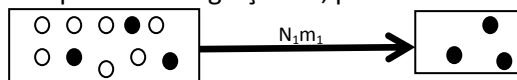
A migração provoca uma diferença nas frequências entre as duas populações. A proporção de genes migrantes que são incorporados em cada geração:

- q_0 – frequência inicial do gene na população receptora;
- Q – frequência do mesmo gene na população migrante;
- m – proporção de novos genes introduzidos em cada geração.

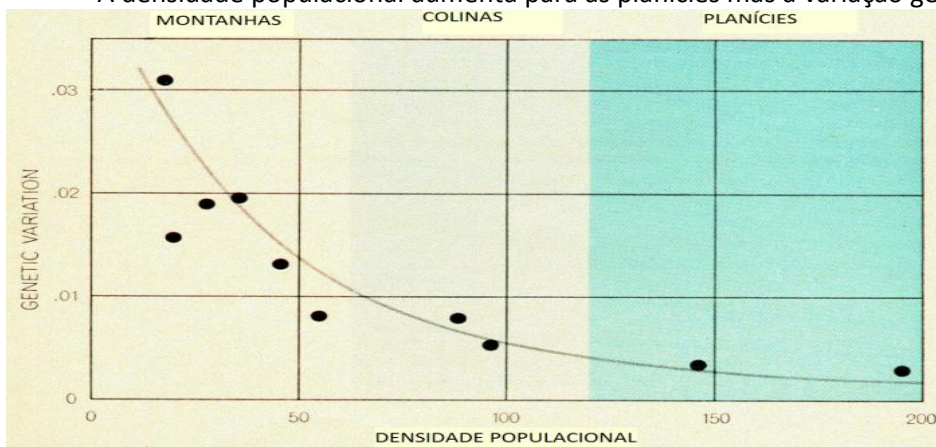
Existe um equilíbrio (fenotípico e genotípico) se houver migração da população dadora para a receptora, acompanhada de uma migração da população receptora para a dadora.



No entanto, a maior parte das migrações é, praticamente unidireccional.



A densidade populacional aumenta para as planícies mas a variação genética diminui.



GENÉTICA MOLECULAR – Filogenia

Filogenia

História evolutiva de um grupo ou linhagem.

Filogenia:

- Vários tipos de dados – morfológicos, moleculares, etc.
- Usa a informação da conservação e diversificação;
- Objectivo – reconstruir as relações históricas entre taxa ou grupos de taxa.

Baseiam-se numa matriz de distâncias entre as unidades taxonómicas operacionais, que podem ser espécies ou grupos taxonómicos, populações ou mesmo indivíduos.

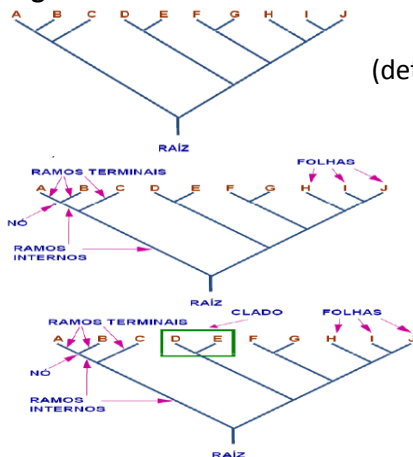
Podem usar desde caracteres morfológicos (morfométricos ou outros) a genéticos (mutações ao nível dos nucleotídeos, SNPs).

Baseiam-se em diversos métodos de agrupamento:

- UPGMA cluster analysis
- NJ – Neighbor-joining.

As árvores filogenéticas são representações gráficas que consistem em nódulos (unidades taxonómicas) e ramos (ligações entre os nódulos), que sumariam as relações evolutivas entre os organismos.

Terminologia



Uma árvore filogenética pode ou não ter raiz (determinada por um grupo externo).

Uma árvore tem ramos internos e externos (ou terminais) e folhas.

O ponto de ramificação de duas linhagens evolutivas é o nó.

Um grupo de organismos com um ancestral comum é um clado.

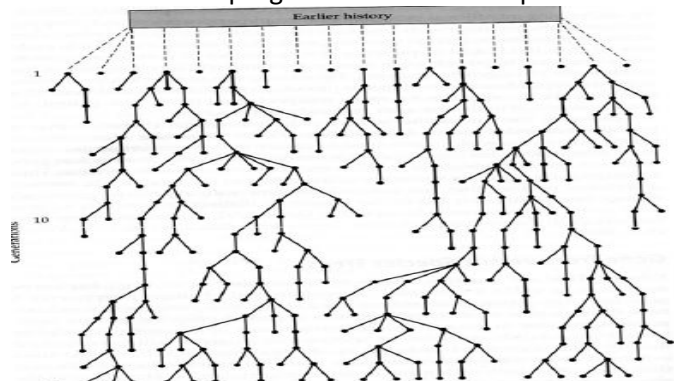
O padrão de ramificação de uma árvore é chamada **topologia**.

Devido ao grande tamanho da maioria das bases de dados moleculares, utiliza-se programas de computador para calcular os parâmetros populacionais, matrizes de distâncias e algoritmos filogenéticos.

Entre vários programas, os mais usados são: PHYLIP, PAUP, BIOSYS-1, MEGA, ...

MODELTEST – para determinar o modelo de evolução que está mais ajustado aos dados moleculares (entre os vários possíveis: Jukes-cantor, Kimura 2 parâmetros, etc).

Clustal e **Bioedit** – programas informáticos para alinhamento de sequências.



Filogenias Usando Sequências de DNA

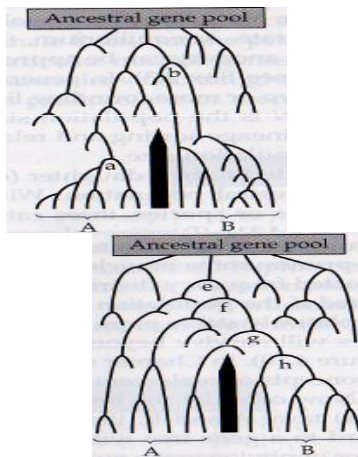
Utiliza-se um ou vários marcadores. Há diversas metodologias para a determinação da melhor árvore filogenética que descreve os dados (diferentes critérios e modos de construção).

O resultado é uma hipótese que pode ser bem ou mal suportada (dependendo por exemplo se a maior parte dos caracteres suporta ou não uma determinada topologia).

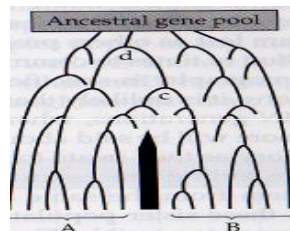
A árvore evolutiva de um gene não corresponde necessariamente à árvore evolutiva da espécie. A identificação de padrões filogenéticos (e de variação de sequências) discordantes entre marcadores pode então servir processos evolutivos que têm um efeito regional no genoma.

Relações Filogenéticas

Monofilia:

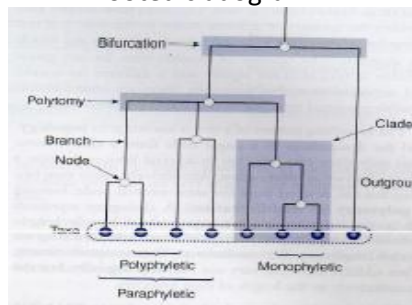


Polifilia:

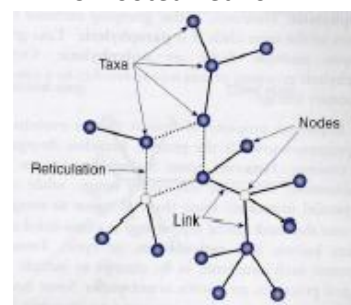


Parafilia – espécie A tem 2 haplótipos que estão mais próximos dos outros haplótipos de B, mais do que está dos de A. logo algo se passou para que um haplótipo semelhante a A, seja muito mais próximo de B.

Rooted cladogram:



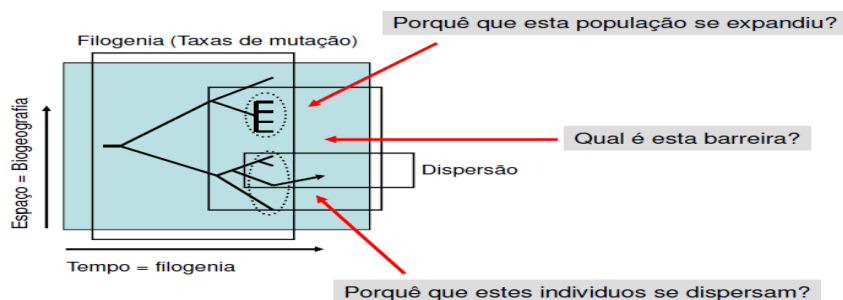
Unrooted network:

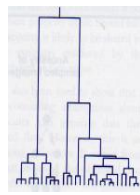


Filogenia

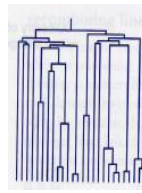
A inferência de uma filogenia muitas vezes não é o objectivo final de uma análise filogenética. É utilizada como uma ferramenta para interpretar processos ecológicos e evolutivos (determinação de taxas de evolução, configurações biogeográficas de populações, evolução reticulada, etc). Importante em diferentes áreas da biologia (evolução, conservação, sistemática, ecologia, etc).

Árvores





População constante – terá tido uma maior constância de indivíduos.

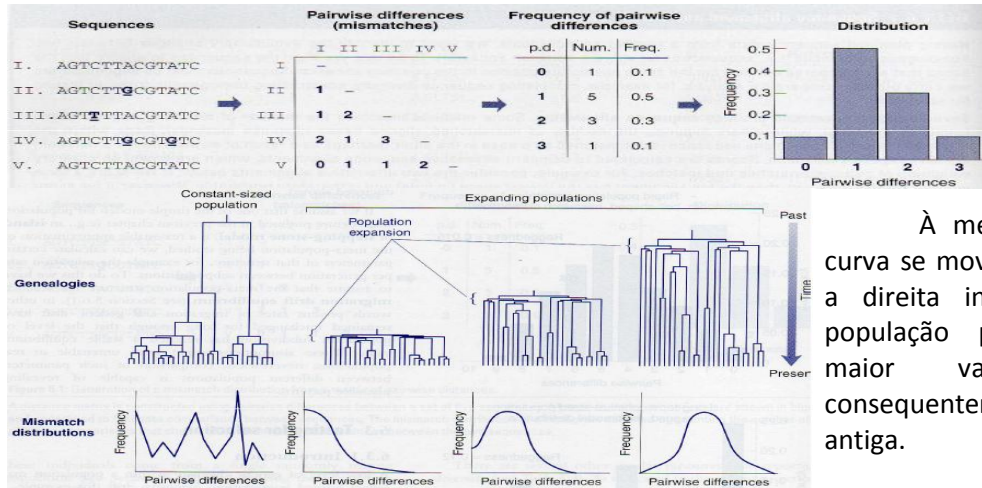


População expandida



População subdividida – poderá ser originada do efeito de Bottleneck.

Análise de Mismatches

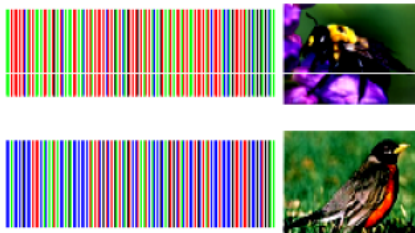


Vê-se par a par as diferenças que existem de mutações.

À medida que a curva se movimenta para a direita induz que a população possui uma maior variação e consequentemente mais antiga.

Bimodais – há muitas variações e pequenas.

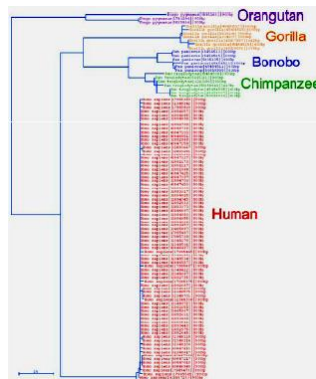
Projecto BARCODE



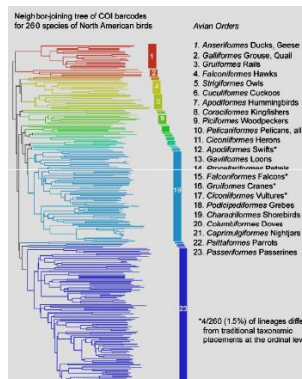
Analisar um gene mitocondrial para o máximo de indivíduos e espécies possíveis. A ideia é criar uma base de dados o mais robusta possível para se conseguir ao máximo diferenciar tipos de espécies. Projecto que pretende de uma forma padronizada identificar todos os animais e plantas através da análise de uma sequência de DNA.

O gene do barcode é o DNA mitocondrial citocromo oxidase I.

Barcode nos Humanos:

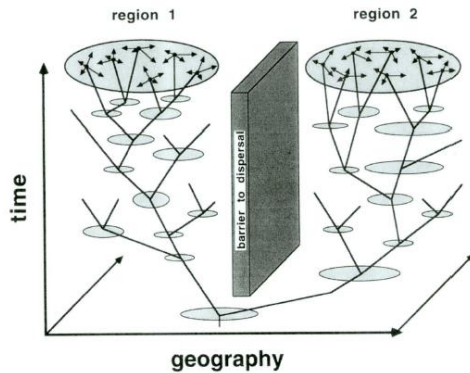


Barcode em aves:



O polimorfismo intraespecífico é importante na procura de novas espécies – pois se é alto é porque, ou não são a mesma espécie, ou o marcador não é o mais adequado, pois em indivíduos de espécies diferentes há polimorfismo intraespecífico reduzido e interespecífico elevado, se tal não ocorre, algo está mal.

Filogeografia



Filogeografia – estuda as causas históricas da distribuição espacial das linhagens.

Análise filogenética do DNA mitocondrial do corço na Península Ibérica e Europa Central.

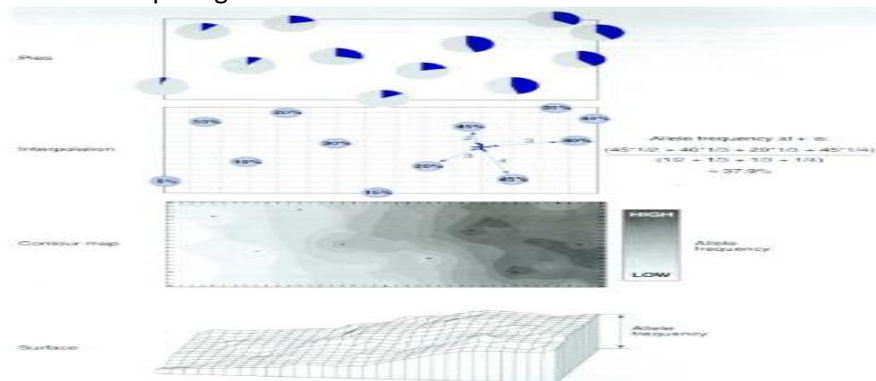
Distribuição geográfica das linhagens mitocondriais de corço na Península Ibérica.

Rede Network de haplótipos:

- Traduz a relação genealógica entre os diferentes haplótipos.
- Os diferentes grupos (clados) podem ser relacionados com a geografia.
- Quando há um haplótipo mais comum, em situação central e com vários sub-haplótipos que divergem deste por poucas mutações (Starlike) este facto sugere uma colonização recente.

Representação Espacial da Variação Genética

Genética da paisagem:



GENÉTICA MOLECULAR – Estrutura Populacional

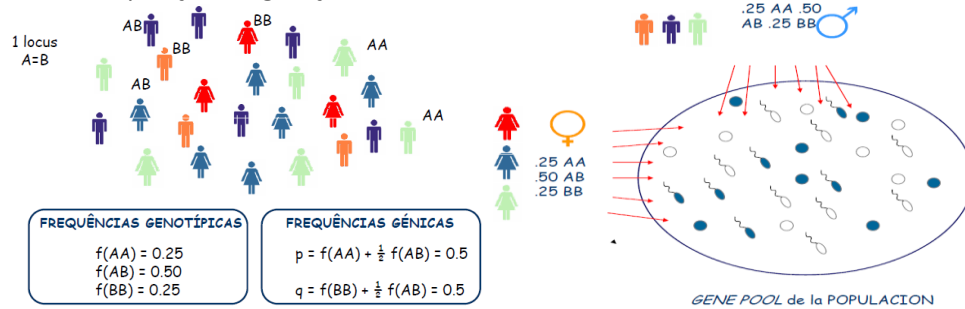
Pressupostos de Hardy-Weinberg

Cruzamentos ao acaso.

População infinitamente grande.

Ausência de selecção, migração, mutação.

Sem sobreposição de gerações.

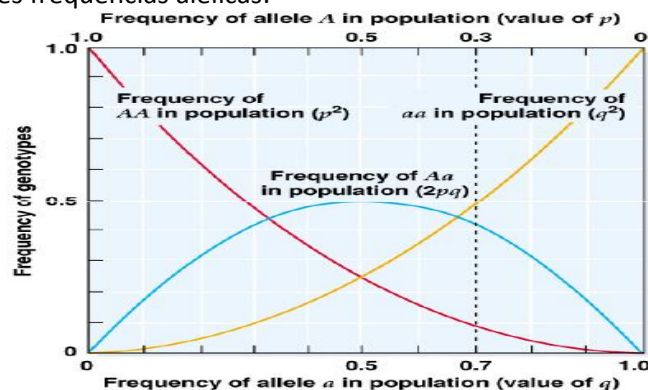


A variação genética pode ser quantificada pelo nível de heterozigotia num determinado locus, que é dado pelo total da frequência de heterozigóticos nesse locus.

Se num locus com 2 alelos, um alelo é muito frequente e o outro é zero, então não haverá heterozigóticos.

Assim, espera-se que a heterozigotia seja máxima quanto maior for o número de alelos num locus e que as suas frequências sejam iguais.

Diagrama que mostra as proporções de homozigóticas e heterozigóticas numa população com diferentes frequências alélicas:



Na ausência de cruzamentos ao acaso – existem 2 tipos de desvios à panmixia:

- **Consanguinidade (inbreeding)** – se o cruzamento entre indivíduos aparentados ocorre com maior frequência do que seria esperado acontecer ao acaso.
- **Assortative mating** – os indivíduos podem cruzar-se preferencialmente com outros que partilhem uma mesma característica (positivo), ou que não a partilhem (negativo).

Gene pool da população – existem metade dos gametas com o alelo A e a outra metade com o alelo B, logo os 2 genes são equifrequentes:

- No gene pool de uma população, existem gametas femininos na proporção de 25 AA, 50 AB e 25 BB. Os gametas masculinos aparecem na mesma proporção (25 AA, 50 AB e 25 BB).

Factores que Alteram Diversidade Genética, ao Nível Populacional

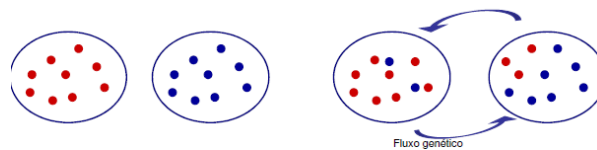
Ecologia, comportamento reprodutivo.

Consanguinidade:

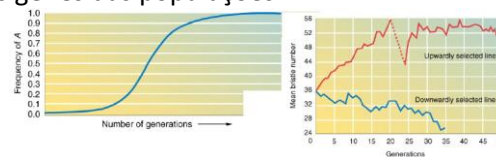
- Desvios aos cruzamentos aleatórios;
- Cruzamentos entre indivíduos aparentados é superior ao que seria esperado;
- Cruzamentos selectivos – escolha não aleatória do par tem consequências em termos populacionais (aumento da homozigotia relativamente ao que seria de esperar de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Migração – troca de genes entre populações. Tende a eliminar diferenças genéticas entre populações. Há um aumento da variabilidade intra-populacional e uma diminuição da variabilidade inter-populacional (origina misturas populacionais).

- Fluxo génico – troca de genes entre populações. Tende a eliminar diferenças genéticas entre populações.
- Aumento da variabilidade intra-populacional e diminuição da variabilidade inter-populacional.

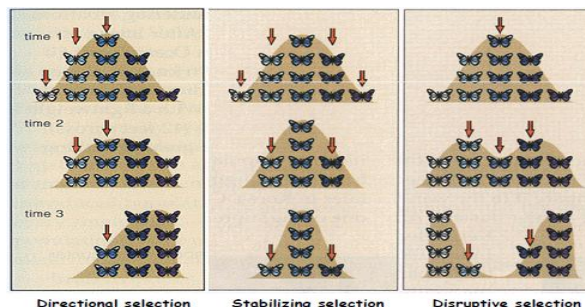


Seleção – reprodução diferencial de indivíduos com diferentes fenótipos numa população. Alguns fenótipos / genótipos conferem maior ou menor adaptabilidade a condições ambientais particulares. Reprodução diferencial pode ser determinada por diferenças entre indivíduos, quanto a factores como mortalidade, fertilidade, fecundidade, sucesso no cruzamento ou viabilidade da descendência. A seleção de determinado gene irá provocar alterações nas frequências dos genes das populações:



Seleção – reprodução diferencial de indivíduos com diferentes fenótipos numa população:

- Alguns fenótipos / genótipos conferem maior ou menor adaptabilidade a condições ambientais particulares.
- Reprodução diferencial pode ser determinada por diferenças entre indivíduos quanto a factores como mortalidade, fertilidade, fecundidade, sucesso no cruzamento ou viabilidade da descendência.



Deriva genética – alteração aleatória das frequências numa população, de geração em geração. Simulações sobre o efeito da deriva genética nas frequências alélicas (frequência do alelo A) em populações de baixo e elevado efectivo.

GENÉTICA MOLECULAR – Estruturação Genética

Descrição e Quantificação da Variabilidade Genética

- Frequências dos alelos.
- Distribuição geográfica dos alelos.
- Testes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Medidas da variabilidade genética.

Parâmetros para Estimar a Variabilidade Genética

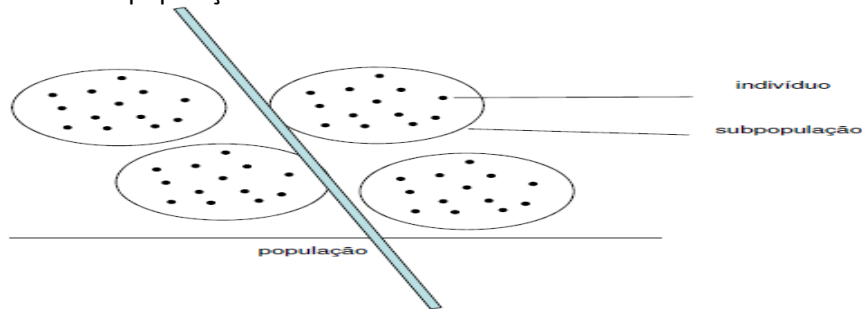
- Frequência dos alelos.
- Percentagem de loci polimórficos – P.
 - $P = \frac{x}{m}$ (x – número de loci polimórficos; m – número de loci analisados).
- A – número médio de alelos por locus.
- Heterozigotia média esperada – H_e : $H_e = 1 - \sum x^2$ em que, x – frequência do alelo x.
- Heterozigotia observada (H_o).
- Quando $H_e = H_o$ – cruzamentos ao acaso.

Cálculo das Partições da Diversidade

- H_{POP} – heterozigotia calculada em cada população.
- H_{GRUPO} – heterozigotia calculada em cada grupo de populações.
- H_{TOTAL} – heterozigotia calculada em todas as populações da espécie.
- Partições da diversidade genética:

- Nas populações: $\frac{H_{POP}}{H_{TOTAL}}$
- Entre populações: $\frac{H_{GRUPO} - H_{POP}}{H_{TOTAL}}$
- Em grandes grupos: $\frac{H_{TOTAL} - H_{GRUPO}}{H_{TOTAL}}$

Estrutura de uma população:



- H_l – heterozigotia observada numa subpopulação ($H_l = \sum \frac{H_l}{k}$).
- H_s – heterozigotia esperada numa subpopulação ($H_s = 1 - \sum p_i \frac{2}{k}$).
 - P – frequência dos alelos;
 - K – número de subpopulações.
- H_T – heterozigotia esperada na população total ($H_T = 2 - pq$).
 - Média das frequências dos alelos nas subpopulações.

Subestruturação Populacional

Uma das mais importantes consequências da subestruturação populacional é a redução de heterozigóticos.

A redução de heterozigóticos resultante da subestruturação está intimamente relacionada com a redução da heterozigotia provocada pelo cruzamento entre indivíduos aparentados – partilha de ancestrais comuns.

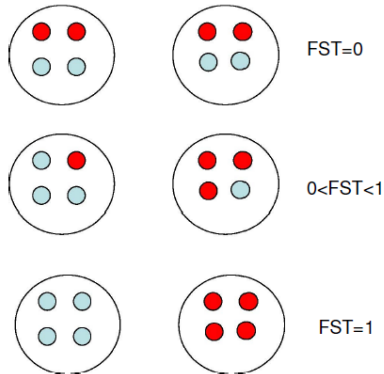
F_{is}

Dá informação sobre a consanguinidade da população e indica se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

$$F_{is} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_e} \right)$$

Se $F_{is} > 0$ – deficiência de heterozigóticos (inbreeding).

Se $F_{is} < 0$ – excesso de heterozigóticos (pode estar associado a uma população pequena).

F_{st}

Indicador de subestruturação das populações, se as população são diferenciadas.

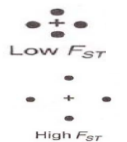
Varia entre 0 e 1.

→ 0 – população sem qualquer estruturação;

→ 1 – populações completamente diferentes.

→ F_{st} entre 0 e 1 – níveis diferenciação populacional.

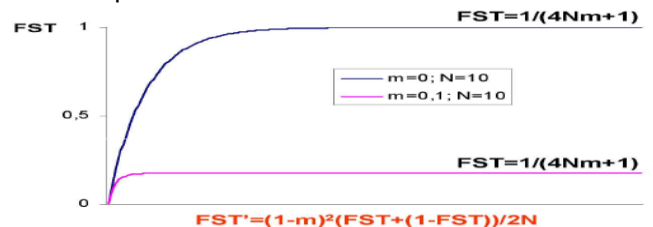
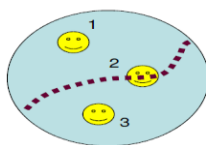
Distâncias genéticas entre populações e a sua distância à média:



→ Estas populações estão mais próximas à média, mostrando que não são muito diferentes umas das outras

→ Estas populações estão mais dispersas da média, mostrando que são mais diferentes umas das outras

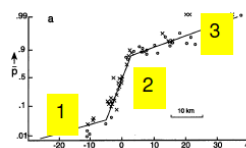
A migração (m) contribui para diminuir o valor de F_{st} :

**Population Genetic Structure**

Allele frequencies
Heterozygosity
Genetic distance
 F_{st}

1 = 2 = 3 = NO STRUCTURE

1 # 2 # 3 = STRUCTURE



Hybrid zone
Clinal variation
Population structure

Cryptic Population Structure

one panmictic population ?

or



an admixed population ?

Structure

O programa *structure* implementa um modelo base do método clustering para enfeirar a estrutura da população e atribuir indivíduos a populações usando os dados do genótipo consistindo em marcadores ligados (*structure* 2) ou desligado (*structure*).

Objectivos do programa:

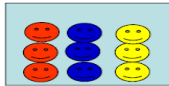
- Inferir a presença de estrutura populacional
- Atribuir indivíduos a populações;
- Identificar indivíduos migradores ou misturados (structure);
- Inferir a taxa de deriva genética;
- Inferir o tempo desde que a população se misturou (structure 2)



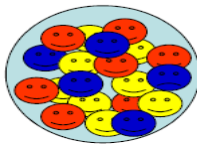
How many populations in the sample?



There are $K = 3$ populations in HWE and LE



Individuals are assigned to each of the 3 populations

Posterior probability for K

K	$\log P(A K)$	$P(K A)$
1	-31.44	~ 0
2	-27.69	~ 0
3	-26.78	0.993
4	-26.83	0.007
5	-26.88	0.00005

The values in the last column assume a uniform prior for K ($K \in \{1, \dots, 5\}$).

simulate millions of populations (clusters)

compute populations values of HWE and LE for K distinct populations (clusters)

estimate the probability that the sample includes K distinct populations (clusters)

assign each individual to:

only one population = no admixture
more than one population = admixture

