



# GENÉTICA NO COTIDIANO

Material de apoio para o curso

Organizador: Enéas Ricardo Konzen

G328

Genética no cotidiano. Material de apoio para o curso/  
Enéas Ricardo Konzen – Organizador.

Diagramação: Ana Carolina Nardini Cabral e  
coordenação de Marlise Bock Santos.

NAPEAD - Núcleo de Apoio Pedagógico à Educação à Distância

Imbé - RS: 2024.

112 p. ; il. color. Recurso eletrônico.

1. Genética. 2. Educação Básica. 3. Konzen, Enéas Ricardo.  
I. Cabral, Ana Carolina Nardini. II. Santos, Marlise Bock.  
III. Título.

CDU 575(816.5)

Ismael Cabral – CRB10/2484

# Módulo 5

Autor:  
Enéas Ricardo Konzen

## MÓDULO 5

### DETECTANDO VARIAÇÃO GENÉTICA: MARCADORES MOLECULARES E PCR

Chegamos até aqui e já aprendemos um pouco sobre a importância da diversidade genética. No capítulo anterior falamos sobre a diversidade genética e seu reflexo na variabilidade fenotípica, destacando também o quanto o ambiente frequentemente influencia. Neste capítulo responderemos à pergunta: como podemos acessar a diversidade genética diretamente no nível de DNA? Para tal, ao longo de décadas, os cientistas descobriram estratégias para identificar sequências e fragmentos de DNA que podem diferenciar indivíduos, populações, espécies, etc. Os cientistas chamaram estes pedaços de DNA de **marcadores moleculares**.

Por que se utiliza a palavra ‘marcadores’? Justamente porque permitem etiquetar ou marcar regiões de DNA segundo algum princípio técnico, de modo que possam ser comparados entre amostras individuais, verificando-se se há ou não diferenças entre as amostras. Por acessar essas diferenças diretamente em nível de DNA, uma macromolécula, são chamados marcadores moleculares.

Mas vamos voltar um pouco e relacionar este tema com o do capítulo anterior. O trabalho de Gregor Mendel foi pioneiro ao desvendar os mecanismos de herança simples de algumas características. Quando ele analisou as características de ervilhas, na verdade, trabalhou com **marcadores morfológicos**. Ao identificar os mecanismos de herança por trás das proporções que observou em gerações diferentes, o próprio Mendel trabalhou com seus primeiros **marcadores genéticos**. Marcadores morfológicos tais como a cor e forma das ervilhas são ao mesmo tempo marcadores genéticos, **pois a sua segregação se enquadra em princípios mendelianos**. Na  $F_2$  originada de um cruzamento entre linhas puras, espera-se a proporção fenotípica de 3:1 quando se trata de uma característica controlada por apenas um gene. Conclusão: um marcador genético é qualquer característica que possa ser discriminada por categorias e que possua segregação que se ajuste ao modelo mendeliano, dados os genótipos dos parentais e a maneira como o cruzamento se deu.

**Mas o que isso tem a ver com o DNA?** Vamos retomar a frase ‘**qualquer característica que possa ser discriminada por categorias**’. ‘Qualquer característica’ implica tanto aspectos morfológicos quanto moleculares. Você vai compreender que marcadores de DNA são genéticos na medida que também seguem padrão mendeliano de segregação.

## Compreendendo o conceito de marcador molecular

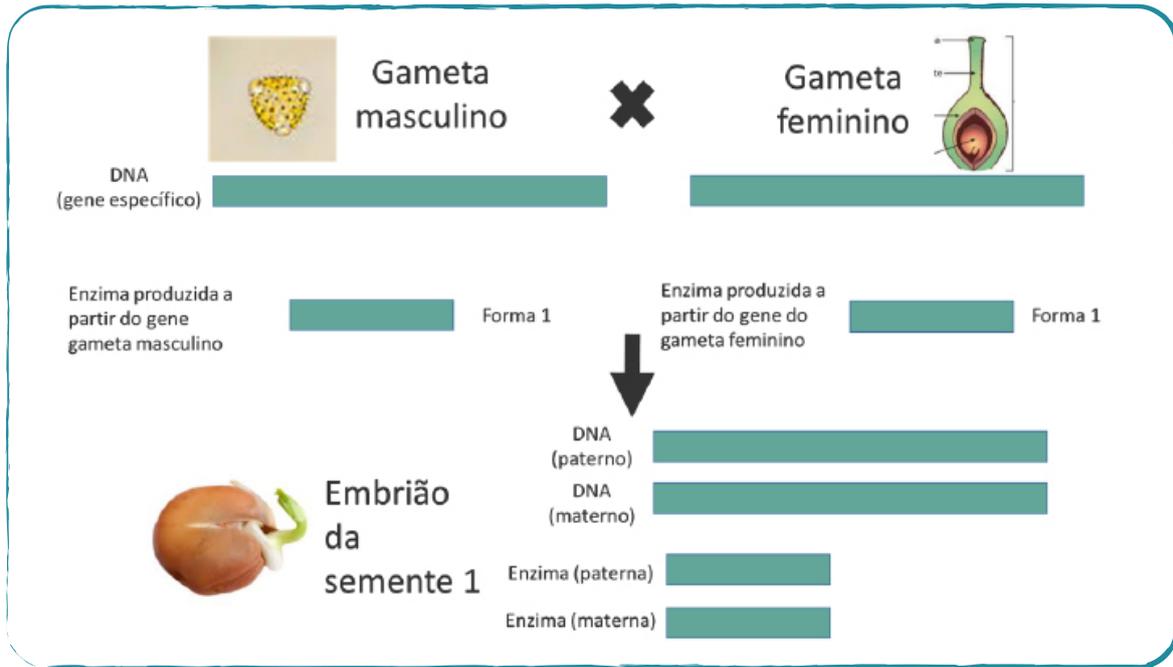
É natural pensar que quando os cientistas começaram a trabalhar com marcadores genéticos, as características eram morfológicas, afinal, não havia sequências de proteínas e de DNA disponíveis até a década de 1960. No entanto, à medida que o conhecimento e as técnicas de isolamento e separação de proteínas e DNA foram aprimoradas, isso foi aplicado justamente às moléculas. O grande pulso inicial para isso não foi o DNA, exatamente. Foi um produto dele: as enzimas.

**Enzimas** são proteínas que atuam em processos metabólicos diversos no nosso organismo, regulando a velocidade de reações químicas importantes para nossa vida. Assim, desempenham papel fundamental na manutenção da vida de qualquer organismo. E veja bem, **enzimas são produto da expressão de genes**. Genes são feitos de DNA. Os genes são transcritos em RNA mensageiro (RNAm) no núcleo celular. O RNAm é transportado para o citoplasma e lá é traduzido em proteínas, incluindo as enzimas.

Se o DNA apresenta variações, estas podem ou não ser refletidas na sequência de aminoácidos das enzimas (isso nós vimos no capítulo 3). Se uma mutação no DNA altera o aminoácido que é codificado, a carga elétrica líquida da enzima (diferença entre cargas positivas e negativas) poderá ser modificada. Além disso, a massa molecular (o peso da enzima) também poderá ser modificada. O fato é que a mesma enzima poderá ser representada por diferentes formas ou constituições moleculares, mas manter a mesma função.

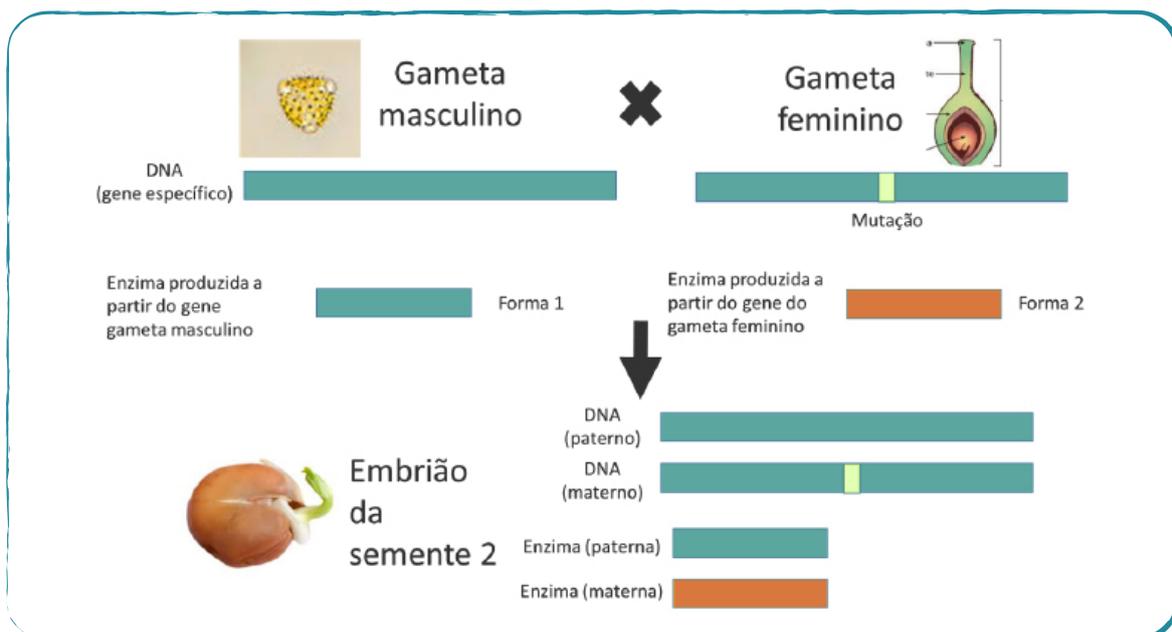
As **isoenzimas** são definidas como diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, como resultado da presença de sequências diferentes do mesmo gene em uma população, ou seja, a presença de **alelos diferentes**. Também usa-se o conceito de **aloenzimas**: enzimas que são o produto de diferentes alelos de um mesmo gene. Aloenzimas podem ser o resultado de mutações pontuais que afetam a sequência de DNA que codifica o gene. Frequentemente, isoenzimas são chamadas de **marcadores bioquímicos**, para diferenciar dos marcadores de DNA.

Considere o exemplo de uma planta que é utilizada como doadora de pólen e de outra planta materna que recebe este pólen em um cruzamento. Considere também uma enzima específica, que é codificada por um gene (um segmento de DNA). Para o embrião gerado (embrião 1) após a fertilização de um gameta masculino com o feminino, **ambos com a mesma sequência de DNA**, serão produzidas **enzimas idênticas**, tanto a partir da cópia do gene paterno, quanto da cópia do gene materno (Figura 5.1).



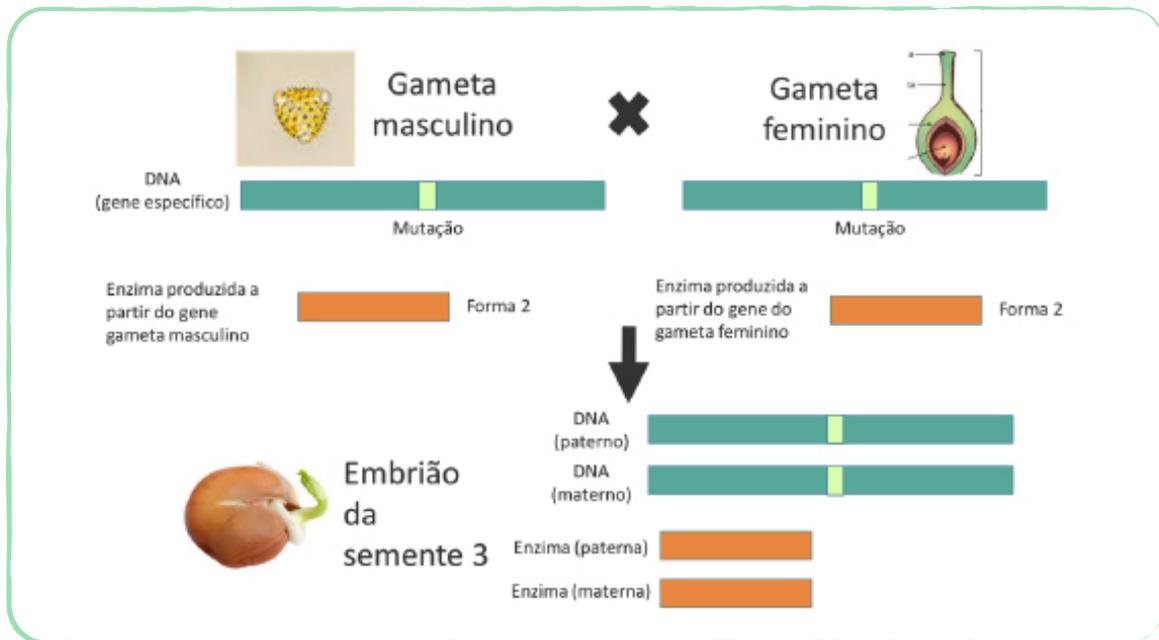
**Figura 5.1** - Formas idênticas de uma enzima em dois parentais de uma espécie de planta.

Para a fertilização de um gameta masculino com a forma 1 do gene/enzima com um **gameta feminino que contenha mutação** (esta refletindo em alteração de um ou mais aminoácidos para o mesmo gene), produzem-se duas formas diferentes da mesma enzima em um indivíduo (embrião 2), conforme a figura a seguir (Figura 5.2).



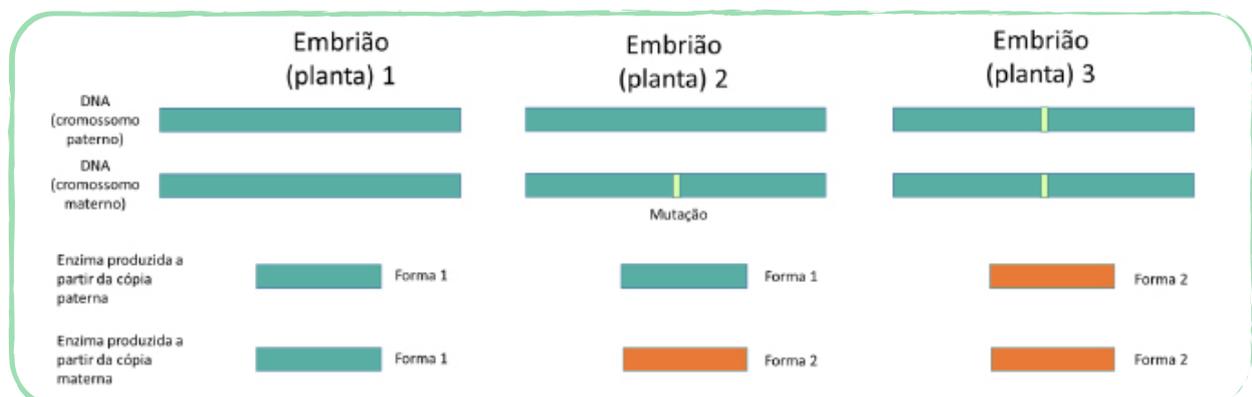
**Figura 5.2** - Formas diferentes da mesma enzima, devidas à mutação no DNA materno que alterou um aminoácido da proteína produzida.

Finalmente, um terceiro gameta masculino com a mutação que gera a forma 2 da enzima fertiliza um gameta feminino com a mesma mutação. Assim, o embrião 3 apresenta duas cópias do gene mutado, **gerando enzimas somente da forma 2** (Figura 5.3).



**Figura 5.3** - A forma mutada está presente tanto no pólen quanto no óvulo, gerando duas formas idênticas da enzima, embora, comparativamente à original, seja uma forma mutada.

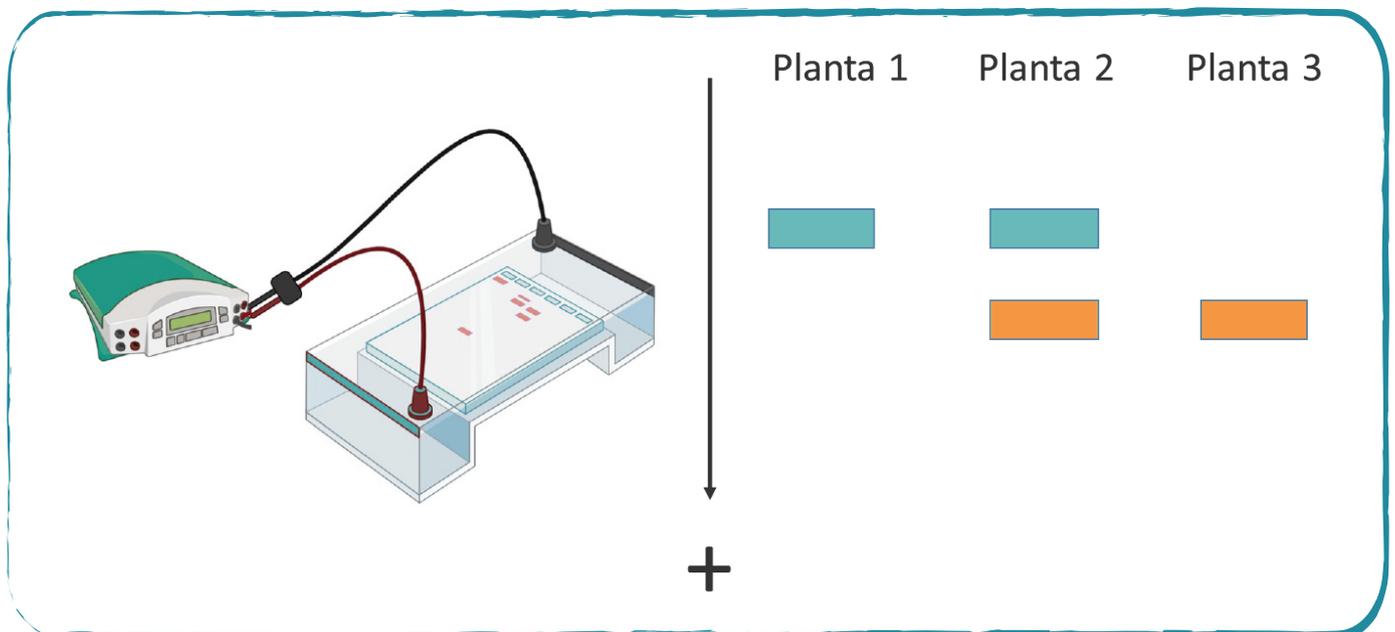
A partir disso, podemos dizer que há dois alelos para esse gene: o alelo que codifica a forma 1 da enzima e o alelo que codifica a forma 2. Assim, o embrião ou planta 1 é **homozigoto** para o alelo que codifica a forma 1 da enzima, pois tanto a cópia materna do gene quanto a paterna produzem a mesma forma da enzima. Para o caso da planta 2, gera-se um **heterozigoto**, pois duas formas diferentes da mesma enzima estão presentes em um indivíduo. Para a planta 3, novamente temos um homozigoto, pois duas cópias da forma 2 são produzidas, uma materna e outra paterna. Um resumo dos três embriões (ou plantas novas) produzidos é apresentado a seguir (Figura 5.4).



**Figura 5.4** - Formas alélicas presentes em cada.

## Separando moléculas em um campo elétrico: a eletroforese

Ao separarmos as proteínas de amostras em um gel feito de agarose ou poliacrilamida (material bastante poroso, que forma uma gelatina com microporos), este submetido a um campo elétrico com um polo negativo e outro positivo, as enzimas de massa molecular e cargas elétricas diferentes deverão migrar a também a distâncias diferentes. Considerando o nosso exemplo, essa separação entre alelos acontece pois a carga elétrica líquida das moléculas do alelo 1 e do alelo 2 (do exemplo do tópico anterior) e/ou a massa molecular de cada um são diferentes. Na prática, é com essa técnica, chamada **eletroforese**, que podemos identificar e diferenciar homozigotos de heterozigotos (Figura 5.5).



**Figura 5.5** - Separação por eletroforese.

A observação dessas migrações permite identificar diferenças de origem genética entre amostras que estejam sendo comparadas. Isso começou com uma publicação em 1966 pelos autores Hubby e Lewontin, que estudaram uma população de mosca-da-fruta. Depois disso, essa técnica foi aplicada a diversas outras espécies, ficando conhecida como **eletroforese de isoenzimas**. Mas quando se descobriu que era possível acessar essa variação diretamente no nível de DNA, tudo se acelerou.

## Marcadores de DNA e PCR

Os **marcadores moleculares** ou **marcadores de DNA** são caracterizados pela variação nos nucleotídeos da sequência de DNA, são herdados geneticamente e não são influenciados pelo ambiente. Basicamente, são **fenótipos moleculares**. Pode-se observar variações no DNA como mutações de base e em regiões repetitivas. São conhecidas diversas técnicas que são utilizadas dependendo do princípio de análise. Entraremos em detalhes apenas com a técnica que ficou bastante conhecida durante a pandemia do coronavírus, a reação em cadeia da polimerase (PCR), e como ela é aplicada para descobrir variações genéticas através de marcadores microssatélites (SSR), que veremos no final deste capítulo.

A sigla **PCR** vem do inglês *Polymerase Chain Reaction*. Traduzindo-se: **reação em cadeia da polimerase**. É uma técnica desenvolvida durante os anos 1980 que permitiu imitar o processo de duplicação do DNA para alguns fragmentos do material genético. Sobre isso, as células naturalmente passam por duplicação de todo o seu DNA antes de proceder com a divisão celular. Na mitose, produzem-se células idênticas à original. O DNA duplicado separa-se novamente em duas partes, permitindo a formação de duas células-filhas com a mesma constituição cromossômica da célula que lhes deu origem.

Detalhando mais um pouco, a duplicação inicia com o desenrolamento dos filamentos de DNA, ou seja, os filamentos são abertos pouco a pouco, liberando espaço para a entrada de enzimas e outras moléculas necessárias. Uma pequena sequência iniciadora de 10 pares de bases se liga (por complementaridade de bases) a uma das extremidades. Esta sequência é chamada de **primer**. A partir dela, uma enzima chamada **DNA polimerase** adiciona nucleotídeos livres na célula que são complementares à sequência do DNA molde. Pouco a pouco cada filamento de DNA será duplicado. Em um sentido, essa duplicação acontece de forma contínua. No outro filamento, pouco a pouco, alguns pedaços vão sendo duplicados e costurados com outras enzimas. Ao final, duas cópias idênticas (se não ocorrerem erros ou mutações) serão produzidas.

O desenvolvimento da PCR foi baseado neste mecanismo natural das células, de modo que fragmentos de DNA passaram a ser **multiplicados ou amplificados** em pequenos tubinhos de plástico. Em um microtubo, montando-se uma reação composta de água, tampão em pH adequado, nucleotídeos dos quatro tipos (A, G, T e C), um primer para o gene alvo (ou seja, uma pequena molécula variando de 10 a 27 nucleotídeos, no geral), uma unidade de uma enzima DNA polimerase, cloreto de magnésio (cofator da enzima) e do DNA alvo, foi possível fazer a multiplicação *in vitro* de pedaços de genes, genes inteiros ou outras regiões de interesse, ou mesmo regiões aleatórias ao longo dos cromossomos. O volume de uma reação como essa é muito pequeno, variando de 10 a 25 microlitros.

## Finalmente, vamos ao processo da técnica!

Primeiro, o material é colocado em um aparelho chamado termociclador, a uma temperatura inicial de 94°C por cerca de 30s, em que ocorre a desnaturação (separação) da dupla hélice do DNA. Ou seja, o DNA é separado em duas fitas. Logo após, a temperatura é reduzida a um valor que permita a ligação dos primers às suas seqüências complementares de DNA. A temperatura de anelamento dependerá do tamanho do primer e suas características físico-químicas. Na etapa seguinte, a temperatura é elevada a 72°C (ideal para o funcionamento de uma forma de DNA polimerase extraída da espécie de bactéria *Thermus aquaticus*, comumente chamada Taq DNA polimerase). Esta enzima tem a função de inserir os nucleotídeos (A, G, T e C) para formação das cadeias complementares. O primeiro ciclo da PCR é então encerrado. Para ter uma quantidade suficiente da seqüência alvo são necessários entre 30 e 40 ciclos. Teoricamente, a cada ciclo ocorre a duplicação do material genético alvo. A Figura 5.6 ilustra as principais etapas da PCR.

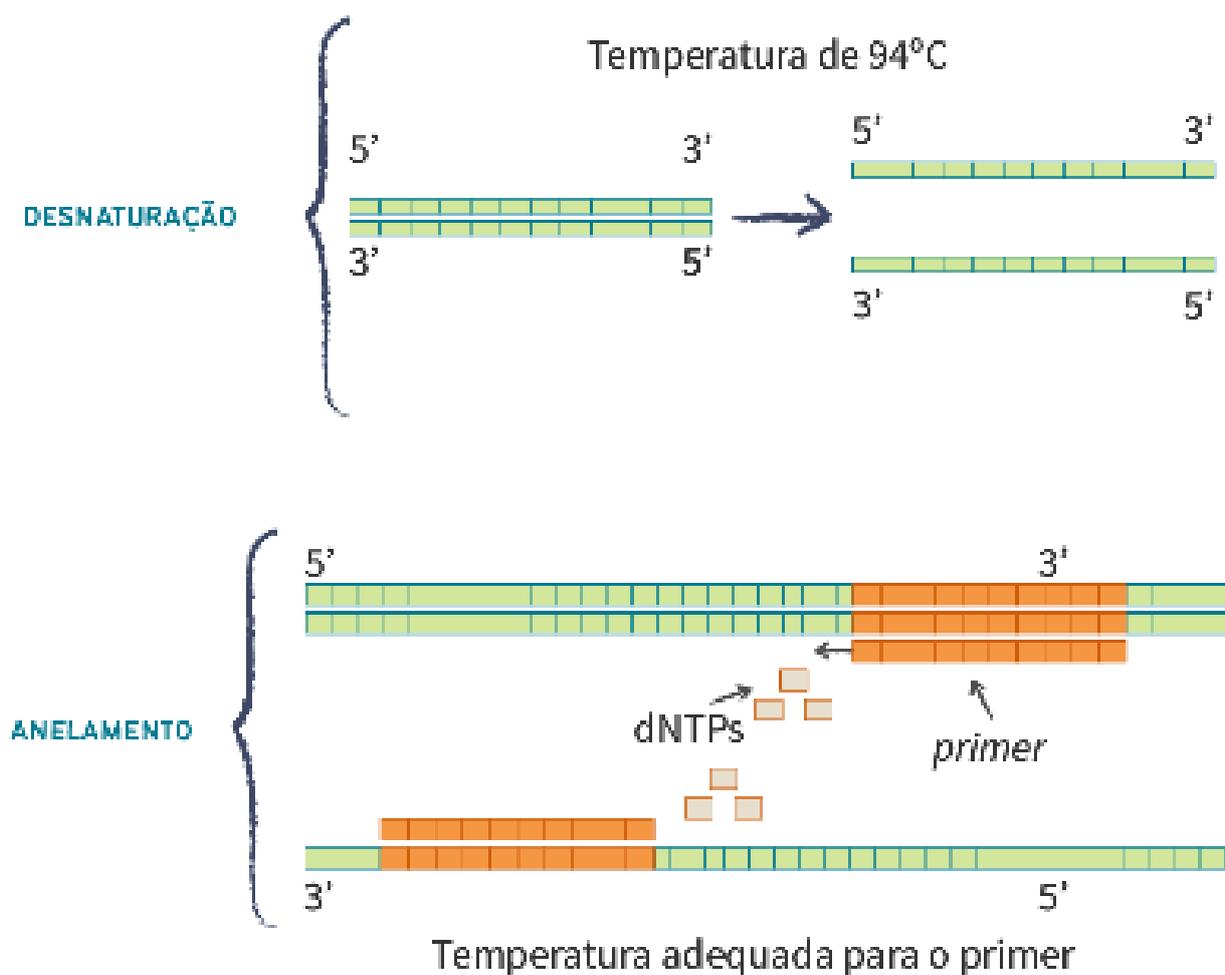
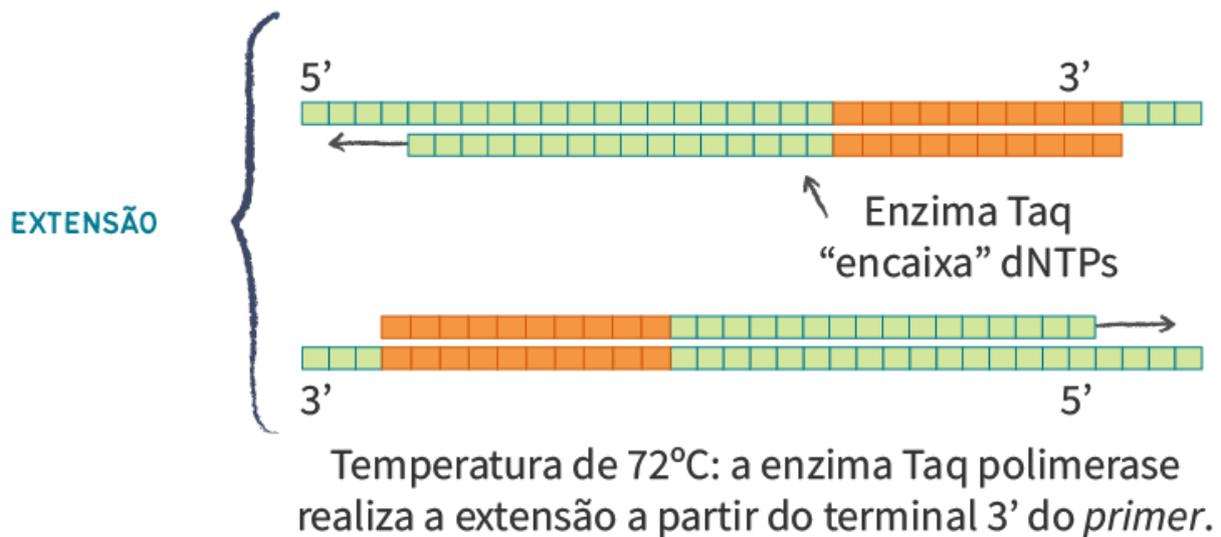


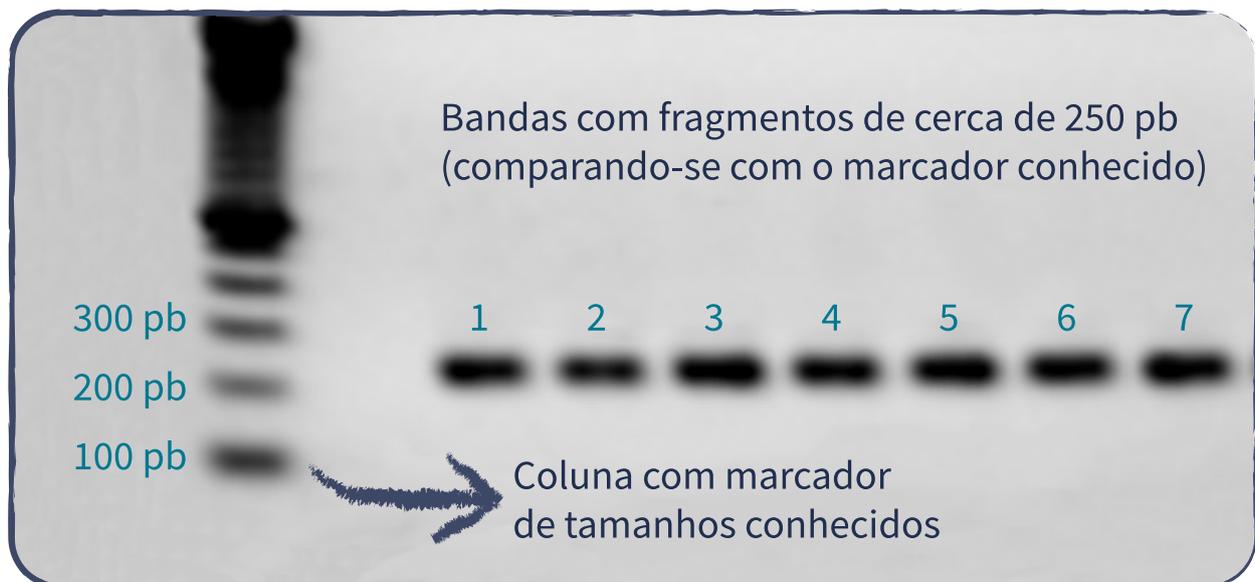
Figura 5.6 - As etapas de uma PCR (início)



**Figura 5.6** - As etapas de uma PCR (final).

A leitura dos resultados é frequentemente feita pela **eletroforese em gel de agarose**. Assim como descrito para isoenzimas, as moléculas são submetidas a um campo elétrico, na qual migram na direção de um polo positivo. Os nucleotídeos possuem carga negativa, portanto direcionam-se para o polo positivo. Em relação ao tamanho, os fragmentos maiores não irão se movimentar tanto e ficarão na base. Quando são mais curtos, tendem a avançar mais pelos poros do gel. Uma fileira do gel é reservada como um padrão de referência que contém fragmentos de DNA de comprimentos conhecidos, ou seja, aquela sequência que queremos comparar. Após a separação dos fragmentos, já é possível analisar o gel e verificar os tamanhos de faixas que foram encontrados. Para isto, o gel é pigmentado com um corante que se liga ao DNA e depois colocado sob luz UV, o que nos permite visualizar o DNA presente em diferentes locais ao longo da extensão do gel.

Na figura a seguir (Figura 5.7), note que a primeira coluna está preenchida com fragmentos de tamanho conhecido, iniciando em 100 pares de bases (100 pb = significa que há fragmentos de DNA com duas fitas, cada um com 100 bases em sequência). Esses fragmentos aparecem como bandas, essas manchas escuras em formato retangular com bordas arredondadas, que na verdade são vários fragmentos de DNA de mesmo tamanho agrupados nessa porção do gel. Proporcionalmente à altura dos marcadores conhecidos (cada banda), as amostras 1 a 7 migraram até a mesma altura, correspondendo a fragmentos de aproximadamente 250 pb em cada caso. As bandas das amostras 1 a 7 são o produto de reações de PCR separadas que foram realizadas, amplificando (= multiplicando) fragmentos de 250 pb. Esse gel foi corado com um reagente intercalante de DNA e submetido à luz ultravioleta para poder ser visualizado e fotografado. A imagem foi convertida ao formato negativo, de modo que se criasse o contraste entre as bandas escuras e o fundo acinzentado.



**Figura 5.7** - Exemplo de um gel após eletroforese de produto de PCR de um pequeno fragmento de gene.

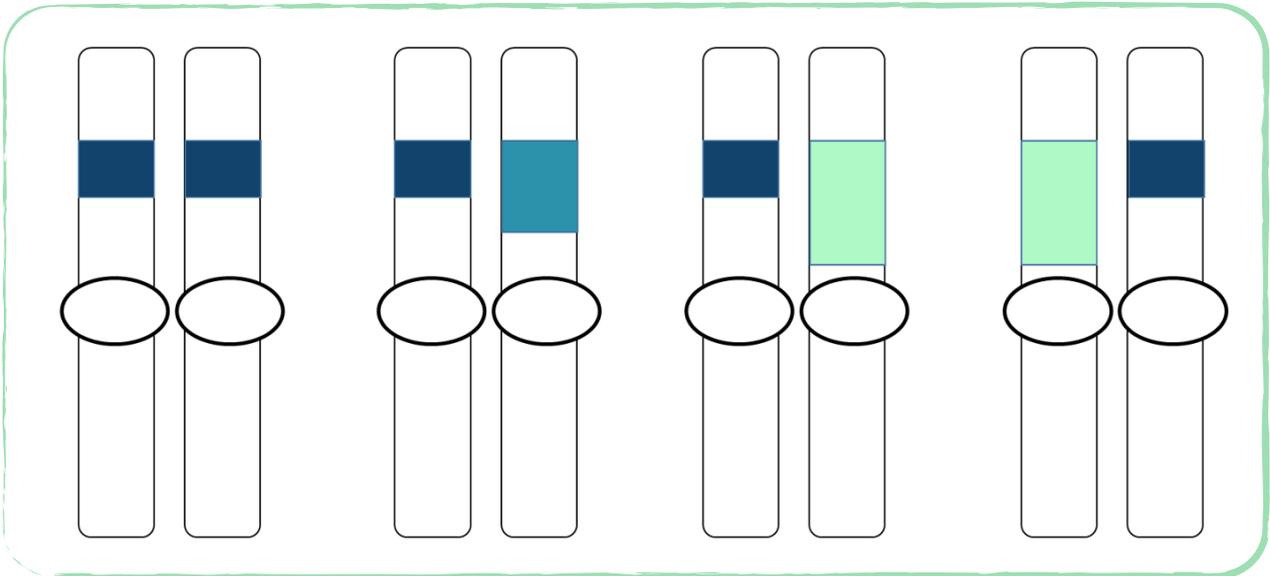
## Marcadores microssatélites

O DNA dos organismos eucariotos é formado por muitas regiões repetitivas. Algumas delas, são pequenos fragmentos constituídos por repetições de 2 a 6 bases. Por exemplo, o fragmento ATCATCATCATCATCATCATCATCATC apresenta 10 repetições da sequência curta ATC. Podemos representar isso por  $(ATC)_{10}$ . Este tipo de repetições é frequente em humanos, plantas e animais. Os cientistas verificaram que essas repetições variam no comprimento entre indivíduos de uma população e que podiam ser utilizados para identificação e diferenciação genética. Regiões repetidas como essas são chamadas de **microssatélites**. Quando utilizados para identificar ou distinguir indivíduos, tornam-se **marcadores microssatélites**.

Vamos supor quatro indivíduos de uma população que contenham um microssatélite localizado em algum ponto da metade superior de um cromossomo. A figura seguinte ilustra esse exemplo. Note, no entanto, que o microssatélite está completamente fora de escala, pois na realidade costuma ser um pequeno pedaço de DNA de 150 a 350 bases, mais ou menos, em um cromossomo que frequentemente ultrapassa unidades ou dezenas de milhões de bases. Representamos dessa forma meramente para o propósito de compreensão de um marcador microssatélite.

Nesta figura, há quatro indivíduos que variam para o comprimento desse microssatélite. Note que sempre há dois cromossomos para cada indivíduo. Isso é esperado, pois um cromossomo vem do pai e o outro, chamado de **cromossomo homólogo**, vem da mãe. Considere que se trate de um microssatélite com repetições da unidade TCC. O indivíduo 1 possui 50 repetições dessa unidade, ou seja,  $(TCC)_{50}$ . O número de

repetições entre os dois cromossomos homólogos (paterno e materno) é o mesmo. Por sua vez, o indivíduo 2 apresenta 50 repetições TCC em um homólogo, enquanto o outro apresenta 60 repetições. No indivíduo 3, um homólogo tem 50 repetições e o outro 70. E no indivíduo quatro, um homólogo tem 70 repetições e o outro 50 (Figura 5.8).



**Figura 5.8** - Representação esquemática de um loco microsatélite hipotético com tamanhos diferentes (fora de escala, apenas para propósito didático).

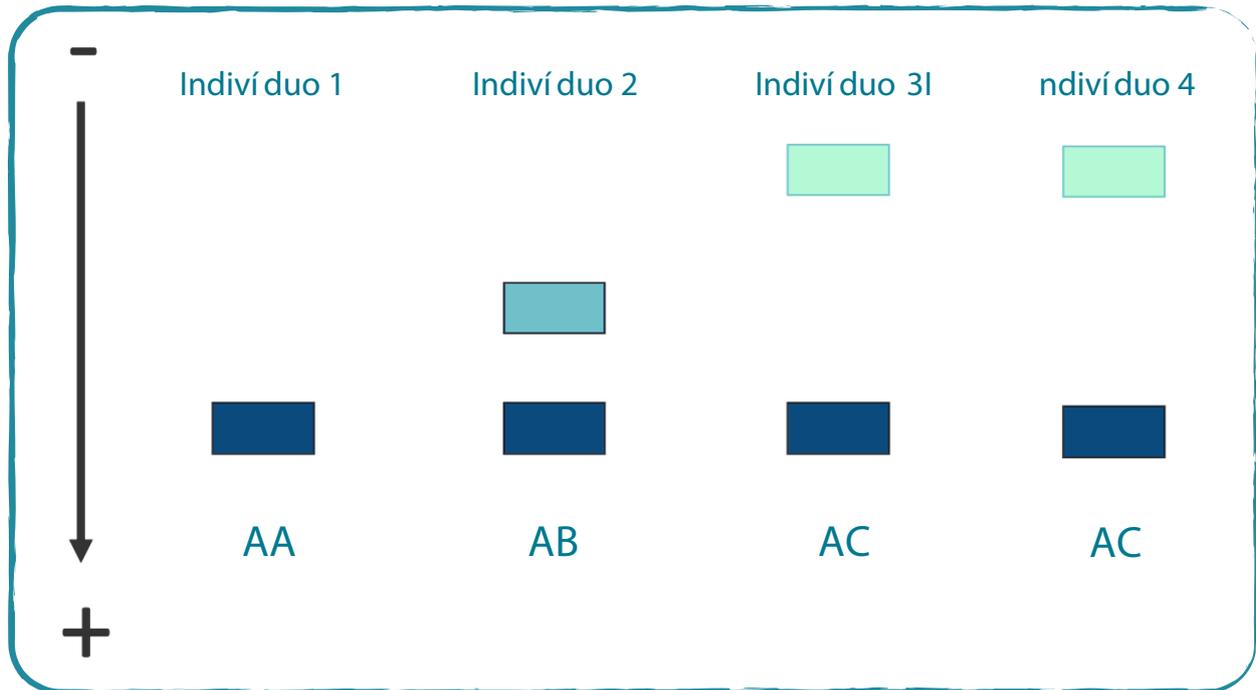
Esse microsatélite pode ser utilizado como diagnóstico de diferenças genéticas entre os indivíduos, baseando-se no comprimento de repetições que apresenta. Inclusive, é possível diferenciar até dois comprimentos dentro de um mesmo indivíduo, já que os homólogos podem ter comprimentos de repetições distintos.

Através da PCR é possível amplificar esses fragmentos em cada indivíduo e separá-los por eletroforese. Normalmente, essa separação é feita através do uso de um aparelho sequenciador. Mas nos anos 1990 e 2000 muito se usavam os geis de poliacrilamida, que permitem uma resolução melhor do que com agarose.

Quando os fragmentos forem separados em gel e visualizados, o resultado será semelhante ao apresentado na figura a seguir. Fragmentos maiores vão migrar menos e fragmentos menores mais. Mesmo que um microsatélite não seja parte de um gene (pode acontecer às vezes, no entanto), é possível chamar cada comprimento de repetições de alelo. Isso para fins de análise. Aqui alelo adota um sentido técnico, não biológico. Interpretando-se o gel, o fragmento que migrou menos é o mais pesado. Vamos chamá-lo de alelo C. O segundo maior é o alelo B. O menor é o alelo A.

**A partir disso, podemos genotipar os indivíduos para seus alelos (Figura 5.9):**

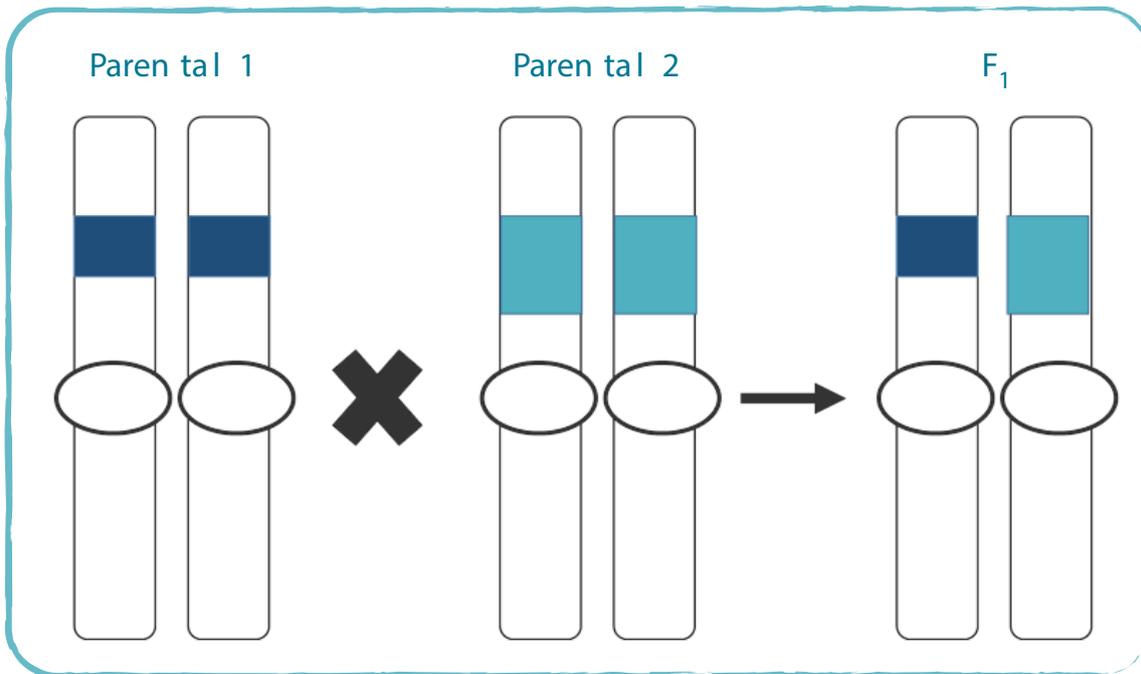
- o indivíduo 1 será AA, pois apresenta dois fragmentos de mesmo tamanho (dos dois pais) que migraram até a mesma posição. Será, portanto, homozigoto para o alelo A;
- o indivíduo 2 será AB, pois há dois fragmentos de tamanhos diferentes, cada um proveniente de um homólogo;
- os indivíduos 3 e 4 serão AC, pois englobam o fragmento de tamanho 50 e o de tamanho 70.



**Figura 5.9** - Genotipagem de microssatélites.

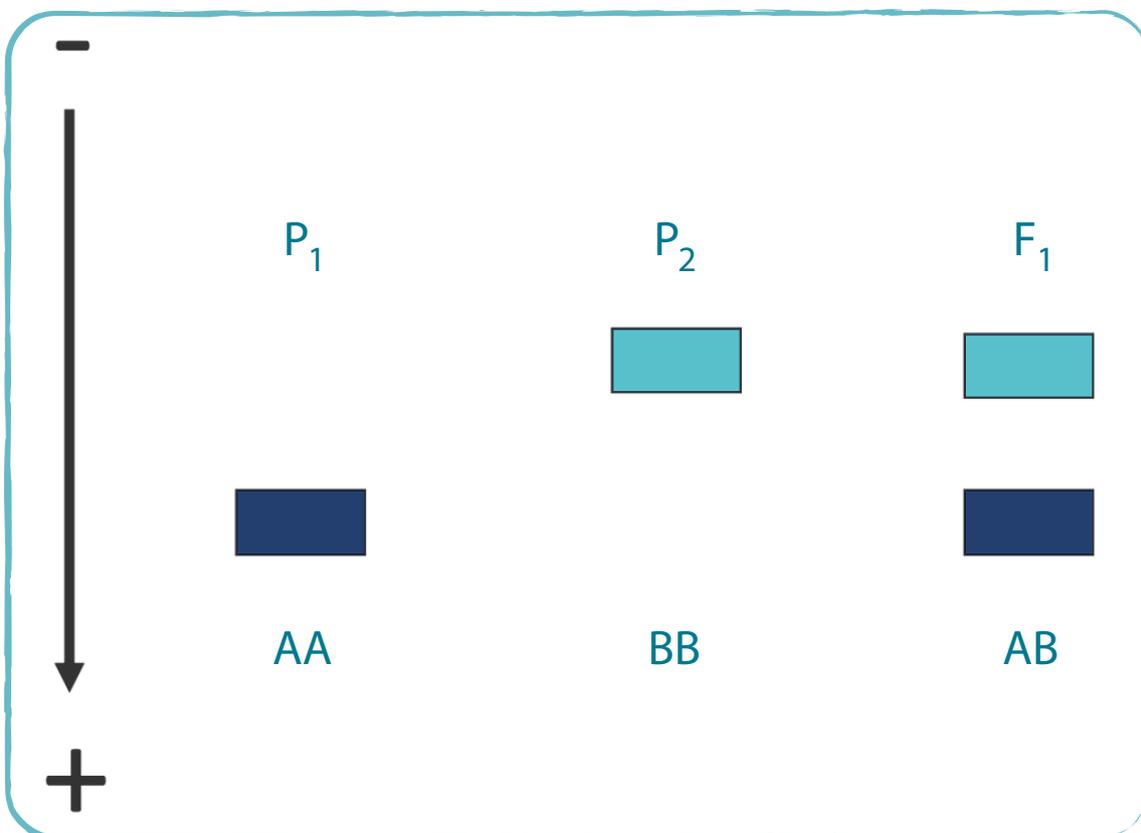
Marcadores microssatélites são muito utilizados para estudar diversidade genética de populações. Outras duas grandes aplicações para estes marcadores são análise de paternidade e análise forense. Os testes de paternidade são realizados com 15 marcadores diferentes. Os seus resultados permitem identificar com quase 100% de probabilidade o pai ou mãe de um filho que tenha sido submetido ao teste.

Generalizando, a descendência gerada pelos pais pode ser chamada de primeira geração filial ou  $F_1$ . Na figura a seguir (Figura 5.10), se um parental apresentar duas cópias do microssatélite que confere o alelo A (retome o exemplo anterior), enquanto o outro tem duas cópias do alelo B, o resultado será um filho com uma cópia do alelo A e uma cópia do alelo B, ou seja, um heterozigoto para esse microssatélite.



**Figura 5.10** - Exemplo de microsatélite sendo transmitido ao filho.

Ao aplicar a técnica de eletroforese, os resultados serão como mostrado a seguir (Figura 5.11).



**Figura 5.11** - Genotipagem de microsatélites de pais e filho.

## Aplicações gerais

Os marcadores moleculares são muito importantes para caracterizar a diversidade genética de populações. Como a ação antrópica tem causado intensa fragmentação dos habitats naturais dos seres vivos, levando muitas espécies ao risco de extinção, é possível que a diversidade genética de várias espécies seja reduzida ao longo do tempo. Isso não é bom para a perpetuação da espécie, considerando as constantes mudanças do ambiente, especialmente no cenário atual de mudanças climáticas. Assim, um geneticista da conservação pode amostrar populações de espécies ameaçadas e verificar a sua diversidade genética por marcadores moleculares. Se a diversidade for baixa, o conservacionista pode realizar a introdução de indivíduos daquela espécie que contenham alelos diferentes dos que estavam presentes na população. Na medida em que estes novos indivíduos inter cruzam com os que já estavam presentes, os novos alelos serão introduzidos na população, aumentando a variação genética.

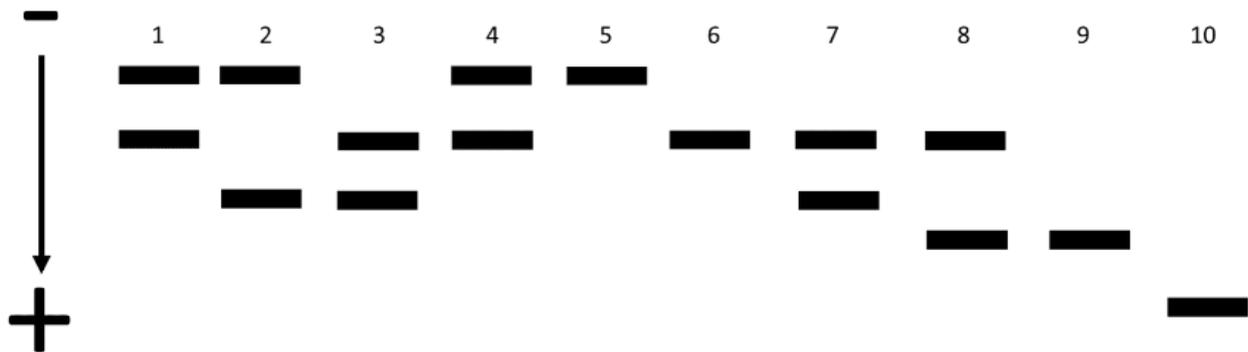
Marcadores moleculares também são muito úteis para identificar cultivares de plantas, raças de animais, distinguir espécies de plantas, animais, fungos, bactérias, archaeas, etc. São extremamente importantes para diferenciar as diferentes formas de vida. Nos primeiros dois capítulos, na verdade, já trabalhamos com marcadores moleculares, pois utilizamos diferenças nucleotídicas para realizar análises de parentesco entre indivíduos.

Outras aplicações já comentadas anteriormente com os microssatélites, são a análise de paternidade e a análise forense. Nesta última, amostras de DNA de suspeitos de um crime cometido em certo local podem levar à identificação do verdadeiro criminoso. Supondo que três indivíduos são suspeitos de um assassinato em um local. Se houver impressões digitais na arma utilizada no crime ou vestígios de material biológico de qualquer suspeito no local do crime, a genotipagem de microssatélites pode identificar quem foi o autor do crime.

Os marcadores moleculares se tornaram ainda mais importantes a partir da pandemia do coronavírus, que iniciou em 2020. E mais, se tornaram populares. Pois foi através da técnica de PCR em tempo real que tem sido possível identificar se uma pessoa está ou não infectada com o vírus. Esse é o tema do próximo capítulo.

## ATIVIDADE DO CAPÍTULO

Marcadores microssatélites são multialélicos, frequentemente, em populações de animais e plantas. Sejam os perfis eletroforéticos de um marcador microssatélite em uma população de 10 golfinhos. O esquema mostra a migração dos fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (bandas separadas do polo negativo para o polo positivo em uma cuba com tampão). Sendo os microssatélites marcadores codominantes, atribua genótipos a todos os golfinhos. Quais são homocigotos? Quais são heterocigotos? Quantos alelos este marcador apresenta na população analisada? Considere a banda com menor mobilidade como o alelo A, como referência.



### Referências consultadas

Alfenas, A. C. (Ed.). (2006). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. UFV.

Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.

Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S., & Doebley, J. (2013). Introdução à Genética. 10a edição. Editora Guanabara, editor.

Konzen, E. R. (2014). Towards conservation strategies for forest tree endangered species: the meaning of population genetic statistics. *Advances in Forestry Science*, 1(1), 45-51.