

Marcadores moleculares no estudo da Evolução

Meta da aula

Definir marcadores moleculares, descrever os principais métodos moleculares e avaliar, pelas características de cada marcador, o mais adequado para o estudo de diferentes problemas em evolução.

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Enumerar os principais tipos de marcadores moleculares.
- Dar exemplos de problemas em evolução que podem ser estudados com marcadores moleculares.

Pré-requisito

Para acompanhar bem esta aula, é importante que você domine as informações básicas de Biologia Molecular, especialmente os Módulos 1 e 2. Seria bom também que você revisse a aula sobre Filogenia na disciplina Diversidade dos Seres Vivos. Para entender por que os marcadores moleculares constituem boa ferramenta para o estudo da evolução é importante, ainda, que aulas anteriores, sobre frequências gênicas e genotípicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg, estejam claras para você.

INTRODUÇÃO



RICHARD C. LEWONTIN

Nasceu nos Estados Unidos da América, em 1929; trabalha atualmente na Universidade de Harvard e é um dos mais importantes evolucionistas vivos. Juntamente com J. L. Hubby, foi um dos pioneiros na utilização de métodos moleculares para estudo da Genética de Populações.

ALOENZIMAS

As proteínas podem ser classificadas como estruturais (aquelas que participam como blocos constitutivos das células) ou enzimas (aquelas que participam das reações bioquímicas). Dentre as enzimas, encontramos as isoenzimas, que são aquelas que atuam sobre o mesmo substrato. Se as isoenzimas resentam padrão mendeliano de herança, dizemos que são aloenzimas, ou seja, comportam-se como diferentes alelos de um loco.

O estudo da Genética de Populações depende de técnicas efetivas para observação e mensuração da variação gênica presente nas populações naturais. Nas Aulas 5 (Frequências gênicas e genotípicas e heterozigosidade), 6 (Equilíbrio de Hardy-Weinberg: aplicações, implicações) e 7 (Equilíbrio de Hardy-Weinberg: violações dos pressupostos), você estudou como essa variação pode ser descrita.

Nos primeiros 30 anos, após a proposição da teoria sintética da Evolução (1930-1932), a variação estudada pelos pesquisadores era, principalmente, fenotípica com herança mendeliana clássica (como, por exemplo, diferenças de cor ou formato dos olhos da mosca-da-fruta; diferenças de tipo de crista em galinhas; cor da pelagem em preás; grupos sanguíneos em humanos etc.) e cromossômica (padrão de bandas, inversões etc.). Foi na década de 1960, que **RICHARD C. LEWONTIN** e J. L. Hubby, para estudar a variação gênica presente em populações naturais, introduziram uma técnica de separação de proteínas muito utilizada em Bioquímica: a eletroforese de aloenzimas. Começou, naquele momento, o uso de nova ferramenta para o estudo da Evolução: os marcadores moleculares.

AS FERRAMENTAS

No estudo da Evolução, são chamados marcadores moleculares aquelas moléculas que representam locos gênicos e apresentam alguma variabilidade, de modo que possam ser usadas para inferências a respeito dos padrões de diversidade dos organismos. As moléculas biológicas mais utilizadas para estudo da variação gênica são as proteínas e o DNA. As tecnologias mais utilizadas são eletroforese de **aloenzimas** e, mais recentemente, várias técnicas de amostragem de DNA. Vamos entender o que são essas técnicas e como funcionam.

Eletroforese de aloenzimas

A eletroforese pode ser definida, de maneira geral, como migração de partículas sob ação de corrente elétrica. No caso da eletroforese de **ALOENZIMAS**, a técnica se baseia, primeiramente, nas características físico-químicas das proteínas; ou seja, é sabido que dos vinte aminoácidos, cinco possuem carga elétrica, três dos quais (lisina, arginina e histidina) positiva, e os demais (ácido glutâmico e ácido aspártico), negativa.

Tal fato faz com que proteínas diferentes possam apresentar cargas diferentes, movimentando-se com diferentes velocidades, sob a ação de campo elétrico; em outras palavras: diferentes proteínas podem manifestar diferentes mobilidades eletroforéticas.

Outro fato importante é que, pelos princípios da Biologia Molecular, espera-se certa correspondência entre a seqüência de nucleotídeos no DNA e a seqüência de aminoácidos na proteína por ele codificada, isto é, entre o gene e seu produto (ver Aula 6 do curso Diversidade dos Seres Vivos: Introdução às macromoléculas). Finalmente, é sabido que a atividade e, portanto, a presença de algumas enzimas, pode ser visualizada em extratos simples de organismos, através de coloração histoquímica.

Para se realizar uma eletroforese, algumas condições básicas são necessárias:

1 – fonte de eletricidade que produzirá campo elétrico, em função do qual as partículas, no caso as enzimas, estarão deslocando-se;

2 – suporte (geralmente gel de amido, agarose ou poliacrilamida) onde serão aplicadas amostras dos organismos que se quer estudar, no qual o campo elétrico estará agindo;

3 – extração das enzimas, que é feita a partir da homogeneização de indivíduos inteiros (caso de pequenos insetos, por exemplo), órgãos ou tecidos (caso de organismos maiores, como peixes, camundongos ou o próprio homem);

4 – coloração histoquímica, que é a precipitação, oxidação ou fluorescência de um corante em função das reações catalisadas pelas enzimas;

5 – interpretação dos padrões observados.

A eletroforese de aloenzimas está representada na **Figura 8.1**. Observe, nesta figura, as condições que foram descritas acima.

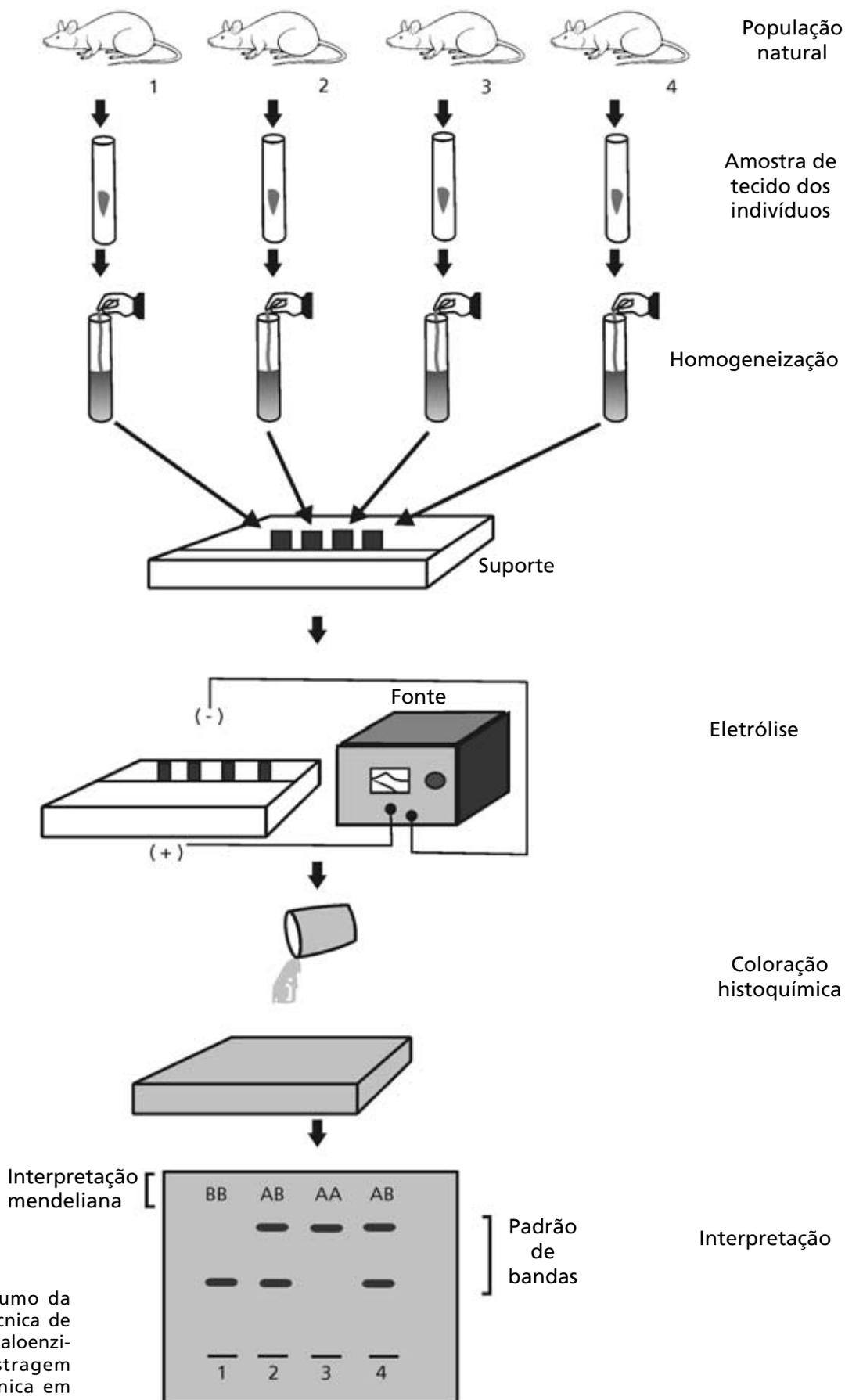


Figura 8.1: Resumo da aplicação da técnica de eletroforese de aloenzimas para amostragem da variação gênica em populações naturais.

Como você pôde verificar na **Figura 8.1**, existe entre os indivíduos amostrados uma variação no padrão de bandas observadas. Essa variação pode ser interpretada diretamente como variação gênica. A interpretação é simples: indivíduos que apresentem apenas uma banda no gel são interpretados como homozigotos (AA ou BB); indivíduos que apresentem as duas formas da enzima, com mobilidades eletroforéticas diferentes, são interpretados como heterozigotos (AB). Como você já deve ter deduzido, o padrão de bandas na eletroforese de aloenzimas é co-dominante (ver Aula 8 do curso de Genética básica: do gene ao fenótipo).

ATIVIDADE



1. Observe a interpretação mendeliana do gel de eletroforese da **Figura 8.1** e responda:

- Quantos alelos estão presentes nessa população?
- Quais as frequências genotípicas?
- Quais as frequências gênicas?

Respostas:

- 2 alelos, A e B
- $f(AA) = 25\%$; $f(AB) = 50\%$; $f(BB) = 25\%$ ou 1:2:1
- $f(A) = f(B) = 0,5$

RESPOSTA COMENTADA

Você acabou de realizar uma descrição sucinta da variação gênica nesta população. Para tanto, você utilizou não só as facilidades do método de eletroforese, mas, também, os seus conhecimentos sobre frequências gênicas e genotípicas.

O uso de eletroforese como método de estudo da variação gênica em populações incorre, no entanto, na aceitação de algumas limitações; entre elas, aquelas que dizem respeito à quantidade de variação capaz de ser detectada. Por eletroforese de aloenzimas, não é possível detectar substituições de aminoácidos que não mudam a carga da proteína, alterações silenciosas no DNA e variação em íntrons (ver Aula 22 do curso de Biologia molecular: processamento do RNA). Como consequência, em eletroforese estaremos sempre falando de quantidade de variação menor que aquela existente de fato. Talvez, a maior limitação desse método resida no fato de que a variação amostrada por eletroforese seja, na realidade, variação fenotípica, e não genotípica. Duas consequências advêm daí: primeiro, que conceitos como heterozigosidade e homozigosidade ficam relativizados, já que se trabalha com produtos dos genes; segundo, que os chamados alelos (melhor seria a designação técnica de alelomorfos) são afetados não só por possíveis alterações pós-transcricionais, como também pela ação do ambiente e, ainda, por condições de estocagem do material a ser analisado (tempo, refrigeração etc.).

Para além das suas limitações, a utilização da técnica eletroforética oferece muitas vantagens, como, por exemplo, fácil preparação de extratos a ser utilizados. Acima de tudo, a interpretação mendeliana das frequências obtidas em seus padrões de bandas (observe, de novo, a **Figura 8.1**) é uma das maiores vantagens da eletroforese e também o que faz dela não só uma técnica, mas um método de estudo dos problemas em Genética de populações. Desse modo, a eletroforese é, até os dias de hoje, reconhecidamente, um dos métodos mais eficazes na detecção e amostragem de variação genética em populações.

Técnicas de DNA: PCR

Com o desenvolvimento, na década de 1970, da **TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE**, a Genética de populações pôde ter acesso à variação gênica presente nas seqüências de DNA. Com a possibilidade de extrair, cortar e unir DNA exógeno em vetores como fagos e plasmídeos, tornaram-se possíveis a amplificação e o seqüenciamento do DNA.

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

Tecnologia do DNA é o nome que se dá ao conjunto de técnicas de Engenharia genética, como a clonagem e a reação em cadeia da polimerase (PCR em inglês). Essas técnicas consistem, basicamente, na possibilidade de cortar, unir e inserir seqüências do DNA de uma espécie em outra. Isso se tornou possível com o entendimento do fenômeno da restrição, que é a impossibilidade de reprodução de certas linhagens de vírus dentro de certas linhagens de bactérias. Esse fenômeno se deve à ação das endonucleases de restrição, que são enzimas capazes de reconhecer uma seqüência específica de bases do ácido esoxirribonucléico (DNA) e de romper, por clivagem da molécula, a continuidade da dupla-hélice. O mecanismo de restrição cumpre o importante papel de proteger a bactéria do ataque do vírus. Uma característica importante desse fenômeno é que a clivagem é assimétrica e característica para cada tipo de enzima de restrição; por isso, os fragmentos formados pela ação das enzimas são de tamanhos variáveis, mas, fundamentalmente, com extremidades que apresentam seqüências de bases semelhantes. Assim, mesmo que se utilizem DNAs de origens diferentes (espécies diferentes, por exemplo), os fragmentos têm em comum a assimetria e a complementaridade das suas extremidades. Isso possibilita o pareamento indiscriminado dos fragmentos. A soldagem posterior é efetuada por outra enzima, a ligase; dessa forma, são obtidas moléculas híbridas de DNA. Esse é o fundamento da Tecnologia do DNA recombinante.

Para ser trabalhado, o DNA necessita primeiramente ser extraído das células. Bem diferente do que acontece com a eletroforese de aloenzimas, a extração do DNA não se dá simplesmente pela homogeneização de tecidos. Esse processo de extração ocorre, geralmente, com uma primeira etapa de tratamento dos tecidos com enzimas que degradam proteínas e detergentes os quais destroem as membranas celulares. Numa etapa posterior, o DNA é extraído, limpo e precipitado pela ação de algumas substâncias, tais quais fenol, clorofórmio e álcool. Extraído o DNA, o processo subsequente é, geralmente, aplicação da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), em que dois pequenos oligonucleotídeos iniciadores são usados para amplificar a região de DNA por eles flanqueadas.

A reação de PCR ocorre em uma máquina chamada termociclador, que repete vários ciclos de três temperaturas: a primeira, para desnaturar o DNA e parar todas as reações enzimáticas; a segunda, para que os iniciadores possam se unir à fita molde de DNA; e a última, para que o processo enzimático de replicação do DNA seja levado a cabo. O ambiente químico dessa reação contém, além dos iniciadores e da fita molde de DNA, a enzima que polimeriza a reação (uma DNA polimerase que tolera temperaturas elevadas, a *Taq* DNA polimerase), o material para construir as novas fitas de DNA (dNTPs) e um co-fator que auxilia a reação (geralmente $MgCl_2$), tudo isso dissolvido em água destilada, filtrada e estéril. A cada ciclo completo de reação, o processo se repete com a replicação exponencial do DNA e, ao final do processo, obtém-se um grande número de cópias do segmento de DNA flanqueado pelos iniciadores.

Parece complicado, mas não é! As etapas do PCR estão ilustradas na **Figura 8.2**. Observe, nesta figura, os detalhes sobre as temperaturas geralmente utilizadas no processo de PCR e como ele forma um ciclo que leva à multiplicação exponencial de uma molécula molde de DNA.

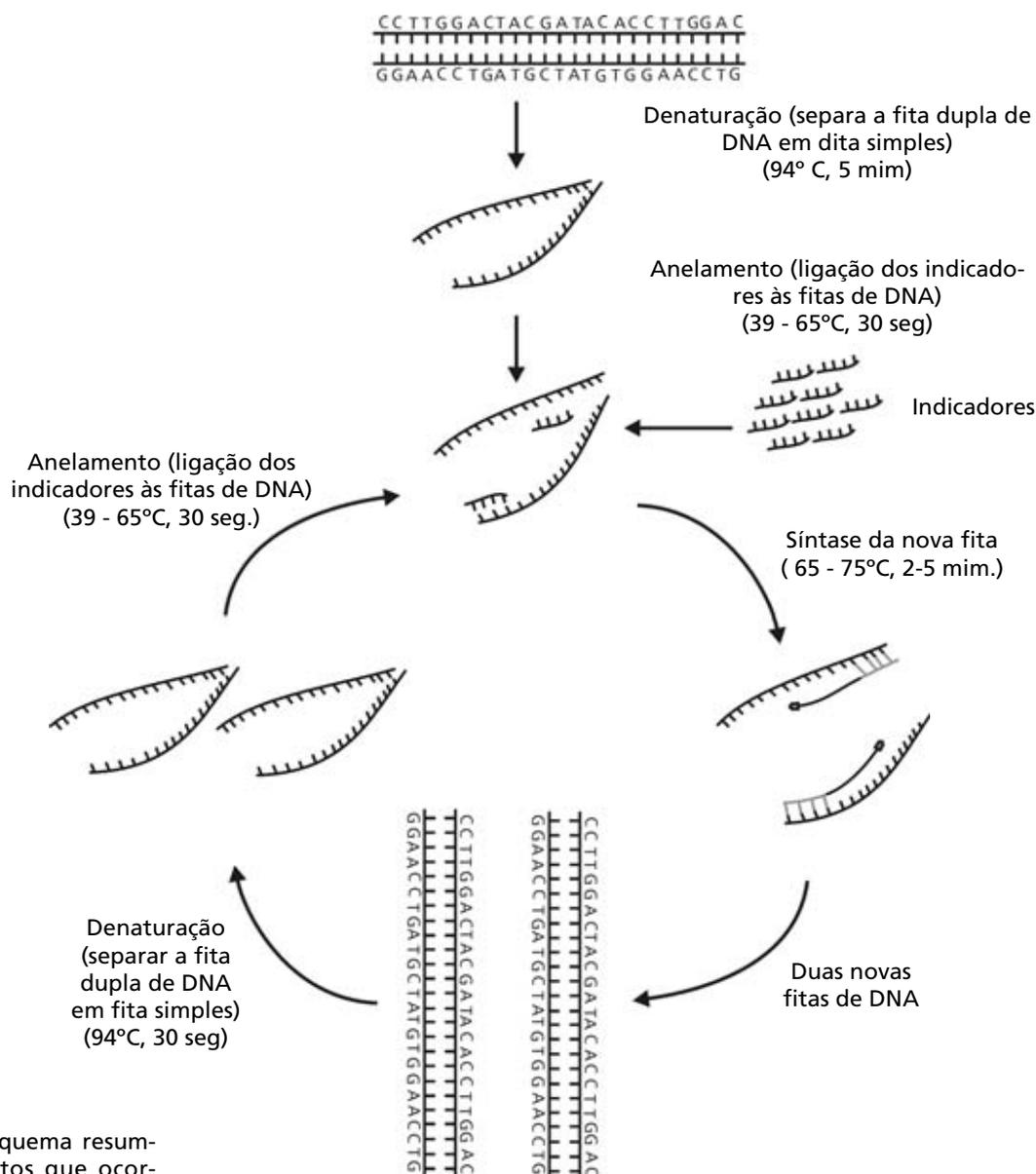


Figura 8.2: Esquema resumindo os eventos que ocorrem com o DNA durante a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Obtidos os segmentos de DNA produzidos pelo PCR, precisamos fazer agora uma eletroforese para separar esses fragmentos em função do seu tamanho e estrutura. O suporte das eletroforeses de DNA são, geralmente, géis de agarose ou poliacrilamida. A visualização desses

segmentos se dá pela coloração desses géis por substâncias como brometo de etídio ou prata, que revelam a variação como bandas em diferentes posições no gel. Cada banda corresponde a um grupo de moléculas de mesmo tamanho. Um padrão diferente de bandas entre indivíduos significa diferença genética entre eles. O conjunto dessa variação interindividual representa a variação gênica da população, que pode ser a mesma ou variar entre as populações, em função da ação das forças evolutivas.

Técnicas de DNA 2: Sopa de letrinhas

A variação gênica, presente no segmento de DNA obtido pelo PCR, pode ser estudada de várias formas. Se o segmento amplificado contém seqüências repetitivas que variam em número, o tamanho do segmento irá variar entre os indivíduos da população. Esse é o tipo de variação gênica presente em microssatélites (repetições constituídas de dois a cinco pares de bases) e minissatélites (até 10, 20 pares de base de repetição) de locos único. Nesses casos, a interpretação dos padrões de bandas é equivalente àquele obtido por aloenzimas. Nos casos de minissatélites que apresentam mais de um loco no genoma, ou seja, locos múltiplos, o padrão de bandas é mais complexo, sendo chamado, então, de *fingerprints* (palavra em inglês que significa impressão digital). Minissatélites de locos múltiplos são assim chamados porque apresentam um conjunto tão grande de bandas (equivalentes aos diferentes alelos de cada loco), que é muito difícil encontrar dois indivíduos que partilhem do mesmo padrão. É por isso que se diz que o padrão de bandas equivale a uma “impressão digital molecular”. Para que fique mais claro o que estamos descrevendo, veja o esquema da **Figura 8.3**, que ilustra os padrões de minissatélites de loco único e locos múltiplos.

Locos de Minissatélite

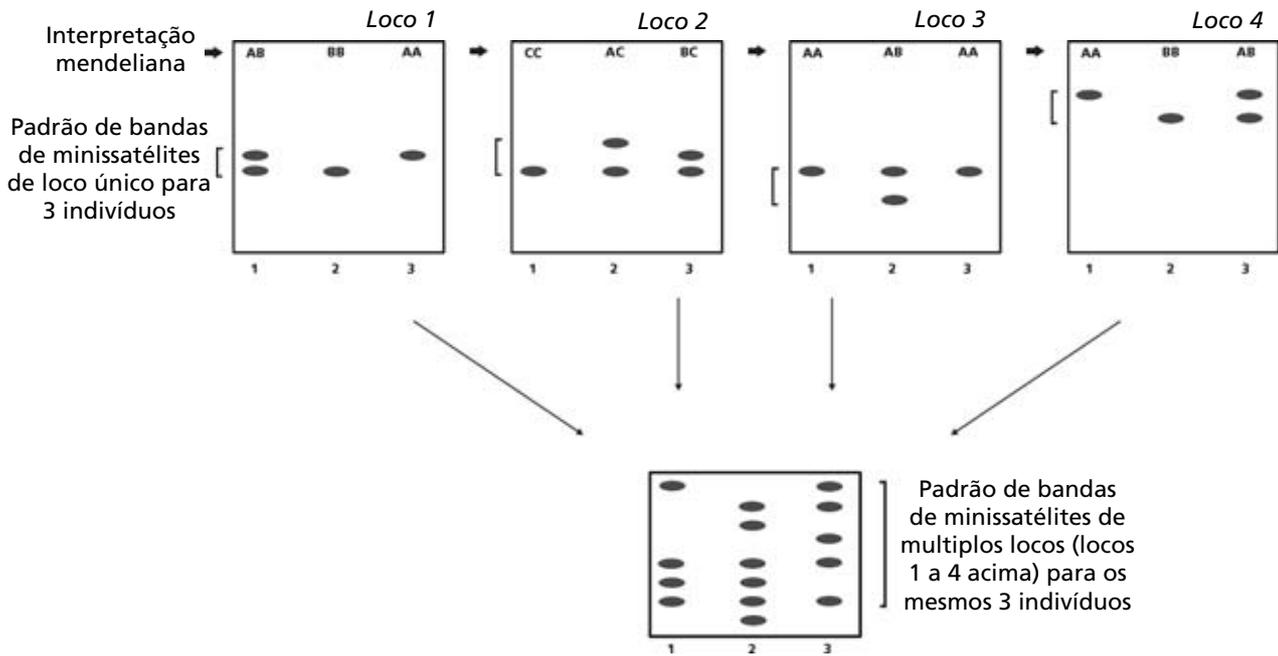


Figura 8.3: Esquema representando os padrões de bandas obtidos para quatro locos de minissatélite de loco único e o padrão de *fingerprint* (minissatélite de múltiplos locos) que seria obtido pela composição deles.

A variação gênica em micro e minissatélites tem origem em inserções e deleções dessas repetições (pequenos blocos de nucleotídeos que são ganhos ou perdidos). Outra forma de variação gênica que pode ser amostrada pelas técnicas de DNA é aquela que tem origem em mutações pontuais (mutações gênicas de substituição de bases; ver Aula 13 de Biologia molecular: mutação e reparo do DNA). Nesse caso, o estudo pode ser feito pelo sequenciamento total do segmento (ver Aula 6, do curso Grandes temas em biologia: como se obtém a seqüência de uma molécula de DNA ou de RNA) ou, ainda, pela utilização de enzimas de restrição (polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição, RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

As enzimas de restrição (ou endonucleases de restrição) são capazes de “digerir” uma seqüência específica de DNA dupla-fita, de quatro, cinco ou seis pares de base (bp) de comprimento. Essas enzimas foram isoladas e purificadas de bactérias, nas quais agiam protegendo a célula contra a invasão de DNA exógeno (uma infecção por vírus, por exemplo). O DNA da bactéria é protegido da ação dessas endonucleases de restrição por um sistema específico de marcação do seu DNA por moléculas de metila (processo denominado metilação).

A técnica de RFLP envolve a utilização de enzimas de restrição que irão cortar o DNA, amplificado pelo PCR, em função do reconhecimento de seqüências específicas. Por exemplo, a enzima de restrição *Eco* RI, — assim chamada por ter sido extraída da bactéria *Escherichia coli* — reconhece e digere a seqüência específica 5'-GAATTC-3'. Assim, diferentes indivíduos, numa dada população, poderão apresentar, para a mesma seqüência de DNA, diferentes mutações. Essas mutações podem determinar que a enzima de restrição *Eco* RI não reconheça mais um sítio de restrição (se mudar a seqüência de 5'-GAATTC-3' para 5'-GTATTC-3', por exemplo) ou, alternativamente, que passe a reconhecer um novo sítio (a operação inversa, por exemplo, mudando uma seqüência 5'-GTATTC-3' para 5'-GAATTC-3'). Muito complicado? Então, observe a **Figura 8.4**, pois ela pode auxiliar você a entender esse processo.

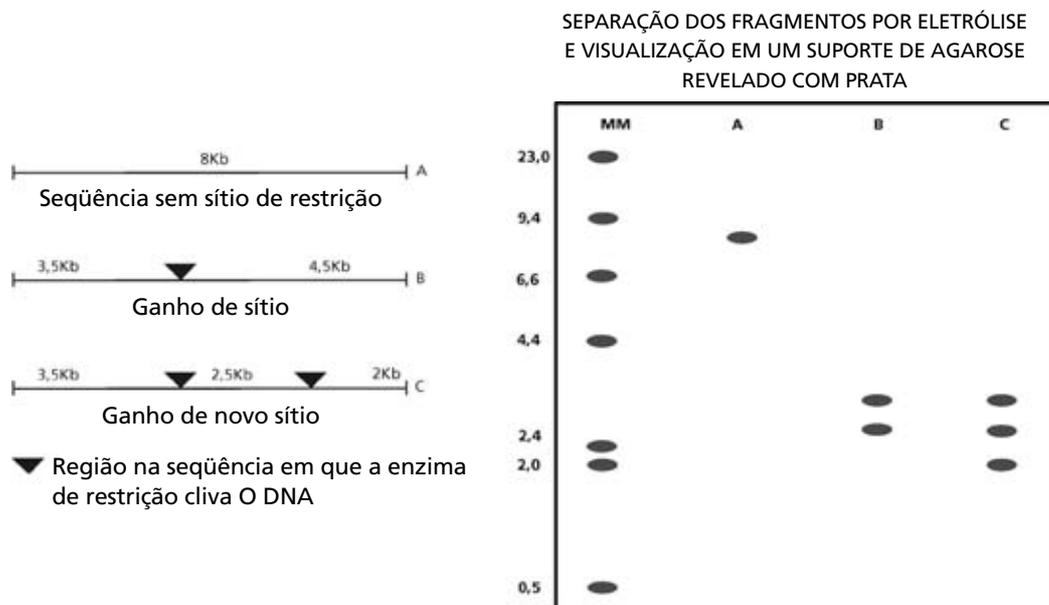


Figura 8.4: Mapa de restrição indicando o padrão de corte de uma determinada enzima e um esquema representando a separação dos fragmentos em um suporte (gel de agarose ou poliácridamida) e seus respectivos tamanhos em **Kb**. MM é um marcador molecular que apresenta um conjunto de bandas com tamanhos conhecidos.

Ficou mais claro para você, agora? É interessante notar que o padrão mostrado na **Figura 8.4** é haplóide, ou seja, é para uma seqüência única de DNA que se origina de um cromossomo apenas. Para organismos diplóides, a seqüência tem origem de um par de cromossomos. Desse modo, o indivíduo apresentará um padrão semelhante àqueles mostrados na **Figura 8.4** (A, B ou C) apenas se for homocigoto. No caso de indivíduos heterocigotos, o padrão de bandas será uma composição

KILOBASE (Kb)

É uma unidade de medida de peso molecular do DNA. 1kb significa um conjunto de 1.000 nucleotídeos.

dos três padrões representados: AB, AC ou BC. Assim, para o exemplo dado, poderemos ter seis padrões distintos de bandas, que equivalem aos seis genótipos possíveis, se considerarmos os três padrões haplóides como alelos: AA, BB, CC, AB, AC e BC. Entendeu? Então, tente realizar a atividade a seguir.

ATIVIDADE

2. Qual é o genótipo dos três indivíduos representados na Figura 8.5?

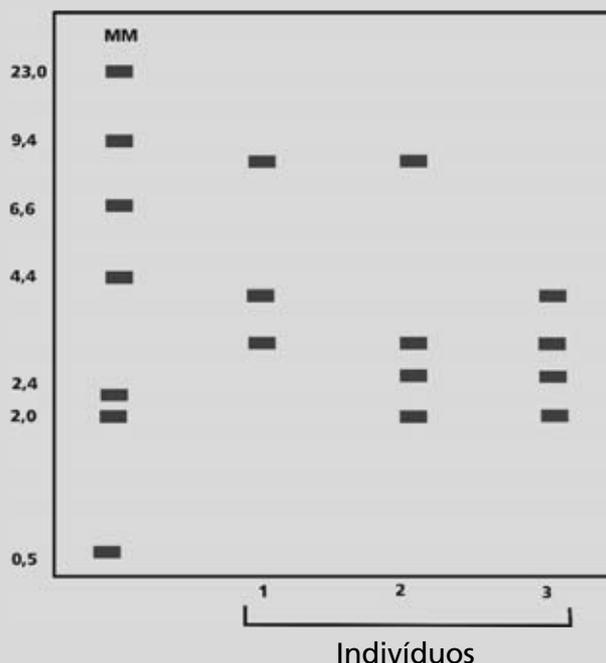


Figura 8.5: Esquema representando a separação dos fragmentos de restrição em um suporte (gel de agarose ou poliacrilamida) e seus respectivos tamanhos em kb. MM é um marcador molecular que apresenta um conjunto de bandas com tamanhos conhecidos.

RESPOSTA COMENTADA

Você identificou que os três indivíduos são heterozigotos. O primeiro indivíduo (AB) e o segundo (AC) apresentam número de bandas que é igual à soma do número de bandas de cada um dos alelos. O terceiro indivíduo (BC) apresenta uma banda a menos do que a soma do número de bandas de cada um dos alelos. Isso se dá porque os alelos B e C apresentam banda de mesmo tamanho; logo, essas bandas apresentam a mesma mobilidade eletroforética.

As facilidades da técnica de PCR podem ser utilizadas para amplificar segmentos aleatórios de DNA ao longo de todo o genoma dos organismos. Esse é o caso da técnica de RAPDs (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, do inglês *Randomly Amplified Polimorphic DNAs*). Nessa estratégia, iniciadores pequenos (por volta dos 10 pares de base) e de seqüência aleatória são utilizados para o PCR com temperaturas que permitam seu pareamento em diversas regiões do genoma, amplificando, desta forma, grande número de segmentos de DNA dos mais diversos tamanhos e origens. O padrão de bandas observado é muito semelhante àquele obtido para minissatélites de locos múltiplos; contudo, a diferença fundamental entre esses dois *fingerprints* é que, no primeiro caso, sabemos que as bandas equivalem a alelos de locos definidos e, no caso dos RAPDs, as bandas observadas equivalem a regiões do genoma amplificadas ao acaso.

As técnicas de DNA que descrevemos são mais próximas da variação real do genoma que a eletroforese de aloenzimas; contudo, à exceção do seqüenciamento total, marcadores moleculares de DNA também são uma estimativa indireta da variação gênica. Como em toda técnica, estudos fundamentados em polimorfismo de DNA obtidos por PCR também possuem alguns pressupostos. Primeiramente, é preciso assumir como verdade que o produto obtido pelo PCR é o desejado. A reação em cadeia da polimerase é tanto mais específica quanto maiores forem as temperaturas usadas, embora nada impeça que alguma outra região do genoma, semelhante àquela com a qual acreditamos estar trabalhando, possa ser amplificada juntamente com a desejada ou no lugar da que se deseja amplificar.

Outro pressuposto importante que assumimos é que todos os alelos estão sendo certamente e igualmente amplificados. Isso significa dizer que, quando observamos um homozigoto, ele, certamente, possui apenas aquela banda no gel, e nenhuma outra deixou de ser amplificada pela reação ou foi amplificada de maneira que não pudéssemos observar. Em alguns casos, seqüências diferentes podem ser mais difíceis de amplificar que outras, o que invalidaria nosso pressuposto.

Finalmente, assumimos que os segmentos de DNA amplificados são comuns por descendência, e não por convergência (ver Aula 3 da disciplina Diversidade dos seres vivos: filogenia); ou seja, quando observamos os padrões de bandas de dois indivíduos diferentes e

percebemos que eles são iguais, admitimos que aqueles indivíduos partilham de um ancestral comum. Porém, outra possibilidade seria a de que elas, por acaso, apresentassem a mesma mobilidade eletroforética; estaríamos, então, inferindo que um parentesco, de fato, não existe entre esses dois indivíduos.

QUAL O MELHOR MARCADOR MOLECULAR?

Os marcadores moleculares disponíveis atualmente podem ser classificados de acordo com a existência de dominância. Técnicas como aloenzimas, microsatélites, minissatélites de loco único e RFLPs apresentam co-dominância, sendo homozigotos e heterozigotos facilmente identificáveis no padrão de bandas visualizado após a eletroforese (veja, de novo, na **Figura 8.1**, a interpretação dos padrões de bandas no gel). Por outro lado, técnicas como RAPDs e minissatélites de locos múltiplos apresentam dominância. Neste caso, basta a presença de um único genoma que possibilite a amplificação do fragmento, para que a banda seja visualizada. No caso de indivíduos heterozigotos, a banda também será observada, impossibilitando a distinção de um dos homozigotos do heterozigoto.

Marcadores moleculares com situação de dominância tornam-se menos úteis para análises populacionais. Nesses casos, para se estimar as frequências gênicas a partir da interpretação do padrão de bandas, é preciso que se assumam um pressuposto muito importante e não necessariamente atendido: o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (ver Aula 7).

A escolha da técnica molecular a ser empregada depende da avaliação, também, de alguns critérios. Primeiramente, é importante definir o problema a ser investigado, uma vez que diferentes marcadores moleculares apresentam diferentes taxas de substituição, ou seja, evoluem em velocidades diferentes.

Marcadores que evoluem muito rápido são úteis para o estudo de indivíduos, famílias e populações; isso se dá porque altas taxas de substituição determinam que a taxa de mudança, para uma dada região da molécula, seja tão rápida que indivíduos, mesmo muito aparentados, serão diferentes, quando estudados por esse marcador. Por exemplo, técnicas como RAPDs produzem quantidade muito grande de variação observável, o que é útil para estudos de paternidade, modos de reprodução ou organismos clonais.

Aloenzimas, por sua vez, são adequadas para pesquisa em nível populacional, uma vez que apresentam padrões de co-dominância e níveis moderados de variação. Os microssatélites, que são abundantes no genoma e exibem grande variação alélica, são especialmente indicados para estudos de populações altamente endocruzadas (*inbred*), típicas em sistemas de cultivo em massa (agricultura, aquacultura etc.).

Marcadores que evoluem mais lentamente são mais adequados para os estudos que envolvem diferentes espécies ou táxons supra-específicos. Nesse caso, como a taxa de mudança é mais lenta, indivíduos proximamente aparentados, como aqueles que pertencem à mesma família ou população, não apresentarão diferenças, sendo todos iguais, quando estudados por esse marcador. Técnicas como RFLPs e seqüenciamento são bons exemplos desse tipo de marcador; daí serem indicadas para estudos de Filogenia, por exemplo.

Outro critério importante a ser observado é o tipo de material disponível para estudo. Trabalhos com aloenzimas demandam quantidade razoável de material biológico (10 a 50mg por loco gênico analisado), que deve estar obrigatoriamente fresco ou congelado. Dessa forma, dependendo do organismo, a amostragem para os trabalhos com aloenzimas pode ser destrutiva, impondo limitações para sua utilização em estudos com organismos muito pequenos (ou larvas), bem como com espécies raras. Trabalhos que utilizam as facilidades da técnica de PCR não oferecem esse tipo de problema. Em tais casos, porém, as limitações estão relacionadas ao custo da técnica (reagentes, equipamentos), ao tempo e à experiência necessários para obtenção dos dados (conhecimento especializado, equipamento sofisticado), o que restringe, por exemplo, os tamanhos de amostra que podem ser utilizados nestes estudos.

A escolha do marcador molecular adequado depende de análise de custo e benefício, bem como de precisa definição do problema a ser investigado.

CONCLUSÃO

Não é demais repetir, nesta disciplina de Evolução, que a perspectiva populacional da variação interindividual foi um dos grandes méritos de Darwin, do mesmo modo que o modelo mendeliano e sua concepção de herança particulada foi decisivo para construção de uma explicação para as mudanças evolutivas. Essa explicação é a teoria sintética da Evolução.

Para a teoria sintética, a primeira condição para que o processo evolutivo ocorra é a existência de variação gênica nas populações. De outro modo, não é possível que haja mudança na composição genética das populações ao longo das gerações. Dessa forma, o trabalho de medir e caracterizar a variação gênica presente em populações é condição fundamental para se estudar Evolução.

Nas três aulas anteriores, você estudou como medir e caracterizar a variação gênica. Nesta aula, você estudou várias técnicas de amostragem da variação gênica em nível molecular. Os marcadores moleculares representam locos gênicos que apresentam alguma variabilidade e, portanto, são ótima ferramenta para estudar Evolução.

RESUMO

Moléculas, tais como as aloenzimas e o DNA, podem ser usadas para amostrar a variação gênica presente nas populações; para tanto, utilizam-se técnicas, como a eletroforese de aloenzimas, PCR, microssatélites, minissatélites, RFLPs e RAPDs. Quando usamos aloenzimas, precisamos assumir o pressuposto de que a seqüência de aminoácidos na proteína equivale à seqüência de nucleotídeos no DNA, e ter claro, também, que a quantidade de variação amostrada é sempre uma subestimativa da variação total. Marcadores moleculares de DNA, por outro lado, são mais próximos da variação real do genoma, mas também é necessário assumir pressupostos para se trabalhar com eles: o produto obtido é o desejado; todos os alelos estão sendo amplificados igual e certamente; os segmentos de DNA amplificados são comuns por descendência e continuam sendo uma estimativa indireta da variação gênica. Diferentes marcadores moleculares apresentam diferentes taxas evolutivas, sendo úteis para o estudo de diferentes problemas da Evolução.

ATIVIDADES FINAIS

1. Por que a variação amostrada pelo método de eletroforese de aloenzimas é uma subestimativa da variação total?

COMENTÁRIO

Como você já viu nesta aula, são características como a subestimativa da variação que fazem da eletroforese um método conservador, ou seja, se tem muita segurança em relação à variação revelada pelo método.

2. Se duas seqüências de DNA diferentes não são amplificadas uniformemente numa reação de PCR, qual a consequência que isto pode acarretar para uma interpretação mendeliana do padrão de bandas obtido?

COMENTÁRIO

Você deve ter percebido que os métodos moleculares apresentam limitações técnicas, e este é um exemplo desse tipo de limitação..

3. Imagine se você quisesse estudar um organismo muito pequeno ou uma espécie ameaçada de extinção. Você optaria por utilizar marcadores de aloenzimas? Justifique sua resposta.

COMENTÁRIO

Esperamos que nesta questão tenha ficado evidente para você que nenhum método molecular é universal. Para escolher o melhor método molecular é preciso conhecer todas as características de todos os métodos.

4. O que significa dizer que um marcador molecular tem evolução rápida?

COMENTÁRIO

Se você respondeu bem esta questão, significa que já está tomando decisões a respeito do melhor marcador molecular para cada problema em Evolução. Parabéns! Você alcançou o objetivo desta aula.

5. Se você quisesse estudar as relações de parentesco entre táxons separados evolutivamente há muito tempo, como diferentes ordens ou classes, escolheria marcadores de evolução lenta ou rápida? Justifique sua resposta.

COMENTÁRIO

Além de ter de conhecer muito bem as características de todos os métodos para você utilizar os marcadores moleculares em Evolução, deve também, ter boa definição do problema biológico a ser estudado.

AUTO-AVALIAÇÃO

Esta aula envolveu grande quantidade de informações e, provavelmente, exigiu de você, também, um esforço de revisão dos conteúdos estudados em outras disciplinas. Mas não se assuste; caso você tenha sentido muita dificuldade, leia de novo o conteúdo da aula que, agora, já não será tão novo. Do mesmo modo, dedique um pouco mais de tempo à observação e análise das figuras; elas podem facilitar muito o entendimento de todas essas técnicas.

Esperamos que você tenha conseguido realizar a atividade proposta sem problemas; caso isso não tenha ocorrido, retorne à explicação, que as coisas devem ficar mais claras. Quanto aos exercícios, eles seguem uma ordem crescente de dificuldade; logo, comece pelo primeiro e siga sem medo até o fim. A última questão é um desafio, aceite-a como tal e divirta-se! Confira suas respostas e aprenda com seus erros!

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Nas primeiras quatro aulas desta Disciplina, você estudou Evolução sob uma perspectiva histórica. Nas Aulas de 5 a 8, foi apresentado o material da Evolução: estudou-se como medir, descrever e amostrar a variação gênica. Nas próximas aulas, vamos estudar as forças evolutivas. A primeira delas será a Mutação, que é a força evolutiva que deu origem a toda variação gênica.