



CAÇANDO GENES

Cristina Yumi Miyaki¹, Lyria Mori² & Maria Cristina Arias³.

1. cymiyaki@ib.usp.br; 2. lmori@ib.usp.br; 3. mcarias@ib.usp.br

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Resumo

A atividade proposta é uma simulação da busca de um gene candidato ou responsável por determinado fenótipo, utilizando uma análise combinada de heredograma e de marcadores moleculares. Como exemplos, utilizaremos nessa atividade as doenças denominadas fenilcetonúria e a alcaptonúria.

Introdução

O sequenciamento do genoma humano pode significar para o público não especializado uma esperança de cura para doenças genéticas. No entanto, esse caminho é muito longo e um dos primeiros passos é mapear, ou seja, identificar e localizar os genes envolvidos nas patologias.

Uma possível abordagem de identificação de novos genes humanos associados a doenças pode se iniciar com o estudo das genealogias (**heredogramas**) de famílias com pessoas afetadas. Em seguida, como existem diversos **marcadores moleculares genéticos** mapeados em cada cromossomo humano, é feita uma busca por marcadores que estão sempre presentes (ligados) com o fenótipo em estudo. Esses marcadores são sequências que não causam a doença, mas estão fisicamente próximos ao gene candidato responsável pela mesma (Griffiths *et al.* 2006). Assim, são estudados marcadores moleculares distribuídos por todo genoma dos indivíduos da família e é feita uma **análise de ligação**, ou seja, é realizada a busca de um ou mais marcadores que sempre ocorrem nos indivíduos afetados pela doença e que não ocorrem nos indivíduos saudáveis. Como a localização desses marcadores nos cromossomos é conhecida, é possível inferir a localização do gene responsável pela doença. Com o sequenciamento do genoma humano e consequente identificação e mapeamento de potenciais genes, a inferência sobre o gene candidato responsável pela doença foi facilitada.

Em 1901, um ano após a redescoberta do trabalho de Mendel, Archibald Garrod (1857-1936) foi o primeiro cientista a correlacionar uma doença humana com as leis Mendelianas da herança. Garrod observou que a urina de algumas crianças podia escurecer quando exposta ao ar e se interessou pelo significado químico e clínico desse fenômeno. O pigmento escuro na urina era um produto da oxidação do ácido homogentísico, um derivado dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, componentes comuns das proteínas. Essa doença foi denominada de alcaptonúria (AKU). Garrod descobriu que a AKU é uma condição que se inicia logo no início da infância e persiste durante a vida toda. Ele verificou também que os pais (aparentemente normais) de pacientes com AKU eram frequentemente primos de primeiro grau. Concluiu então que a anomalia era hereditária. Ele coletou informação sobre a história da família (assim como a urina) de seus pacientes. Com base em discussões com William Bateson (divulgador das idéias de Mendel), Garrod deduziu que a AKU era uma doença recessiva. Ele também foi o primeiro a propor a idéia de doenças do tipo “erros inatos do metabolismo”. Esse foi o primeiro caso publicado sobre herança recessiva em humanos.

Houve uma demora de 50 anos até que se mostrasse que, no fígado dos pacientes com AKU, a atividade da enzima que normalmente quebra o ácido homogentísico, denominada oxidase do ácido homogentísico (HGO), está de fato ausente. Outros 40 anos se passaram até o gene responsável pela codificação da enzima HGO e o correspondente alelo mutante fossem localizados no cromossomo 3 (banda 3q2), clonados e sequenciados. Hoje se sabe que problemas na via metabólica que envolvem o uso do aminoácido fenilalanina resultam em outras doenças (Figura 1).

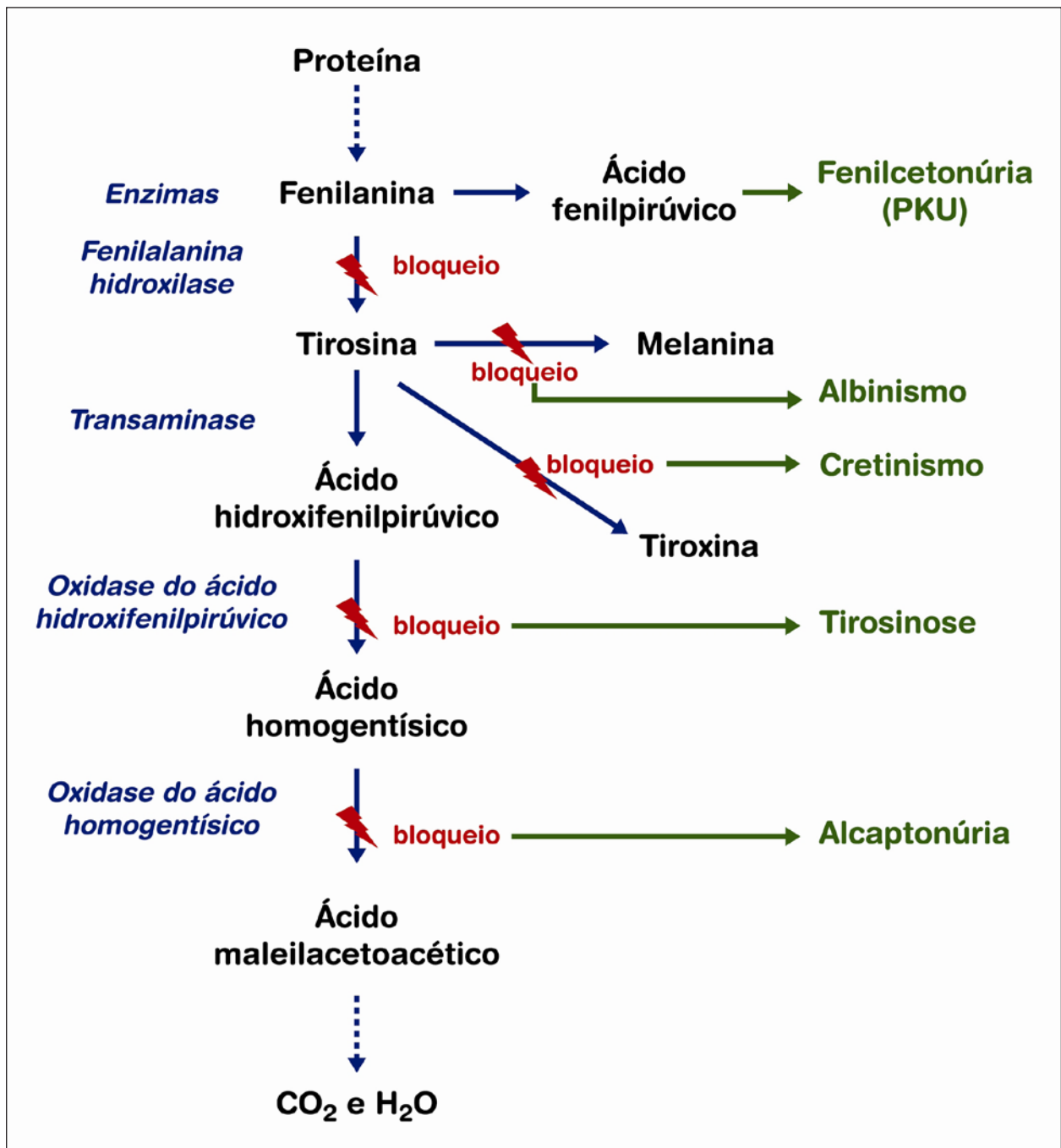


Figura 1. Via metabólica da fenilalanina. Bloqueios em diferentes etapas dessa via metabólica podem ocorrer por mutações nos genes que codificam as enzimas responsáveis por cada uma dessas etapas. No exemplo da via da fenilalanina existem cinco doenças (em verde) que podem ocorrer em consequência de bloqueios em diferentes etapas (enzimas envolvidas em azul e substratos ou produtos em preto).

O processo de descoberta de outra doença, denominada de fenilcetonúria (PKU), foi semelhante à da AKU. Ele começou na Noruega, em 1934, quando uma mãe com dois filhos com retardo mental consultou o médico Asbjørn Følling. Durante a entrevista Følling ficou sabendo que a urina da criança tinha um odor estranho. Mais tarde, ele testou a urina dessas crianças com cloreto férrico e viu que enquanto a urina normal resultava em cor amarronzada, a urina da outra criança ficava verde. Ele deduziu, após testes com cloreto férrico, que a substância química responsável

deveria ser o ácido fenilpirúvico. Devido à semelhança química com a fenilalanina, o ácido fenilpirúvico poderia ter se formado a partir de fenilalanina presente no sangue.

Os dados da época foram claros o suficiente para mostrar que a fenilalanina era a responsável pela PKU devido ao seu acúmulo e subsequente conversão em altos níveis de ácido fenilpirúvico, que então interferia no desenvolvimento normal do tecido nervoso. Isso levou à formulação de uma dieta especial, pobre em fenilalanina. Tal dieta deve ser usada por mães durante a gravidez e nos recém-nascidos

diagnosticados como PKU positivo para que estes se desenvolvam normalmente. Desde 1966, no Brasil, todo recém-nascido é obrigado por lei a fazer o “teste do pezinho”, que consiste em uma pequena punção no calcanhar e a retirada de uma amostra de sangue para verificar a concentração de fenilalanina. Se a doença for diagnosticada, a criança deverá ter uma dieta com baixo teor de fenilalanina e poderá ter um desenvolvimento normal sem riscos de retardo mental.

Nessa atividade, a proposta é simular o processo de busca do gene da fenilcetonúria, uma deficiência da mesma via da alcaptonúria, e discutir a importância da advertência -“Contém fenilalanina” - na embalagem de alguns produtos alimentícios.

Objetivos

Por meio de uma atividade lúdica pretendemos que os participantes compreendam como:

1. Os heredogramas são obtidos e analisados;
2. Os marcadores podem ser utilizados no mapeamento de genes;
3. Os pesquisadores utilizam heredogramas e marcadores para mapear genes relacionados a doenças humanas.

Função pedagógica

1. Interpretação de heredogramas.
2. Inferência (hipótese) sobre o padrão de herança de fenótipos.
3. Interpretação de ligação entre marcadores e a manifestação do fenótipo.

Preparando a Atividade

Antes de aplicar a atividade em sala de aula o professor deverá ler o conteúdo total da atividade proposta, copiar as Figuras 2 e 3 e os Quadros 1 e 2 em número suficiente para os grupos de alunos formados. Os marcadores moleculares presentes nos cromossomos 1 e 12 (Figura 3) devem ser recortados, coluna a coluna, de modo a conter o padrão de marcadores presentes em cada indivíduo da geração III e IV do heredograma, identificados por algarismos romanos e arábicos.

Material para um grupo formado por cinco alunos

Quadro 1. Histórico da família com filhos afetados pela fenilcetonúria.

Figura 2. Heredograma de uma família com indivíduos afetados pela fenilcetonúria.

Figura 3. Colunas contendo o resultado da eletroforese de diversos indivíduos (recortar em tiras).

Quadro 2.

Cópia do mapa gênico da região 12q24.

Aplicando a Atividade

1. Dividir a classe em grupos de cinco alunos.
2. Explicar o problema biológico, ou seja, fazer um resumo da introdução.
3. Distribuir o conjunto de Figuras (2 e 3) e Quadros (1 e 2) para cada grupo de alunos.
4. A procura pelo gene responsável pela fenilcetonúria deve iniciar-se com a leitura do histórico clínico do Quadro 1.
5. Pedir aos alunos para analisarem o heredograma (Figura 2) e estabelecer o padrão de herança do fenótipo fenilcetonúrico.
6. Pedir para os alunos colocarem os marcadores moleculares sobre o heredograma, ao lado do fenótipo (tubo de ensaio) de cada indivíduo.
7. Pedir para os alunos analisarem os padrões e verificarem se existe algum marcador (bandas coloridas identificadas por letras maiúsculas e números arábicos) em comum nos dois irmãos afetados.
Lembrar aos alunos que, de acordo com a análise do heredograma, feita por eles, a fenilcetonúria deve ser autossômica recessiva, portanto o indivíduo fenilcetonúrico deverá ser homozigótico para a mutação do gene. No exemplo usado nesta atividade, o marcador em comum entre os indivíduos afetados IV.2 e IV.3 é a banda C1, presente no cromossomo 12, que é mais espessa (possui duas cópias pois se encontra em homozigose).
8. O passo seguinte é procurar no mapa gênico (Quadro 2) algum gene envolvido no metabolismo da fenilalanina.

Procedimento para o aluno

1. Ler o histórico clínico da família (Quadro 1).
2. Analisar o heredograma da família e responder as questões: (Figura 2):
 - a) a fenilcetonúria é hereditária?
 - b) a fenilcetonúria é dominante ou recessiva?
 - c) a fenilcetonúria é autossômica ou ligada ao sexo?
3. Colocar os marcadores moleculares ao lado dos tubos de ensaio dos respectivos indivíduos do heredograma.
4. Analisar o padrão de bandas dos indivíduos e verificar se existe algo em comum entre os dois irmãos com fenilcetonúria.
5. Procurar no mapa gênico do cromossomo 12 (Quadro 2) algum gene envolvido no metabolismo da fenilalanina.

Respostas para as questões da seção “Procedimento para o aluno”

2.a). A fenilcetonúria é hereditária, um dos indicadores para essa conclusão é o nascimento de filhos afetados por fenilcetonúria em casamento entre primos (Figura 2: casal III2 x III3).

2.b). A fenilcetonúria é recessiva, uma vez que um casal normal (Figura 2: casal III2 x III3) tem filhos afetados.

2.c). A fenilcetonúria deve ser autossômica, porque o casal III2 x III3 tem filhos afetados de ambos os sexos.

4. O marcador em comum entre os indivíduos afetados IV.2 e IV.3 é a banda C1 mais espessa (homozigose) do cromossomo 12.

5. A região 12q24.1 possui o gene fenilalanina hidroxilase, que em estado mutado e em homozigose resulta na fenilcetonúria.

Glossário

Análise de ligação – Associação do marcador molecular com o fenótipo, indicando que o gene determinante da característica está fisicamente próximo ao marcador de modo que a probabilidade de ocorrer uma permutação entre eles é muito pequena.

DNA (Ácido desoxirribonucleico) – cadeia dupla de nucleotídeos, tendo desoxirribose como açúcar; a substância fundamental da qual são compostos os genes.

Heredograma – árvore genealógica que mostra o fenótipo de cada um dos membros da família em relação a uma determinada característica.

Marcador molecular genético – Uma região do genoma que apresenta polimorfismo, esse polimorfismo é resultante de mutações como substituições, deleções ou inserções de bases no DNA. É um sítio de heterozigose não necessariamente associado à variação fenotípica, usado como uma marca para um determinado loco cromossômico. A metodologia mais utilizada para o isolamento desses marcadores moleculares é a **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*, ou reação em cadeia da polimerase em português). A PCR consiste na amplificação de um segmento específico de DNA; utiliza dois iniciadores (*primers*) que se ligam (hibridam) flanqueando a região a ser amplificada, DNA polimerase e nucleotídeos. Dá-se então início a ciclos sucessivos de desnaturação, ligação dos iniciadores e crescimento de novas cadeias. Ao final, a região alvo do DNA é amplificada milhões de vezes.

Teste com cloreto férrico – Teste qualitativo colorimétrico, que pode ser feito na urina. O teste consiste na adição de 0,5ml de solução de cloreto férrico a 10% a 1ml de urina, que se cora em verde ou azul-esverdeado nos casos positivos, indicando a presença de ácido fenilpirúvico.

Bibliografia e Leitura Adicional Recomendada

- Cold Spring Harbor Laboratory: www.dnalc.org e <http://www.dnai.org>
- Griffiths, A. J.; Wessler, S. R.; Gelbart, W. M.; Suzuki, D. T. & Miller, J. H. 2006. Introdução à Genética. 8a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 123, 181, 184, 192.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). NCBI. Johns Hopkins University. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>
- Watson, J. D. & Berry, Andrew. 2003. DNA – O segredo da vida. Companhia das Letras. São Paulo. p. 316-346; p. 347-385.

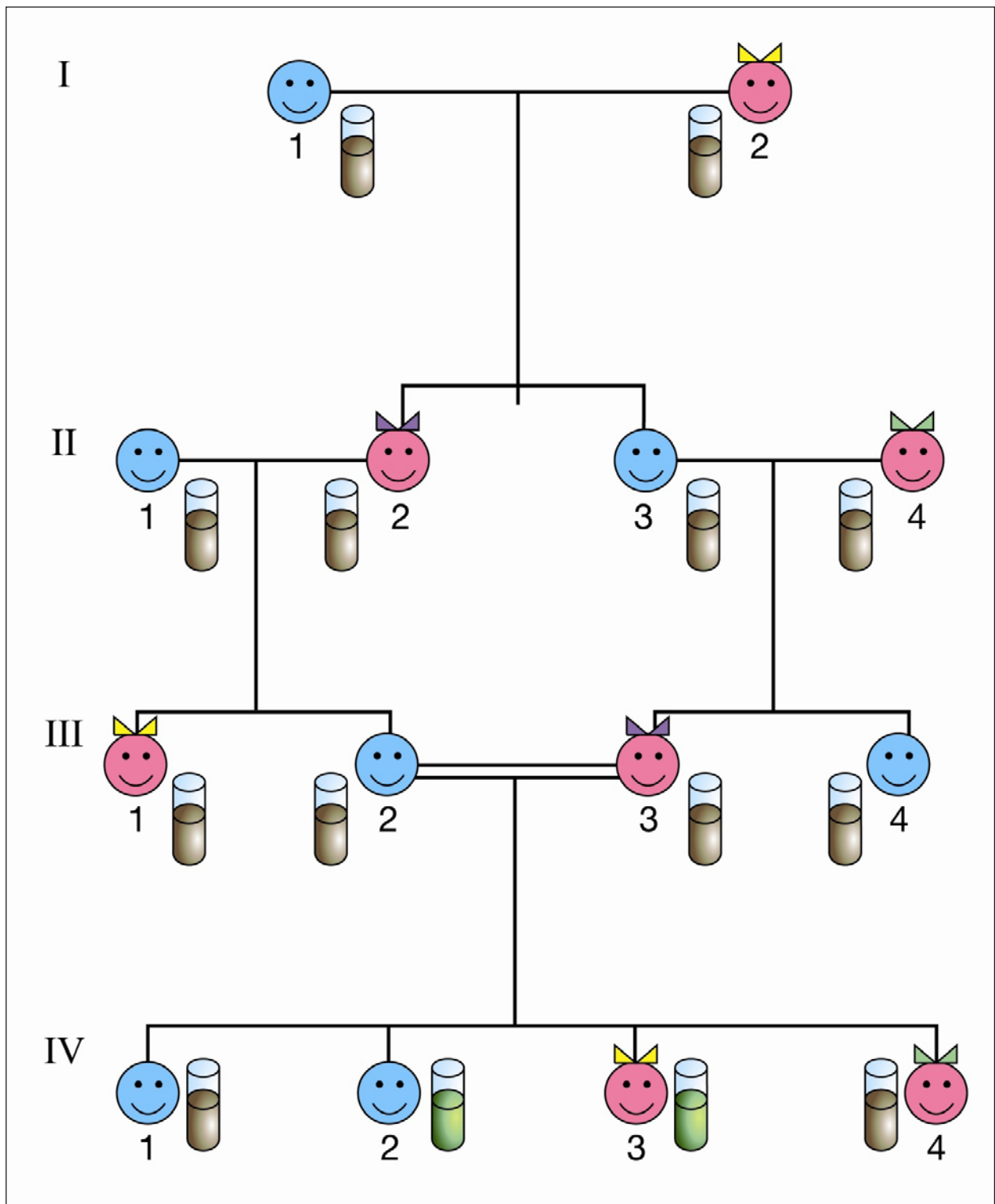
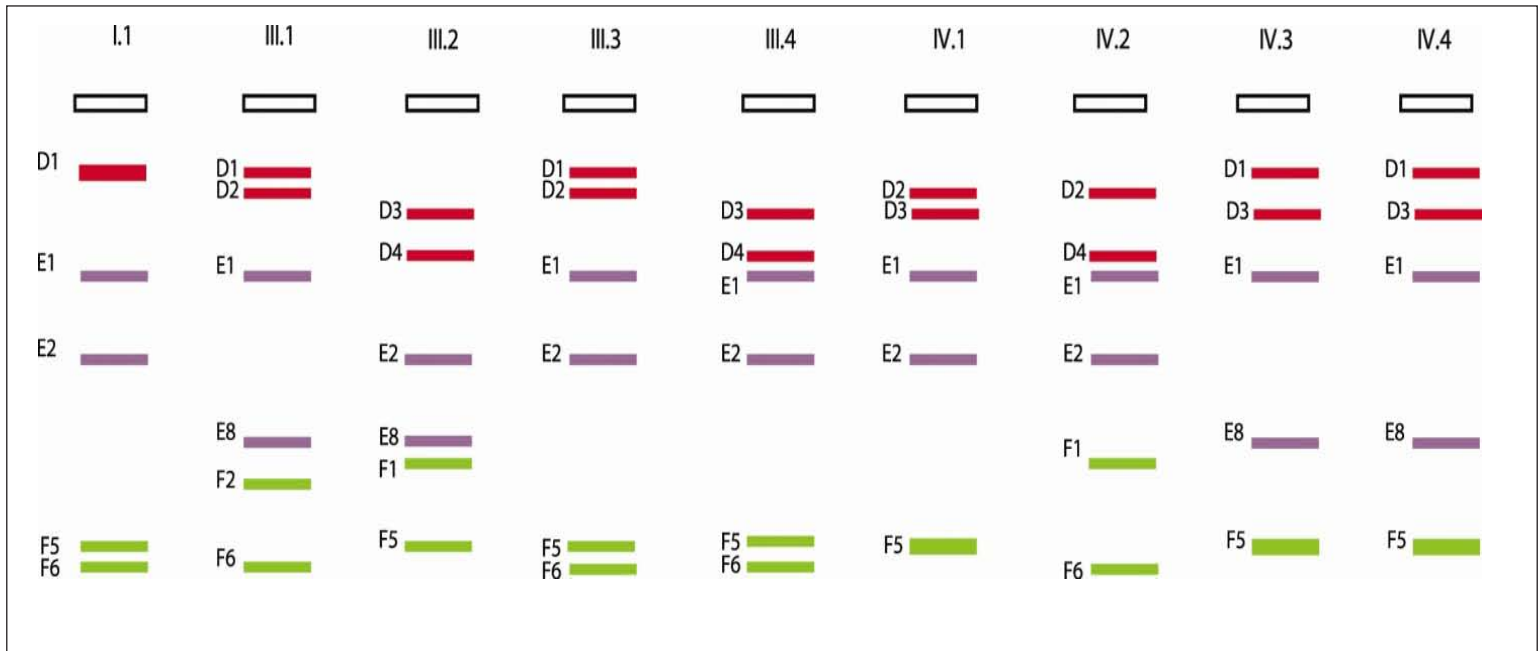


Figura 2. Heredograma de uma família com dois indivíduos com fenilcetonúria (PKU). Os tubos de ensaio representam os resultados dos exames de urina: em marrom - urina normal; em verde - urina de fenilcetonúricos. Em azul estão representados os indivíduos do sexo masculino, em rosa indivíduos do sexo feminino. O traço duplo que liga os indivíduos III2 e III3 representa casamento entre primos.

A



B

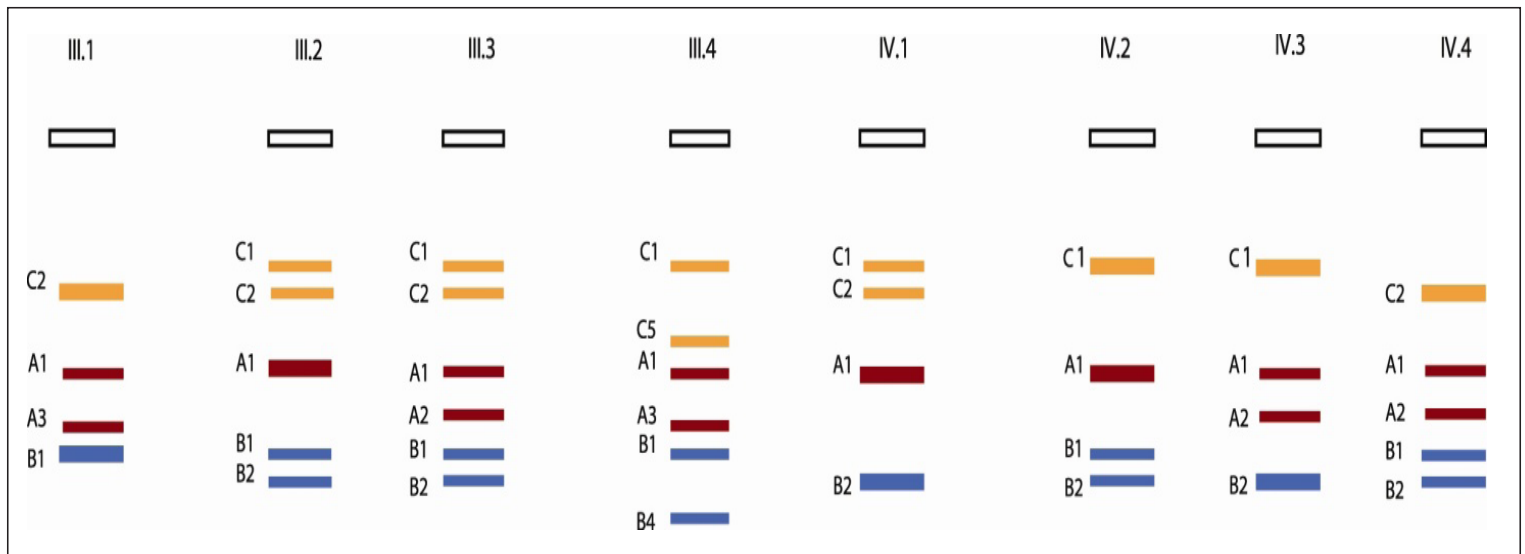


Figura 3. Marcadores moleculares dos cromossomos 1 (A) e 12 (B), bandas coloridas identificadas por letras maiúsculas e números, presentes nos indivíduos das gerações III e IV. Os algarismos romanos e arábicos identificam os indivíduos do heredograma (Fig. 2).

Uma mulher (III.3) casada com um primo (III.2) teve dois filhos (IV.2 e IV.3) com retardo mental e dois filhos normais (IV.1 e IV.4). O médico consultado percebeu que a urina das crianças com a anomalia tinha um odor estranho. Mais tarde, ao testar a urina dessas crianças com cloreto férrico, o médico viu que a urina ficava verde enquanto a de crianças normais resultava em cor amarronzada. A cor verde indicava que havia altos níveis de ácido fenilpirúvico como consequência da ausência de metabolização de seu precursor, a fenilalanina.

Quadro 1. *Histórico da família com filhos afetados pela fenilcetonúria. Os algarismos romanos e arábicos referem-se aos indivíduos do heredograma representado na Figura 2*

Quadro 2. *Mapa gênico com a localização de genes da região 12q24 do cromossomo 12, retirado da página da Johns Hopkins University (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap.cgi?d5992>), com algumas modificações.*

Localização	Símbolo	Nome	Doença	Comentários	Método
12q24.1	APPL2, FLJ10659	Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain, and leucine zipper-containing protein 2			Ch, REc
12q24.1	BCL7A, BCL7	B-cell CLL/lymphoma-7A	B-cell non-Hodgkin lymphoma, high-grade (3)		Ch
12q24.1	CMKLR1	Chemokine-like receptor 1			A
12q24.1	CORO1C	Coronin 1C			A
12q24.1	FOXP4	Forkhead box N4			R, REc
12q24.1	ISCU, HML	Iron-sulfur cluster scaffold, E. coli, homolog of	Myopathy with exercise intolerance, Swedish type, 255125 (3)		R, REc, Fd
12q24.1	PAH, PKU1	Phenylalanine hydroxylase	Phenylketonuria (3); [Hyperphenylalaninemia, mild] (3)	close to IGF1	REa, A, Fd
12q24.1	PRKAB1	Protein kinase, AMP-activated, noncatalytic, beta-1			A
12q24.1	PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1	Protein tyrosine phosphatase, nonreceptor-type, 11	Noonan syndrome 1, 163950 (3); Leopard syndrome, 151100 (3); Leukemia, juvenile myelomonocytic, 607785 (3)		A, Fd
12q24.1	RPH3A, KIAA0985	Rabphilin 3A			R, REc
12q24.1	SART3, P100, KIAA0156, TIP110, DSAP1	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3	Porokeratosis, disseminated superficial actinic, 1, 175900 (3)		Fd, Psh, REc, H
12q24.1	STUT2	Stuttering, familial persistent 2	Stuttering, familial persistent 2 (2)	max lod with PAH	Fd
12q24.1	SVOP	SV2-related protein			REc
12q24.1	TBX3	T-box 3	Ulnar-mammary syndrome, 181450 (3)		REc, A
12q24.1	TBX5	T-box 5	Holt-Oram syndrome, 142900 (3)		Fd, REc, Ch
12q24.1	TDG	Thymine-DNA glycosylase			A
12q24.1	TECT1	Tectonic 1			REc, R
12q24.1	TPCN1, TPC1, KIAA1169	Two-pore segment channel 1			R, REc
12q24.1	TRPV4, VROAC	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (vanilloid receptor-related osmotically activated channel)			REc