

# Genética



**Raniê Ralph G. Teixeira**  
[ranieralph@hotmail.com]

**UFESMED 76**

Quarta, 26 de Abril de 2006.

Doenças genéticas são associadas a doenças hereditárias por se manifestarem logo no início da vida, na infância, e serem tratadas por pediatras.

Exs:

- Fenilcetonúria

- Fibrose Cística: 1/2500. Atinge principalmente a população caucasiana e é caracterizada pela pneumonia repetitiva.

Apesar de valorizada na pediatria, várias doenças tem etiologia ambiental também. Uma série de cardiopatias possui etiologia multifatorial: ambiental e genética.

Outro exemplo de doenças presentes em crianças e também em adultos com etiologia multifatorial é a diabetes.

Estudando irmãos gêmeos homocigóticos podemos perceber que distúrbios psiquiátricos também possuem uma etiologia multifatorial.

Será que a tendência à violência é uma característica unicamente ambiental? Estudos mostram que também existe um componente genético. Entretanto, não se pode cair no preconceito de dizer que a genética determina o comportamento do indivíduo: crianças com predisposição genética à violência, mas criadas em um ambiente saudável não desenvolvem-na.

Hoje, sabe-se que tanto o ambiente quanto o componente genético são responsáveis pela manifestação de várias características.

- Câncers: Todo câncer é uma doença genética porque envolve genes. Nem todo câncer é hereditário, mas todo câncer possui alterações cromossômicas, nos genes. Apenas de 5% a 10% dos câncers são hereditários, ou seja, transmitidos de uma geração para outra.

Genética médica: aplicação prática da genética à medicina.

Histórico:

- Acreditava-se que as características hereditárias dos pais eram misturadas na formação dos filhos.

- Mendel mostrou que as características se mantinham íntegras e eram transmitidas. Ele formulou a fundamentação da genética que se conhece hoje. (1865). Trabalhou com plantas em um mosteiro. Na época não foi valorizado entre outros motivos porque usou muitas contas matemáticas. Considerado o pai da genética.

- 1902: através da Alcaptonúria (doença rara que causa artrite e se manifesta também pela urina escura) Garrod sugeriu que essa doença era causada por um erro inato do metabolismo. Deste ponto, Johanssen definiu a palavra gene. Então, surgiram vários experimentos por meio dos quais conseguiram entender melhor o funcionamento da genética.

Foi definido o padrão de transmissão de várias doenças em que o DNA era responsável: anemia falciforme, FC, fenilcetonúria.

- 1953: Watson E Crick definiram a estrutura física do DNA por meio da qual se desenvolveram uma série de tecnologias. A base da genética molecular.

- 1956: O desenvolvimento das tecnologias permitiu que vários pesquisadores conseguissem identificar o número correto de cromossomos. (46) Até aquele momento pensava-se em 48 cromossomos. Também foi possível estabelecer diagnósticos em Citogenética (S. Down).

- 2003: Sequenciamento do Genoma Humano. Agora se conhece exatamente a seqüência de nucleotídeos no DNA. O que codifica essa seqüência, qual a interação dessas proteínas codificadas são perguntas que deram origem ao Projeto Proteoma (entender o que cada proteína codificada faz), ao Projeto Transcriptoma (como os transcritos de RNA agem no organismo) e outros.

Hoje sabe-se que qualquer doença pode ser/ter origem:

1) Puramente genética:

- monogênicas: o defeito ocorre em um único gene. Ex: Fibrose Cística (FC).

- cromossômicas: o defeito ocorre em um cromossomo Ex: S. Down.

2) Puramente ambiental: Ex: Doenças infecciosas.

3) Doenças multifatoriais: Os indivíduos possuem predisposição de desenvolver a doença, mas só desenvolvem se estiverem expostos. É difícil de ser estudada porque não se sabe ao certo qual o componente ambiental e qual o genético. Ex: Diabetes, doenças cardíacas, Fenda Labial, Hipertensão, pé torto congênito.

Estrutura e replicação do DNA:

Características Hereditárias:

O DNA é responsável pela transmissão das características hereditárias. Os experimentos de Mendel estabeleceram padrões de herança. Mas, qual seria o material genético realmente?

Experimento de Griffith

Um dos primeiros experimentos que mostra o material genético é o de Griffith (1928) que usou o Streptococcus pneumoniae. Trata-se uma bactéria capsulada que quando inoculada em camundongos é letal. Outra linhagem não capsulada forma uma colônia de aspecto rugoso que quando inoculada no camundongo não provoca sua morte. Se essas bactérias capsuladas forem mortas pelo calor e forem inoculadas também não matam os camundongos.

As bactérias letais mortas pelo calor e as não letais foram inoculadas no camundongo. Observou que apesar das capsuladas estarem mortas os camundongos morriam. Então, existia algum princípio transformante que fazia as bactérias não letais adquirirem características letais.

Algumas bactérias em colônias também adquiriam o aspecto liso, ou seja, recebiam o componente de letalidade.

"efeito Griffith" ou "transformação".

Experimento de Avery

Em 1944 Avery tentou investigar que componente químico tem a propriedade de transformar a característica da bactéria.

Ele matou a linhagem letal (lisas) de bactérias e extraiu componentes específicos. (polissacarídeos, lipídios, RNA, proteína e DNA). Pos esses componentes específicos em contato com bactérias não letais rugosas. Só observou mudanças quando punha DNA das bactérias lisas em contato com as bactérias rugosas. Algumas bactérias adquiriam as características de ser lisas. Hoje se sabe que a transformação permite que fragmentos livres de DNA possam entrar na bactéria, se recombinar e a bactéria passa a ter essa característica.

Mesmo assim a comunidade científica relutava em aceitar o DNA como estrutura transformante por este ser uma estrutura bastante simples, mais simples do que uma proteína. A estrutura química do DNA era conhecida há bastante tempo.

Outro experimento que sugere o papel do DNA nas características:

- 1952: Cientistas utilizaram fagos:

+ Marcados com enxofre radioativo e;

+ Marcados com fósforo radioativo.

Quando infectaram uma bactéria – Escherichia coli perceberam que o material radioativo de enxofre, responsável por marcar proteínas, não permanecia na célula. Por outro lado o fósforo radioativo, que identificava o material como DNA, era encontrado dentro da célula.

Além disso, quando os fagos se multiplicavam e lisavam a célula, o fósforo também era encontrado nas linhagens filhas.

OBS: FAGOS são vírus que infectam bactérias. A cápsula protéica marcada pelo enxofre não entra na célula. Só o material genético é quem entra na célula.

### Estrutura do DNA: 4 tipos de nucleotídeos de DNA

Formado por um açúcar, um radical fosfato e uma base nitrogenada. O que difere entre um nucleotídeo e outro é a base nitrogenada. Existem dois nucleotídeos purínicos e dois pirimidínicos.

- Nucleotídeo: Fosfato + Pentose + BN.
- Nucleosídeo: Pentose + BN. É o nucleotídeo sem o grupamento fosfato.

Adenina: desoxiadenilato.

Guanina: desoxiguanilato.

Outro estudo importante foi o realizado por Watson e Crick com base em experimentos que já haviam sido desenvolvidos na época. Propuseram a estrutura tridimensional do DNA. Utilizaram os estudos de Franklin e Wilkins que havia trabalhado com: dados de difração do raio X da estrutura do DNA.

Suposições sobre DNA:

- longo e fino;
- duas partes similares paralelas;
- helicoidal.

Outro pesquisador Chargaff criou uma série de regras empíricas:

- Quantidade total de nucleotídeos pirimidínicos (T+C) = quantidade total de nucleotídeos purínicos.
- Observou também que T=A e C=G.

Com base nesses dados, Watson e Crick propuseram o DNA como sendo:

- uma dupla fita;
- fitas alinhadas de forma antiparalela: numa extremidade temos o carbono 3 da pentose e na outra o carbono 5 da pentose;
- as duas fitas estão organizadas de modo que as bases nitrogenadas estão no centro por serem hidrofóbicas;
- timina se pareia por meio de 2 pontes de H com a adenina;
- citosina se pareia por meio de três pontes de H com guanina;
- um nucleotídeo pirimidínico se pareia com um purínico;
- os radicais fosfatos estariam na partes de fora da dupla hélice por serem hidrofílicos.

Em nível tridimensional essas hélices tem um giro para direita.

- Forma A (menos hidratada e mais compactada).
- Forma B
- Cristais sintéticos (filamento Z).

### Replicação do DNA

Na época havia 3 hipóteses sobre como se procedia a replicação do DNA. Acreditava-se que ela poderia ser:

- Semiconservativa: sugerida por Watson e Crick.
- Conservativa;
- Dispersiva.

Experimento de Meselson-Stahl para provar que a replicação era semiconservativa (1958):

A experiência de Meselson-Stahl envolveu o crescimento de bactérias de E. coli em um meio de crescimento que continha nitrogênio pesado (Isótopo Nitrogênio-15 ao invés do mais comum, o isótopo de peso molecular menor, Nitrogênio-14). A primeira geração de bactérias cresceu em um meio onde havia uma fonte exclusiva de Nitrogênio-15. As bactérias foram então transferidas para um meio com Nitrogênio-14. Watson e Crick acreditavam que a duplicação de DNA fosse **semi-conservativa**. Se fosse,

então o DNA produzido por bactérias crescidas nestes dois meios seriam intermediárias entre pesadas e leves. E eram. (retirado da internet por ser impossível acompanhar na aula).

Na replicação semiconservativa cada uma das fitas originais é utilizada como molde. Cada nucleotídeo incorporado, então, é complementar.

Outro experimento que prova a replicação semiconservativa:

- Forneceu às células de feijão em grande divisão timina radioativa: Percebeu que uma das fitas permanecia radioativa e a outra não.

Cromossomos arlequin: BuRR

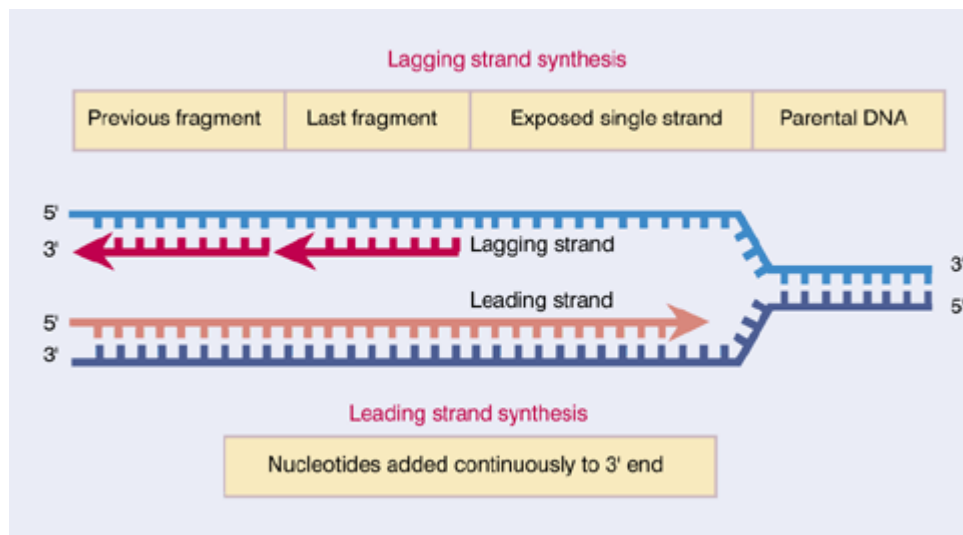
Como acontece essa replicação?

Existem origens de replicação. Ela não ocorre em qualquer ponto.

1950 - Kornberg foi o primeiro a descobrir uma enzima que duplicava o DNA: DNA polimerase. Observou que a partir de um DNA parental colocando-se nucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP – adenina, timina, citosina e guanina) com a enzima e outros componentes que otimizem seu funcionamento é possível replicar o DNA.

Como acontece essa replicação?

A dupla fita deve se abrir e a DNA polimerase só caminha no sentido 5' → 3'. Uma das fitas gera uma cadeia contínua e na outra fita uma cadeia descontínua. Essa cadeia descontínua foi observada por Okasaki. (fragmento de Okasaki).



- semiconservativa: cada uma das fitas originais serve de molde e os outros nucleotídeos são acrescentados de forma complementar;

- assíncronica: não acontece na mesma velocidade. Algumas regiões do núcleo se duplicam mais rapidamente.

- Origem de replicação: em eucariotos há várias origens e nos procarionotos há uma única origem.

- Cada unidade de replicação pode ser chamada de replicon.

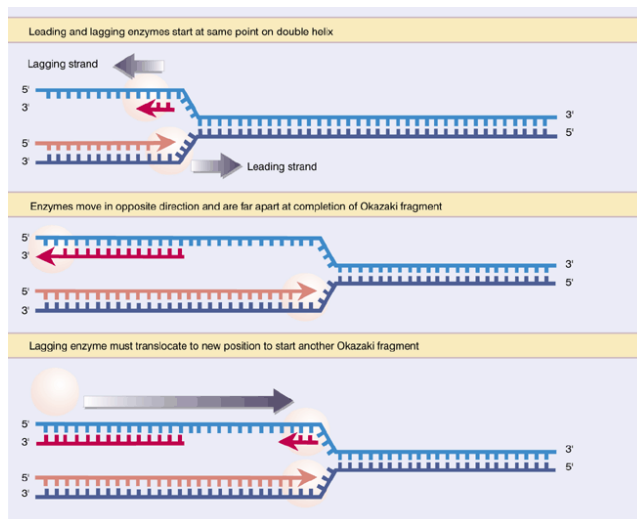
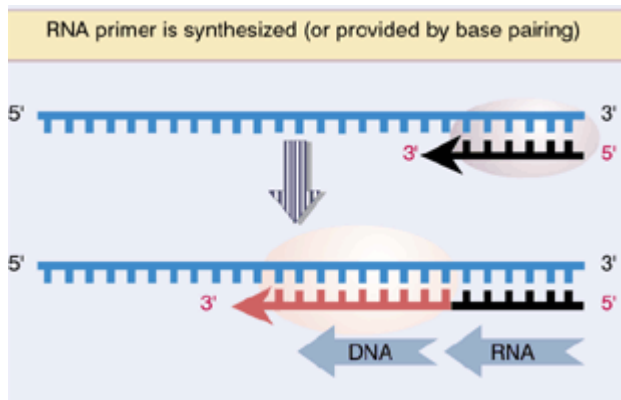
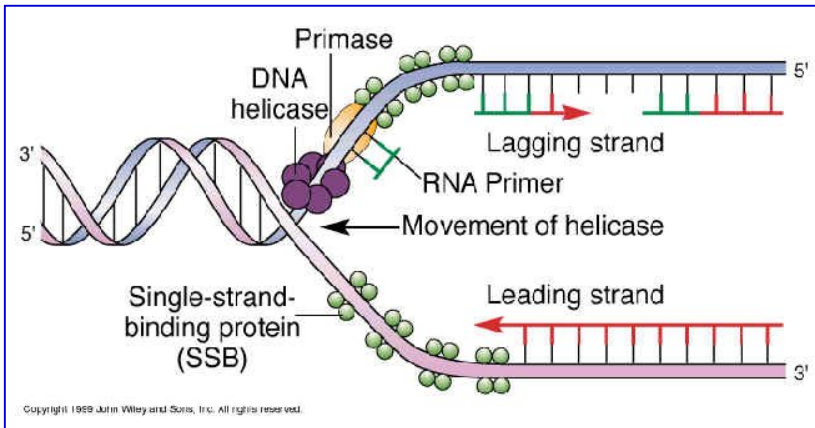
- Bidirecional

- Forquilhas de replicação.

A duplicação ocorre na Fase S da interfase do ciclo celular.

Para ocorrer a duplicação o DNA precisa se abrir. As helicases quebram o DNA de fita dupla. Proteínas SSP estabilizam o DNA de fita simples aberto. (mantém a fita simples). A topoisomerase (se localiza ainda na região de fita dupla) reduz a pressão, o estress que tenta fechar a forquilha novamente. A DNA polimerase que alonga a cadeia. (só alonga uma cadeia de DNA se já existe uma determinada sequência de nucleotídeos pré-existentes – o primer). Então, a RNA polimerase ou primase que acrescenta nucleotídeos de RNA que tem a função apenas de início da síntese. A partir de então, a DNA polimerase consegue alongar a fita de DNA.

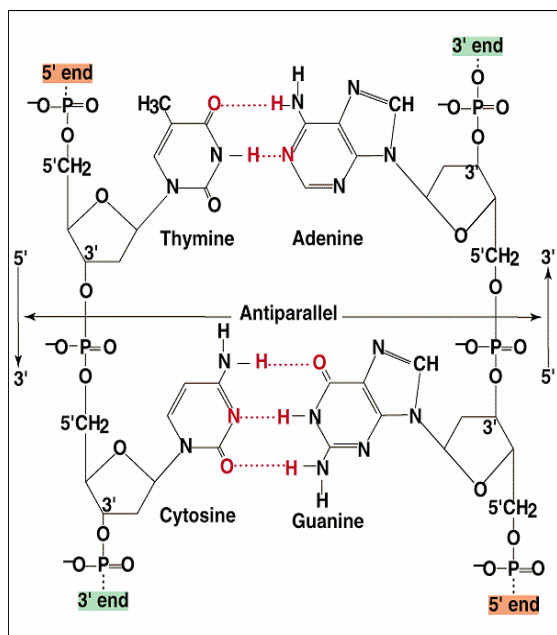
Quando enzimas de correção verificam se o DNA está correto, estas retiram os primers de RNA.



Todo o conhecimento é baseado na replicação de organismos simples: *E. coli*. Onde a DNA Polimerase III é a principal alongadora. Mas há a I e II que atuam corrigindo.

Nos Eucariotos temos as DNA Polimerases: gama (replicação do DNA mitocondrial), alfa e delta (alongamento), beta e epsilon (correção).

Os nucleotídeos são ligados por ligação fosfodiéster. 3' se liga à 5'.



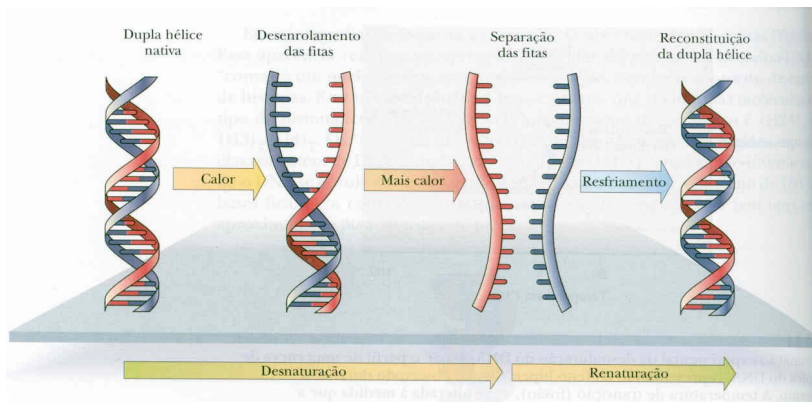
Atividade da telomerase: nessa proteína existe um RNA molde simples e repetitivo. Essa telomerase acrescenta nas pontas dos cromossomos esse DNA repetitivo. Então, em células mais novas, a telomerase deixa as extremidades dos cromossomos formadas por telômeros mais longos. A medida que as células sofrem divisão a atividade deixa de existir. Telômeros: protegem o DNA de ser degradado após ser lesado por radiação, por exemplo.

Teoria telomérica do envelhecimento: o tamanho do telômero indicaria a quantidade de divisões que a célula poderia sofrer, ou se a célula é mais nova ou mais velha.

Em alguns tipos de câncer que perdem o controle da atividade celular, é observado a atividade da telomerase.

Hibridização mostra que os telômeros são repetidos na extremidade de todos os cromossomos. Cromossomos em vermelho e telômeros em amarelo. Nos telômeros não há genes que codificam proteínas, mas mantêm a integridade dos cromossomos.

Experimentos de Doty e Marmur (1960): uma das formas de separar a fita dupla de DNA é através do aquecimento. As fitas se separam. Se essas fitas são renaturadas elas se hibridizam, voltam a se parear se houver complementaridade.



Aplicações:

- Análise da estrutura do genoma;
- Isolamento gênico;
- Hibridização de southern e northern;
- Mapeamento cromossômico.

Bases cromossômicas da Hereditariedade:

O que acontece depois que o DNA se duplica? Para que ocorre sua duplicação? Para que a célula se divida e mantenha seu número diplóide.

O DNA transmite as características hereditárias: O DNA empacotado no núcleo é transmitido para células filhas.

DNA consta de regiões:

- gênicas: seqüências que codificam proteínas
- não gênicas (DNA não codificante): seqüências que não codificam proteínas. Possuem funções importantes:

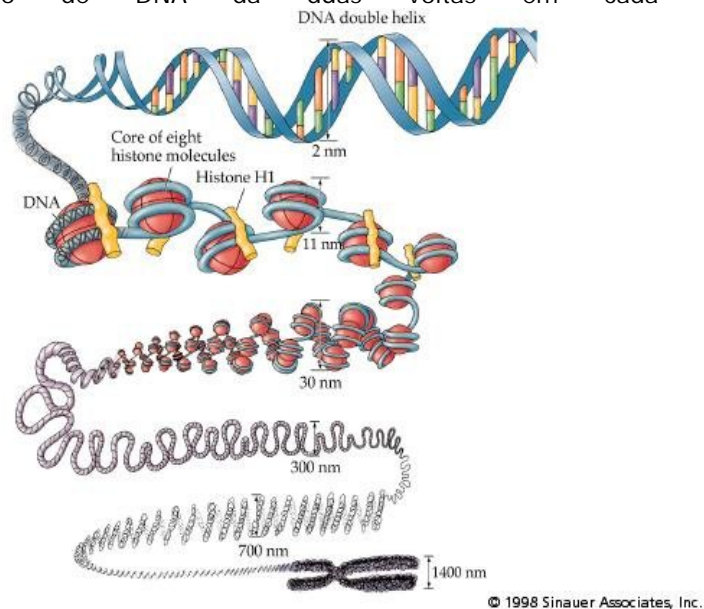
- regulação e controle da transcrição.
- ao longo da evolução esse material extragênico forneceu base para ocorrência dessa evolução.
- importante na estrutura dos cromossomos: centrômeros e telômeros.

No núcleo há DNA e proteínas empacotados. Lá ocorre espiralização do DNA junto com proteínas histonas.

A unidade básica de condensação do DNA são os nucleossomos: 8 proteínas (octômero) histonas, 4 em cima e 4 embaixo (h2a h2b, h3 e h4 e h1 do lado de fora) + DNA. Esses nucleossomos se empacotam em solenóides. (segundo grau de compactação). Existe um arcabouço protéico no qual o solenóide se gruda formando alças para se compactar ainda mais.



O filamento de DNA dá duas voltas em cada octômero no nucleossomo.



Enquanto a célula está em interfase o DNA possui um grau baixo de compactação e as células estarão sintetizando proteínas específicas ao tipo de tecido a que pertencem. Quando a célula precisa se dividir o DNA se duplica e precisa se compactar cada vez mais para que na divisão celular cada cromossomo vá para o pólo oposto da célula. A compactação máxima é observada na metáfase (mitose/meiose) e identifica os cromossomos isolados.

Na interfase temos cromatina, fragmentos de DNA com proteínas, pouco compactadas.

Cromatina (na intérfase) e cromossomos (na divisão) são a mesma estrutura com diferenças no grau de compactação.

O cromossomo é formado por cromátides, centrômeros e telômeros. Existem regiões nos cromossomos que são mais ou menos compactadas. (descoberto através de técnicas de coloração, ficando mais ou menos coradas). Isto permite descobrir, por exemplo, qual cromossomo a mais um paciente possui, visto que, cada cromossomo possui um padrão de bandas claras e escuras bem conhecidas no meio científico. Esse padrão de bandas claras e escuras permitiu aos pesquisadores dividir os cromossomos em bandas. Bandas e sub-bandas permitem localizar os genes nas regiões cromossomiais.

Cariótipo: 46 cromossomos que são agrupados em ordem decrescente de tamanho e de acordo com a posição do centrômero.

Os grupos vão de A a G. Os cromossomos sexuais X estão grupo C e Y grupo G.

O cromossomo é a compactação do DNA através de uma série de proteínas.

Doenças monogênicas apresentam cariótipo totalmente normal. Então utiliza-se técnicas especiais de genética molecular, como por exemplo, as reações de PCR. Por outro lado, existem doenças que possuem um cromossomo a mais ou a menos, ou rearranjos grandes que permitem observação em técnicas de citogenética (cariótipo). Citogenética: permite ver número alterado de cromossomos ou estrutura cromossômica muito anormal.

Locus: é a localização dos genes ao longo dos cromossomos.

No organismo há:

- células somáticas: todas que não vão dar origem aos gametas.
- células germinativas: vão dar origem aos gametas.

Câncer em células somáticas não passa para a prole. Se o câncer atingir as células germinativas ocorre transmissão da doença.

- cromossomos autossomos: todos aqueles que não os sexuais.
- cromossomos sexuais:

Numa mutação em que o gene localizado no cromossomo X aja de forma recessiva, o homem tendo um X com a mutação expressa a doença. O homem é hemizigoto para o cromossomo X.

Cada par de cromossomos autossômicos são chamados de homólogos.

- Alelos: todos temos o mesmo gene localizado na mesma posição. O que um gene tem de diferente entre uma pessoa e outra? Esses genes que possuem uma pequena variação na sua seqüência são chamados de alelos. Alelos são as diferentes variações de um mesmo gene na população.

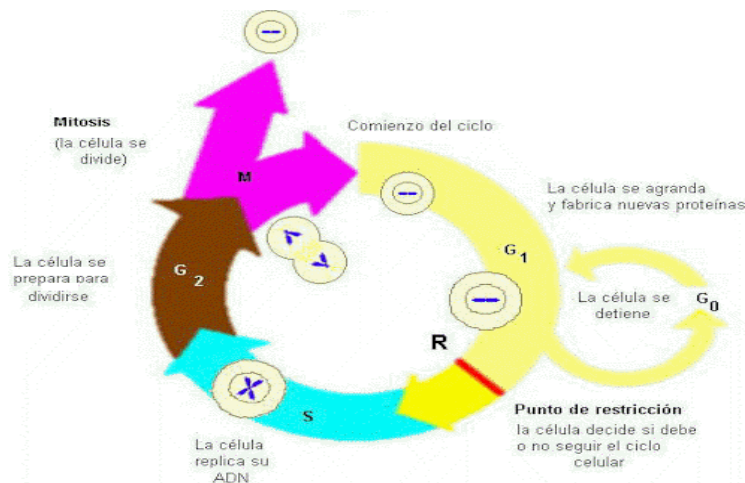
- Meiose (reduz a metade o número de cromossomos) e Mitose (mantém o número de cromossomos) são divisões celulares.

Ciclo celular:

- Intérfase: G<sub>1</sub> (célula metabolicamente ativa, repouso em relação à divisão celular), S (fase de replicação do DNA – cada cromatina passa a ter duas cromátides irmãs) e G<sub>2</sub>.

- Mitose: onde cada uma dessas cromátides irmãs é separada.

Pontos de controle (check point) determinam que a célula entre em divisão. Se a célula passa de G<sub>1</sub> para S necessariamente ela vai caminhar para a divisão celular.



Gametogênese: As células que irão formar os gametas precisam colonizar o tecido. Em seguida, dividem-se por mitose. A seguir entram em meiose reducional e equacional.

Meiose: Segregação cromossômica independente. Podem ocorrer erros de não disjunção que conduzem a trissomias e monossomias identificáveis pela citogenética.

Crossing-over: recombinação de genes homólogos de cromátides não irmãs. Mistura características e mantém os cromossomos unidos durante a metáfase I quando se formam duas placas equatoriais.

Peculiaridades entre a gametogênese masculina e feminina:

Espermatogênese:

O número de mitoses para dar origem aos gametas é alto. Ocorre ao longo de toda a vida a partir da puberdade. A partir de uma espermatogônia tem-se o surgimento de 4 espermatozoides viáveis.

Ovogênese:

O número de mitoses é limitado. A partir de uma ovogônia tem-se o surgimento de 1 óvulo e 3 glóbulos polares. Toda a população de células que dá origem aos gametas é formada na vida intra-uterina e não cresce mais. A partir da puberdade uma apenas dessas células que sofre meiose por ciclo menstrual.

Por que os eventos de trissomia são mais freqüentes em erro de disjunção na mulher do que no homem? Porque o aparelho de divisão fica parado muito tempo na mulher.

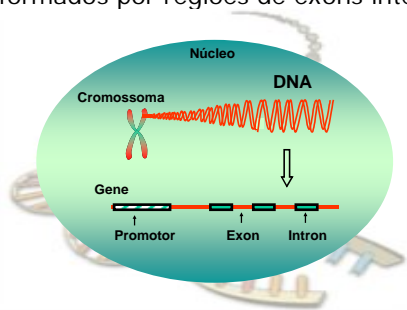
Genoma Humano:

Dogma central da biologia: A partir de uma molécula de DNA sintetiza-se proteína e essa síntese ocorre através de um intermediário RNAm. (transcrição e tradução).

No RNA o açúcar é a ribose e a timina é substituída pela uracila.

Em termos gerais, todas as células possuem o mesmo conteúdo de DNA. A partir desse DNA sintetizam proteínas. Então, por que se formam diferentes tecidos com proteínas específicas? Porque existe uma expressão diferenciada de alguns genes em relação a outros e isso define a característica do tecido.

Nos procaríotos cada região gênica codifica a proteína, nos eucariotos o gene possui uma região não codificante. As regiões codificantes são chamadas exons e as não codificantes de introns. Os genes são formados por regiões de exons intercalados por regiões de introns.



Genes: uma seqüência de DNA necessária para a produção de um produto funcional.

Na região anterior e posterior ao gene existem seqüências de DNA com função de regulação. Antes de cada gene há uma região promotora. E depois há o códon de finalização e uma região 3' não produzida. A região antes do gene pode ser chamada de 5'UTR englobando inclusive a região promotora, acentuadora, etc. (untranslated region).

A região depois do gene pode ser chamada de 3'UTR.

Família de Genes:

Ao longo do genoma existem áreas ricas e outras pobres em genes. A distribuição de genes não é homogênea ao longo dos cromossomos. (existem cromossomos ricos e áreas mais ricas do que outras).

Genes agrupados no mesmo cromossomo e próximos (família das globinas e superfamília das imunoglobulinas).

- Pseudogenes: estrutura semelhante a genes, mas que não codificam nada.
- Retrotransposons: fragmentos do DNA que se duplicam ou saem daquela região do cromossomo e se infiltram/incorporam em outras regiões dos cromossomos.
- Regiões não codificantes repetitivas: Agrupadas (ex. DNA satélite) ou dispersas (ex. seq LINE L1 e SINE família Alu).

Expressão gênica diferencial. Por quê? Como ocorre?

Porque há regiões reguladoras dentro da seqüência de DNA e fatores de transcrição (FT) – outros componentes que não a seqüência de DNA que promovem ou inibem a transcrição de genes. (proteínas, lipídios e hormônios).

A RNA polimerase sintetiza o filamento de RNA. O nucleotídeo acrescentado na transcrição é de RNA. Inicialmente tanto as regiões de exons e introns são transcritas.

O primeiro nucleotídeo acrescentado na extremidade 5' é chamado de CAP e tem função de proteção porque os nucleotídeos de RNA são muito instáveis e tendem a ser degradados. Na extremidade 3' há acréscimo de poli (A).

Ainda dentro do núcleo os fragmentos de intron são excluídos do filamento de RNA formando o RNA maduro. (fenômeno conhecido como splicing do RNA ou recomposição e processamento). Os introns são deletados e as regiões de exons são unidas.

Esse RNA maduro através dos poros da membrana nuclear sai do núcleo. Em cada filamento de RNA se grudam os ribossomos onde vão sendo incorporados aminoácidos trazidos pelo RNAt. Forma-se a estrutura primária da proteína: seqüência de aminoácidos a partir da estrutura do DNA. Essa estrutura precisa assumir sua estrutura quaternária e sofrer outros processamentos.

Fitas antiparalelas e complementares de DNA

- Transcrito primário: ocorre no sentido 5'→3' do RNA que está sendo transcrito.

- Gene transcrito: lido no sentido 3'→5' da fita de DNA que está sendo transcrita.

O RNA é semelhante à fita de DNA que não é usada como molde (não transcrita). Então para descrever o gene você usa a fita que não é usada para transcrição: fita senso.

Então o transcrito primário é complementar ao gene lido (de 3'para 5') e semelhante ao filamento de DNA 5' para 3' (fita senso, não transcrita).

- Fita de DNA não transcrita é a fita relatada na literatura ou em banco de dados. (fita censo).

- Fita anti-senso: é a fita que está sendo transcrita.

Código Genético: Cada três nucleotídeos codificam um aminoácido.

- universal: todos organismos vivos utilizam o mesmo código genético.

- degenerado: mais de uma trinca é capaz de sintetizar o mesmo aminoácido.

Há 3 códons de terminação e 1 de início.

Matriz aberta de leitura (ORF): local no qual 3 nucleotídeos produz um aminoácido. É o segmento onde sabe-se que gera um produto funcional. Se em uma determinada seqüência de DNA você tem uma matriz aberta de leitura você tem a codificação de um produto funcional. É a parte codificante do gene.

Processamentos pós-traducionais

Seqüência primária

A proteína pode sofrer:

- dobramento tridimensional;

- modificações: glicosilações, clivagens.

- cadeias polipeptídicas associadas.

Geram as estruturas quaternárias.

É importante observar que pode haver mutação em um gene que permite a síntese normal da proteína mas impeça sua glicosilação e isto também é causa de doenças.

Início da transcrição:

- Regiões promotoras:

TATA boxe

CAT boxe (CCAAT)

Ilhas de CpG (5'-CG-3')

- Regiões não promotoras com função:

+ Acentuadora

+ Silenciadora

A regulação está na própria fita de DNA ou em fatores externos.

Recomposição do RNA ou Splicing:

Eliminação das regiões de introns e ligação das regiões de exons.

Os introns são autoremovíveis ou existem uma série de proteínas para realizar essa atividade?

Em alguns organismos esse processamento é autoremovível.

Mas, na espécie humana existe uma série de proteínas que se liga na região e ajuda na eliminação do fragmento de intron e na ligação dos exons.

Spliceossomo: várias proteínas de remoção, intron e exons a serem unidos.

Splicing Alternativo: em alguns tecidos o splicing elimina também exons gerando isoformas de um gene.

- Isoformas de um gene: Ex. alfa-tropomiosina.

Inicialmente acreditava-se que nossas células possuíam 100 mil genes em função da variedade de proteínas. A medida que o sequenciamento foi concluído descobriu-se que na verdade um número cada vez menor de genes era encontrado. Hoje, acredita-se que temos uns 25 mil genes.

Como explicar então a grande quantidade de proteínas e um número pequeno de genes?

Praticamente todos os genes em função de splicing alternativo (que gera isoformas de um gene) ou de regiões promotoras alternativas conseguem codificar mais de uma proteína funcional.

Exemplo:

Distrofia muscular de Duchenne:

O feto nasce bem. A criança entre 3 e 5 anos começa a apresentar déficit motor e aos 12 anos já está na cadeira de rodas. O indivíduo costuma morrer antes dos 20 anos. Esses pacientes tem mutação na distrofina que é uma proteína presente na membrana nuclear do músculo. O músculo tem suas fibras rompidas a partir da contração e relaxamento. 50% dos doentes possuem retardo mental como outro sintoma: como explicar uma mutação que é expressa no músculo também dar retardo mental em algumas crianças? Observou-se que uma das isoformas da distrofina é expressada também no cérebro.

Organização do Genoma Humano:

Regiões ricas em genes e regiões pobres em genes.

Genoma nuclear:

- Genes e seqüências relacionadas: única ou moderada repetitivas=25%

+ DNA codificante: 10%

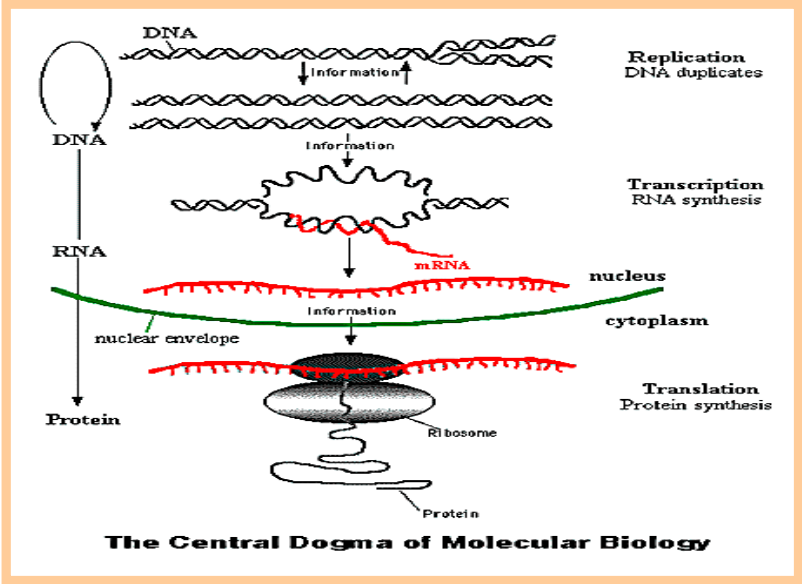
+ DNA não codificante: 90% . Ex. pseudogenes, introns, seqüências não traduzidas.

- DNA extra-gênico:

+ Único ou pequeno número de cópias=60%.

+ Moderado a altamente repetitivo: 40%

- Repetição em tandem ou repetição agrupadas.
- Repetições diversas.



Quinta-feira, 27 de abril.

## FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

Qual a importância de se conhecer a tecnologia se o médico lida com os pacientes? O avanço científico depende do avanço tecnológico.

Genética Médica Moderna: Conhecer a Base molecular das mutações e doenças facilita Diagnóstico e Tratamento.

### 1. Análise do DNA e RNA

A análise do DNA e RNA enfrenta problemas como obter esse material em grandes quantidades e em quantidades purificadas.

A solução tecnológica se dá por meio de:

- clonagem;
- reação de PCR (reação em cadeia da polimerase).

Desse modo, busca-se isolar aquela região do DNA desejada e aumentá-la em número, ou seja, amplificá-la.

Clonagem:

O DNA de interesse extraído de determinado tecido (como o sangue periférico) é aumentado através de duas maneiras:

- pela reação de PCR;
- cortando o DNA com enzimas e gerando uma série de fragmentos. Estes são então inseridos em um vetor. (é um fragmento de DNA que carrega o gene de interesse). Dessa forma geramos uma biblioteca de DNA. Nessa técnica de clonagem usam-se enzimas de restrição que são responsáveis por cortar o DNA. Une-se o fragmento de DNA de interesse com o DNA vetor.

Vetor:

A enzima de restrição pode cortar a dupla fita de modo que uma fita é cortada mais do que a outra e isso gera uma cadeia maior e outra menor. Este corte também pode ser uniforme e as duas fitas do DNA apresentam o mesmo tamanho. A enzima gera seqüências complementares entre o DNA de interesse e o vetor porque corta também o DNA do vetor.

Para selecionar as bactérias que contêm o plasmídeo unido ao gene de interesse coloca-se também um gene que garante resistência a antibiótico. (por exemplo, a ampicilina)

Exemplos de vetores: plasmídeos, bacteriófagos lambda, cosmídeos, BACs, (cromossomos artificiais de bactérias) e YACs. (cromossomos artificiais de leveduras).

- Plasmídeo é uma seqüência de DNA extracromossômica de bactéria. O DNA das bactérias é circular. (tanto o cromossomial quanto o extracromossomial – plasmídeo). Em geral os plasmídeos não contêm genes essenciais para a sobrevivência da bactéria, mas possuem importância muito grande por carregar genes que garantem resistência a antibióticos. De outro modo: são fragmentos de DNA circular encontrados fora do cromossomo das bactérias e que são utilizados para carregar genes de interesse.

- Bacteriófago lambda: Trata-se de um vírus que promove infecção de bactérias. Faz com que os fragmentos virais aumentem em número. Quando esse vetor infecta uma bactéria o número de fragmentos do DNA de interesse aumenta juntamente com a infecção/multiplicação. Promove a morte da célula bacteriana a partir da lise celular.

- Cosmídeos: Vetores semelhantes a plasmídeos, mas maiores, e que possuem propriedades semelhantes a bacteriófagos. São circulares, mas atuam como bacteriófagos contaminando células bacterianas.

- Cromossomos artificiais permitem armazenar uma quantidade maior de DNA.

Cada um desses vetores utiliza técnicas diferentes e isso torna um vetor ou outro melhor de acordo com a circunstância: se o trabalho é realizado com gene grande ou pequeno, por exemplo. A principal diferença, então, entre os vetores é a capacidade de carregar um gene maior ou menor.

Digestão com enzimas de restrição:

As endonucleases de restrição foram descobertas em bactérias e hoje podem ser compradas em lojas de biologia molecular.

São utilizadas para clonagem e para diagnóstico de mutações.

Funcionamento do diagnóstico de mutações:

Salienta-se que as mutações podem trocar nucleotídeos dentro do DNA. Digere-se determinado fragmento por meio das enzimas de restrição que reconhecem a sequência de DNA e a cortam numa região determinada, no sítio de reconhecimento. A seguir realiza-se uma reação de PCR, visando aumentar determinada região do DNA (amplificar determinado gene). A região amplificada é cortada com enzimas de restrição e geram-se fragmentos. Esses fragmentos correm em um gel de agarose submetidos a uma DDP. (eletroforese) O DNA apresenta carga negativa e por isso caminha do pólo negativo para o positivo. Este gel pode ser de agarose ou de poliacrilamida. Dessa maneira os fragmentos de DNA menores caminham mais rápidos pela rede de gel. Efetuam-se comparações com a eletroforese de fragmentos normais para saber se houve mutação.

As alterações (mutações) podem criar ou abolir sítio de restrição: se isto ocorrer as enzimas não vão atuar no local original e serão gerados fragmentos com tamanho diferente do que deveria. (demonstrado pela eletroforese). Isso é utilizado para diagnósticos de mutações que tem a localização de seus genes conhecida.

Construção de bibliotecas:

Permite isolamento de grande quantidade de DNA para estudo.

Os fragmentos de interesse podem ser gerados a partir:

- do próprio DNA genômico (por enzimas de restrição);
- do DNA que codifica proteínas (DNA complementar ou cDNA – apresenta apenas exons).

Métodos de isolamento de cDNA:

Utiliza a enzima transcriptase reversa que tendo o RNA como molde transcreve DNA. Um RNA mensageiro é extraído de uma célula. Como esse RNA possui cauda poli A isso permite adicionar um primer de timina que se pareia com a cauda. A partir daí a transcriptase reversa alonga a fita.

Lembra-se que o RNA mensageiro maduro só possui regiões de exons e daí dizer que o cDNA só possui genes que codificam proteínas.

Sondas de ácidos nucleicos.

São fragmentos de DNA ou RNA conhecidos que são marcados de alguma forma com fluorescência ou material radioativo.

São utilizadas nas técnicas abaixo:

Métodos de análise de ácidos nucleicos:

Buscam investigar a quantidade e a qualidade do DNA de determinada amostra.

Suas etapas envolvem: eletroforese em gel e hibridização de ácidos nucleicos.

Técnicas: utilizam o princípio da hibridização, a eletroforese e as sondas.

Blot é transferência. O princípio das técnicas é o mesmo e a primeira descrita foi a de Southern. Os cientistas foram mudando o nome da técnica como referência humorística à primeira descrita.

Princípio de hibridização: os filamentos de DNA conseguem se complementar. As fitas complementares conseguem se ligar em um ambiente ideal, formando uma dupla fita. Esta propriedade é usada nas técnicas.



1) Southern blot: investiga o DNA.

Os fragmentos de DNA passam por eletroforese e caminham de acordo com tamanho. São comparados com o marcador (padrão). Este gel é colocado em contato com alguma substância que core DNA. (brometo de etídeo). Por meio de luz ultravioleta vêem-se os fragmentos brilhar.

A eletroforese pode ser aplicada diagonalmente também. Isso permite estudar fragmentos grandes porque neste caso seria necessário um gel enorme para permitir os fragmentos correrem.

Em um tubo de ensaio podemos ter apenas a sonda (DNA) e em outro apenas o DNA investigado. Promove-se uma desnaturação (calor) e as fitas dos DNA são separadas. Os DNA são colocados em contato e promove-se uma renaturação que restabelece a ligação entre as fitas complementares (DNA de interesse pode se ligar com DNA de interesse e também com o DNA da sonda). Deste modo, fitas complementares entre a sonda (conhecida) e o DNA em estudo podem se ligar. Observa-se então a marcação no DNA em estudo. (lembrar que a sonda é marcada).

A técnica propriamente dita:

Amostras de DNA são digeridas por endonucleases de restrição. Esses fragmentos são fracionados por tamanho por meio de eletroforese em gel de agarose. Ocorre então a transferência por absorção (blotting) para membrana de nitrocelulose ou náilon: pega-se uma membrana de nitrocelulose e coloca-se em cima do gel e por um processo de absorção os fragmentos migram do gel para a membrana. Isso é feito para trabalhar com a membrana de celulose que não quebra com facilidade como o gel de agarose.

Nessa membrana há o DNA do paciente.

Coloca-se essa membrana em contato com a sonda e promove-se uma desnaturação. Então os fragmentos tanto da sonda quanto do DNA em estudo são quebrados. Se eles forem complementares podem vir a se ligar. Lava-se isso e depois revela. (com raio X ou com aparelhos de técnicas de fluorescência). Aí detecta-se as bandas.

A sonda fornece especificidade maior. Ela permite a visualização da região de interesse.

2) Northern blot: investiga o RNA.

3) Western blot: investiga proteínas e não ácidos nucléicos, mas a técnica é muito parecida. Utiliza não uma sonda de DNA e sim um anticorpo marcado para se ligar às proteínas.

No Southern blot podem ser gerados vários fragmentos e no gel várias bandas pela enzima de restrição (ER). Se usarmos uma ER que corte regiões repetitivas gera-se:

VNTRs: seqüências de DNA não codificante encontradas na população em número variável. (variable number of tandem repeats) O número de repetições varia de pessoa para pessoa.

Amostras de DNA genômico são digeridas com uma ER que reconhece sítios de restrição bem conservados, que flanqueiam um locus VNTR específico (DNA - minissatelite hipervariável).

Utiliza-se uma sonda de repetição em vez de uma sonda flanqueadora única.

Isso gera um padrão de bandas para cada pessoa.

Algumas pessoas tem 10 cópias de VNTRs, outras 3. Essas seqüências são encontradas ao longo de todo genoma. Esses VNTRs são altamente polimorfos.

Gera o "perfil de DNA": testes para estabelecer identidade e parentesco.

É a técnica do "DNA fingerprinting" ou "Datiloscopia do DNA". (Técnica inventada por Jeffreys e col 1985). Técnica que utiliza sondas com loci múltiplos.

Aplicações dos testes que determinam o perfil de DNA

- Utilizado para excluir ou confirmar paternidade.

- Na Medicina Forense:

+ Utilizado em investigações criminais: se os DNA de uma amostra encontrada no local do crime pertencem ao suspeito um ou ao dois, além da vítima.

- Averiguar se gêmeos RN são monozigóticos ou dizigóticos.

### Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Amplamente utilizada como ferramenta de biologia molecular.

Usada para obter número grande de amostras daquela região do DNA.

Extrai-se o DNA a partir de qualquer tecido. Constrói-se em laboratório os primers específicos que vão amplificar a região desejada. Eles vão estar localizados na extremidade da região desejada. Nucleotídeos e a DNA polimerase que alonga a fita de DNA são colocados no tubo de ensaio. Esses primers (2 por DNA – primer R e F) delimitam o local onde a amplificação vai ocorrer.

Material para realização do PCR: amostra do paciente (DNA genômico), primers, nucleotídeos livres trifosfatados, DNA polimerase e ambiente com condições necessárias para atuação da enzima.

No termociclador ou máquina de PCR ocorre a regulação da temperatura em tempos específicos. Ocorre um aumento de temperatura para desnaturar o DNA genômico do paciente. Promove-se uma renaturação para tentar ligar os primers na região correta. E a seguir diminui-se a temperatura para melhor atuação da polimerase. 95 graus → 55 graus → 72 graus.

Repete-se a temperatura de desnaturação, renaturação e de ação da polimerase. São efetuados de 30 a 40 ciclos no termociclador. (35)

Quarta-feira, 03 de maio de 2006.

Animações online:

[www.whfreeman.com/iga8e](http://www.whfreeman.com/iga8e)

Variação Genética em indivíduos

Mutação e polimorfismo

1. Introdução:

Variação pode ser observada em indivíduos ou em populações.

Genes (genótipo) + Ambiente → Características. (fenótipo).

O que determina diferenças e semelhanças entre os indivíduos? A genética e o ambiente.

A seqüência de DNA entre diferentes indivíduos era idêntica em 99,9% das regiões codificantes.

A variabilidade genética que gera suscetibilidade a doenças, diferenças físicas é observada em 0,1% dos genes codificantes.

As variações respondem por efeito grande e/ou pequeno no fenótipo dependendo da característica. O produto gênico somado gera a variabilidade observada.

Exemplos de variações:

- variações físicas
- variações anatômicas
- variações fisiológicas
- intolerância dietética
- respostas terapêuticas ou reações adversas a medicamentos
- suscetibilidade a infecções. Por exemplo, a tuberculose.
- predisposição ao câncer
- influência na aptidão atlética, artística, personalidade.

Como podem ser classificadas as variações

Mutação: são variações extremamente raras. Mutação é associada a doença. Frequência menor que 1% na população.

- genômica: número de cromossomos. (aneuploidias)
- cromossômica: estrutura de cromossomos. (rearranjos). O cromossomo sofre uma quebra e a região livre tende a ser degradada. Na hora do reparo para evitar degradação pode haver uma ligação errada.
- gênica: genes (alteração de poucos pares de bases nas seqüências de DNA). Em geral associada a mutações monogênicas. Ex. Fibrose cística e distrofia.

Resultado: perda, ganho ou alteração de materiais genéticos. Isso pode levar a uma determinada doença. Excesso de material genético gera excesso de expressão e pode causar doença. (Síndrome de Down).

- Ausência do produto gênico. (perda) Ex. doenças autossômicas recessivas. Só desenvolve doença por perda de função quem é recessivo.

Haploinsuficiência: Doenças autossômicas dominantes o indivíduo tem a doença mesmo tendo um alelo normal. Porque nesse caso a quantidade reduzida a metade não é suficiente para o indivíduo ser normal. Por que o heterozigoto em doença dominante manifesta a doença e em recessiva não manifesta.

-Alteração na dosagem (níveis de expressão). Ex: cópias a mais de um gene.

- Modificação protéica benéfica ou maléfica. (alteração) A troca de nucleotídeos que geram modificações na proteína podem ser modificações maléficas ou benéficas.

- Algumas alterações não afetam o produto gênico (código genético degenerado) → ausência de conseqüências clínicas.

Tipos de células:

- linhagem somática → Não herdada.
- linhagem germinativa → herdadas.

Origem das mutações:

- Genômica: não-disjunção.
- Cromossômicas: quebras e rearranjos.
- Gênicas:
  - + erros durante a duplicação;
  - + falhas no reparo de danos.

As mutações podem ser:

- Espontâneas
- Induzidas

As mutações gênicas podem ser chamadas de mutações de ponto.

- normal, deleção, inserção e substituição.

Quadro de leitura:

- Mutações múltiplas de três faz com que a partir da mutação os códons colocam os aminoácidos na posição correta. Pode gerar problemas ou não. Pode ser uma mutação na mesma trinca ou envolvendo duas trincas: a partir dali a codificação é normal.
- Deleção de um nucleotídeo: a trinca é deslocada. A trinca diferente determina a síntese de um aminoácido diferente. A partir da mutação os aminoácidos inseridos não são os originais. Altera-se a matriz de leitura. Cria códon de parada prematuro. Nesse caso a proteína não é ao menos parecida com a original.

Mutações do mesmo gene podem causar doenças diferentes em termos de gravidade. (ex. Distrofia de Duchene e de Becker). A de Becker é mais benigna. Ambas as doenças são causadas por mutações no gene da distrofina.

A diferença é pelo tipo de mutação. A de Duchene altera o quadro de leitura e a de Becker mantém o quadro de leitura.

Mutação de substituição:

- mutação de sentido trocado
  - mutação silenciosa: resultando no mesmo aminoácido.
  - mutação sem sentido: cria códon de parada prematura. Apesar de o indivíduo ter a seqüência isso vai agir como se fosse a deleção. Não há codificação de aminoácidos a partir daí.
- Ou seja, mutações de substituição podem ter um efeito extremamente leve ou grave.

Duplicações e deleções: Podem causar expansões ou retrações.

- Mutação causada por recombinação desigual (crossing over desigual) → deleções e duplicações.

Pode haver um pareamento desigual e após o crossing gerar-se um cromossomo com duplicação daquela região e um com deleção.

Se o gameta tiver a cromátide com TMP duplicado o indivíduo adulto vai ter um cromossomo normal e outro não. Esse indivíduo vai ter três cópias do gene TMP. Ex. Doença de Charcot-Marie-Tooth.

Se o gameta for o da deleção o indivíduo resultante da fecundação só vai ter uma cópia do TMP e também vai manifestar uma neuropatia.

### Mutação no sítio de splicing

Nos limites do exon e intron existe uma seqüência conhecida chamada de consenso. O aparato de splicing reconhece que ali é o limite do exon/intron e diz que a partir dali pode ser deletado o intron. Se ocorrer uma mutação nessa região pode gerar deleção de um exon normal e inserção de intron que não deveriam existir.

Pontos quentes de mutação: em algumas regiões as mutações são mais freqüentes.

+ Transição: troca de nucleotídeos do mesmo grupo. (purina X pirimidina).

+ Transversões: troca de nucleotídeos de grupos diferentes.

Existe um excesso de transversão. Ao longo da evolução a citosina (nucleotídeo metilado) tende a se transformar numa timina.

Entretanto em algumas regiões (Ilhas CpG) a citosina metilada nunca se transforma em timina: são encontradas bastante em regiões promotoras. Inibe a expressão gênica. Isso pode causar um efeito tão grave que leve a morte. E por isso ela não é substituída por timina. A citosina metilada faz com que aquele gene seja silenciado.

Taxa de mutação: é o número de novas mutações por locus por geração.

Taxa de mutação germinativa: cerca de 10 a menos 4 à 10 a menos 6 por locus por geração.

“Pelo menos 1 a cada 20 pessoas recebeu um novo gene mutado de um de seus genitores”

Para doenças autossômicas dominantes em que os pais tem a doença pode-se estimar a taxa de mutação. Se ocorre mutação observa o fenótipo.

Existem doenças genéticas que não são herdadas. Na distrofia de duchene pode ocorrer mutação nova nos indivíduos na vida embrionária.

- Acondroplasia: tipo de nanismo. Doença autossômica dominante. Os pais são normais e podem ter filhos doentes. Então a mutação surgiu na linhagem germinativa de um dos pais ou ocorreu no filho na vida embrionária.

### Diversidade Genética Humana

Polimorfismo: Variação freqüentemente associada ao normal. Presente numa freqüência maior ou igual a 1% da população.

Polimorfismo em proteínas:

Ex: grupo sanguíneo ABO.

Locus cromossomo 9.

Relação: A & B – codominantes. O – recessivo.

Glicosiltransferase acrescenta na proteína H (antígeno) dependendo do gene:

- A- N-acetilgalactose.

- B – D-galactose.

- O – versão mutante sem atividade.

Ex: Sistema Rh

Locus cromossomo 1

Rh+ → codifica proteína Rh-D.

Rh- → alelos Rh-D não funcionais. Não expressam a proteína Rh-D.

- Doença Hemolítica do recém nato.

Polimorfismo em regiões não codificantes:

- DNA codificante do genoma: 5% do genoma total. Regiões não codificantes? !!!

- RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.
- SNP: polimorfismo de nucleotídeo único.
- VNTR: número variável de repetições em tandem. (regiões de minissatélite e microsatélite.)

### VARIAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES

Pacientes e familiares são reflexos da população a qual pertencem. Esse tipo de informação impede o risco de recorrência em outras gerações.

#### 1. Genética de populações

- estudo da distribuição de genes nas populações;
- estuda como as freqüências de genes e de genótipos são mantidas ou alteradas;

O que mantém ou altera a freqüência do genótipo:

- Fatores genéticos: mutação e reprodução;
- Ambientais e sociais: seleção e migração (que trás genes de outras regiões).

#### 2. Diversidade genética em populações humanas:

Diferentes populações humanas:

- Compartilham os mesmos CROM e LOCI;
- Possuem alelos diferentes;
- Alelos são observados em diferentes freqüências;

Isso caracteriza os grupos étnicos.

#### 3. Freqüências alélicas a partir de freqüência genotípicas:

Ex.

Gene CCR5 codifica receptor de citocina. Um alelo diferente possui uma deleção e este gene não tem a produção da proteína. A característica clínica é desenvolver resistência à infecção ao HIV. Característica autossômica recessiva benigna.

Ferramentas moleculares: permite analisar a população para estabelecer a freqüência alélica.

Total: 788 pessoas

Freqüências Genotípicas: (dados obtidos por técnicas de ferramentas moleculares)

Total: 788 pessoas;

CCR5/CCR5=647

CCR5/deltaCCR5=134

deltaCCR5/deltaCCR5=5

Permite obter as freqüências alélicas:

CCR5=  $(2 \times 647) + (1 \times 134) / (788 \times 2) = 0,906$

delta CCR5=  $1 - 0,906 = 0,094$ .

A lei de Hardy-Weinberg

Calcula as freqüências genotípicas a partir das freqüências alélicas;

Geoffrey Hardy – matemático inglês;

Wilhelm Weinberg – médico alemão.

Alelo	Freq de um alelo na pop	Freq genótipo
A	p	(AA) $p^2$
a	q	(aa) $q^2$
		(Aa) $2pq$

É baseada em várias suposições:

- Combinação aleatória na formação dos genótipos;

- População grande;
- Taxa de mutação sutil
- Ausência de seleção à favor ou contra um genótipo particular;
- Ausência de migração significativa entre indivíduos de populações diferentes;

#### Implicações da Lei de HW

1. As frequências de três genótipos (AA, Aa, aa) são dadas pelos termos da expansão binomial de  $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ .
2. As proporções dos genótipos não mudam de geração para geração. Frequência genotípica em equilíbrio. O alelo não pode dar vantagem seletiva para o indivíduo em relação aos demais. Ou seja, o alelo tem que ser neutro.

#### Aplicação prática.

Estimar a frequência de heterozigotos numa população.

Fenilcetonúria: DAR. (gera retardo mental).

PKU: Incidência é de 1/4500 na Irlanda.

Como estimar a frequência do alelo que causa a doença?

Pacientes PKU = aa

$q^2 =$  incidência

$q^2 = 1/4500$

$q = 0,015$ .

$P+Q=1$

$P=0,985$

Qual a chance de se observar um fenótipo em heterozigose?

$2pq = 0,029 =$  aproximadamente 3%.

Chance de achar um portador é de 3% na população da Irlanda.

Ou 1 (heterozigoto) em cada 33 pessoas são portadoras normais.

Em cada 66 pessoas na Irlanda são encontradas 2 portadores normais.

#### Frequência de genes e genótipos LIG ao X (doenças recessivas)

A frequência pode ser obtida diretamente pela incidência de fenótipos nos homens ou por meio da Lei de HW em mulheres.

Ex: Daltonismo.

#### Fatores que perturbam o equilíbrio de HW

- Reprodução não é aleatória

+ estratificação: a comunidade afroamericana se reproduz de forma independente nos EUA. Esta comunidade apresenta muito mais anemia falciforme. Subgrupos → distúrbios relativamente comuns na população.

+ casamento preferencial: parceiros compartilham semelhanças

+ consangüinidade (endogamia)

- aumentam as chances de portadores assintomáticos que compartilham mutações nos mesmos genes se casarem.

- Distúrbios raros.

- Tendência à genótipos homozigotos → Risco doenças AR.

Reprodução não é aleatória → Estratificação

Doença	População	Incidência
D. Tay-Schas	Judeus Ashkenazi	1:3900
	Não Judeus A.	1:112000

Anemia Falciforme	Afroamericanos	1:400
	Hispano-americanos	1:40000
Fenilcetonúria	Escoceses	1:5300
	Japoneses	1:109000

Desequilíbrio:

Fatores que provocam desequilíbrio na frequência de um gene:

- Desvios das frequência ao longo das gerações;
- Fatores que perturbam o equilíbrio de HW de forma sutil e lenta.

Desvios: mutação e seleção (adaptados) e migração.

Se um locus está em Desequilíbrio de HW vale a pena investigar.

A força da seleção em:

Doenças AR: pequeno efeito da mutação;

Doenças AD e Ligadas ao X: efeito significativo da mutação.

Mutação e seleção:

A medida que um alelo mutado surge. Ele pode ser:

- melhor: aumenta em frequência na população. Eleva  $q$ .
- pior: diminui em frequência na população. Relacionada com a morte e esterilidade.

Ex:

- Osteogenese imperfeita tipo II → Letal. (doença não herdada).

- Síndrome de Ápert → Craniosinostose. (o fechamento das suturas ocorrem em momentos errados/precoces → além da deformação da calota apresentam problemas mentais). Em geral não se reproduzem. Apresentam pais normais.

Era de se esperar que os alelos sejam extintos. Mas ocorre mutação nova em diferentes indivíduos.

Doenças AD

Mutação x Seleção

- Acondroplasia: Nanismo. Apresentam pais normais. Eles podem se reproduzir, mas em geral acabam deixando menos filhos que as pessoas normais. O alelo também não se extingue por surgirem novas mutações.

Doenças Ligadas ao X (recessiva)

Mutação X Seleção

Homens hemizigotos & Mulheres heterozigotas manifestante:

Pessoas com distrofia não geram descendentes e o gene não é extinto por surgimento de novas mutações.

Doença genética letal: a paciente não deixa descendentes.

Nas doenças ligadas ao X letal: Ex. distrofia muscular de Duchene.

1/3 dos casos = mutações novas.

2/3 dos casos = herdados.

Hemofilia:

- Mutações novas: 15%.

Seleção à favor de heterozigoto → Vantagem do Heterozigoto.

Algumas mutações mesmo sendo deletérias tendem a ser mantidas na população.

Ex. Anemia Falciforme.

Doença AR frequente na África. Neste locais a malária é endêmica e os homozigotos normais são suscetíveis à malária e frequentemente morrem.



Os homozigotos falcêmicos apresentam anemia grave.

Os heterozigotos apresentam hemácias inóspitas para a malária. As hemácias não sofrem afoçamento em condições normais. Mais adaptados e se reproduzem mais.

Deriva genética: flutuações na frequência de um alelo.

- Flutuação ao acaso das frequências gênicas principalmente em populações pequenas.

- Efeito fundador. Descrito em populações isoladas.

Na população da Europa existia uma determinada doença AR (Síndrome de Ellis-van Creveld). Ela era muito rara. As pessoas foram para a América e fundaram uma comunidade isolada – Amish. Essa comunidade promovia casamentos consangüíneos e vivia isolada do resto do país.

Estes casamentos fizeram com que a Síndrome (apresenta polidactilia) aparecesse com frequência maior: primeiro porque as pessoas que se mudaram da Europa, que fundaram a nova comunidade provavelmente tinham aquele alelo. A frequência do alelo na nova comunidade agora é bem maior. (efeito fundador).

Aconselhamento genético.

Quarta-feira, 10 de Maio de 2006.

## PADRÕES DE HERANÇA MENDELIANOS GREGOR MENDEL

Os padrões relacionados com DOENÇAS MENDELIANAS

### MANIFESTAÇÃO

Em geral dava-se se muita importância às doenças ao nascimento (congênitas), mas hoje se estuda as doenças que se manifestam na infância, na vida adulta (idade de manifestação tardia).

Incidência: 0,36% entre nativos. De uma forma geral as doenças mendelianas são raras.

### Heredograma:

A importância do heredograma reside no fato de que apesar de uma doença ser rara na população ela pode reincidir numa mesma família.

Consta de:

- História familiar → padrão de transmissão da doença;
- Probando, propósito, caso índice → indivíduo que fez a família procurar aconselhamento genético;
- Graus de parentesco → Primeiro Grau, Segundo Grau... Identificar porque está relacionado com a incidência maior de doenças autossômicas recessivas.
- Consangüinidade → Casal com um ou mais ancestrais em comum → Idem acima.
- Caso isolado, esporádico → Torna difícil estabelecer um padrão de herança.

### Simbologia para desenho do heredograma:

Triângulo=Aborto.

À medida que os indivíduos são afetados eles são marcados. Se forem usados marcações diferentes está se representando características diferentes, heranças distintas.

Facilita identificar os indivíduos por genealogia (algarismo romano) e o número do indivíduo (algarismo arábico).

### Cromossomos autossomos:

Homens e mulheres → Diplóides.

### Cromossomos sexuais:

Mulheres: Homozigotas ou heterozigotas.

Homens: hemizigotos.

Hipótese de Lyon (Mary Lyon): Um dos cromossomos X da mulher se torna inativo e o outro fica ativo.

Observado na interfase como uma massa mais densa na periferia do núcleo. (corpúsculo de Barr)

Compensação da dose: compensação em termos de expressão gênica.

- inativação de um dos cromossomos X das células femininas;
- A inativação ocorre cedo na vida embrionária;

No início da vida embrionária os 2 X estão ativos expressando genes em ambos os alelos.

- Alguns genes escapam da inativação: alguns genes permanecem ativos naqueles cromossomos inativos (são expressos em dose dupla).

Essas duas características acima explicam porque a portadora de Síndrome de Turner manifesta a doença já que o normal seria supor que ela só necessitaria de um X para ser normal.

- A inativação é determinada aleatoriamente (inativação do X materno ou paterno), mas quando ocorre é permanente nas células filhas.

Mosaicismo somático: As mulheres formam um mosaico de cromossomos de origem paterna ou materna inativado (X).

Em mulheres que apresentam ausência de glândulas sudoríparas determinado por um gene ligado ao X: como essa doença manifesta na pele mostra-se que diferentes mulheres na mesma família apresentavam essa doença em partes segmentadas do corpo. Representando a parte que apresenta os cromossomos X mutante inativos e os X normal ativos. (com glândulas).

## PADRÕES DE HERANÇA MENDELIANOS:

Autossômico Dominante:

- não salta gerações é sugestivo de ser dominante.
- homens e mulheres afetados na mesma proporção é sugestivo de ser autossômico.

Autossômico Recessivo:

- Pais normais tendo filhos afetados;
- homens e mulheres afetados na mesma proporção.

Ligado ao X recessivo:

- Pais normais tendo filhos afetados;
- Mais homens afetados.
- A mulher é portadora assintomática.
- Na prática as filhas do homem são normais porque o homem afetado dificilmente casa com uma mulher portadora. (a não ser casamento consanguíneo). Cada indivíduo que vem de fora da família é homozigoto normal. (XHXH).

Homem afetado tendo filho do sexo masculino afetado exclui a doença ligada ao X recessivo porque a mulher seria portadora e como dito isto é muito raro.

A transmissão é materna.

As filhas são normais portadoras e os filhos são normais. (normalmente)

Daí o fato da hemofilia ser MUITO mais freqüente nos homens.

Os genes no Y estão relacionados com a fertilidade masculina.

Ligado ao Y

Todos os filhos homens de um indivíduo afetado vão herdar essa característica.

Ex: pêlos na orelha em uma família no interior da Índia.

Ligada ao X Dominante:

- Excesso de mulheres afetadas por elas terem dois X;
- Pai afetado sempre tem filha afetada.

Padrões de herança mais raros: em geral a mutação está em genes autossomos e não em cromossomos sexuais.

Situações em que homens são mais afetados, mas não se trata de herança ligada ao X recessiva.

- Fenótipo limitado ao sexo:

Ex: puberdade precoce limitada. Os meninos (sexo masculino) começam a desenvolver as características sexuais secundárias. Existe uma mutação em um receptor que se mostra continuamente ativado mesmo sem seu ligante.

- Distúrbios influenciados pelo sexo:

Ex: hemocromatose. O distúrbio no metabolismo do Ferro. Ferro é absorvido em quantidade muito maior do que em condições normal.

As mulheres ingerem menos ferro e perdem grande quantidade na menstruação. E isso faz com que sejam muito menos freqüentemente doentes.

OBS:

- Heterozigoto para AR → Os heterozigotos não manifestam a doença. Mas a nível bioquímico são detectadas algumas alterações.

- Homozigoto para AD → O heterozigoto manifesta a doença e os indivíduos homozigotos para doença manifestam alterações muito mais graves.

Patologia das mutações:

- Nas doenças recessivas a mutação faz com que a proteína não seja expressa.

"Perda de função"

- Nas doenças dominantes o indivíduo é portador de um gene mutante e de outro normal. Por que o heterozigoto mesmo tendo um gene normal manifesta a doença. 3 hipóteses para explicar manifestação da doença:

+ Haploinsuficiência: em alguns casos produzir metade da quantidade da proteína não é suficiente para o indivíduo ter um fenótipo normal.

+ Dominante negativo: cadeias polipeptídicas se interagem para formar a estrutura final da proteína. Proteína normal se junta com proteína anormal e gera uma proteína final anormal. Ex: Osteogênese imperfeita e Síndrome de Marfan

+ Ganho de função: Algumas mutações fazem com que algumas proteínas tenham uma função diferente ou exarcebada em relação à função normal. Ex. Câncer: um proto-oncogene que deveria controlar a divisão celular, passa a estimular a divisão demasiadamente.

Fatores que complicam os padrões de herança clássicos:

- Mutação nova

Ex: acondroplasia. Indivíduos afetados comumente são filhos de pais normais por constituírem mutações novas.

A priori o risco dos pais normais terem outro filho afetado é desprezível por que a mutação pode ter ocorrido nas células embrionárias do afetado. Entretanto pode ter havido Mosaicismo gonadal e a chance se aproxima de 10%.

As gônadas de um desses pais podem ter algumas células normais e algumas células portadoras da mutação.

- Expressão variável:

Alguns indivíduos da família possuem um quadro muito grave e outros muito leve. Isso dificulta a montagem correta do heredograma porque alguns indivíduos podem ser não computados como doentes.

Ex. Neurofibromatose (AD): os indivíduos com mutação sempre tem a doença, alguns de forma leve (mesmo que o próprio indivíduo ache que não possui a doença) e outras de forma grave.

- Penetrância incompleta: explicada em cada doença.

Em alguns casos há salto de gerações na doença AD porque há indivíduos que são portadores da mutação, mas não desenvolvem a doença. Ex. retinoblastoma.

Penetrância de 80 a 90%. Acredita-se que é necessária a mutação do segundo alelo da célula somática na retina para manifestar a doença. Pode ser confundida com AR. A nível celular a doença é recessiva.

Existem casos de retinoblastomas não herdados ou esporádicos em proporções muito menores.

- Pleiotropia: uma mutação em um gene que causa manifestação em diferentes sistemas do organismo. Acontece praticamente em todas as doenças.  
Ex. S. de Marfan=mutação no gene da fibrilina causa problemas musculares, esqueléticos e cardíacos.

Fatores que complicam os padrões de herança clássicos:

- Heterogeneidade genética:

+ Heterogeneidade alélica: Várias mutações que vão caracterizar um alelo e todas essas mutações causam a mesma doença.

Vários alelos → mesma doença.

Ex. Fibrose Cística →

alelo mutante A (deleção);

alelo mutante B (inserção);

etc.

Existem mais de mil mutações nesse gene.

+ Heterogeneidade de locus.

Uma determinada doença pode ser causada por mutações em genes diferentes.

Vários loci (genes) → uma doença.

Ex: Surdez Hereditária não sindrômica (AR) (a única manifestação é a surdez).

- locus A (gene A crom. 5).

- locus B (gene B crom. 21).

- locus C (gene C crom. 13).

Dois indivíduos surdos podem ter filhos normais (heterozigotos).

Cruzamento: aaBB x AAbb = AaBb.

Cuidado com fenocópia. Pacientes que possuem quadro clínico semelhante ao que você está estudando (surdez), mas cujo sintoma foi causado por uma causa ambiental. Ex. indivíduo na velhice que fica surdo por motivos não genéticos.

Surdez = Rubéola na gravidez (causa ambiental).

- Consangüinidade:

Nesse caso existe risco grande de surgimento de doença AR. Homozigose por alelo herdado de um ancestral em comum.

- Parentesco;

- Mesma origem técnica;

- Isolado genética.

Em translocações e reversão.

[flapvit@yahoo.com.br](mailto:flapvit@yahoo.com.br)

Quarta-feira, 07 de Junho de 2006.

Citogenética

É o estudo dos cromossomos: não só o número, mas também a estrutura e como esses cromossomos são herdados.

Estudo dos cromossomos → estrutura e herança.

1. Importância:

Alguns distúrbios cromossômicos estão relacionados a:

- perdas reprodutivas: aborto de recorrência é indicação para solicitar o cariótipo porque alterações cromossômicas podem ser sua causa.
- malformações congênitas associadas a alterações cromossômicas: tanto de cromossomos inteiros ou de regiões específicas. RM (isolado ou com outras associações) e câncer também podem ser associados a distúrbios cromossômicos.
- Mais de 100 síndromes cromossômicas específicas já foram descritas.

Anomalias citogenéticas:

- 1% dos nativos: de cada 100 crianças que nascem uma delas apresenta uma alteração citogenética.
- 2% das gestações de mulheres acima de 35 anos apresentam alguma alteração cromossômica. A idade materna avançada também é indicação clínica de solicitação de cariótipo para o feto.
- 50% dos abortos espontâneos de primeiro trimestre estão relacionados a alterações cromossômicas.

O cariótipo evidencia alterações de grandes segmentos de DNA.

Para doenças de genética molecular (FC, síndrome de marfan, etc) usam-se técnicas de biologia molecular porque a alteração é tão pequena que a observação do cariótipo não evidencia problema nenhum.

Desta maneira as doenças visualizadas pelo cariótipo são agrupadas em doenças de citogenética.

Ao se comparar a proporção de cromossomos normais e anormais entre abortos espontâneos e nativos percebe-se que boa parte dos abortos espontâneos apresentavam anomalias cromossômicas.

Cromossomos anormais estavam presentes em 94% dos abortos espontâneos e em 6% dos nativos.

- 99% dos fetos formados com monossomia do X tendem a ser abortados.
- De cada 100 conceptos com trissomia do 21, 78% tendem a ser abortados.

Ou seja, mesmo as alterações compatíveis com a vida apresentam tendência do conceito ser abortado naturalmente.

## MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS HUMANOS

Caracterização dos cromossomos na espécie humana: braços curtos (p) e longos (q). Posição do centrômero:

A) Metacêntrico: braços de tamanhos iguais. Então, foi padronizado qual é o braço p e qual é o braço q.

B) Acrocêntrico: cujo braço curto apresenta uma região de DNA satélite. Esse DNA é repetido nos outros 5 pares de acrocêntricos. Dessa forma, uma deleção no braço curto de um acrocêntrico não trás conseqüências clínicas porque os outros pares do mesmo tipo apresentam a mesma seqüência de DNA.

Se ocorrer uma translocação onde o braço longo do 21 se liga ao braço longo de outro cromossomo não há consequências porque esse DNA está repetido em outros cromossomos. Pode trazer problema para a prole do indivíduo.

O portador equilibrado de uma alteração cromossômica (possui o braço longo de um cromossomo 21 ligado a um braço longo de um cromossomo 14) não possui carga genética a mais ou a menos. Na realidade ele não possui o braço curto de um 14 e de um 21, mas como esses braços curtos apresentam DNA satélite, onde há DNAr que codifica DNA relacionado com a síntese de ribossomos, isso não causa problema porque os outros acrocêntricos suprem essa deficiência. Esse indivíduo pode formar 6 gametas, dos quais 3 são abortos espontâneos. Além disso, de cada 3 gametas viáveis um pode gerar um filho portador de síndrome de Down, ou seja, o indivíduo possui uma chance de 1/3 de apresentar um filho com Down. Esse risco é teórico - 33% - e o risco na prática é de 15% para menos.

C) Submetacêntrico: possui um braço longo e um braço curto.

As trissomias do 13, 18 e 21 são compatíveis com a vida. As outras trissomias são inviáveis.

## MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS HUMANOS

Os genes estão em locus específicos. Usando técnicas de citogenética gera-se um padrão de bandas claras intercaladas com escuras. Isso fornece localizações de genes específicos e a elas foram dados números. Essas localizações correspondem a bandas e subbandas. A contagem das bandas e subbandas começa a partir dos centrômeros. A diferenciação de cromossomos com tamanhos parecidos também é feita por meio destas técnicas de coloração em bandas (positivas= escuras, claras=negativas). As técnicas permitem investigar se o cromossomo possui todas as bandas que deveria ter.

Os cromossomos podem ser agrupados para formar o cariótipo. Este é gerado com os cromossomos organizados de maneira decrescente do grupo A ao G. Os 5 pares de acrocêntricos são observados no grupo G (21 e 22) e no D (13, 14, 15).

## INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA SOLICITAÇÃO DE UM CARIÓTIPO

Quando se deve pedir um cariótipo do paciente:

1) Problemas de crescimento e desenvolvimento iniciais: retardo no desenvolvimento, face dismórfica (implantação errada de orelha), malformações múltiplas, baixa estatura, genitália ambígua, RM, etc.

2) Natimorto e morte neonatal:

Possuem anomalias cromossômicas:

- 0,7% dos nativos;

- 10% dos natimortos;

- 10% dos casos de morte neonatal.

3) Problemas de fertilidade e/ou abortos recorrentes: em 3% a 6% dos casos de infertilidade ou de aborto recorrente observa-se alguma alteração equilibrada no pai ou na mãe.

4) História familiar:

- importante em algumas circunstâncias: portador equilibrado de alguma alteração estrutural.

5) Neoplasias: na amostra do tecido tumoral pode haver alterações cromossômicas somáticas que ajudam no diagnóstico e também a estabelecer um prognóstico.

6) Gestação de uma mulher com idade avançada: para mulheres acima de 35-37 anos de idade pede-se o cariótipo do feto como parte de um pré-natal.

## PREPARAÇÃO DE UM CARIÓTIPO PARA ANÁLISE:

### Material

Para estudar o cromossomo é necessário que ele esteja em divisão. Ou seja, é necessário material vivo, por ex. sangue periférico heparinizado. Ou seja, há necessidade de células se dividindo: MOV, pele (fibroblastos), biópsia de vilosidades coriônicas, células do líquido amniótico, etc.

### Método

O material é colocado em uma cultura de células. Aguarda-se para que haja aumento da divisão e do número de células. Substâncias que estimulam a divisão também são colocadas junto ao material. Em seguida, interrompe-se a divisão celular com colchicina que compromete as fibras do fuso. As células são tratadas com soluções hipotônicas fazendo com elas aumentem de volume e tendam a estourar.

Lâmina → fixada → corada → analisada ao MO.

O Soro fetal bovino apresenta fatores de crescimento que estimulam desenvolvimento das células. Trata-se de um meio nutritivo.

### Identificação cromossômica

Como gerar os padrões de banda?

Prepara-se a lâmina e submete-a aos seguintes procedimentos:

#### A) Bandeamento G:

Muito utilizado no Brasil.

Mergulha-se a lâmina em tripsina que digere algumas proteínas. Cora com corante Giemsa. Isso gera um padrão de bandas escuras (bandas G positivas) e bandas claras (bandas G negativas).

Utilizados em outros países:

#### B) Bandeamento Q:

Coloração com quinacrina mustarda ou compostos correlatos.

A seguir utiliza a microscopia de fluorescência.

#### C) Bandeamento R:

A lâmina é submetida a aquecimento e a coloração é realizada como no bandeamento G. Há uma coloração inversa a do bandeamento G (reverso G/Q): utilizado também quando uma banda muito pequena é difícil de ser visualizada e a alteração de cor facilite a visualização para ter certeza de que a banda não foi deletada.

Durante a preparação todas as células não podem estourar ao mesmo tempo quando pingadas na lâmina porque os cromossomos de todas as células juntos inviabilizam a identificação de quais vieram de uma determinada célula.

### Identificação cromossômica:

- Universalidade da classificação cromossômica;
- Evita ambigüidade;
- Visa precisão da localização de cada banda ao longo dos cromossomos.

### Procedimentos especiais:

#### A) Bandeamento C:

- coloração da região centromérica dos cromossomos;
- outras regiões de heterocromatina constitutiva (1q, 9q, 16q e Yq).

#### B) Bandeamento de alta resolução:



- Em geral, analisam-se os cromossomos na metáfase quando eles estão mais espiralizados.
- Na análise em fases anteriores (ex. pro-metáfase) é possível ver melhor algumas bandas.
- Utiliza coloração G ou R;
- Permite investigar anomalias estruturais pequenas.

#### Sítios Frágeis:

- são espaços observados ocasionalmente em pontos característicos de alguns cromossomos;
- são produzidos pela exposição das células in vitro a condições de crescimento ou substância química que alterem ou inibem a síntese de DNA.
- Ex. região distal do cromossomo Xq na S. FraX (RM).
- A nível molecular observam-se repetições CGG no gene FMR1 e isso está associado à formação do sítio frágil. Está numa região antes do gene (5'UTR – a citosina se torna metilada e não é expressa. Regiões com citosina tendem a ser mais condensadas).

Regiões menos condensadas, em geral, são mais propícias à transcrição.

Genericamente:

Eucromatina apresenta muita Adenina e Timina.

Heterocromatina apresenta muita Citosina e Guanina.

A Heterocromatina é replicada posteriormente.

C) FISH = Hibridização in situ com fluorescência.

Citogenética molecular:

Técnica feita em uma célula em interfase:

- lâmina com cromossomos fixados;
- desnaturação in situ onde as fitas de DNA se abrem. Por meio de temperatura, por exemplo.
- Hibridização com DNA conhecido e marcado (sonda) → fluorescência.
- Vantagens em relação à técnica de cariotipagem normal: nessas técnicas em que a célula é analisada em interfase não há necessidade de cultura de células que é um processo que pode demorar até 15 dias. Além disso, o diagnóstico é rápido em comparação com o diagnóstico com bandeamento tradicional.

FISH

Cariotipagem espectral (SKY)

Utiliza sondas multicoloridas de cromossomos (uma para cada um dos 24 cromossomos).

FISH

Marcação telomérica: sonda para os telômeros. Em todos os telômeros a sequência de DNA é a mesma.

FISH

Hibridização genômica comparativa (CGH):

Pega-se o DNA do seu paciente e 2 controles normais. A amostra do paciente e uma amostra normal são coradas com fluorocromos diferentes:

Paciente: vermelho

Controle: verde.

Todo o DNA do paciente passa a agir como uma sonda vermelha e o controle como verde.

Pega-se um terceiro cariótipo conhecido e normal e coloca esse cariótipo com amostras do paciente e do controle.

Se houver uma deleção no paciente na região haverá coloração verde. Ou seja, excesso de verde em uma região indica deleção.

Excesso de vermelho em um ponto indica duplicação.

Essa técnica permite identificar microdeleções que não são facilmente evidenciáveis pelos outros métodos.

Uma cor intermediária indica uma região normal.

## ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

As anomalias podem ser agrupadas em alterações cromossômicas numéricas e estruturais.

### A) Numéricas:

Surgem a partir de erros de não disjunção.

#### A.1) Poliploidias: alterações de número n de cromossomos.

Ex: triploidia e tetraploidia. Encontradas somente em material de aborto.

#### A.2) Aneuploidias: alterações de número em cromossomos específicos. Utiliza-se o sufixo ssomias. Presente em 3 a 4% de todas gestações.

Ex. monossomia, trissomia (47, XY, +21).

Os cromossomos normalmente estudados em pré-natal são X, Y, 13, 18 e 21 porque são os que manifestam trissomias mais frequentemente. Utiliza-se a técnica de FISH.

Exemplos de laudo: de acordo com a técnica de FISH o indivíduo é normal para todos esses 5 cromossomos.

### B) Estruturais:

Acontecem após quebras cromossômicas na maioria das vezes. Após a quebra os cromossomos podem se ligar corretamente ou formar rearranjos que são alterações estruturais.

#### B.1) Deleção:

B.2) Inserção: quebras em dois cromossomos. A região quebrada pode ser inserida em outro cromossomo.

B.3) Duplicação: causada por crossing-over desigual na meiose.

B.4) Inversão: quebra no cromossomo em dois pontos. A seguir, ele volta a se estruturar dando uma volta de 180 graus. Nesse tipo de rearranjo não há perda nem ganho de material genético. Deste modo é um rearranjo muitas vezes equilibrado. A consequência desse rearranjo ocorre se o indivíduo quiser ter filho.

Se a inversão envolver o centrômero é pericêntrica. Se não envolver é paracêntrica.

Há formação da alça de inversão. Os cromossomos não ficam pareados linearmente.

Se na alça de inversão ocorrer o crossing-over pode haver geração de problemas.

Inversão paracêntrica: nas cromátides que sofreram crossing há geração de um cromossomo sem centrômeros e outro com dois centrômeros. O cromossomo com dois centrômeros é quebrado porque um é puxado para um lado e o outro para outro. O ideal é que um centrômero esteja inativo. O cromossomo sem centrômero tendem a se perder.

Inversão pericêntrica: as cromátides que apresentam crossing vão ter duplicações e deleções.

Os gametas da paracentrica que sofreram crossing são inviáveis. Na paracêntrica o indivíduo nasce normal ou portador como o pai.

Os gametas da pericêntrica geram problemas porque há gametas com deleção e duplicações. E por isso é pior.

### Estruturais

Alguns cromossomos apresentam forma em anel: as extremidades teloméricas foram perdidas e se ligam. Representamos por R.

### Estruturais

Marcador: Ex. 47, XX, +mar. Enquanto não se identifica o cromossomo a mais presente na célula chama-se de marcador.

Isocromossomo

Ex. 46, XX, i (Xq)

Em algumas meioses o X pode se separar não para os lados, mas para cima. Em seguida, os dois braços longos podem se juntar e formar um cromossomo chamado de isocromossomo.

B.5) Translocações:

As alterações mais estudada em cariótipos humanos são as translocações

- Recíprocas: quando dois cromossomos se quebram e eles se unem.

- Robertsoniana: Perda de braço curto dos acrocêntricos e eles se unem pelos centrômeros.

parte de um 21 (com mais um 21 livre) ligada a parte de um 14 (com mais um 14 livre). Esse indivíduo apresenta 45 cromossomos. Não é o número de cromossomos que determina se ela é normal ou não e sim a sua constituição genética. O indivíduo pode ser 45, XX, -21, -14, +Tranlocado 21/14 e ser normal.

REARRANJOS:

- Balanceados: alterações na estrutura dos cromossomos, mas em geral sem perda ou ganho de material genético. O exemplo mais típico são as translocações. Fenótipo normal.

- Não-balanceadas: Em geral relacionadas a quadros sindrômicos. (monossomias e trissomias parciais). Deleções e inserções costumam gerar alterações não-balanceadas.

MOSAICISMO:

70% das células normais e 30% das células com trissomia do 21.

Linhagens celulares geneticamente distintas no mesmo indivíduo.

Ocorre por não disjunção mitótica.

Um dos problemas enfrentados em exames pré-natais a partir de vilosidades coriônicas

Exames pré-natais → mosaicismo confinado à placenta. Estuda o material extra-embriônico, será que ele equivale ao material embrionário?

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS EM NEONATOS

Quadro de incidências.

EFEITOS DO IMPRINTING GENÔMICO:

Molas hidatiformes:

Algumas mulheres tem diagnóstico de gravidez pelo beta-hCG e a ultrassonografia mostra um material dismórfico.

- atrofia fetal ou ausência de feto;

O material extraembrionário formando o concepto. Quando analisado percebe-se que ele é formado por células diplóides de origem paterna.

Formação: óvulo sem núcleo fecundado por um espermatozóide que depois multiplica seu material genético.

Por que mesmo sendo diplóide tendem ao aborto espontâneo? Alguns cromossomos que estão silenciados em um dos genitores não são expressos.

Teratomas ovarianos:

O contrário também acontece

- célula diplóide de origem materna.

Um óvulo cujo material foi duplicado e aí a geração de um concepto e forma um câncer.

Também não progride em função do imprinting genômico.

## DISTÚRBIOS MENDELIANOS COM EFEITOS CITOGENÉTICOS:

Alguns distúrbios mendelianos apresentam efeito citogenéticos.

A S. FraX é observável em citogenética.

Xeroderma pigmentoso (heterogeneidade de locus): sensibilidade à luz UV.

Ou seja, distúrbios monogênicos que podem trazer conseqüências citogenéticas.

## BASES CROMOSSÔMICAS DA DETERMINAÇÃO SEXUAL:

O cromossomo Y:

O que determina o sexo na espécie humana?

Basta a presença do Y para desenvolvimento do sexo masculino.

Quais genes são importantes no cromossomo Y.

Um gene no braço curto SRY determinante do sexo.

No braço longo do Y há genes que quando deletados estão relacionados com azoospermia ou oligospermia. (infertilidade)

Ou seja, genes determinantes do sexo e relacionados com a infertilidade.

Existe uma região do cromossomo Y chamada de região pseudo-autossômica que se parece com o X e que pode realizar crossing.

Embriologia do sistema reprodutivo:

A partir de uma gônada indiferenciada.

Se o indivíduo possui o cromossomo Y estimula-se a medula da gônada indiferenciada. Forma-se os testículos.

Se o indivíduo não possui o cromossomo Y estimula-se o córtex da gônada indiferenciada. Forma-se os ovários.

Formam-se os ductos de Muller e a genitália externa.

## GENE DETERMINANTE DO TESTÍCULO

TDF OU SRY.

## GENE DETERMINANTE DO TESTÍCULO

Sexo reverso: pessoas com fenótipo absolutamente masculino, mas sem o Y.

A pessoa tinha gônadas masculinas, mas cariótipo 46, XX. Também eram férteis.

As pessoas que apresentam o sexo fenotípico diferente do sexo genotípico formam o sexo reverso.

Também existem mulheres com genótipo 46, XY.

Os homens XX possuem uma região (SRY e TDF) que veio do Y no X.

As mulheres XY possuem um cromossomo Y sem a região SRY.

## O CROMOSSOMO X

Sofre inativação nas mulheres formando o corpúsculo de Barr. Homens normais não apresentam corpúsculo de Barr. Homens 47, XY apresentam um corpúsculo de Barr.

- Sempre há um X ativo e todos os outros vão estar inativos formando Barr.

- Existem genes que escapam à inativação nos cromossomos inativados.

- Inativação não aleatória do X, ou seja, preferencial:

+ Translocação que envolve X e autossomo: há um X normal e um translocado. Toda vez que o translocado for inativado, inativa o autossomo também. Gera-se uma monossomia parcial. As células que tem o X normal que foram inativados tem uma vantagem seletiva em relação às outras. Ou seja, o X normal vai ser preferencialmente inativado.

+ Inativação do X com deleção ou inserção que envolva um gene importante: inativação preferencial do X alterado.

O cromossomo X

O centro de inativação do X é o gene XIST.

O cromossomo X inativado tem o gene XIST ativo inativando o resto do cromossomo.

Alguns genes no cromossomo X estão relacionados ao desenvolvimento mental. Por isso homens prevalecem com RM.

#### DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL E GONADAL:

- Hipospadia branda nos homens: abertura do pênis é na região ventral.
- Genitália ambígua/ clitóris aumentado em mulheres.
- Hermafroditismo: tecido ovariano e testicular.

#### DISTÚRBIOS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL E GONADAL:

- Genes autossômicos ou genes ligados ao X que participam da conversão da gônada indiferenciada.

Ex. mulheres sexo-revertidas 46, XY. A duplicação do gene DAX1 em Xp21. Geneticamente um homem mas a duplicação faz desenvolver características femininas.

Displasia camptomélica (AD).

- SOX9 (17q) → Mutações nesse genes fazem com que 2/3 das mulheres sejam sexo reverso. 46, XY.

- SOX9 → duplicação geram homens sexo-revertidos com cariótipo feminino mas com fenótipo de homem.

#### PSEUDO-HERMAFRODITISMO FEMININO:

- cariótipo 46, XX (feminino).
- Tecido gonadal ovariano/ -
- Genitália ambígua.

Ex:

- hiperplasia adrenal congênita (AR)
- + deficiência de enzima do córtex da supra-renal;
- + biossíntese de cortisol;
- + a alta quantidade de crianças viriliza crianças do sexo feminino.
- + deficiência da 21-hidroxilase;
- + hiperprodução de precursores;
- + aumento dos níveis de andrógenos;
- + incidência de 1/2500.

#### MASCULINO:

- cariótipo 46, XY;
- testículos
- genitália ambígua.

Distúrbio de formação do testículo durante a embriogênese.

Ex: insensibilidade androgênica.

A testosterona é formada mas não é convertida na sua forma ativa. Não se liga ao receptor e não dispara a formação de genes. Também pode haver mutação no receptor das células alvo.

- deficiência do esteroide 5-alfaredutase (AR).

Converte testosterona em diidrotestosterona ou ausência de receptores androgênicos nas células alvo.

- feminilização da genitália externa dos homens afetados;
- pênis pequeno;
- genitália externa feminina, vagina em fundo cego sem útero ou trompas.
- pêlos pubianos e axilares raros;
- testículos normais localizados na região abdominal ou canal inguinal.

Citogenética bastante relacionada com abortos espontâneos e malformações congênitas.

## BASES BIOQUÍMICAS DAS DOENÇAS GENÉTICAS & ERROS INATOS DO METABOLISMO

Qual o erro bioquímico que explica a patologia das doenças. Inicialmente buscava-se erros em genes que codificam enzimas. Daí surgiu o termo erros inatos do metabolismo (doenças relacionadas com enzimas).

Também doenças em genes que codificam proteínas estruturais. Ex. DMD e FC

Conhecer as bases bioquímicas é importante para desenvolver estratégias melhores de tratamento e melhorar o prognóstico.

A maioria dos tratamentos genéticos não envolve cura.

### 1. Introdução:

- Padrão de expressão de proteínas:

+ Proteínas de manutenção: expressas no organismo inteiro.

+ Proteínas tecido-específicas.

Mutações nas proteínas de manutenção em geral é pior.

- Correlação genótipo X fenótipo → variação fenotípica de uma doença.

+ Heterogeneidade alélica: diferentes alelos, mutações que causam a mesma doença. Ex. FC.

+ Heterogeneidade de locus: mutações em diferentes genes que causam a mesma doença. Ex. Distrofia muscular de cinturas e Surdez hereditária não síndromica.

+ Genes modificadores: portadores da mesma mutação, mutação idêntica com portadores com manifestações mais graves e outros mais leves. Os genes modificadores fazem com que o fenótipo de determinada doença seja modificado. São genes difíceis de serem localizados.

- Distúrbio do metabolismo: células, tecidos e órgão são formados por substâncias que precisam ser metabolizadas por enzimas.

As enzimas são codificados por genes. Como os alelos dos genes podem gerar enzimas que codifiquem melhor ou pior do que aquele produto.

### 2. Doenças metabólicas:

Variantes comuns na população:

- efeito fenotípico leve.

Ex. angiotensinogênio.

Alelo que predispõe à hipertensão e pré-eclampsia.

No estudo dessas doenças metabólicas deve-se ter cuidado com fenocópicas (mesmo sintoma mas etiologias diferentes). O cuidado é importante porque o tratamento pode variar dependendo da etiologia.

Triagem neonatal das variantes mais comuns: Ex. fenilcetonúria.

Autossômico recessivo.

Heterozigoto portador normal X H P normal → risco de  $\frac{1}{4}$ .

Defeitos dos processos metabólicos:

- Enzimas

- Síntese, transferência, degradação.

### 3. Histórico:

Erros inatos do metabolismo é termo proposto pelo pesquisador da Alcaptonúria (urina escura e artrite). Garrod propôs em 1902 que cada indivíduo apresentava uma individualidade química e que esses pacientes apresentavam ERROS INATOS DO METABOLISMO.

Hoje esse conceito forma a Base da genética bioquímica contemporânea.

Na via metabólica da fenilalanina existe uma enzima (oxidase do ácido homogentísico) que em carência gera um excesso do substrato ácido homogentísico. Esse ácido é encontrado e excretado em altas quantidades na urina. Esse substrato em excesso pode seguir algumas vias alternativas e produtos da oxidação desse substrato podem ser depositados nos tecidos conjuntivos gerando as artrites. Nesta mesma via bioquímica se houve alteração de outras enzimas há outras doenças.

#### 4. Metabolismo de aminoácidos.

##### Hiperfenilalaninemias:

Alta taxa de fenilalanina no soro. Na maioria dos casos o erro está na fenilalanina hidroxilase. Os pacientes tem como principal sintoma o RM grave. Existe uma fração pequena de pacientes que também apresenta mutações no cofator dessa enzima (BH4-tetraidropterina).

Esse cofator também atua em outros fatores como a tirosina e triptofano hidroxilase gerando deficiência de dopamina e serotonina.

A fenilalanina em excesso altera o desenvolvimento do SNC. Ela entra em vias metabólicas alternativas produzindo ácido fenilcetopirúvico que é excretado na urina.

É um exemplo de heterogeneidade alélica.

Defeito bioquímico	Enzima afetada	Loc gênico
PKU clássico	PAH <1% ativ (>1mM Phe)	12q24.1
PKU variante	PAH atividade residual	12q24.1
Hiperfenilalaninemia não-PKU	PAH atividade residual (<1mM Phe)	12q24.1

A não-PKU não gera RM.

Mutações no mesmo gene, mas mutações diferentes podem fazer com que a enzima não tenha atividade (mais severas) ou tenha atividade quase normal (mutações muito leves).

Genes que participam da síntese ou reciclagem do cofator também gera a doença. Heterogeneidade de locus.

Defeito bioquímico	Enzima afetada	Loc gênico
Reciclagem bloqueada de BH4		
Síntese bloqueada de BH4		

As mães ao quando casam com uma pessoa não aparentada (provavelmente AA). Como o filho é heterozigoto eles não deviam manifestar RM. Mas se a mãe não faz dieta de fenilalanina pode gerar RM no filho. O excesso de fenilalanina da mãe pode gerar RM no feto.

As crianças desenvolvem RM não em função de seu genótipo e sim da sobrecarga da substância materna. Existem diferentes mutações com diferenças proporcionais regionais.

Na fenilcetúria há várias mutações. Alguns pacientes são homozigotos: portadores da mesma mutação. Encontrados em família.

- Heterozigoto composto: duas mutações diferentes no mesmo gene.

#### 4.2 Tirosinemia hereditária tipo I

- acúmulo de substrato mutagênico e tóxico para o fígado.
- disfunção renal, neuropatia periférica aguda;
- doença hepática progressiva,
- propensão à cirrose e câncer de fígado.

#### 5. Metabolismo de carboidrato:

Galactosemia:



Galactosemia clássica:

Falta de desenvolvimento;

Insuficiência hepática

Catarata

Retardo do desenvolvimento

Longo prazo: pouco crescimento, RM, insuficiência ovariana. Mesmo para indivíduos tratados na infância.

Deficiência na GAL-1-P-uridil-transferase.

5.2 Frutose, glicose, glicogênio, lactose:

Várias genes que mutados geram doenças específicas bem descritas.

## METABOLISMO DE CARBOIDRATOS.

Conjunto: GENES + AMBIENTE (doenças multifatoriais).

Diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1)

- ausência de insulina, manifesta na infância;

Diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2)

- resistência à insulina, adulta;

Diabetes de início na maturidade (MODY)

6. Defeitos no metabolismo de purinas

Síndrome de Lesch-Nyhan (lig X):

Mutação na enzima HPRT que participa do metabolismo da guanina.

Os pacientes desenvolvem:

- coreoatenose (distúrbio do movimento);

- espasticidade;

- RM;

- Aumento de ácido úrico → gota e cálculos renais.

- Auto-mutilação.

Algumas mutações leves fazem com o que paciente não tenha a doença mas tenha aumento de ácido úrico.

Exemplo de heterogeneidade alélica.

7. Metabolismo de lipídios:

Quando o indivíduo está em jejum prolongado, os lipídios são quebrados para geração de energia. Então, defeitos nessas enzimas, fazem com que pessoas com jejum prolongado desmaiem.

Deficiência de MCAD, LCHDA e SCAD.

MCAD → Deficiência de acil CoA desidrogenase de cadeia média;

LCHDA → de cadeia longa.

SCAD → de cadeia curta.

O tratamento é evitar que os pacientes fiquem em jejum prolongado.

8. Vias de degradação:

DISTÚRBIOS DE ARMAZENAMENTO LISOSSÔMICO

- Lisossomos: os substratos não degradados se acumulam no lisossomos das células.

+ enzimas hidrolíticas deficientes.

+ acúmulo de substratos

+ morte celular  
(progressão clínica).

O exemplo mais típico são as Mucopolissacaridoses – MPS.

Deficiência de degradação das GAGS (a partir das proteoglicanas da matriz extracelular).

Sintomas clínicos: face grosseira & perda auditiva; RM e problemas comportamentais; hepatoesplenomegalia e disostose múltipla.

O tratamento é administrar as enzimas que estão faltando.

Doença de Hurler e de Scheie foram classificadas apenas clinicamente. Causam deficiência na alfa-L-iduronidase. Os pacientes com quadro clínico grave foram classificados como Hurler e os leves como Scheie e os com quadros intermediários como Hurler-Scheie. O desenvolvimento da tecnologia permitiu ver que elas são causadas por mutações no mesmo gene. Deste modo a doença de Hurler e a de Scheie foram classificadas como mucopolissacaridoses do tipo I. São doenças AR.

## 8.2. Doença de Tay-Sachs:

A enzima não degrada corretamente o gangliosídeo G. As crianças nascem normais e aos 4, 5 meses apresentam uma doença neurológica progressiva.

## 9. Sistema de transporte:

Ex. transporte anormal da cisteína.

Cistinúria → tendência a cálculos renais.

Co-fatores: oligoelementos → íons ou metais pesados.

Homeostasia normal → evita a estocagem tóxica destes elementos.

Doença de Wilson relacionada ao transporte deficiente de cobre.

## 10. Ciclo da uréia:

Evita o acúmulo de restos nitrogenados.

Incorpora nitrogênio à Uréia.

Excretada pelos rins → ciclo da uréia → síntese novamente de Arginina.

Os pacientes com deficiência nas enzimas gera um acúmulo de precursores da uréia (amônia e glutamina).

Clínica: letargia progressiva (distúrbio neurológico que pode levar ao coma).

Existe uma heterogeneidade muito grande: casos graves e leves.

## 11. Produção de energia:

Vias bioquímicas a partir de vários substratos (glicose, ácidos graxos, aminoácidos).

Não só componentes sintetizados pelo genoma nuclear como também pelo genótipo mitocondrial.

Fenótipo varia de acordo com o erro.

## 12. Defeito em proteínas não-enzimáticas:

### 12.1 Hipercolesterolemia familiar: Padrão de herança AD com efeito de dosagem.

O receptor de LDL é sintetizado no RE e depois de passar pelo complexo de Golgi é expresso na membrana celular. Quando ele se liga ao seu ligante ele forma uma cobertura de clatrina que faz com que a substância seja endocitada. Parte da vesícula volta para membrana e parte vai para os lisossomos para serem degradadas.

As mutações são agrupadas de acordo com o problema causado:

Classe I: a mutação é tão grave que a proteína não é expressa.

Classe II: a proteína é expressa mas não é transportada do RE para o golgi.

Classe III: há problemas na ligação receptor/ligante.

Classe IV: problemas no agrupamento de clatrina na vesícula dentro da célula.

Classe V: problemas de reciclagem desse receptor.

### 12.2 FC:

Mutações no gene CFTR que também podem ser agrupadas de acordo com o problema que causa na proteína:

Classe I: proteína não sintetizada, ausente.

Classe II: defeito no processamento.

Classe III: defeito na regulação.

Classe IV: defeito na condução por problemas na condução do canal de cloro.

### 12.3 Defeitos em proteínas estruturais/regulatórias.

DMD e DMB: proteína deficiente é a distrofina.

DMD: ausência total de proteína.

DMB: pouca de proteína.

O tipo de mutação. Mutações que alteram o quadro de leitura não tem a proteína funcional (DMD) e mutações que não alteram o quadro de leitura (DMB).

Pacientes com DMB podem apresentar mutações de mais de 60% do gene. Quando essa deleção foi investigada percebeu-se que ela estava bem no meio do gene e não na extremidade. Então, as regiões terminais da proteína estavam conservadas mesmo as regiões em bastão tendo sido deletadas. Só assim já é possível ligação da proteína.

Numa das extremidades a distrofina se liga a proteínas do citoesqueleto (Ex. actina) na outra extremidade ela se liga a proteínas de membrana. A distrofina então é marcada na membrana da célula.

Nos pacientes com distrofia, na fase ativa, onde as fibras estão se rompendo é encontrada altas taxa de CK no soro. Os pacientes em estado terminal apresentam taxas de CK normais porque os pacientes não tem quase nenhuma fibras muscular para se romper.

### DM cinturas:

Mutações em outras proteínas que não a distrofina.

Quando investiga-se a distrofina e ela está presente em forma normal é sugestivo de outro tipo de distrofia.

### Osteogênese imperfeita:

Caracterizada por mutações no gene do colágeno tipo I.

Os pacientes apresentam fragilidade óssea muito grande. Sofrem fraturas só por esbarrar.

Na forma letal a criança nasce cheia de fraturas com morte neonatal.

Casos desde graves a leve.

O colágeno I é formado por duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2.

Autossômica dominante.

Proporção de cadeias normais X recessivas:

A cadeia do colágeno I é formada por duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2.

Nos pacientes com mutação na cadeia alfa 1 que altere o quadro de leitura a proteína não é sintetizada ou se for sintetizada vai ser degradada. A proteína alfa 1 codificada pelo alelo normal vai ser normal.

O gene da cadeia alfa 2 é normal e codifica normais.

Esse paciente forma só fitas normais, mas algumas em menor quantidade.

O indivíduo não é normal porque há uma quantidade reduzida de colágeno.

Esse tipo de alteração gera um alelo chamado de nulo e causa a osteogênese das mais leves, tipo I.

Classificação clínica

Tipo I: leve.

Tipo II: forma letal.

Tipo III: forma mais grave.

Tipo IV: forma intermediária ou de quadro clínico moderado.

Os pacientes podem apresentar mutação que faz com que a proteína seja sintetizada alterada.

2 cadeias normais de alfa 1 e um normal de alfa 2 = colágeno normal.

1 cadeia mutada alfa 1 + 1 cadeia normal alfa1 + normal alfa2:

2 cadeias mutadas de alfa1 + uma cadeia normal de alfa 2:

1 cadeia alfa normal + 1 cadeia alfa 1 mutada + normal alfa2

1 proteína normal para cada três proteínas alteradas.

Se a mutação for na cadeia alfa 2 vai haver 50% de proteína normal para 50% de proteína alterada.

12.4 Distúrbios neurodegenerativos com padrão de herança multifatorial:

Ex. doença de Alzheimer, Doença de Parkinson.

12.5 doenças que envolvem DNA mitocondrial.

13. Farmacogenética:

Se baseia na resposta diferente entre diferentes indivíduos que tomam o mesmo medicamento.

- variabilidade na resposta a drogas;

- variabilidade genética;

Acredita-se que as drogas precisam ser metabolizadas por enzimas. Essas enzimas por sua vez são codificadas por genes. Alelos diferentes numa população podem codificar enzimas mais eficientes ou menos eficientes na degradação de um substrato.

Há um padrão de herança multifatorial.

Dois exemplos esclarecedores a nível genético de qual é o erro:

Reações adversas a drogas:

Hipertermia maligna (AD):

- resposta adversa intensa a anestésicos comuns de inalação e relaxantes musculares (ex. halotano e cloreto de succinilcolina).

Sinais:

- aumento de temperatura;

- parada na contração muscular;

- hipercatabolismo;

Apesar de ser AD tem incidência maior em crianças do que adultos e em homens do que mulheres.

→ níveis elevados de cálcio ionizado nos retículos.

50% dos casos podem ser esclarecidos: mutações no gene RYR1 que participam da formação do canal de liberação de cálcio.

Trata-se de uma doença com penetrância incompleta.

Conduta: sódio dantrolene e uso de anestésicos alternativos.

Deficiência de Glicose-6-fosfato-desidrogenase:

Enzima codificada por gene localizado no cromossomo X.

Expressa em todo organismo.

Alterações são encontradas em 10% dos homens afro-americanos.

As pessoas com alteração nessas enzimas em condições normais não desenvolvem nada. Só desenvolvem hemólise quando em contato com algumas drogas.

- susceptíveis a hemólise induzida por drogas. Ex. drogas antimaláricas, primaquina, antibióticos sulfonamida, sulfonas como a dapsona, a naftalina, etc.  
Mutação no gene G6PD que responde pela produção de NADH.

- nessas pessoas há um dano oxidativo maior levando à hemólise.