



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDADE, EVOLUÇÃO E MEIO AMBIENTE
LABORATÓRIO DE GENÉTICA EVOLUTIVA E DE POPULAÇÕES



Laboratório de
Genética Evolutiva
e de Populações

Roteiro das Aulas Práticas de Genética

Prof. Danon Cledes Cardoso
Prof. Maykon Passos Cristiano
Profa. Patrícia de Abreu Moreira

Ouro Preto, Minas Gerais, 2º semestre 2016

EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*

Introdução

Plasmídeos são moléculas extracromossomais de DNA encontrados em bactérias os quais contêm, aproximadamente de 1.000 a 100.000 pares de bases. Alguns plasmídeos replicam independentemente do DNA cromossômico e podem estar presentes em centenas de cópias por célula. Naturalmente, o DNA plasmidial existe como uma molécula superespiralada devido a alterações no enrolamento das duas fitas de DNA em torno de si.

Essas alterações criam torções no DNA para justamente aliviar parcialmente a tensão causada pelo superespiralamento. O DNA se dobra sobre si mesmo e tem uma estrutura mais condensada e emaranhada do que o DNA quando está relaxado. Se uma ou mais ligações fosfatos do DNA superespiralado forem quebradas, a molécula se desenrola de uma forma chamado DNA circular aberto.

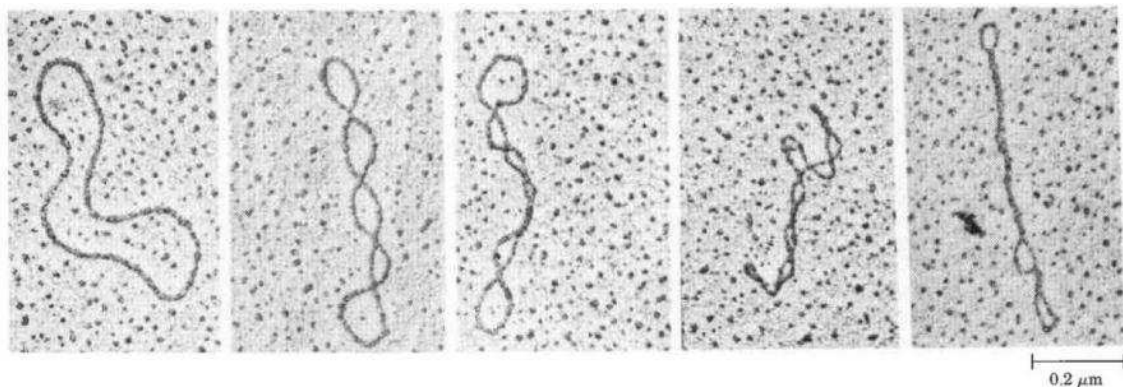


Figura 01- Alterações de torções da molécula de DNA.

Materiais

- a) 3 microtubos
- b) 2 pipetas de transferência
- c) 1 béquer para descarte
- d) Solução 1
- e) Solução 2

- f) Solução 3
- g) Etanol absoluto 100%
- h) Etanol 70%
- i) Água bi-destilada
- j) Cultura líquida saturada de *E. coli*
- k) Centrífuga
- l) Vórtex
- m) Isopor com gelo

Procedimento

- a) Prepare 100mL de meio de cultura LB contendo 6mg de ampicilina.
- b) Adicione uma colônia ao meio de cultura e incube a 37°C por aproximadamente 15-18 horas até o crescimento atingir a fase estacionária.

OBS: as etapas a) e b) foram previamente realizadas.

- c) Com uma pipeta de transferência marcada com a letra A, pegue aproximadamente 1,5mL da cultura de bactéria e adicione em um microtubo.
- d) Centrifugue os tubos a 8.000g por 3 minutos.
- e) Descarte o sobrenadante e repita os itens **c)** e **d)**. O objetivo de repetir essas etapas é para se obter um maior número de células e conseguir mais quantidade de DNA plasmidial.
- f) Adicione 5 gotas (200µL) da Solução 1 e ressuspensa o pellet usando a pipeta de transferência A.

Solução 1: Glicose 50mM, Tris 25mM (pH 8.0), EDTA 10mM (pH 8.0). A glicose é adicionada para aumentar a pressão osmótica fora da célula. O Tris é um agente tamponante usado para manter o pH constante (pH 8.0) e o EDTA protege o DNA

contra enzimas de degradação (DNAses). Esse reagente se liga a cátions bivalentes que são necessários a atividade da DNase.

- g) Adicione 5 gotas (200 μ L) da Solução 2. Misture invertendo os microtubos e deixe-os a temperatura ambiente por 5 minutos.

Solução 2: NaOH 0,2N, SDS 1%. O NaOH fornece o ambiente alcalino que rompe as células. Ele também é capaz de romper a dupla fita de DNA. O SDS é um detergente que rompe a membrana lipídica e desnatura proteínas celulares.

- h) Adicione 7 gotas (300 μ L) da Solução 3. Misture invertendo os microtubos. Em seguida, incube-os em um isopor com gelo por 10 minutos.

Solução 3: Acetato de potássio 5M, ácido acético glacial. O ácido acético neutraliza o pH permitindo que o DNA se renature. O acetato de potássio também precipita o SDS junto com o debrí celular. O DNA cromossômico da *E. coli* também é precipitado junto com o debrí celular, enquanto que o DNA plasmidial permanece em solução.

- i) Centrifugue a 12.000g por 5 minutos.
- j) Com uma pipeta de transferência limpa e marcada com a letra B, transfira o sobrenadante (~400 μ L) para um novo microtubo. Esta etapa separa o DNA plasmidial do debrí celular e DNA cromossômico no pellet. Portanto, evite pipetar o precipitado branco durante a transferência. É preferível deixar um pouco do sobrenadante no microtubo junto com o debrí celular.
- k) Preencha o restante do microtubo com etanol absoluto (~800 μ L). Misture invertendo os microtubos e incube 2 minutos a temperatura ambiente. O etanol é eficiente para precipitar os ácidos nucleicos mas é menos efetivo com

proteínas. Assim, essa etapa purifica de maneira rápida o DNA das proteínas.

- l) Centrifugue a 12.000g por 5 minutos. Deverá ser observado um pellet esbranquiçado no fundo do microtubo. Essa etapa purifica ainda mais o DNA plasmidial de outros contaminantes. Essa é uma etapa que pode ser interrompida e reiniciada outro dia. Neste caso, guarde o microtubo no freezer (-20°C).

- m) Verta o sobrenadante no béquer de descarte, seque o microtubo invertendo sob um papel toalha e acrescente ~1mL de etanol 70%. Esse etanol ajuda a remover o excesso de sal e SDS da solução.

- n) Após uma rápida centrifugação, retire o etanol tendo muito cuidado para não deixar o pellet sair.

- o) Deixe o DNA secar por 5 minutos e adicione, em seguida, 1 gota (~20µL) de água bi-destilada para ressuspender o DNA. O material genômico está pronto para uso e pode ser guardado por tempo indefinido no freezer.

ELETROFORESE HORIZONTAL EM GEL DE AGAROSE

Introdução

A eletroforese constitui uma ferramenta analítica por meio do qual podemos avaliar o movimento de moléculas, tais quais como DNA, RNA e proteínas, em um campo elétrico. Técnicas eletroforéticas modernas fazem uso de uma matriz gélica polimerizada a qual é utilizada como suporte para separação dessas moléculas. A amostra a ser analisada é aplicada neste meio, dentro de uma canaleta, o que vai permitir que a molécula penetre na matriz, quando sob efeito de corrente elétrica.

A migração, ou seja, o movimento das moléculas pela matriz, e subsequente separação das mesmas, pode ser influenciada por vários fatores: a intensidade do campo elétrico gerado, a rigidez da matéria a qual forma o meio de separação (gel), o tamanho, a forma, a carga e a composição química da molécula a ser analisada, etc. A eletroforese constitui, portanto, uma técnica rápida e conveniente, permitindo-nos analisar, ou mesmo purificar, diferentes biomoléculas, especialmente, proteínas e ácidos nucleicos.

Para analisarmos grandes fragmentos de ácidos nucleicos, na faixa de 200 a 50.000 pares de bases, a eletroforese em agarose é a mais recomendada. A agarose é um produto extraído a partir de algas e constitui um polímero linear de galactopirranose. O gel é preparado dissolvendo-se a agarose em tampão eletroforético sob aquecimento. Após um breve resfriamento, essa mistura é vertida em um recipiente de formato compatível com a cuba eletroforética e, posiciona-se, finalmente, o pente para a formação das canaletas no gel. Após a solidificação, o gel pode ser posicionado na cuba para aplicação das amostras e subsequente eletroforese.

Ácidos nucleicos podem ser visualizados após a imersão no gel (com os fragmentos de DNA já separados) em solução de brometo de etídio. A solução de brometo pode ser adicionada

diretamente na solução de agarose, antes do gel solidificar ou ser adicionado às amostras antes de aplicá-las. O brometo de etídio emite fluorescência sob radiação ultravioleta quando intercalado entre as bases nitrogenadas do ácido nucleico. A mobilidade dos ácidos nucleicos no gel é influenciada pela concentração de agarose e ainda pelo peso molecular e conformação do ácido nucleico.

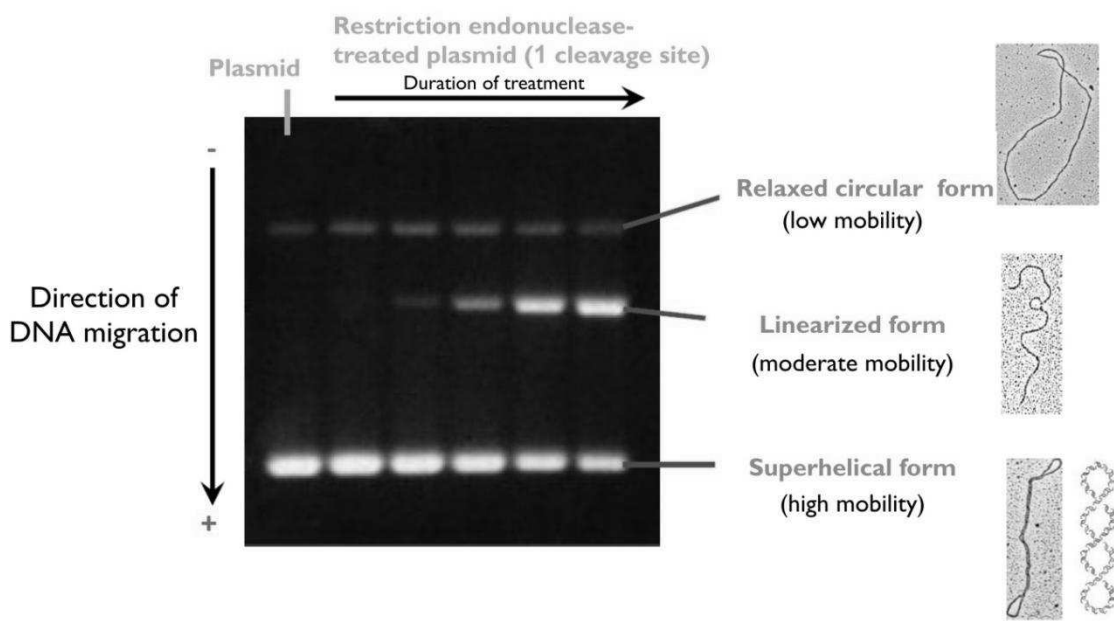


Figura 01- Eletroforese em gel de agarose mostrando a influência do grau de compactação do DNA na migração da molécula.

Materiais

- a) Agarose
- b) Solução eletroforética TBE 1X (Tris-HCl, Ácido bórico, EDTA)
- c) Tampão da amostra (Azul de bromofenol)
- d) Solução de brometo de etídio 10mg/mL



*ATENÇÃO! O BROMETO DE ETÍDIO É UM AGENTE MUTAGÊNICO.
MANUSEAR TODOS OS MATERIAIS UTILIZANDO LUVAS.*

- e) Microondas
- f) Cuba de eletroforese
- g) Fonte de eletroforese

Procedimento

- a) Primeiramente, verifique e ajuste, se necessário, a altura do pente com relação ao suporte, local em que verteremos o gel de agarose para solidificar.
- b) Vede as extremidades abertas do suporte com material emborrachado ou fita crepe.
- c) Dilua a solução tampão TBE 5X para a concentração final de 1X em quantidade suficiente para preencher o volume da cuba de eletroforese.
- d) Em um erlenmeyer adicione 0,3g de agarose e 30 mL da solução tampão TBE 1X. Essa quantidade é necessária para um gel de agarose com uma concentração igual a 1%. Aqueça o erlenmeyer em microondas até obter uma solução límpida e homogênea.
- e) Deixe a solução esfriar (a temperatura ideal é aquela em que seja possível suportar o calor do frasco entre as mãos).
- f) Adicione 5 μ L da solução de brometo de etídio no gel ainda líquido. Misture cuidadosamente!
- g) Em seguida, despeje o conteúdo do erlenmeyer sobre o suporte evitando a formação de bolhas.

- h) Após a completa solidificação do gel (cerca de 30') remova CUIDADOSAMENTE as fitas adesivas e transfira o gel COM O SUPORTE para a cuba de eletroforese.
- i) À parte, prepare as amostras de DNA a serem analisadas misturando-as ao tampão da amostra. Você poderá utilizar 3 μ L de DNA e 3 μ L do tampão.
- j) Remova CUIDADOSAMENTE o pente do gel de agarose e observe as canaletas formadas. Com auxílio de uma pipeta, aplique a mistura da amostra + tampão em cada uma das canaletas.
- k) Em seguida, conecte os eletrodos à fonte de eletroforese, certificando que as canaletas com suas amostras estão próximas do catodo (eletrodo preto).
- l) Aplique uma voltagem de 100V, proseguindo a corrida até que o corante tenha migrado uma distância apropriada no gel (cerca de 45').
- m) Em seguida, desligue a corrente elétrica, remova os cabos dos eletrodos e examine o gel no transiluminador, sob luz UV.

MUTAÇÃO EM *ESCHERICHIA COLI* INDUZIDAS POR LUZ UV

Introdução

A mutação refere-se tanto à modificações do material genético quanto ao processo de modificação. A mutação é, em última análise, a origem de toda variação genética; provê a matéria-prima para a evolução. Se não houvesse mutação, todos os genes existiriam em apenas uma forma. Os alelos não existiriam e a análise genética clássica seria impossível. A mutação em algum nível é essencial para garantir nova variabilidade genética e ensejar a adaptação dos organismos a novos ambientes.

Como era de se esperar, a taxa de mutação é influenciada por fatores genéticos e surgiram mecanismos que controlam a taxa de mutação em várias condições ambientais. A radiação ultravioleta, por ter menos energia que a radiação ionizante, penetra apenas nas camadas superficiais das células em vegetais e animais superiores e não causa ionização. Os raios ultravioleta dissipam a energia dos átomos que encontram, levando os elétrons nos orbitais externos para maiores níveis de energia, um estado conhecido como excitação. As moléculas que contêm átomos em formas iônicas ou estados excitados são quimicamente mais reativas que aquelas que contêm átomos em seus estados normais estáveis. A reatividade aumentada dos átomos nas moléculas de DNA é responsável pela maior parte da mutagenicidade da radiação ionizante e luz ultravioleta.

A radiação ultravioleta (UV) é facilmente absorvida por muitas moléculas orgânicas como as purinas e as pirimidinas no DNA, que então se tornam mais reativas ou excitadas. Os raios UV penetram pouco no tecido. Portanto, em organismos multicelulares, apenas a camada celular epidérmica está exposta aos efeitos do UV. A luz ultravioleta, porém, é um potente mutágeno para organismos unicelulares. A absorção máxima de UV pelo DNA ocorre no comprimento de onda de 254 nm. A

mutagenicidade máxima também ocorre com 254 nm, sugerindo que o processo de mutação por UV é mediado diretamente pela absorção de UV por purinas e pirimidinas. Estudos *in vitro* mostram que há intensa absorção pelas pirimidinas a 254 nm, que, portanto, tornam-se muito reativas. Dois produtos importantes da absorção de UV por pirimidinas (timina e citosina) são os hidratos de pirimidina e os dímeros de pirimidina (Figura 1). Os dímeros de pirimidina causam mutações por dois mecanismos. Os dímeros perturbam a estrutura das duplas hélices de DNA e interferem na replicação precisa do DNA. Durante os processos celulares há mecanismos que reparam defeitos no DNA, como dímeros de timina induzidos por UV.

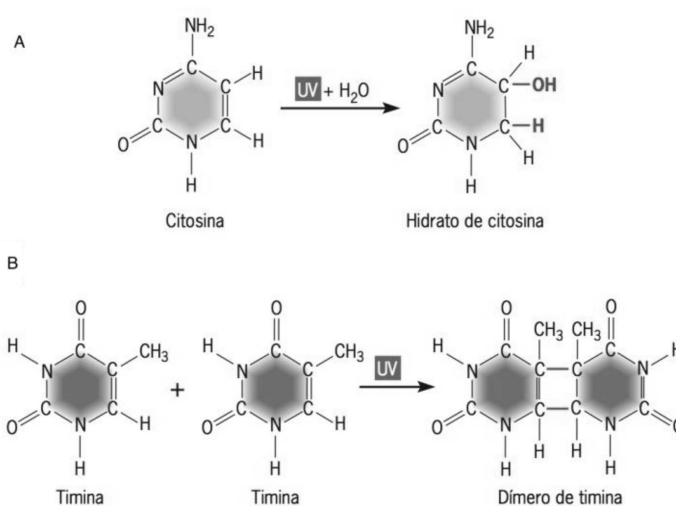


Figura 1 – Fotoprodutos de piridina por irradiação UV. A) Hidrólise de citosina em uma forma hidrato que pode causar erro de pareamento das bases durante a replicação. B) Ligação cruzada de moléculas de timina adjacentes para formar dímeros de timina, que bloqueiam a replicação de DNA.

As bactérias possuem eficientes mecanismos de reparos do DNA. O reparo dependente de luz ou fotorreativação do DNA é o mecanismo utilizado pelas bactérias para reparar lesões na molécula de DNA e reverter a mutação causada pela luz UV. A enzima DNA fotoliase é a responsável pelo reparo e remoção do dímeros de timina, os quais são provocadas quando o DNA é exposto à luz ultravioleta. A DNA fotoliase reconhece esses dímeros e se liga a eles, depois, utiliza a energia da luz para clivar

as ligações cruzadas covalentes. Na ausência de luz, a enzima DNA fotoliase pode reconhecer os dímeros, mas não consegue clivá-los.

Materiais

- a) Alça de platina e cabo Koller
- b) Bico de Bunsen
- c) Meio LB líquido (Luria-Bertani)
- d) Meio LB sólido
- e) Caneta
- f) Capela de fluxo laminar
- g) Luz ultravioleta
- h) Folha para cobrir a placa com o meio de cultura sólido

Procedimentos

- a) Inocule a bactéria *E. coli* no meio LB líquido, e incube por 16 a 20 horas a 37°C.
- b) Com o auxílio da alça de platina, pegue uma alíquota do meio LB líquido e faça quatro estrias no meio LB sólido. Marque cada estria com um tempo de exposição. Marque 20S, 40S, 60S e 80S (Figura 2).

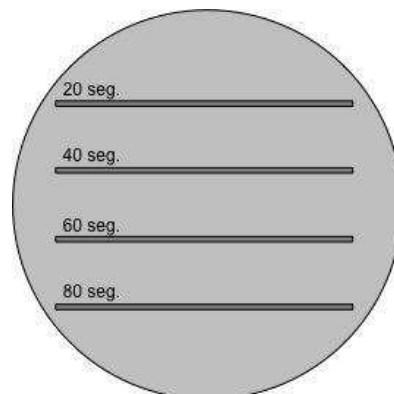


Figura 02- Vista geral da placa de Petri com os inóculos.

- c) Depois que o inóculo secar, exponha a placa com o meio de cultura LB sólido na luz UV em diferentes tempos.
- d) Cubra as estrias denominadas de 20S, 40S e 60S, e exponha apenas a estria denominada 80S na luz UV, pelo tempo de 20 segundos (Figura 3).
- e) Depois deixe descobertas as estrias denominadas de 80S e 60S (mantenha as outras estrias protegidas da luz), e exponha à radiação UV por mais 20 segundos.
- f) Posteriormente, cubra apenas a estria denominada de 20S e deixe descoberta as outras estrias, e exponha a placa por mais 20 segundos à irradiação UV.
- g) Finalmente, exponha toda a placa na luz UV por 20 segundos finais.
- h) Incube a placa a 37°C por 16 a 20 horas. Depois observe os resultados de crescimento das colônias.

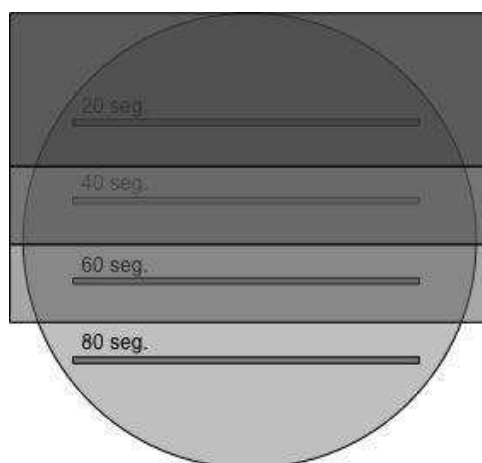


Figura 3 – Vista geral da placa com os inóculos, mostrando os diferentes tempos de exposição à radiação UV.

DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO VIA PCR

Introdução

Em 1985, foi descrita a metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR, de *polymerase chain reaction*). Seu idealizador, Kary Mullis, recebeu, por isso, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1993. A PCR permite a produção de grandes quantidades de um determinado segmento de DNA *in vitro* a partir de uma pequena quantidade de DNA-molde, evitando assim a necessidade de introdução (clonagem) do DNA de interesse em bactérias.

A amplificação do material genômico via PCR pode ter diferentes finalidades, como por exemplo, o diagnóstico de infecções. Isso é possível visto que podemos amplificar genes existentes apenas no agente infectante e não no hospedeiro. Nessa aula, iremos utilizar a técnica de PCR para o diagnóstico da doença parasitária malária em amostras de aves. A malária aviária pode ser causada por parasitos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. O diagnóstico é possível por meio da amplificação da região altamente conservada do gene SSU rRNA mitocondrial nos parasitos supracitados. As sequências dos *primers* que flanqueiam a região são 343F → 5' GCTCACGCATCGCTTCT 3' e 496R → 5' GACCGGTCATTTTCTTTG 3'.

Materiais

- a) Isopor com gelo
- b) Termociclador
- c) DNA da amostra
- d) Taq polimerase
- e) Tampão da Taq
- f) MgCl₂
- g) dNTPs
- h) *Primer* R
- i) *Primer* F

- j) H₂O ultrapura
- k) Micropipetas
- l) Microtubos
- m)Ponteiras descartáveis

Procedimento

Para a amplificação da região de interesse, faremos uma PCR com um volume final igual a 25 μ L. Serão necessários 9ng do DNA extraído da ave/hospedeiro, 1,5X do tampão da enzima Taq polimerase (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% Triton x-100), 5 mM MgCl₂, 250 μ M de dNTP, 0,2 μ M de cada *primer* e 1 unidade da enzima Taq polimerase.

Primeiramente, faça o cálculo dos volumes de cada “ingrediente” necessário:

DNA (3ng/ μ L) _____
Tampão da Taq _____
MgCl₂ (50mM) _____
dNTPs (10mM) _____
Primer R (10 μ M) _____
Primer F (10 μ M) _____
Taq (5U/ μ L) _____
H₂O _____

- n) Multiplique os valores do MIX DE PCR pelo total de amostras mais 2 quantidades. Esse excesso é importante para evitar que falte o mix para as últimas amostras.
- o) Em um microtubo de 1,5 mL adicione todos os ingredientes da PCR comuns a todas as amostras, ou seja, não adicione o DNA no mix de PCR. É importante que a água seja adicionada primeiramente e que a Taq polimerase seja adicionada por último.
- p) Pipeta o DNA nos microtubos de PCR e, logo em seguida, adicione o volume necessário do mix de PCR preparado

acima em cada amostra para se atingir o volume final de 25 μL .

q) Insira os tubos no termociclador com a seguinte programação:

- 1) 94°C – 2min
 - 2) 94°C – 1 min
 - 3) 62°C – 1min
 - 4) 72°C – 1min e 10s
 - 5) 72°C – 3 min
 - 6) 4°C - ∞
- Repetir as etapas 2 a 4 30 vezes**

r) O diagnóstico, ou seja, o resultado da PCR, somente será possível com a técnica de eletroforese. O tamanho esperado do gene dos parasitos é de cerca de 200 pares de bases.

ELETROFORESE VERTICAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Introdução

Assim como a eletroforese horizontal, a eletroforese vertical constitui uma ferramenta analítica por meio da qual podemos analisar o movimento de moléculas.

Géis formados pela polimerização de acrilamida apresentam características positivas quando utilizados em procedimentos eletroforéticos: alto poder de resolução, para moléculas de pequeno e moderado peso molecular; apresenta mínima interação das moléculas aplicadas no gel (fase móvel) e a matriz de poliacrilamida (fase estacionária); estabilidade física da matriz (muito menor que a apresentada em outros processos de separação, como a gel filtração).

A eletroforese proporcionada por géis de poliacrilamida permite uma grande resolução porque a separação dos componentes presentes na amostra é realizada tanto pelo peneiramento realizado pela matriz (fase estacionária) quanto pela mobilidade eletroforética da molécula. A matriz gélica constitui uma rede contínua de poros por meio da qual as moléculas serão separadas. Moléculas menores passam com menor dificuldade pelos poros do gel, percorrendo, portanto, maiores distâncias quando comparado com moléculas maiores.

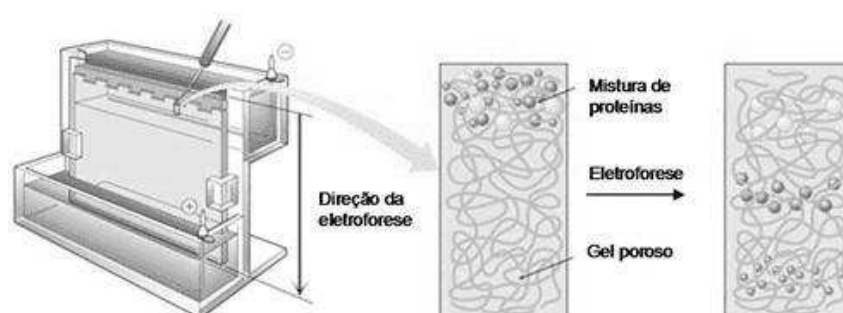


Figura 01- Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida.

Géis de poliacrilamida são preparados por meio da polimerização, proporcionada por radicais livres, da acrilamida juntamente com a bis-acrilamida (N,N'-methylene-bis-acrylamide). A reação de polimerização é iniciada quando se adiciona à solução dois catalizadores, o Persulfato de Amônio e o N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED). Alternativamente, a polimerização fotoquímica pode ser promovida por meio de adição de riboflavina, sob exposição à radiação ultravioleta.

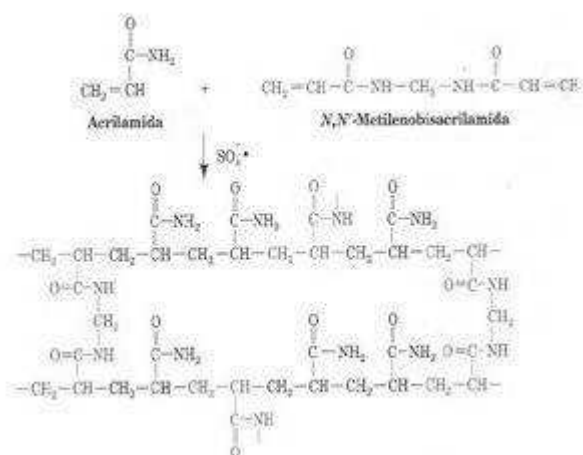


Figura 02- Ilustração da reação química de polimerização da acrilamida com a bis-acrilamida.



CUIDADO! A acrilamida, bis-acrilamida, TEMED e persulfato de amônio são tóxicos e devem ser manipulados com cuidado. A acrilamida é uma neurotoxina e o risco maior ocorre ao se manipular o reagente na forma não polimerizada (principalmente o pó). Utilize luvas durante a manipulação dos mesmos.

Materiais

Para fazermos um gel de poliacrilamida 6% iremos precisar de:

- Solução de bis-acrilamida (29:1)
- TBE 5X
- Água destilada
- TEMED
- Persulfato de Amônio (PA)
- Béquer
- Placas de vidro

- h) Cuba de eletroforese vertical
- i) Fonte de eletroforese
- j) Pipetas
- k) Micropipetas
- l) Ponteiras
- m) Solução fixadora

Solução fixadora: Etanol absoluto e ácido acético. O tratamento com ácido acético torna as moléculas insolúveis e impedem a sua difusão para fora do gel durante os passos seguintes. Outras substâncias que podem interferir com processo de coloração (tampões, íons, denaturantes, detergentes, anfólitos) são também removidas neste passo.

- n) Solução de coloração

Solução de coloração: Nitrato de prata (AgNO_3), solução fixadora e água destilada. O gel é impregnado com prata e as condições ácidas, deixadas pela solução fixadora, evitam que a prata seja, nesse momento, reduzida. A Redução da prata, a qual se tornará insolúvel e visível, será feita na etapa seguinte.

- o) Solução reveladora

Solução reveladora: Hidróxido de sódio, formaldeído e água destilada. Essa solução irá promover a redução da prata pois é uma solução alcalina a qual contém formaldeído. Esse método ácido (em que o nitrato de prata é o agente de impregnação e o formaldeído em meio alcalino é o agente redutor) é rápido, resultando em coloração com poucas marcações inespecíficas, servindo tanto para proteínas quanto para ácidos nucleicos.

Procedimento

- p) Primeiramente, monte o suporte para o gel, o qual será formado pelas placas de vidro.

- q) Em um béquer, adicione 40 mL de água destilada, 12 mL da solução de bis-acrilamida (29:1), 12 mL de TBE 5X, 800 μ L de PA e 50 μ L de TEMED.
- r) Em seguida, verta o conteúdo do béquer por entre as placas de vidro evitando a formação de bolhas. Coloque o pente para formação das canaletas.
- s) Após a completa solidificação do gel (cerca de 30') transfira o gel COM O SUPORTE para a cuba de eletroforese.
- t) À parte, prepare as amostras de DNA a serem analisadas misturando-as ao tampão da amostra. Você poderá utilizar 4 μ L de DNA e 4 μ L do tampão.
- u) Preencha a cuba de eletroforese com TBE 1X.
- v) Em seguida, utilize uma caneta retroprojeter para marcar as canaletas formadas, antes da remoção do pente. Em seguida, remova CUIDADOSAMENTE o pente do gel de poliacrilamida e observe as canaletas formadas. Com auxílio de uma pipeta, aplique a mistura da amostra + tampão em cada uma das canaletas.
- w) Em seguida, conecte os eletrodos à fonte de eletroforese, certificando que as canaletas com suas amostras estão próximas do catodo (eletrodo preto).
- x) Aplique uma voltagem de 100V, proseguindo a corrida até que o corante tenha migrado uma distância apropriada no gel (cerca de 45').
- y) Em seguida, desligue a corrente elétrica, remova os cabos dos eletrodos e transfira o gel para um recipiente apropriado para fazer a coloração.
- z) Primeiramente, cubra o gel com a solução fixadora e mantenha o gel sob agitação por 15 minutos.
- aa) Em seguida, descarte essa solução e adicione a solução de coloração. Aguarde por 15 minutos.
- bb) Finalmente, descarte a solução de coloração, lave o gel com água destilada e adicione a solução reveladora. Aguarde o aparecimento das bandas.

UM CASO GENÉTICO: CÂNCER COLORRETAL

Parte 1 – Apenas má sorte?

Jane estava em casa quando Samuel, seu irmão mais velho, ligou no celular. Imediatamente ela se lembrou que deveria ter ligado para ele mais cedo para saber como tinha sido a consulta com o médico. Seu irmão estava reclamando de algumas dores abdominais já havia algumas semanas.

“Oi Sam! Eu ia te ligar...como foi sua consulta com o médico?”

“Honestamente Jane, nada bem...eu acabei de sair do consultório e ele me disse que eu tenho câncer colorretal”.

“O que?! O que você está dizendo?! Não é possível! Você também? Papai morreu de câncer de cólon quando a gente era criança...” Jane falou com aperto na garganta.

“Calma, Jane”. Disse Samuel. “Isto não significa uma sentença de morte imediata. O doutor falou que apesar dele ter encontrado vários tumores no meu cólon, eu ainda estou no estágio inicial e é possível fazer tratamento. Mas eu sei que a notícia não é boa. O meu médico está sugerindo que a melhor coisa a se fazer é remover cirurgicamente meu cólon. E...Jane, o médico também disse que já que papai e eu temos o mesmo tipo de câncer, seria uma boa ideia você fazer um exame colorretal também”.

Após esta conversa com seu irmão, Jane ficou muito preocupada com esta coincidência de câncer na história médica de sua família. A morte do seu pai causada por câncer colorretal ainda era uma lembrança dolorosa. Ela sabia também que seu avô paterno havia morrido de algum tipo de câncer antes dela nascer, apesar disto não ser muito comentado. O pensamento de que ela poderia ser a próxima era assustador. E sobre os gêmeos, Marco e Carolina?

- 1- Faça o heredograma da família, indicando os indivíduos afetados com câncer.

2- Você acha que Jane tem um bom motivo para estar preocupada? Por quê?

Parte 2 – A visita de Jane ao médico

“Boa tarde Jane”! Disse Dr. Henrique Ferreira assim que Jane entrou no consultório. “Eu sei que você veio aqui para conversarmos sobre a sua preocupação relacionada ao câncer na sua família”.

Jane contou ao médico a história de câncer na família, incluindo a morte precoce de seu pai devido ao câncer colorretal e o recente diagnóstico do irmão com o mesmo tipo de câncer, o que resultou na recomendação do médico do irmão para que Jane fizesse um exame de cólon.

“Dr. Ferreira o que quer dizer verificar meu cólon”? Jane perguntou já se sentindo bastante incomodada.

“Eu sei que a ideia de examinar o cólon não parece muito agradável, mas é o exame mais importante para testar se sua família tem um histórico de câncer colorretal”. Explicou Dr. Ferreira. “O procedimento para examinar o interior do cólon é chamado de colonoscopia. O objetivo é procurar por áreas com crescimento celular aumentado no cólon. Essas áreas são chamadas de pólipos ou adenomas. Os pólipos são pequenos tumores benignos que se forma no intestino. Pessoas que herdam a predisposição ao câncer de colorretal têm um risco maior de desenvolver estes pólipos com idades mais novas. Apesar dos pólipos serem benignos, as células dos pólipos são como um primeiro passo na direção para se tornarem malignas. Assim, a colonoscopia não irá prevenir o câncer, mas irá permitir detectar os sítios de crescimento alternado. Nós poderemos impedir o desenvolvimento do câncer de cólon removendo os pólipos encontrados”.

“Assim, é altamente recomendado que a colonoscopia seja realizada mais cedo nas pessoas de uma família com predisposição de câncer colorretal.” Continuou o Dr. Ferreira, “mesmo quando uma pessoa não tem uma história familiar de

câncer colorretal, é ainda recomendado que se faça uma colonoscopia após os 50 anos”.

“Eu entendo muito bem agora a importância de examinar meu cólon”, falou Jane, “mas não existe alguma maneira de eu descobrir com certeza se eu tenho uma predisposição hereditária de desenvolver o câncer colorretal”?

“Eu ia justamente sugerir a você que além de fazer a colonoscopia, faça um teste genético, o qual pode revelar se você tem predisposição ao câncer colorretal. Normalmente, estes testes genéticos são feitos primeiros em membros da família que são afetados. Eu sugiro que você e seus irmãos marquem uma consulta com um conselheiro genético para iniciar o teste”.

3- O que significa ser predisposto a desenvolver câncer?

4- Se uma pessoa é predisposta a ter câncer, isto significa que ela irá, definitivamente, desenvolver o câncer um dia?

Parte 3 – Exame Genético

Na mesma semana, Samuel e Jane conseguiram marcar uma consulta com a Dra. Denise Mesquita, médica geneticista,

“Jane e Samuel, bom dia. Eu sou a Dra. Denise Mesquita e vou ser a conselheira genética de vocês. Vocês vieram aqui para fazer um teste genético para diagnosticar se vocês herdaram a predisposição para câncer colorretal”.

“Sim”, disse Jane, “eu estou preocupada porque nosso pai morreu com câncer colorretal quando nós éramos crianças e agora Samuel também tem...e ele tem apenas 30 anos”!

“Por que nós não começamos por este ponto e revemos sua história familiar? Primeiro: você sabe de algum outro parente que já foi diagnosticado com câncer”? Perguntou Dra. Mesquita.

“Bem, além do Samuel e do papai, eu sei que nosso avô por parte de pai também teve câncer”. Disse Jane, “mas ele morreu muito antes de nós nascermos e eu não sei que tipo de câncer era. Além dele, eu não sei de ninguém mais na nossa família que teve câncer”.

“Baseando-se no que você me disse sobre a história médica, eu criei um heredograma da sua família focando a relação entre os indivíduos que tem câncer. O desenvolvimento extremamente precoce de câncer colorretal tanto em você, Samuel, e no seu pai, e o fato de um parente diretamente relacionado com seu pai ter morrido de algum tipo de câncer sugere que a causa do câncer colorretal na sua família é do tipo polipose adenomatosa familiar (PAF), disse a Dra. Mesquita”.

“Mas o que exatamente é isto que está sendo herdado na nossa família que causa o desenvolvimento de câncer colorretal? É algo no nosso DNA, não é”? Perguntou Jane.

“Você está certa”, respondeu a Dra. Mesquita, “tem haver com o seu DNA. O DNA nas suas células contém genes que codificam proteínas que controlam o crescimento, desenvolvimento e divisão celular. Uma mutação na sequência de DNA de um gene pode alterar a proteína que está sendo codificada de forma que ela não mais funciona corretamente. Algumas dessas mutações podem mudar a função da proteína que permite o crescimento incontrolável da célula e permitir o desenvolvimento do câncer”.

“Então, talvez haja uma mutação no meu DNA”, disse Samuel, “mas se você for fazer um teste genético, como você sabe qual DNA olhar? Nós humanos não temos uma enorme quantidade de DNA? Como exatamente você sabe o que testar”?

“Realmente procurar por uma mutação no DNA de uma pessoa, seria como procurar uma agulha no palheiro”, respondeu a Dra. Mesquita, “mas as pesquisas na área da genética molecular já descobriram que nas famílias com PAF apresentam uma mutação no gene *Polipose Adenomatosa Cólica* (no inglês APC – Adenomatous Polyposis Coli)”.

“Ah então você não vai olhar todo o meu DNA”, concluiu Samuel, “você só precisa olhar este gene e ver se tem uma mutação, certo?”

“Exatamente”, disse Dra. Mesquita, “nós iremos coletar o seu sangue, isolar seu DNA e sequenciar o seu gene *APC* para poder comparar sua sequência com a de uma pessoa conhecidamente normal”.

“Isto parece simples. Então, se você achar uma mutação no meu gene *APC* você poderia ver se minha irmã herdou a mesma mutação também, certo?” Perguntou Samuel.

“Sim, como você foi diagnosticado com câncer colorretal, nós iremos procurar pela mutação no seu DNA primeiro Samuel”, confirmou a Dra. Mesquita, “mas antes de prosseguir eu preciso preveni-los sobre este teste genético.” Normalmente, cada família com PAF possui uma mutação única no gene *APC*. O gene *APC* é muito grande. Ele possui 15 regiões codificantes, chamadas éxons, as quais dão origem a uma proteína de 2843 aminoácidos. De fato, o gene *APC* é tão grande que nós, na verdade, sequenciamos o RNA mensageiro, o qual está diretamente relacionado com a proteína *APC* sendo que os íntrons são removidos”, explicou Dra. Mesquita, “bom, vamos agora coletar o sangue do Samuel e proceder com o teste”.

- 5- Quais seriam os processos necessários em laboratório para a realização desse procedimento, ou seja, quais os procedimentos para fazer o sequenciamento do RNAm?

Parte 4 – Análise do gene *APC*

Após o sequenciamento, precisamos comparar o cDNA do gene *APC* sequenciado do Samuel com o cDNA do gene *APC* de uma pessoa normal. Para isso, vá até a página inicial do NCBI (The National Center for Biotechnology Information) e siga as instruções abaixo:

Encontre a sequência normal do cDNA de gene *APC* no website NCBI. Na caixa “All databases” selecione “Nucleotide”, na caixa ao lado digite “Human APC gene mRNA” e, em seguida, clique em “Search”.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

NCBI National Center for Biotechnology Information

All Databases MeSH NCBI Web Site NLM Catalog

Human APC gene mRNA Search

NCBI Home Resource List (A-Z) All Resources Chemicals & Bioassays Data & Software DNA & RNA Domains & Structures Genes & Expression Genetics & Medicine Genomes & Maps Homology Literature Proteins Sequence Analysis Taxonomy Training & Tutorials Variation

NCBI Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical information. Mission | Organization | Research | NCBI News

Popular Resources PubMed Bookshelf PubMed Central PubMed Health BLAST Nucleotide Genome SNP Gene Protein PubChem

NCBI Announcements March 5th webinar: "NCBI and the NIH Public Access Policy: PubMed Central submissions, My NCBI, My Bibliography and SciENcv" Feb 25, 2015

NCBI Facebook page Find out the latest news about NCBI resources and participate in community discussions. GO

Na página de apresentação dos resultados, clique na sequência de 8972 pares de bases, denominada “Human APC gene mRNA, complete cds” (M74088.1) para acessar a sequência do gene *APC* de uma pessoa normal.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Human APC gene mRNA Search Help

Save search Advanced

Show additional filters

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order Send to: Filters: Manage Filters

Found 34 nucleotide sequences. Nucleotide (31) EST (3)

See *APC adenomatous polyposis coli* in the Gene database
apc reference sequences Genomic (1) Transcript (3) Protein (3)

Results: 1 to 20 of 31 << First < Prev Page 1 of 2 Next > Last >>

1. **Human APC gene mRNA, complete cds**
Accession: M74088.1 GI: 182396
GenBank FASTA Graphics

2. **Human polyposis locus (DP1 gene) mRNA, complete cds**

3. 3,178 bp linear mRNA
Accession: M73547.1 GI: 190161
GenBank FASTA Graphics

4. *APC* [human adenomatous polyposis coli kindreds 347 and 139] mRNA Partial Mutant_117 nt
Accession: S87300.1 GI: 454025

Species: Animals (30) Fungi (1) More ...

Molecule types: genomic DNA/RNA (13) mRNA (18) More ...

Source databases: GenBank (17) RefSeq (12) More ...

Sequence length: Custom range...

Release date: Custom range...

Revision date: Custom range...

Clear all Show additional filters

Results by taxon: Top Organisms [Tree] Homo sapiens (28) Rattus norvegicus (1) Mus musculus (1) Pseudocercospora fijiensis (1)

Find related data: Database: [Select] Find items

Search details: ("Homo sapiens"[Organism] OR Human[All Fields]) AND apc gene[All Fields] AND mRNA[All Fields] Search See more...

Recent activity: Turn Off Clear

Em seguida, clique no link “FASTA” para obter a sequência do gene nesse formato.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

Display Settings: GenBank Send: Change region shown

Human APC gene mRNA, complete cds

GenBank: M74088.1

FASTA Graphics

Go to: Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Articles about the APC gene

Testing models of the APC tumor suppressor/ β -catenin interaction reshapes our [Genetics. 2014]

Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological n [J Urol. 2014]

KCTD1 suppresses canonical Wnt signaling pathway by enhancing β -caten [PLoS One. 2014]

See all...

LOCUS HUMAPAPC 8972 bp mRNA linear PRI 09-DEC-1993

DEFINITION Human APC gene mRNA, complete cds.

ACCESSION M74088

VERSION M74088.1 GI:182396

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 8972)

AUTHORS Kinzler, K.W., Nilbert, H.C., Su, L.K., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hedge, P., McKechnie, D., Finnian, R., Markham, A., Groffen, J., Boguski, M.S., Altschul, S.F., Horii, A.K., Ando, H., Miyoshi, Y., Niki, Y., Nishisho, I. and Nakamura, Y.

TITLE Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21

Copie toda sequência, um total de 8972 pb, conforme indicado abaixo, cole em um bloco de notas e salve a sequência, identificando-a como uma sequência normal.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

Display Settings: FASTA Send: Change region shown

Human APC gene mRNA, complete cds

GenBank: M74088.1

FASTA Graphics

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Articles about the APC gene

Testing models of the APC tumor suppressor/ β -catenin interaction reshapes our [Genetics. 2014]

Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological n [J Urol. 2014]

KCTD1 suppresses canonical Wnt signaling pathway by enhancing β -caten [PLoS One. 2014]

See all...

Pathways for the APC gene

XAV939 inhibits tankyrase, stabilizing AXIN

>gi|182396|gb|M74088.1|HUMFAPAPC Human APC gene mRNA, complete cds
 GTCCTCAAGGGTACGCAAGGATGGCTGCAGCTTCATATGATCAGTTGTTAAAGCAAGTTGAGGCACTGAAGA
 TGGAGAACTCAAATCTCGACAAGAGCTAGAAGATAATCCCAATCATCTTACAAAACCTGGAAGCACTGAGGC
 ATCTAATATGAAGGAAGTACTAAACAAGCTACAAGGAAGTATTGAAGATGAAGCTATGGCTCTCTCTGGA
 CAGATGATTTATTAGAGCGTCTTAAAGAGCTTAACTTAGATAGCAGTAATTTCCCTGGAGTAAAACCTGC
 GGTCAAAAATGTCCTCTCTTATGGAAGCCGGGAAGGATCTGTATCAAGCCGTTCTGGAGAGTGCAG
 TCCTGTTCTATGGGTTCAATTCGAAGAGGGGTTGTAAATGGAAGCAGAAAGTACTGGATATTTA
 GAAGAAGCTGAGAAAGAGAGGTCATTGCTCTCTGCTGATCTTGACAAAAGAAAGAAAGAAAGCACTGGT
 ATTACGCTCACTTCAGATCTCACTAAAGATAGTAGTCTTCCCTTACTGAAATTTTCTCTTACA
 AAGATATGACGAGAGGCAATTCGATATGAGCGAGGCAATCAGAGTTCCGATGGAGAAACACTA
 GGTACTGCGAGGATGGAAGAGGACAGGCAAGGAAAGTATGAGCAATTCAGCAATGGAAGGACA
 TACTTGTATACGACAGCTTTTACAGTCCCAAGCAAGAGAGAGAGGTCATCTCAGAACAAGCATGA
 AACCGCTCACATGATGCTGAGCGGCAAGTGAAGCTCAAGGAGTGGAGAAATCAACTGGCACTTCT
 GATAATGGTCAGGTTCAACTACACGAATGGACCATGAAACAGCCAGTGTTTTGGTCTAGTAGCACAC
 ACTCTGCACCTCGAAGGCTGACAAGTCACTGGGAACCAAGGTTGGAATGGTATTCATTGTTGTCAAT
 GCTTGGTACTCATGATAAGGATGATATGCTCGGAACCTTGGCTAGCTTATGCTCCAGCTCCAGAACGCTGT
 ATATCCATGCGACAGTCTGGATGCTTCTCTCTCTCATCCAGCTTTACATGGCAATGACAAGCACTCTG
 TATTGTTGGGAAATCCCGGGGCAAGAGAGGCTCGGGCCAGGGCCAGTGCAGCACTCCACAACATCAT
 TCACTCACAGCTGATGACAAGAGAGGCGGCTGAAATCCGAGTCTTCACTTTTGGAAACAGATACGC
 GCTTACTGTGAAACCTGTTGGGAGTGGCAGGAAGCTCATGAACAGGCACTGGACAGGCAAAAATCCAA
 TGCCAGCTCCTGTTGAACATCAGATCTGCTCTGCTGTGTGTTCTAATGAAACTTCAATTTGATGAAGA
 GCATAGACATGCAATGAATGAAGTGGGGGACTACAGGCTTGCAGAAATTTGCAAGTGGACTGTGAA
 ATGACGGGCTTCAATGAACTACAGATTTACACTAAGACGATATGCTGGAATGGCTTGGCAAACT
 TGACTTTGGAGATGAGCAACAAGGCTACGCTATGCTTATGAAAGGCTGCATGAGAGCACTTGTGGC

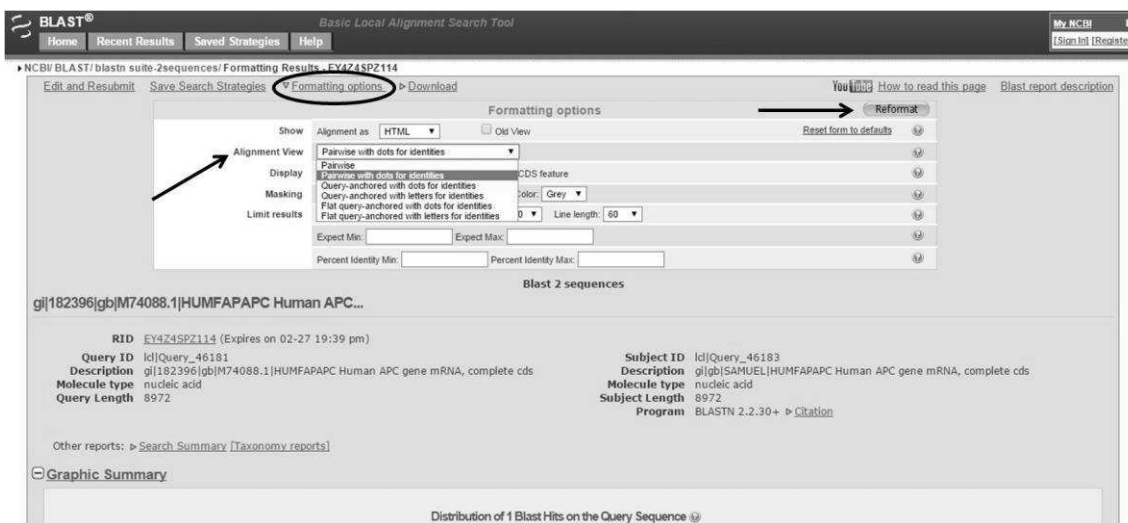
Em uma outra página da internet, busque pela ferramenta BLAST do NCBI. Nesta página, no item “Basic BLAST” selecione a opção “nucleotide blast”.

Na página que se abre, clique na opção “Align two or more sequences” e, em seguida, copie as sequências FASTA apropriadas e cole nas caixas correspondentes, como indicado na figura abaixo:

Na área “Enter Query Sequence” você irá colar a sequência FASTA que foi inserida por você em um Bloco de Notas. Na área “Enter Subject Sequence” você irá colar a sequência FASTA do Samuel a qual foi enviada por e-mail em um arquivo .txt. Após colar ambas as sequências clique no botão azul escrito BLAST e aguarde a página de resultados. Nessa página você poderia observar o alinhamento da sequência normal (Query) com a sequência do Samuel (Sbjct).

Para observar o alinhamento com mais facilidade, clique na opção “Formatting Options” no alto da página e no item “Alignment View” selecione a opção “Pairwise with dots for identities”. Em seguida, clique no botão azul REFORMAT.

Na página com o resultado reformatado, cada base da sequência do cDNA do gene *APC* do Samuel que é igual ao da pessoa normal foi transformada em um ponto. Observe o resultado.



6- O que você observou quando a sequência do cDNA do gene *APC* do Samuel foi comparada com a sequência de uma pessoa normal?

7- Quais são as três possíveis consequências em nível da proteína que a mutação encontrada na sequência do gene *APC* do Samuel pode causar?

Agora, vamos traduzir tanto a sequência normal do gene *APC* quanto a sequência do Samuel para verificar o efeito dessa mutação no gene do Samuel. Para isto, abra outra página do NCBI, clique na opção “All Resources” no canto esquerdo da página e selecione a aba “Tools”. Descendo a página, encontre e clique na opção “Open Reading Frame Finder (ORF Finder).”

The screenshot shows the NCBI website interface. At the top, there is a navigation bar with 'NCBI Resources' and 'How To' links, and a search bar. Below this, the 'All Resources' section is active, with a sub-menu containing 'All', 'Databases', 'Downloads', 'Submissions', 'Tools', and 'How To'. The 'Tools' sub-menu is highlighted with a black arrow. On the left side, a vertical menu lists various categories, with 'All Resources' circled in black. The main content area under 'Tools' lists several tools: '1000 Genomes Browser', 'Amino Acid Explorer', 'Assembly Archive', 'BLAST Link (BLINK)', 'BLAST Microbial Genomes', and 'BLAST RefSeqGene'. Each tool has a brief description of its function.

Copie e cole a sequência normal do gene *APC* na caixa e clique no botão “ORF Finder”. Na página de resultados você irá observar seis barras coloridas. Estas barras foram obtidas pois existem seis possíveis janelas de leitura abertas (ORF). O programa ORF Finder colore de azul quaisquer códons entre o códon de iniciação (AUG) e de parada (UGA, UAG ou UAA). Você verá uma janela de leitura que é praticamente toda colorida de azul. Esta é a janela de leitura normal que você deve comparar com a sequência do Samuel. Para isso, mantenha essa página aberta por enquanto. Em uma nova página, repita todas essas etapas descritas utilizando a sequência do gene do Samuel.

Analisando as duas páginas da ORF Finder, compare a tradução da sequência normal do gene *APC* com a tradução da sequência do Samuel.

- 8- O que você percebe em relação ao produto traduzido da sequência obtida do gene do Samuel quando comparado ao produto obtido da sequência normal?
- 9- Das três possibilidades a qual você listou na questão de número 7, qual é a consequência da mutação no gene *APC* do Samuel?

Parte 5 – A proteína *APC*

“Samuel, eu estou realmente apavorada para saber o resultado do meu teste hoje”, disse Jane ao entrar no consultório da Dra. Mesquita. “Depois do que ela nos explicou, eu tenho sonhado todas as noites se eu tenho ou não a mutação como você também”.

“Eu sei como você está se sentindo”, disse Samuel à irmã, “mas não importa o que aconteça, eu estou feliz de estar aqui do seu lado nesse momento”.

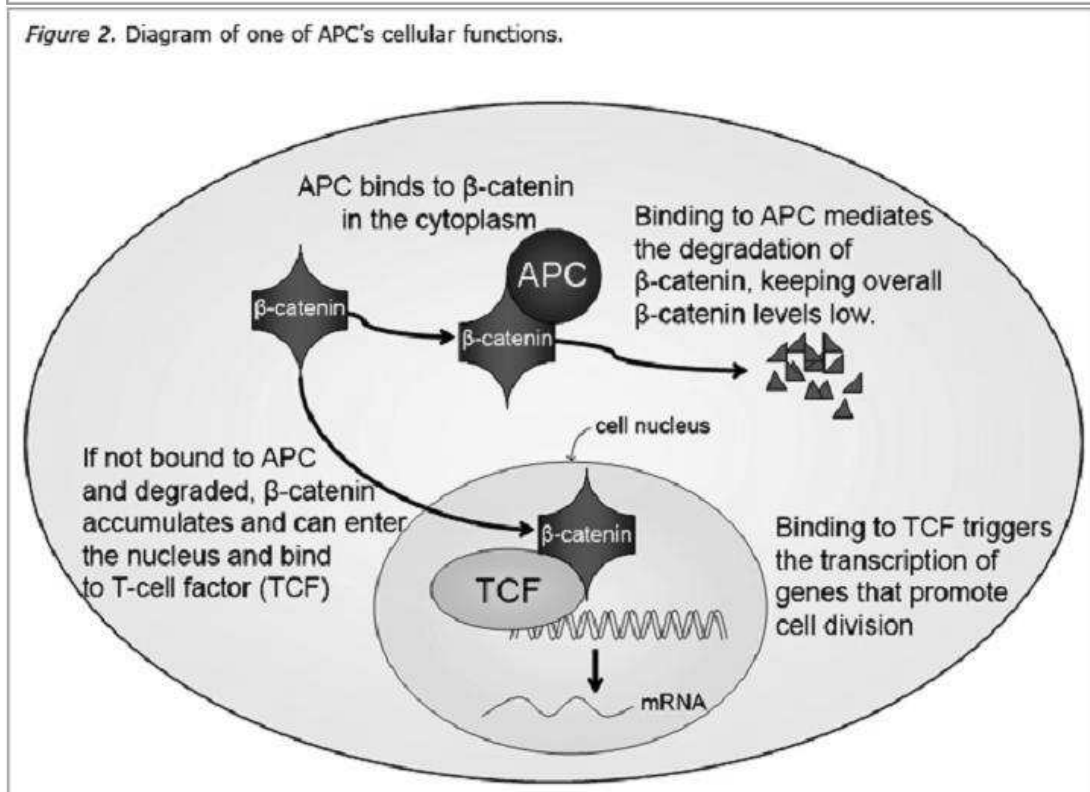
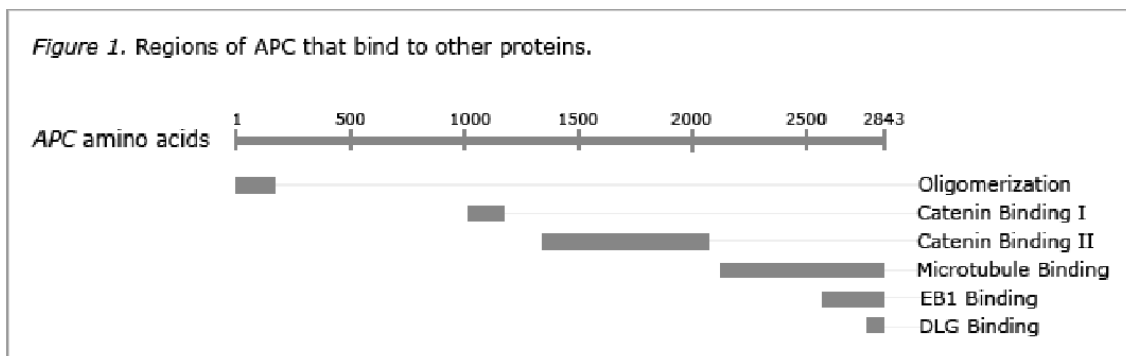
A Dra. Mesquita entrou nesse momento no consultório: “Jane e Samuel, que bom que vocês chegaram juntos. Infelizmente Jane o seu teste genético também mostrou que você herdou a mesma mutação que o Samuel tem. Como discutido anteriormente, a polipose adenomatosa familiar (PAF) é causada por uma mutação no gene *APC* e, por causa disso, você está um passo mais próxima de desenvolver câncer, que uma pessoa com duas cópias normais do gene. Se a cópia normal do gene *APC* nas suas células ficar também danificada, isto levará ao câncer de cólon”.

Samuel abraçou ainda mais forte a irmã. “Eu não sei o que pensar”, disse Jane, “eu acho que estou me sentindo dormente. O que é esse gene *APC*? O que ele faz que o conecte ao câncer de cólon? E o que eu devo fazer?”

“Bom, o gene *APC* codifica uma proteína que é importante para o controle do crescimento celular”, explicou a Dra. Mesquita, “*APC* interage com e se liga a outras proteínas na célula. A proteína *APC* é grande e nós já sabemos que algumas regiões na proteína são especializadas em se ligar a outras proteínas distintas. Quando *APC* se liga a outras proteínas, ela influencia a função delas. Veja as figuras que tenho aqui. Eu acho que irão ajudar na compreensão de tudo”.

As duas figuras apresentadas pela Dra. Mesquita estão mostradas abaixo. A Figura 1 consiste de um diagrama da proteína *APC* mostrando as regiões (domínios) conhecidos que se ligam a outras proteínas. A Figura 2 mostra um diagrama de uma das funções celulares da proteína *APC*. Analise as figuras e então

utilize as informações aprendidas para responder as questões abaixo.



- 10- Você esperaria que a mutação de Jane e Samuel aumentasse ou diminuísse a habilidade da proteína *APC* se ligar a β -catenina?
- 11- Se a cópia normal do gene *APC* estiver danificada nas células de Jane, como isso afetaria a β -catenina nesta célula? Como essa mudança afetaria o crescimento da célula?

SENSIBILIDADE GUSTATIVA A FENILTIOCARBAMIDA (PTC)

Introdução

Quando, em 1931, o químico norte-americano Fox¹ manipulava feniltiocarbamida (PTC) (Figura 1), ele espalhou acidentalmente cristais deste composto no laboratório. Imediatamente sentiu um forte gosto amargo, mas, curiosamente, seu assistente nada sentiu. Intrigado, submeteu outras pessoas à prova e percebeu que existem diferença sexual na sensibilidade, a qual atinge o gosto da substância.

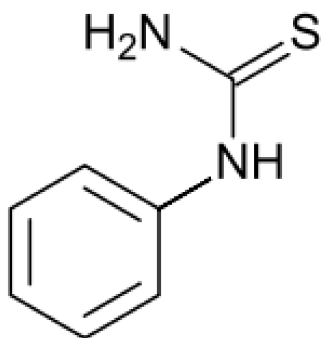


Figura 1 – Fórmula química da substância feniltiocarbamida (PTC).

Quando muitos indivíduos são testados com soluções de diferentes concentrações de PTC, verifica-se que eles se distribuem em dois fenótipos: sensíveis e insensíveis. Porém, essa distinção não é absoluta, visto que a distribuição de suas sensibilidades gustativas apresenta uma grande variação, mostrando dois picos, um para os sensíveis e outro para os insensíveis: como você nota na Figura 2, há uma certa sobreposição, de modo que alguns indivíduos são difíceis de classificar.

É digno de nota o fato de que a característica apresenta variação de etnia. Assim, a insensibilidade é praticamente ausente nas populações indígenas americanas e inuítes (esquimós), atinge cerca de 3% entre os de etnia africana, 10% entre os asiáticos e 30% nos europeus.

¹ Fox, A.L. (1932) The relationship between chemical constitution and taste. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 18: 115-120.

A herança é determinada por um único par de alelos (T e t), de modo que as pessoas sensíveis são TT ou Tt e as insensíveis são tt . Há ainda, uma diferença sexual na sensibilidade, a qual atinge índice ligeiramente maior entre as mulheres.

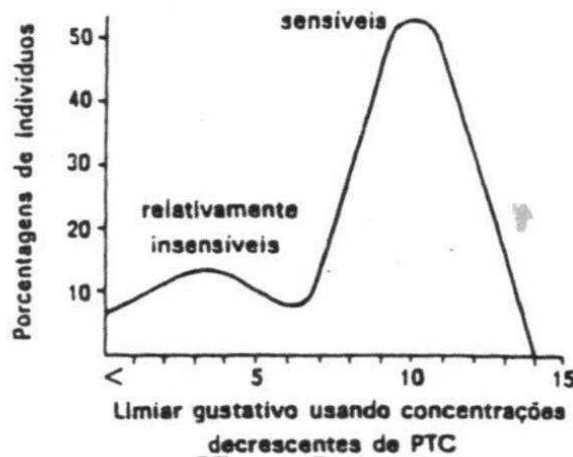


Figura 2 – A sensibilidade ao PTC tem uma distribuição bimodal, o que nos permite separar os indivíduos em dois grupos: os sensíveis e os insensíveis. É um exemplo de um caráter semidescontínuo, visto que se distribui em uma curva com mais de um pico (ou moda): essa distribuição bimodal sugere que o controle da sensibilidade seja determinado por um único par de genes com dominância.

Existem muitas substâncias que, por apresentarem o grupo $NC=S$, são quimicamente semelhantes ao PTC e que revelam o mesmo padrão de resposta nas pessoas testadas. Essa substância é encontrada em vegetais da família *Cruciferae* ou *Brassicacea*, como brócolis, couve, couve-de-bruxelas, couve-flor, rabanete, agrião e repolho, entre outras. Os indivíduos sensíveis, detectam um gosto amargo desagradável, sendo este um critério para rejeição desses alimentos, podendo influenciar diretamente na adoção de hábitos alimentares pouco saudáveis. Curiosamente, esse tipo de substância inibe o funcionamento da tireoide e muitas delas ocorrem em vegetais – tal como na couve – e no leite do gado que se alimenta desses vegetais; desse modo, podemos admitir que essas substâncias causem bócio nas pessoas insensíveis ao gosto típico que as identifica para as demais.

Com efeito, entre os insensíveis constata-se que a frequência de bócio é de 50% superior à da população geral, comprovando que esses indivíduos são mais susceptíveis à ação das substâncias bocígenas encontradas na natureza.

Procedimento

O teste de sensibilidade ao PTC será realizado de acordo com o protocolo adotado para a diluição com 5 gradientes decrescentes de concentração de acordo com Fox (1932).

Concentração das soluções de PTC:

- Solução nº1: 1,0 g de feniltiocarbamida diluída em 1 litro de água.
- Solução nº2: aliquote 8mL da solução nº1 e acrescente 2mL de água.
- Solução nº3: aliquote 6mL da solução nº1 e acrescente 4mL de água.
- Solução nº4: aliquote 4mL da solução nº1 e acrescente 6mL de água.
- Solução nº5: aliquote 2mL da solução nº1 e acrescente 8mL de água.

Após preparadas, as soluções devem ser mantidas armazenadas em geladeira.

Para realização do teste, deve-se pingar duas gotas na língua de cada indivíduo, de maneira crescente em contração do PTC, até o momento que o indivíduos constate o gosto amargo da substância.

Quando necessário, o procedimento pode ser repetido afim de confirmar a percepção à feniltiocarbamida. Após esta etapa notar o resultado de sensibilidade ou insensibilidade ao PTC.

Discussão

a) Complete a tabela abaixo com o número de indivíduos que sentiram o gosto amargo de acordo com a concentração da solução de PTC utilizada.

	Limiar gustativo					
	Soluçã o 5	Soluçã o 4	Soluçã o 3	Soluçã o 2	Soluçã o 1	Insens ível
Número de indivíduos						
Porcentage m						

b) Qual a porcentagem de indivíduos na amostra que são sensíveis e insensíveis na aula? É possível determinar o genótipo desses indivíduos?

ESTUDO DA CROMATINA SEXUAL

Introdução

A cromatina sexual é um corpúsculo heteropicnótico, encontrado nos núcleos interfásicos das células somáticas femininas dos mamíferos em geral. É formada por um dos cromossomos sexuais X que se duplica tardiamente e que é geneticamente inativo. Foi primeiro observada em neurônios de gatas, com o aspecto de um grânulo heterocromático que se localizava junto à membrana nuclear, sendo exclusivamente encontrado em fêmeas. Por esse motivo, passou a ser utilizado no diagnóstico do sexo em mamíferos, a seguir foi confirmada sua presença nos tecidos femininos humanos, inclusive em neutrófilos polimorfonucleares do sangue periférico, onde seu aspecto lembra um bastonete. Devido a sua grande importância no diagnóstico do sexo cromossômico, seu estudo tornou-se obrigatório nos laboratórios de genética médica. Não é observado no núcleo de homens com o número de cromossomos sexuais normais. Em mulheres normais, esfregaços da mucosa oral apontam frequências de cromatina positiva que vão de 20 a 50%. Uma vez que o número de cromatinas sexuais foi verificado corresponder ao número de cromossomos X menos um, seu estudo é também muito útil no diagnóstico de aneuploidias sexuais como a

Síndrome de Turner e Klinefelter, nas disgenesias gonodais, em casos de mosaicismo, etc.

Materiais

- a) Corante fucsina básica
- b) Fenol 5%
- c) Ácido acético glacial
- d) Formaldeído 70%
- e) Álcool absoluto
- f) Álcool 95%
- g) Álcool 70%
- h) Água destilada
- i) Lâminas
- j) Espátulas de madeira
- k) Microscópio

Procedimento

- l) Dissolver 3g de fucsina básica em 100mL de álcool 70% (está será a solução estoque).
- m) Em outro frasco, separar 10mL desta solução estoque e acrescentar 90mL de fenol a 5%, 10mL de ácido acético glacial e 10mL de formaldeído a 37%.

n) Deixar em repouso por no mínimo 24 horas antes de utilizar esta solução na coloração das lâminas.

Essa solução já foi previamente preparada.

o) Com o uso de uma espátula de madeira, raspe a face interna da bochecha. Despreze este primeiro raspado e, em seguida, raspe novamente no mesmo local.

p) Espalhar o material sobre lâminas limpas. Deixar secar.

q) Hidratar primeiramente com álcool 70% por 5 minutos e, em seguida, em água destilada por 8 minutos.

r) Corar durante 15 minutos na solução preparada a partir da solução estoque.

s) Desidratar em álcool 95% e álcool absoluto, com uma passagem rápida em ambos.

t) Observar a lâmina em microscópio óptico, com objetiva de 100X e óleo de imersão.

DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Introdução

Antes de 1900, a administração de sangue com o intuito de salvar vidas humanas era feita de uma maneira aleatória e que na maioria das vezes não era feita com sucesso. Somente a partir de 1900, quando Landsteiner descobriu os grupos sanguíneos do sistema ABO é que os acidentes pós-transfusionais puderam ser interpretados como consequência da interação entre as hemácias do doador e de anticorpos do receptor. Hoje se sabe que, na superfície das hemácias, existem centenas de substâncias, chamadas antígenos, capazes de induzir a resposta imune em indivíduos da mesma ou de outras espécies. Assim, além do grupo sanguíneo do sistema ABO, existem outros sistemas, tais como o Rh, MN, Lewis, etc. Entretanto, os sistemas ABO e Rh merecem atenção especial devido à sua importância nas transfusões sanguíneas e também, no caso do sistema Rh, à doença hemolítica do recém-nascido (eritroblastose fetal).

Phenotype (blood type)	Genotype	Antigen type	Antibodies made by body	Blood-recipient reactions to donor-blood antibodies			
				A (B anti- bodies)	B (A anti- bodies)	AB (no anti- bodies)	O (A and B antibodies)
A	$I^A I^A$ or $I^A i$	A	B				
B	$I^B I^B$ or $I^B i$	B	A				
AB	$I^A I^B$	A and B	None				
O	ii	None	A and B				

Figura 01- Grupos sanguíneos do sistema ABO e as possíveis transfusões.

Materiais

- a) Lancetas estéreis e descartáveis.
- b) Lâminas de microscopia
- c) Algodão
- d) Álcool para assepsia
- e) Anticorpos (anti-soro) Anti-A, Anti-B e Anti-Rh (anti-D)

Procedimento

- f) Primeiramente, faça a assepsia da ponta do dedo com o algodão embebido em álcool.
- g) Com auxílio de uma lanceta nova e esterilizada, faça uma incisão nessa região.
- h) Em uma lâmina, coloque, separadamente, duas gotas de sangue para tipagem do sistema ABO.
- i) Em uma segunda lâmina, coloque uma gota de sangue para tipagem do sistema Rh.
- j) Na primeira lâmina, adicione o soro Anti-A em uma das gotas de sangue e, na outra, adicione o soro Anti-B, misturando em seguida com um palito de dente.
- k) Na segunda lâmina, adicione o soro Anti-D e misture com o palito de dente.
- l) Observe a formação ou não de grumos em cada lâmina e interprete o resultado.

ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Parte 1 – Construção do Heredograma

Jorge e Olga estão ambos preocupados. Eles são recém-casado e começaram a construção de uma família, o que mostrou ser uma grande responsabilidade, cheia de complexidades que nenhum dos dois havia imaginado. Neste exato momento, eles estão na sala de espera de um médico geneticista para um aconselhamento genético. A história de Jorge e Olga começou há 4 anos atrás quando eles se conheceram em uma clínica para tratamento de hemofilia onde Jorge estava esperando seu irmão Jeferson receber uma injeção de fator VIII, a proteína que ajuda a coagulação sanguínea. Quando o nível de fator VIII de uma pessoa é muito baixo (menor que 1% do normal) um pequeno corte pode acarretar problemas sérios devido ao sangramento interno descontrolado. No caso de Jeferson, a hemofilia foi primeiro percebida pelo seu pediatra logo após o nascimento quando a sua circuncisão sangrou intensamente. Desde então, Jeferson tem recebido injeções mensais do fator VIII. Inicialmente, estas injeções continham o fator de coagulação isolado de sangue doador humano, mas nos últimos 10 anos, ele passou a receber o fator recombinante produzido por meio da engenharia genética.

Foi então naquela sala de espera da clínica de hemofilia que Jorge começou a conversar com Olga, que estava esperando o seu tio terminar seu exame e receber a injeção. Assim como Jeferson, o tio de Olga também sofria de hemofilia A devido a deficiência do fator VIII. Começando esta experiência em comum, Jorge e Olga se apaixonaram e se casaram no ano seguinte.

Agora eles estão pensando em ter um filho, mas ficaram preocupados sobre a possibilidade de transmitir doenças

genéticas para suas crianças. Eles sabem, por exemplo, que a hemofilia A é uma doença hereditária, e vários parentes do Jorge sofrem de outra doença, a distrofia miotônica, uma doença que provoca o enfraquecimento muscular.

O primeiro pedido feito pelo médico foi para que eles preenchessem um formulário descrevendo detalhadamente o histórico familiar, listando seus parentes e parentescos, e também se eles eram afetados por qualquer doença genética, caso soubessem. Abaixo são mostrados os formulários:

Nome: Jorge B.

Eu tenho um irmão e uma irmã, nenhum deles são casados. Meu irmão sofre de deficiência do fator VIII, porém, ninguém mais na família sofre. Minha mãe tem dois irmãos e uma irmã. Um dos meus tios e a minha tia são afetadas pela distrofia miotônica. Minha tia afetada casou com um homem não afetado e eles tiveram uma filha aparentemente não afetada. Meu outro tio não é afetado, assim como minha mãe também não é. Nosso médico clínico geral, disse que porque tanto minha mãe como meu tio tem mais de 50 anos e não apresentam sintomas de distrofia miotônica, eles não tem a doença. Meu pai é completamente saudável. Ele foi adotado de um orfanato e nada é conhecido sobre sua família. Minha avó materna foi filha única que também sofre com a distrofia miotônica. O marido dela (meu avô) foi um entre sete filhos (4 meninos e 3 meninas). Ninguém da família sabe muito sobre a saúde do meu avô e tios-avôs. Meus pais estão vivos, mas meus avós já faleceram.

Nome: Olga B.

Eu tenho dois irmãos, um deles tem deficiência do fator VIII. O irmão com a doença é casado com uma mulher que não é doente. Eles têm dois filhos jovens, ambos normais. Meu pai é filho único que não sofre de nenhuma doença e seus pais também são filhos únicos que não sofrem de nenhuma doença. Eles ainda estão vivos. Minha avó materna é saudável e tem

uma irmã que morreu ao nascer. Ela se casou com meu avô que era um filho de quatro filhos homens, que não sofriam de nenhuma doença, pelo que se sabia. Meus avós tiveram dois filhos, minha mãe e meu tio. Meu tio tem hemofilia, mas minha mãe não tem. Meu tio é casado com minha tia que não é afetada e eles tiveram duas crianças, nenhuma delas mostra qualquer sinal da doença. O filho deles ainda é solteiro, mas a filha se casou com um homem normal e eles tiveram um filho que possui hemofilia A.

“Boa tarde” disse o médico, “eu sou o Dr. Cícero Matioli. É um prazer finalmente conhecê-los pessoalmente”.

“Muito prazer também. Eu sou Jorge e esta é minha esposa Olga.”

“Muito prazer.” Disse Olga. “A situação de ter filhos é muito mais estressante do que quando você realmente pensa a respeito.”

“Vocês estão fazendo exatamente a coisa certa. Não existe razão para se preocupar sobre estas coisas antes do necessário. Talvez eu possa tranquilizá-los um pouco. Para começar, eu sei que vocês estão preocupados a respeito da deficiência do fator VIII e distrofia miotônica, porque elas existem na sua história familiar. Existe algo a mais que vocês gostariam de saber?”

“Bem...” começou Olga, “... o fato de nós dois termos estas doenças em nossa família, e de haver uma chance de transmiti-las para nossos filhos, nos abriu os olhos um pouco, mas nós também gostaríamos de saber se você pode prever outras doenças que não aparecem em nossas famílias. Como por exemplo, minha melhor amiga do colegial teve fibrose cística, e ela faleceu com apenas 24 anos, ela também ficava doente o tempo todo.”

“Tudo bem, fibrose cística não parece existir em nenhuma das suas histórias familiares, então, a probabilidade de terem um

filho com essa doença é infinitamente muito pequena, então, vocês não precisam se preocupar sobre isso. Mas, nós podemos gastar um tempo sobre a chance de vocês serem carreadores de genes que nunca aparecem na família. O primeiro passo é converter a informação que vocês me deram em uma representação gráfica chamada heredograma. A partir daí, nós começaremos a associar o parentesco familiar com a manifestação das doenças específicas.”

Responda a seguinte pergunta:

Como seria o heredograma das famílias de Jorge e Olga? Concentre-se nos parentescos e nas pessoas afetadas.

Parte 2 – Características autossômicas dominantes

“Ótimo, isto não se parece como a representação fiel da família de vocês? Parece?”, perguntou o médico.

“Parece bom para mim.” Respondeu Jorge.

“Minha família é tão pequena que não há muito que deixar de fora até a geração dos meus avós.” Disse Olga.

“Bem, a deficiência do fator VIII e a distrofia miotônica são doenças herdadas de maneiras completamente distintas. A outra doença que vocês me perguntaram, a fibrose cística, também tem um padrão de herança diferente das duas outras doenças que vocês estão preocupados. Mas, vamos falar sobre elas, uma de cada vez.”

“A distrofia miotônica é uma doença autossômica dominante e é a mais fácil de se identificar no heredograma. Agora, Jorge, apesar de você ter um tio, uma tia e uma avó que possuem esta doença, você não é afetado, e não possui nenhuma chance de passar esta doença para seus filhos. Então, isto não é uma boa notícia?”

“Mas as doença genéticas normalmente não pulam gerações?” perguntou Jorge. “E mesmo que não pule, minha mãe tem dois irmãos com a doença. Ela não poderia ser uma carreadora, e apenas passar a doença para mim? Desta forma, não seria eu um carreador?”

“Absolutamente não.” Falou o médico Cícero. “Deixe-me explicar porquê.

Responda as seguintes perguntas:

- 1) Doenças autossômicas dominantes pulam gerações? Por quê?
- 2) Poderia Jorge ou sua mãe serem carreadores de um gene que causa a distrofia miotônica?
- 3) Existe alguma possibilidade da tia ou do tio afetados de Jorge serem homozigotos para distrofia miotônica?
- 4) Os sintomas da distrofia miotônica às vezes não aparecem até os 50 anos. Qual é a possibilidade de que a prima de Jorge tenha herdado a distrofia miotônica?
- 5) Qual é a possibilidade de que os filhos de Jorge e Olga herdem o gene da distrofia miotônica?

Parte 3 – Características autossômicas recessivas

“Com certeza, eu me sinto melhor agora sobre isto.” Diz Jorge. “Pelo visto não há nenhuma razão para eu me preocupar a respeito de transmitir a distrofia miotônica para nossas

crianças. Eles terão apenas que se preocupar em herdar a beleza, a inteligência e o incrível senso de humor do pai...”

“E modéstia...” provocou Olga. “Vamos nos controlar um pouco, pois nós ainda não falamos sobre a deficiência do fator VIII, que é a principal razão de nós termos vindo aqui.”

“Certo,” começou o Dr. Cícero, “a deficiência do fator VIII é o que nós chamamos de doença ligada ao X. Antes de explicar para vocês o que é isto, vamos falar sobre uma doença com um padrão mais simples de herança. Muitas características, seja ela considerada uma doença ou não, são descritas como autossômicas recessivas. Estas são um caso no qual você observa carreadores, e o ‘pular’ de gerações. Algumas síndromes recessivas incluem o albinismo, anemia falciforme e a fibrose cística. Vamos ver algumas regras que governam este tipo de herança.”

Responda as seguintes perguntas:

- 1) Quais são as principais características de uma doença autossômica recessiva?
- 2) O que consanguíneo significa? Por que este conceito é especialmente importante quando se discute doenças genéticas recessivas?
- 3) O que existe no heredograma de Jorge e Olga que indica que o padrão de herança da deficiência do fator VIII não é autossômica recessiva?

Parte 4 – Herança ligada ao X

“Muito bem,” começou Olga dizendo, “então a deficiência do fator VIII é ligada ao sexo porque ela afeta somente homens. Isto requer a presença de testosterona ou algo parecido?”

“Não, mas há muitas características que dependem da presença ou ausência de hormônios sexuais. Nós chamamos isto de características influenciadas pelo sexo. Características ligadas ao sexo têm este nome pelo fato de que os genes que elas causam doenças, estão localizadas no cromossomo X, que é um dos cromossomos responsáveis pela determinação do sexo nos humanos. Vamos dar uma olhada como a deficiência do fator VIII ocorre em ambas famílias.”

Responda as seguintes perguntas:

- 1) Quais são as características da herança recessiva ligada ao X?
- 2) Por que um filho nunca irá herdar o cromossomo com o alelo recessivo do pai?
- 3) O que é necessário para uma mulher apresentar uma característica recessiva ligada ao X?
- 4) Reveja o heredograma que você fez para Jorge e Olga e indique aquelas pessoas que são carreadoras para o gene da deficiência do fator VIII.
- 5) Qual é a probabilidade de que Olga seja uma carreadora para o gene da deficiência do fator VIII? Calcule a probabilidade dela transmitir para suas crianças. Os meninos serão afetados de maneira diferente que as meninas?
- 6) Qual é a chance de Jorge ter o gene da deficiência do fator VIII? Ele pode transmitir o gene para seus filhos? E filhas? Como eles serão afetados?

Parte 5 – Assunto polêmico

“Finalmente,” disse o médico Cícero, “vamos falar sobre a fibrose cística. Como eu mencionei anteriormente, provavelmente não há nada para se preocupar uma vez que nenhuma das famílias de vocês dois apresentou na sua história familiar a doença. Lembrem-se de que a fibrose cística é uma doença autossômica recessiva e que para a doença aparecer inesperadamente nos seus filhos ambos precisam ser carreadores.”

“Independente disto, é possível ser testado para esta doença?” perguntou Jorge.

“Sim, mas por razões práticas e econômicas, nós só testamos aquelas doenças que são mais plausíveis de ocorrerem, baseado no histórico do paciente. Por exemplo, nós não testaríamos nenhum de vocês dois para a presença do alelo da fibrose cística.”

“Espere aí...” interrogou Olga, “e no caso de uma doença que aparece em uma idade avançada... o tio do Jorge não mostrou qualquer sintoma da distrofia miotônica até ele ter 43 anos.”

“É mesmo.” Falou Jorge. “E de qualquer maneira, se um teste genético mostrar que você irá desenvolver uma doença genética, e isto se torna parte do seu histórico médico, o plano de saúde não poderia excluí-la como uma condição pré-existente, mesmo que você ainda não a tenha?”

“Bom, atualmente a lei é bastante polêmica sobre este assunto. O teste genético tem o poder de predizer a ocorrência, ou pelos menos, a probabilidade de ocorrência de muitas doenças, tais como câncer, Alzheimer, diabetes... para citar algumas. Muitas pessoas não estão a vontade com esta informação, pois elas têm medo de discriminação, porque

podem fazer parte dos registros médicos. Mas...” disse o Dr. Cícero encerrando a consulta, “... isto é objeto para ser considerado pelos legisladores. É totalmente possível que depois desta conversa que acabamos de ter, que vocês dois saibam muito mais sobre o teste genético do que um congressista ou senador de Brasília. Se você está preocupado sobre a legislação dos testes genéticos para doenças ou características humanas é seu papel avisar a eles a sua opinião. Acredito que, com isto, nós encerramos a nossa consulta. Foi um prazer conhecê-los e poder esclarecer as suas dúvidas.”

“Da mesma forma, você realmente ajudou a gente a se sentir mais tranquilos.” Agradeceu Olga.

“Isto mesmo, eu acho que me sinto bem melhor, obrigado.” Disse Jorge.

Responda as seguintes perguntas:

- 1) Quais são alguns dos riscos e benefícios do teste genético em relação a questões legais (não médicas)?

- 2) Você acredita que uma consequência não intencional do teste genético poderia ser que a população iria procurar menos os cuidados médicos por medo de mais tarde ser negado o plano de saúde ou seguro de vida? Qual lei deveria ser usada pelo governo para o uso deste tipo de dado genético?

CITOGENÉTICA HUMANA

Introdução

Até 1956 o número de cromossomos da espécie humana não era conhecido. Tijo e Levan, na Suécia, e Ford e Hamerton, na Inglaterra, naquele ano, desenvolveram técnicas as quais possibilitou a identificação e visualização adequada do conjunto cromossômico humano. A partir daí, um novo campo de genética, a citogenética, foi criado.

A análise citogenética de cada par de cromossomos homólogos pode ser feita por meio de microscópio óptico ou da fotografia de uma metáfase espalhada, a qual pode ser produzida eletronicamente. Hoje, cada par de homólogos pode ser identificado em ordem crescente de tamanho. O conjunto cromossômico característico da espécie é denominado **cariótipo**. A ordenação dos cromossomos de um cariótipo segundo a classificação padrão (de acordo com o tamanho do cromossomo e a posição do centrômero) é denominada **cariograma** ou **ideograma**.

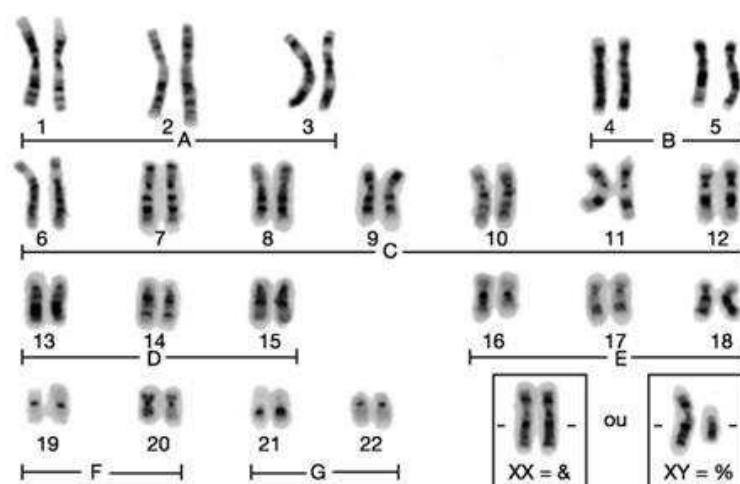


Figura 01- Cariótipo humano com ambas as possibilidades de cromossomos sexuais.

O número normal de cromossomos humanos é 46, ou 23 pares. Desses, 44 (ou 22 pares) são homólogos autossômicos e os dois restantes são cromossomos sexuais. Quanto à sua forma, os cromossomos metafásicos são constituídos por duas cromátides unidas pelo centrômero, também chamado de constrição primária. O centrômero divide as cromátides em braços cromossômicos, sendo denominados **p** (do francês *petit*, pequeno) os braços curtos (ou superiores ao posicionamento do centrômero, quando dispostos em um ideograma pela ordem de tamanho, de acordo com a classificação convencional) e de **q** (do francês *queue*, cauda) os braços longos ou inferiores no ideograma.

É o centrômero que determina a classificação dos cromossomos humanos em três tipos: **metacêntricos**, quando o centrômero é central ou mediano e divide o cromossomo em dois braços iguais; **submetacêntrico**, quando o centrômero está um pouco distante do centro, dividindo o cromossomo em braços ligeiramente desiguais; e **acrocêntrico**, quando o centrômero está mais próximo de uma das extremidades do cromossomo, dividindo-o em dois braços completamente desiguais. Existe ainda um quarto tipo de cromossomo, denominado **telocêntrico**, em que o centrômero está tão próximo a uma das suas extremidades, que somente o braço longo pode ser visualizado. Esse tipo de cromossomo não é encontrado na espécie humana.

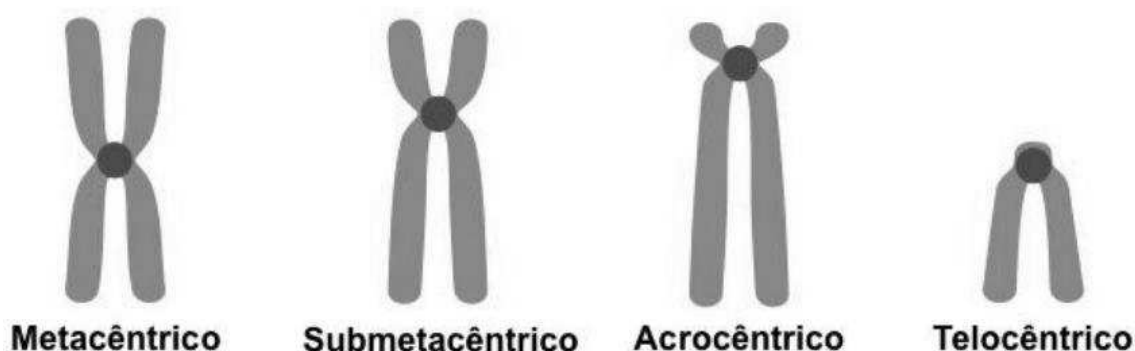


Figura 02- Classificação dos cromossomos com base na posição do centrômero e razão dos braços.

Os cromossomos humanos acrocêntricos podem possuir uma constrição secundária no braço curto (p); em consequência a esse estreitamento, sua extremidade apresenta-se separada do restante do cromossomo, mostrando uma forma arredondada, denominada **satélite**, constituída também de cromatina.

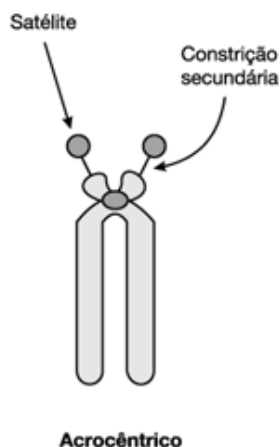


Figura 03- Cromossomo acrocêntrico com satélite em sua extremidade.

Quanto ao tamanho, os cromossomos são considerados grandes, médios, pequenos e muito pequenos, sendo classificados, em ordem decrescente de tamanho, em sete grupos denominado de **A** a **G** e numerados aos pares de **1** a **22**, além dos cromossomos sexuais, que podem ser classificados à parte ou nos respectivos grupos originais. O cromossomo **X** é classificado originalmente no grupo **C**, sendo submetacêntrico e de tamanho intermediário ao dos pares 6 e 7. O cromossomo **Y** é classificado no grupo **G**, sendo acrocêntrico, de tamanho muito pequeno. Ele é mais facilmente distinguível dos outros cromossomos pertencentes ao mesmo grupo, pois é geralmente acrocêntrico, nunca apresenta satélites e seus braços longos apresentam-se pouco afastados um do outro.

O par 1 é o de maior tamanho, metacêntrico, pertencendo ao grupo A; o par 22 é o menor do cariótipo, acrocêntrico e pertencente ao grupo G, A tabela abaixo apresenta uma classificação resumida dos cromossomos humanos, estabelecida

pelos geneticistas em um encontro realizado em Denver (Colorado, EUA) em 1960.

Grupos	Características morfológicas	Nº dos pares
A	Grandes, metacêntricos (1 e 3) e submetacêntricos (2)	1, 2, 3
B	Grandes, submetacêntricos	4,5
C	Médios, a maioria é submetacêntrica	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e X
D	Médios, acrocêntricos	13, 14 e 15
E	Pequenos, metacêntricos ou submetacêntricos (16) e submetacêntricos (17 e 18)	16, 17, 18
F	Muito pequenos, metacêntricos	19, 20
G	Muito pequenos, acrocêntricos	21, 22 e Y

Uma técnica clássica para o estudo dos cromossomos humanos é a microtécnica em que uma pequena amostra de sangue (5 mL) é colhida e misturada a um anticoagulante. Em seguida, duas gotas do sangue total são colocadas em um frasco contendo um meio de cultura apropriado, constituído por soro proteico (soro com um mínimo de 10% de proteínas, soro fetal bovino e/ou soro humano), antibióticos e fitoemoaglutinina (que estimula a divisão de linfócitos T). Esse meio de cultura é incubado em estufa à 37°C, durante 72 horas, tempo no qual a taxa mitótica dos leucócitos atinge o seu máximo e um número razoável de células está em metáfase. Após esse tempo, acrescenta-se uma solução de colchicina à cultura, que é deixada na estufa por mais duas horas. A colchicina interfere na formação do fuso acromático, ligando-se especificamente à tubulina dos microtúbulos e impedindo a divisão dos centrômeros. Assim, a colchicina interrompe o processo mitótico na metáfase.

Em seguida, o material do frasco é submetido à centrifugação por alguns minutos. O sobrenadante é desprezado e ao sedimento adiciona-se água destilada ou uma solução hipotônica de cloreto de potássio, a qual penetra nas células, inchando-as e possibilitando uma dispersão maior dos cromossomos. Cerca de seis minutos depois, o material é submetido novamente à centrifugação, para sedimentação das células, desprezando-se o sobrenadante. As células são, então,

fixadas (mortas) com uma solução de metanol e ácido acético, na proporção 3:1. Esse material é distribuído sobre lâminas e corado, adequadamente, para análise.

Até pouco tempo atrás, um cariótipo era construído a partir de fotografias ampliadas, os cromossomos eram recortados e organizados aos pares, considerando-se sua forma e tamanho, em ordem decrescente, sobre uma folha de papel padronizada para esse fim. Hoje, uma abordagem computadorizada, que produz um esquema ou mapa cromossômico em minutos, substitui o método de recorte e colagem para cariotipagem. Além disso, a análise cromossômica tornou-se altamente refinada, com descrições cada vez mais informativas, incluindo resultados de análise molecular. Atualmente, esse refinamento permite a realização de uma análise cromossômica em muito menos tempo e com maior acuidade.

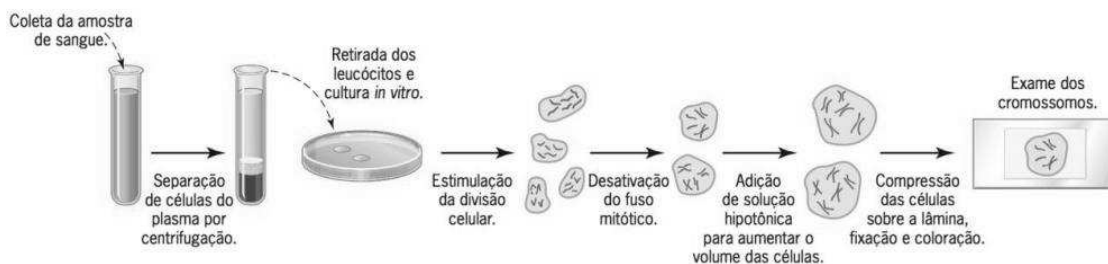


Figura 04- Sequência para obtenção de cromossomos metafásicos humanos.

A análise de cariótipo pode ser utilizada para identificação de síndromes genéticas. A partir do cariótipo recebido, monte um ideograma do mesmo e identifique se o indivíduo possui alguma síndrome e, caso possua, identifique a mesma. Utilize a nomenclatura correta para designação da síndrome, um cariótipo normal, por exemplo, seria 46, XX ou 46, XY.

Materiais

- a) Tesoura
- b) Cola

c) Cromossomos

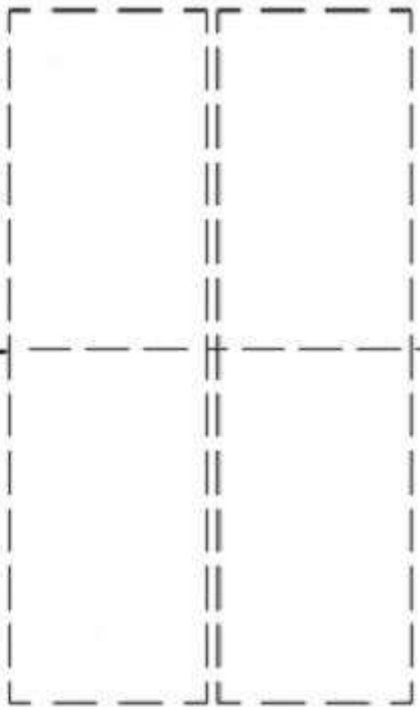
Procedimento

- d) Recorte e cole os cromossomos a fim de montar um ideograma humano.
- e) Em seguida, identifique se existe alguma alteração cromossômica no mesmo e, caso afirmativo, identifique qual é essa alteração e a síndrome genética correspondente.

NOMES: _____

CARIÓTIPO NÚMERO: _____ SEXO: _____

SÍNDROME: _____



1

2

3

4

5

Grupo A

Grupo B

6

7

8

9

10

11

12

Grupo C

13

14

15

16

17

18

Grupo D

Grupo E

19

20

21

22

Grupo F

Grupo G

sexual