

LIGAÇÃO, RECOMBINAÇÃO E MAPEAMENTO GÊNICOS

META

Discutir a importância dos princípios que regem a origem da diversidade genética a cada geração celular e a construção de mapas físicos para a localização de genes em cada cromossomo do genoma.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:

compreender a importância dos mecanismos de ligação gênica e recombinação para a origem da diversidade genética nas populações naturais;
construir mapas genéticos.

PRÉ-REQUISITOS

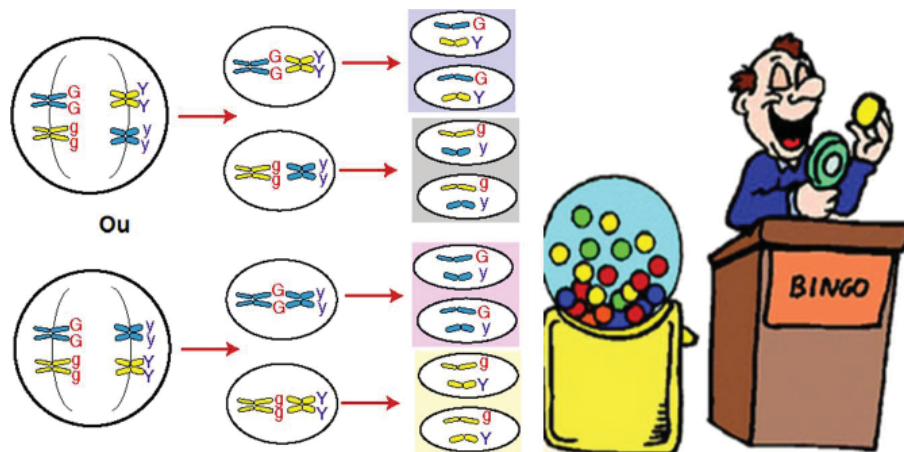
Antes de iniciar o estudo da Recombinação Genética, o aluno deverá fazer uma leitura sobre a As Leis de Mendel em um livro de genética Genética consultando a bibliografia recomendada.

INTRODUÇÃO

A diversidade biológica de determinada espécie é o conjunto de características morfológicas e fisiológicas que a torna capaz de responder às mudanças ambientais. Essa diversidade é originada pelos diferentes conjuntos de alelos estocados nos diferentes indivíduos de uma população. Assim, quanto mais diversificada for esta população, maior a variabilidade de respostas às mudanças ambientais e, conseqüentemente a sua sobrevivência.

Os mecanismos genéticos que dão origem a essa diversidade, a segregação independente e a recombinação gênica, ocorrem durante a divisão celular meiótica, gerando os gametas.

Na segregação independente dos cromossomos (Fig. 1), ou 2ª Lei de Mendel, os cromossomos e seus genes podem combinar-se ao acaso, gerando gametas com diferentes arranjos, como em um sorteio. As combinações mais freqüentes são as parentais; as menos freqüentes são as de gametas recombinantes, ou seja, com novas combinações. As proporções esperadas serão 1:1:1:1.



No entanto, nem todos os genes se comportam de maneira independente, pois quanto mais próximos estiverem no cromossomo maior a probabilidade de serem herdados juntos. A única maneira de separá-los é por meio do *crossing-over* ou recombinação gênica, que ocorre durante a prófase da meiose I, permitindo que genes muito próximos no cromossomo possam ser re-arrumados a cada divisão celular, gerando gametas com diferentes combinações. Mas, diferente da segregação independente de Mendel, na recombinação gênica a proporção de recombinantes é maior e a análise dos cruzamentos mostra uma proporção maior dessas combinações.

Pode-se relacionar a freqüência de recombinantes produzida pelo crossing over à distância entre os genes, mostrando o rearranjo de genes ao longo de um cromossomo e permitindo construir mapas físicos dos cromossomos antes dos mapas moleculares, como veremos neste capítulo

Cada espécie de organismo deve conter de centenas a milhares de genes e, geralmente, um número menor de cromossomos. Para entender essa desigualdade as análises genéticas mostram que cada cromossomo é um pedaço de DNA, que carrega centenas ou poucas centenas de diferentes genes que estão dispostos ao longo dele como contas em um colar

Os cromossomos são, por isso, chamados grupos de ligação, pois contêm um grupo de genes que são ligados juntos. O número de grupos de ligação corresponde ao número de tipos de cromossomo de dada espécie.

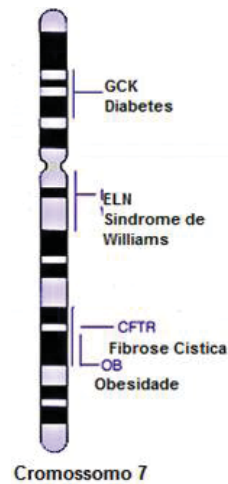


Figura 2 – Estrutura de um cromossomo evidenciando cromossomos ligados

P. exemplo, em humanos

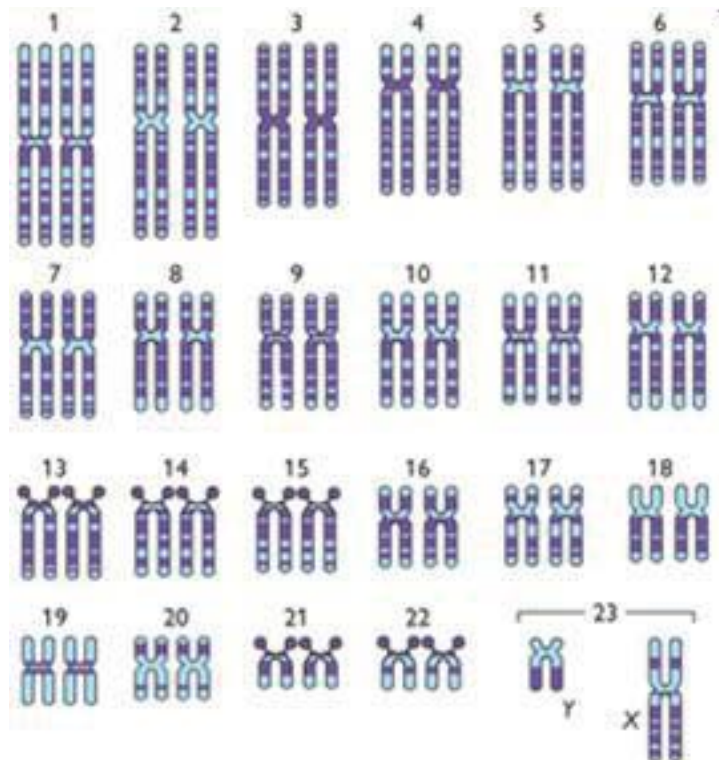


Figura 3- Cariograma humano

- 22 grupos autossômicos de ligação
- Um grupo de ligação do cromossomo X
- Um grupo de ligação do cromossomo Y

O termo ligação (*linkage*) tem dois significados relacionados:

1. Dois ou mais genes podem estar localizados no mesmo cromossomo.
2. Genes que são muito próximos tendem a ser transmitidos juntos.

BREVE HISTÓRICO DOS ESTUDOS DE RECOMBINAÇÃO

Logo após a descoberta dos trabalhos de Mendel, em 1900, seus experimentos foram repetidos por vários cientistas, utilizando-se de diferentes modelos, animais e vegetais, para corroborar seus estudos. Assim, em 1905, William Bateson e Reginald Punnett conduziram um cruzamento em ervilha de cheiro envolvendo 2 traços diferentes:

- Cor da flor e forma do grão.
- Esperavam uma proporção fenotípica de 1:1:1:1 na geração F2.
- Encontraram resultados surpreendentes que não souberam explicar.

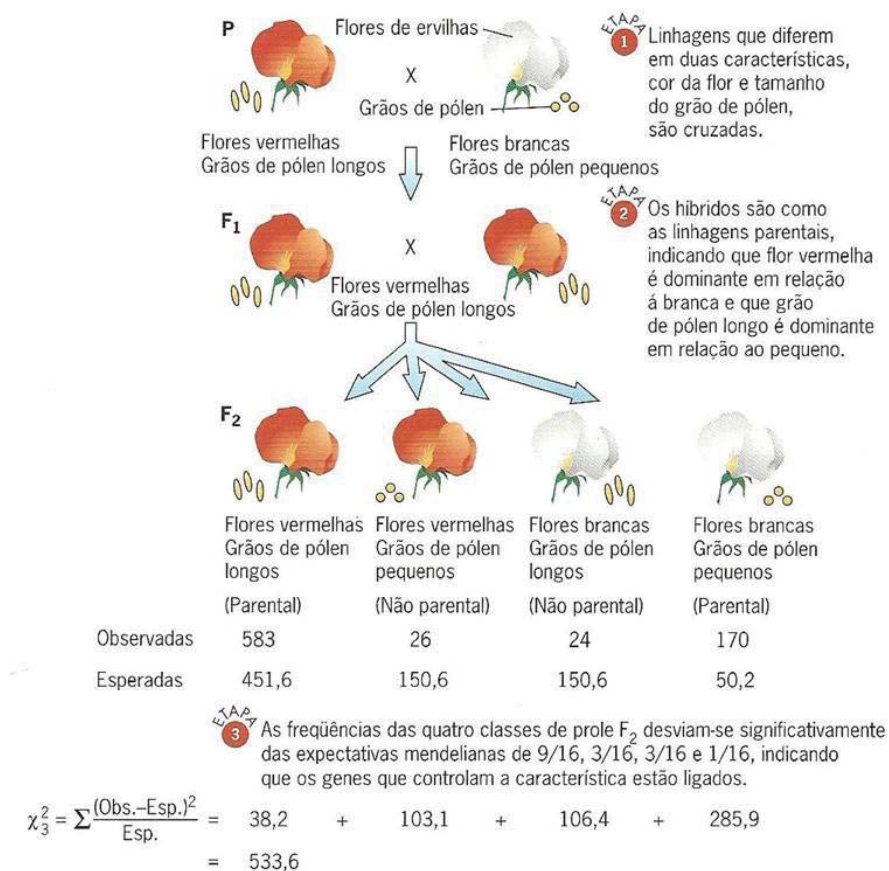


Figura 4 – Experimento envolvendo ligação gênica em ervilhas

Entre os anos de 1910 e 1915, porém, os estudos de Thomas Hunt Morgan e seus colaboradores em *Drosophila melanogaster*, mostraram também, desvios da 2ª lei de Mendel. Seus estudos associariam genes e cromossomos definitivamente. A escolha desse organismo foi essencial para os estudos de Morgan, uma vez que essas moscas são de pequeno tamanho (3 a 4 mm), de fácil manuseio, têm um ciclo de vida muito curto (aproximadamente 12 dias), além de serem extraordinariamente fecundas (cada fêmea pode originar 200 a 300 descendentes ao longo da sua vida), terem sexos facilmente distinguíveis, apresentam grande diversidade de formas e o seu cariótipo possui apenas quatro pares de cromossomas (três autossômicos e um par de cromossomas sexuais).

Nesses estudos, Morgan e col. analisaram cruzamentos envolvendo 2 caracteres autossômicos: cor do olho e tamanho das asas em *Drosophila*. Sabia-se que a cor do olho era determinada por um gene (vermelho ou púrpura), e o tamanho da asa (normal ou vestigial). O cruzamento de indivíduos de olhos vermelhos e asa normais com outro de olhos púrpura com outro de asas vestigiais gerava só indivíduos com olhos vermelhos e asas normais:

Cor dos olhos: Vermelho- pr+ (dominante), pr- púrpura (recessivo)

Forma das asas: normal- vg+ (dominante), vg- vestigial (recessivo)

P pr/pr. vg/vg X pr+ / pr+. vg+/ vg+

Gametas pr. vg pr+ vg+

Díbrido de F1 pr+ / pr . vg+ / vg

Cruzamento-teste ♀ pr+ / pr . vg+ / vg X ♂ pr/pr. vg/vg (testador)

O cruzamento teste, que serve para testar a segregação do genitor díbrido em relação ao genitor recessivo (testador), mostrou uma proporção diferente da mendeliana (1:1:1:1), revelando números diferentes de descendentes com combinações parentais e recombinantes, como segue:

pr+. vg+	1.339
pr . vg	1.195
pr+ . vg	151
pr . vg+	154
	2.839

Esse desvio mostra que as 2 primeiras combinações de genes estão ligadas. Observando-se o percentual de recombinantes na prole, Morgan percebeu que o número de indivíduos era aproximadamente igual ($151 \cong 154$), gerando um total de 305, que é uma frequência de 10,7 ou $(305/2839) \times 100$.

Com esses dados Morgan postulou que os genes estavam fisicamente ligados no mesmo cromossomo e as combinações são mantidas juntas na prole.

Desse modo ficou comprovado que os genes que estão juntos no mesmo cromossomo não segregam de modo independente;

Mas se os genes estão ligados como mostra a alta proporção de combinações parentais, como aparecem as combinações novas, recombinantes?

Morgan sugeriu que, durante a meiose, quando há o pareamento de homólogos, os cromossomos podem trocar pedaços, em um processo chamado *crossing-over*.

Esse processo permite a recombinação gênica. O *crossing-over* ocorre durante a prófase I da meiose no estágio bivalente, onde cromátides não-irmãs de cromossomos homólogos trocam pedaços de DNA. Essa troca pode ocorrer em qualquer local entre 2 moléculas complementares de DNA, mas não é constante.

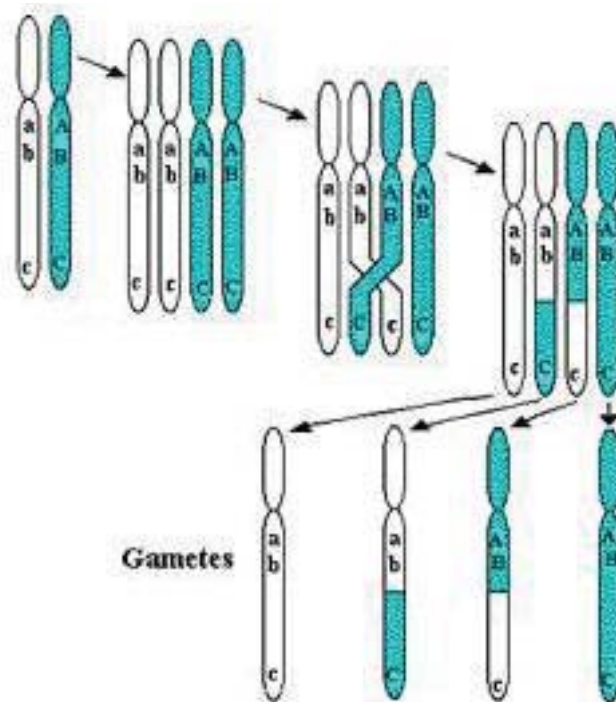


Figura 5 – Crossing-over e recombinação durante a meiose

A evidência citológica do *crossing-over* são os quiasmas-pontos de união entre as cromátides não-irmãs de cromossomos homólogos que trocaram pedaços durante a meiose.

Não há alteração nas seqüências de nucleotídeos no sítio de troca; a quebra e os eventos de religação ocorrem de uma forma tão precisa que não há perda, ganho ou alteração de um único nucleotídeo.

O *crossing-over* ocorre no estágio de quatro cromátides, podendo ocorrer de um a vários *crossing* a cada divisão, por cromossomo.

A frequência de recombinação não é constante ao longo de todo o genoma e é influenciada por efeitos tanto globais quanto locais. Ela pode medir a força da ligação entre os genes. Quanto mais próximos, mais rara a separação e a recombinação, ou vice-versa. Para qualquer 2 genes, a frequência de recombinação nunca ultrapassa 50%; pois essa só é alcançada quando os genes estão muito distantes em um cromossomo ou estiverem em cromossomos diferentes e se distribuem independentemente. Ou seja, não estão ligados.

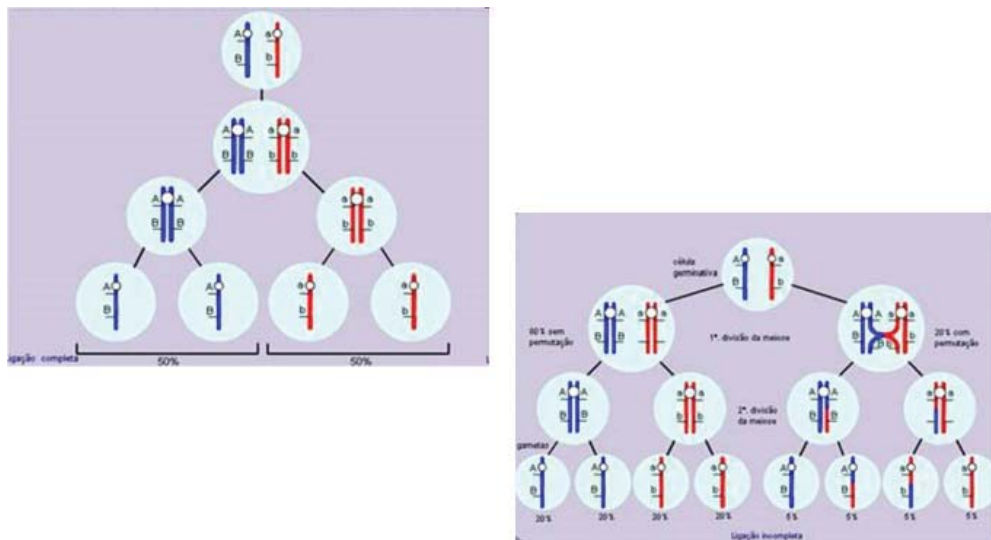


Figura 6- Distribuição cromossômica envolvendo diíbridos com genes ligados

Quanto ao arranjo dos alelos dominantes e recessivos, há duas configurações possíveis: *cis*, quando os alelos dominantes estão no mesmo cromossomo e *trans* quando em cada cromossomo localiza-se um dominante e um recessivo.

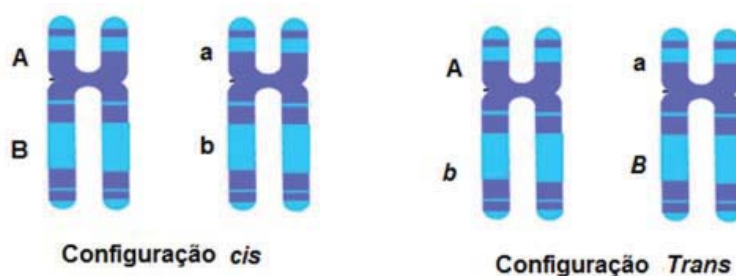


Figura 7 – Configurações de ligação entre genes ligados

FREQÜÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO E MAPA GENÉTICO

A contribuição mais importante dos estudos de Morgan e seus colaboradores foi relacionar a freqüência de recombinantes produzida pelo crossing over á distancia entre os genes, mostrando o rearranjo de genes ao longo de um cromossomo, permitindo construir mapas físicos dos cromossomos antes dos mapas moleculares.

A distância entre os genes determina a probabilidade da ocorrência de crossing. As freqüências de recombinantes para genes ligados variam de 0 a 50%, dependendo da distancia entre eles. Como já vimos, quanto mais distantes mais suas freqüências se aproximam de 50%, o que dificulta saber de os genes estão ligados ou em cromossomos diferentes.

O método básico de mapeamento gênico foi desenvolvido por Alfred Sturtevant, aluno de Morgan, que associou a distancia de genes a distancia real entre eles nos cromossomos.

Usando a freqüência de recombinante encontrada por Morgan de 10,7 % (ver acima) Sturtevant propôs utilizá-la como um índice quantitativo da distancia linear entre os genes pr e vg em um mapa de ligação.

Ele então definiu uma unidade de mapa (u.m.) como a distancia entre genes para a qual um produto de meiose em 100 é recombinante. Ex: a freqüência de recombinação (FR) de 10,7 será 10,7 u.m. A unidade de ficou também conhecida como centimorgan (cM), em homenagem a Morgan.

O mapa geralmente é representado de maneira linear, onde os locus gênicos delimitam as distancias entre os genes.

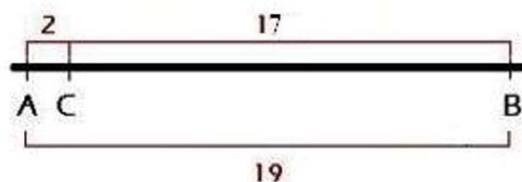
Ex:

Porcentagem de recombinação entre genes A e B: 19%

Porcentagem de recombinação entre A e C: 2%

Porcentagem de recombinação entre B e C: 17%

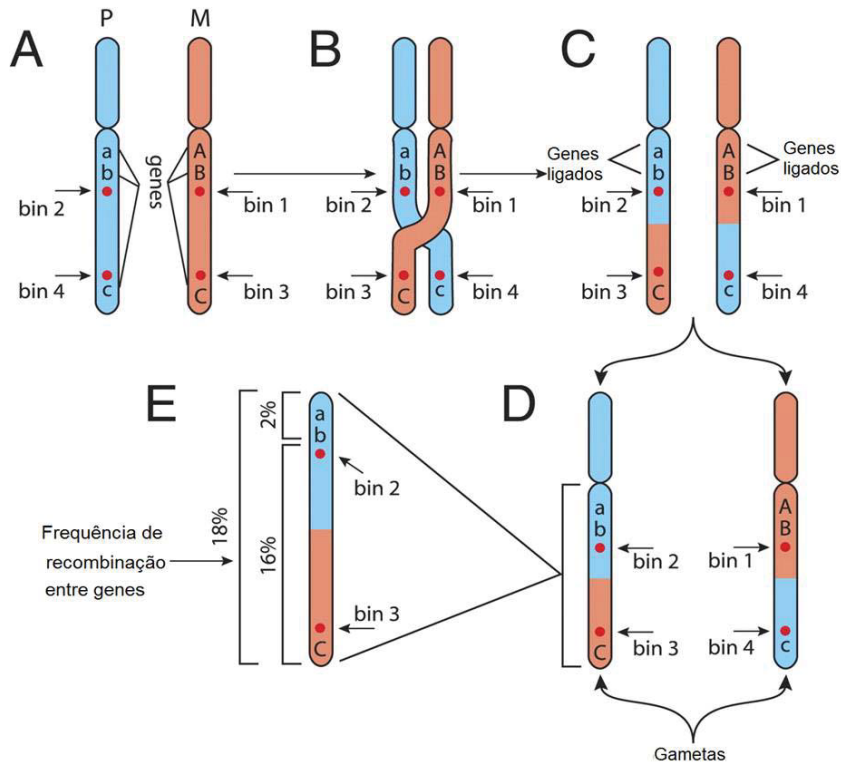
A distância entre A e B será de 19 centimorgans, A e C, de 2 centimorgans e B e C, de 17 centimorgans:



CRUZAMENTO –TESTE DE 3 PONTOS

Pode-se calcular a freqüência de recombinantes e, conseqüentemente, a as distancias entre os genes por meio do cruzamento-teste díbrido, como mostrado nos cruzamentos entre os genes pr e vg , e, de maneira mais

complexa, utilizando o cruzamento teste de 3 pontos. Essa metodologia utiliza um cruzamento entre um tríbrido e um testador triplo recessivo.



cv e ct

v cv ⁺ ct ⁺	580
v ⁺ cv ct	592
v cv ct	45
v ⁺ cv ⁺ ct	40
v cv ct	89
v ⁺ cv ⁺ ct ⁺	94
v cv ⁺ ct	3
v ⁺ cv ct ⁺	5

FR = (45+40+3+5)/1448
 FR = 93/1448
 FR = 0,0640 x 100
 FR = 6,4 cM

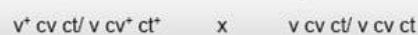
- Todos os locos estão ligados (situados no mesmo cromossomo), pois os valores de FR são menores que 50%

Locos FR (cM)

v e cv	18,5
v e ct	13,2
cv e ct	6,4



- O cruzamento pode ser reescrito da seguinte forma:



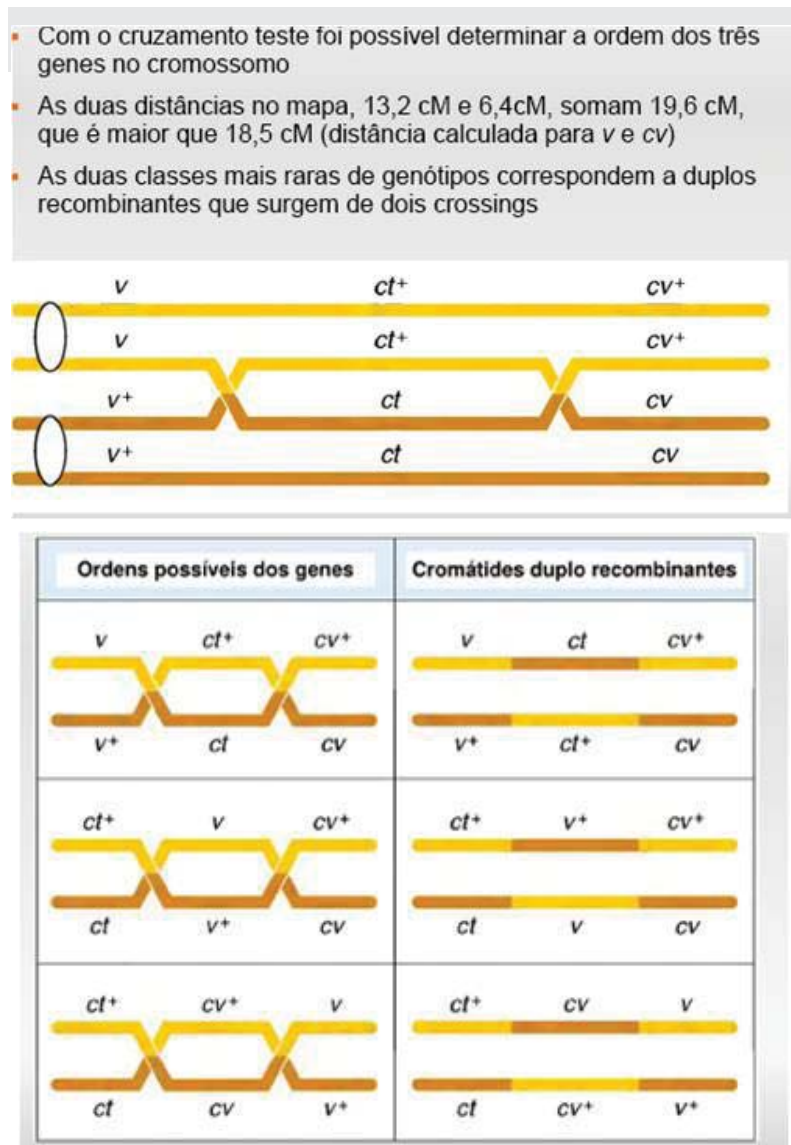


Figura 8- Recombinação e formação de gametas em cruzamento-teste de 3 pontos.

A detecção de classes recombinantes duplas mostra que podem ocorrer crossing-over duplos. Um crossing-over em uma determinada região do cromossomo afeta a probabilidade de ocorrência de outro crossing em uma região adjacente, ou seja, esses fenômenos não são independentes. Essa interação é chamada de interferência. Se os crossings em duas regiões são independentes, então, a frequência de recombinantes duplos seria igual ao produto das frequências de recombinantes nas regiões adjacentes

Interferência (I): um crossing reduz a probabilidade de outro crossing em uma região adjacente

Coincidência (C): proporção de recombinantes duplos observados em relação ao esperado

Assim:

$I = 1 - C$, em que:

$C = (\text{n}^\circ \text{ observado de recombinantes duplos} - \text{FRDO}) / \text{n}^\circ \text{ esperado de recombinantes duplos} - \text{FRDE}$)

No exemplo de *Drosophila*:

$\text{FRDO} = 8$

$\text{FRDE} = 0,064 \times 0,132 = 0,0084$ (8% de 1448 = 12)

$I = 1 - 8/12 = 4/12 = 1/3 = 33\%$

$C = 0$ (interferência completa, $I = 1$)

Nesse caso não são observados duplo recombinantes

$C = 1$ (ausência de interferência, $I = 0$)

Nesse caso o número de duplo recombinantes observado é igual ao número esperado de duplos recombinantes

CONCLUSÃO

O mapeamento de genes através de análise ligação serve para estimar a posição relativa dos genes através da frequência de crossing. Mas ainda é incompleto, pois não estabelece distâncias em relação ao centrômero ou telômeros, os marcos citológicos de um cromossômico, para associar um dado gene a um cromossomo. No entanto a análise conjunta de um gene ligado a determinado cromossomo e seu mapa cromossômico ampliam a análise genética. Com o emprego das metodologias moleculares, os mapas de ligação são associados a dados de mapas físicos e tem fornecido informações valiosas sobre doenças e seus genes defeituosos. Essas associações permitiram construir um “mapa mórbido” (Figura 9))

Mapa genético humana, representando a associação entre genes e doenças

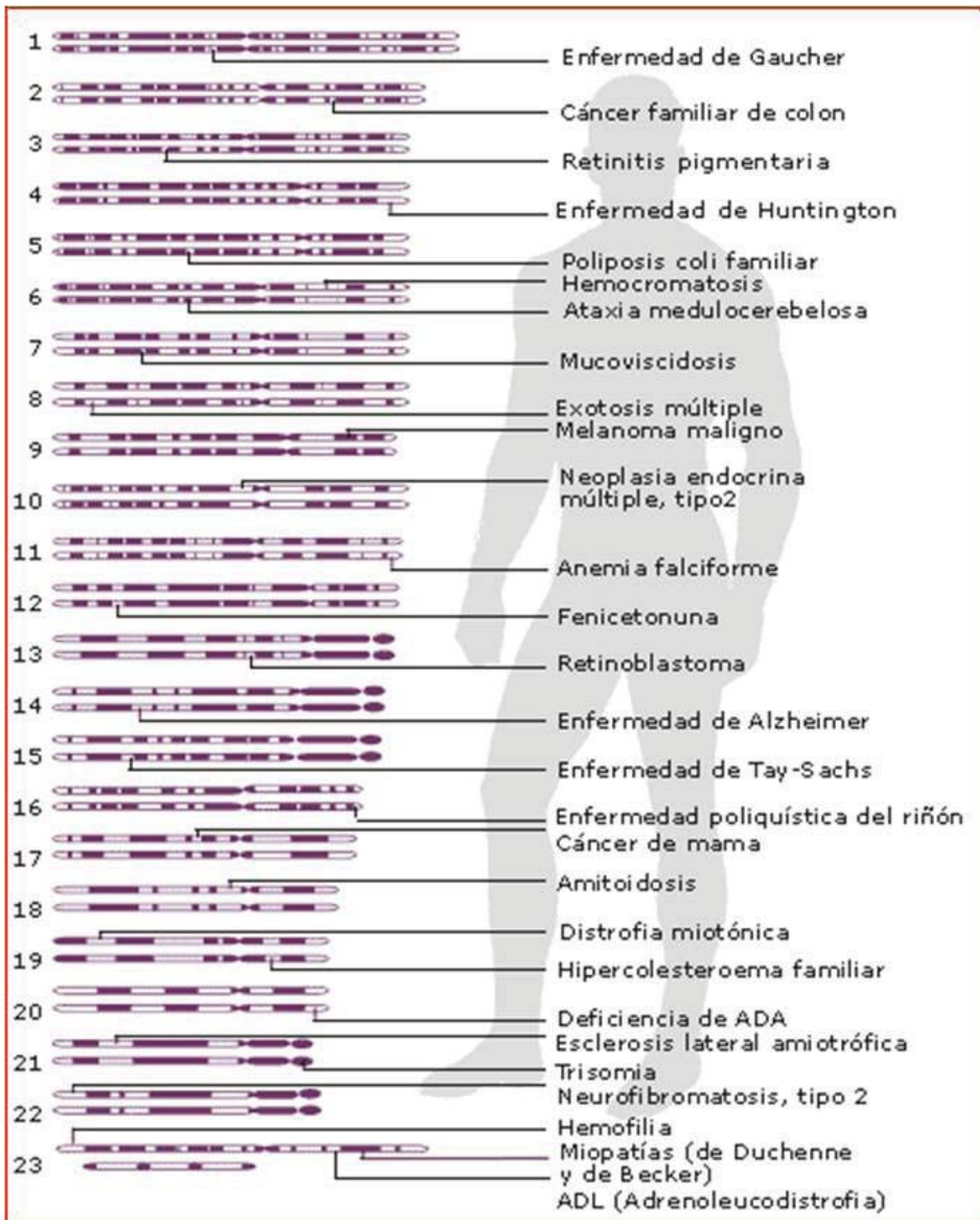


Figura 9- Mapa genético humano representando a associação entre genes e doenças (Fonte: www.educarchile.cl).

do genoma humano que tem ajudado muitas famílias com doenças genéticas raras a rastrear genes de doenças em suas famílias, auxiliando no aconselhamento genético e no prognóstico dessas doenças. Além dessa aplicação, os mapas de ligação associados a outros tem auxiliado nos estudos de filogenia, na compreensão da diversidade entre espécies próximas, no melhoramento genético animal e vegetal e, em seu sentido mais amplo, na compreensão da diversidade genômica de populações naturais.

RESUMO

A formulação da teoria cromossômica da herança, associando genes a cromossomos, foi um marco na Genética que possibilitou o grande avanço que vemos hoje nas mais diversas áreas biológicas. A construção dos mapas genéticos, através da frequência de recombinantes em cruzamentos utilizando diferentes espécies, nos ajudou a associar genes a locais específicos. Essa grande estratégia associada a metodologias citogenéticas e moleculares atuais têm revelado uma gama enorme de diversidade, tanto visível (fenótipos) quanto oculta, nos genomas de diferentes espécies.

Para a espécie humana, essa compreensão tem fornecido dados e metodologias essenciais que podem ajudar a pesquisa medica a fornecer dados mais diretos a sociedade e impulsionado a construção de metodologias que, em breve tempo, salvarão vidas.

EXERCÍCIO RESOLVIDO

Ex: Calculo de recombinação em cruzamento – teste de 3 pontos (3 genes) em *Drosophila*:

- v: olhos vermilion.
- cv: ausência de nervuras nas asas.
- ct: margens das asas cortadas.

P. v+v+ cvcv ctct x v v cv+cv+ ct+ct+

F.1 v+v cv+cv ct+ct x vv cvcv ctct

Distância entre os 1° e 2° genes v e cv (*crossing* simples)

v cv+ ct+	580	
v+ cv ct	592	
v cv ct+	45	FR = (45+40+89+94)/1448
v+ cv+ ct	40	FR = 268/1448
v cv ct	89	FR = 0,1850 x 100
v+ cv+ ct+	94	FR = 18,5 cM
v cv+ ct	3	
v+ cv ct+	5	
Total	1448	



Distância entre os 1º e 3º genes \underline{v} e \underline{ct} (*crossing* simples)

v cv+ ct+	580	
v+ cv ct	592	
v cv ct+	45	FR = (89+94+3+5)/1448
v+ cv+ ct	40	FR = 191/1448
v cv ct	89	FR = 0,1320 x 100
v+ cv+ ct+	94	FR = 13,2 cM
v cv+ ct	3	
v+ cv ct+	5	
Total	1448	

Distância entre os 2º e 3º genes \underline{v} e \underline{ct} (*crossing* duplos)

v cv+ ct+	580	
v+ cv ct	592	
v cv ct+	45	FR = (45+40+3+5)/1448
v+ cv+ ct	40	FR = 93/1448
v cv ct	89	FR = 0,0640 x 100
v+ cv+ ct+	94	FR = 6,4 cM
v cv+ ct	3	
v+ cv ct+	5	
Total	1448	

Conclusão: Todos os locos estão ligados (situados no mesmo cromossomo), pois os valores de FR são menores que 50%.

Teste de três pontos:

Locos FR (cM)

v e cv 18,5

v e ct 13,2

cv e ct 6,4

Observe que a soma de 13,2 e 6,4 = 18,2 refere-se a soma entre os 1º e o 2º genes e entre o 2º e o 3º.



Com o cruzamento teste foi possível determinar a ordem dos três genes no cromossomo.

As duas distâncias no mapa, 13,2 cM e 6,4cM, somam 19,6 cM, que é maior que 18,5 cM (distância calculada para v e cv) As duas classes mais raras de genótipos correspondem a duplos recombinantes que surgem de dois *crossings*.



Ordens possíveis dos genes	Cromátides duplo recombinantes
<p>v ct+ cv+</p> <p>v+ ct cv</p>	<p>v ct cv+</p> <p>v+ ct+ cv</p>
<p>ct+ v cv+</p> <p>ct v+ cv</p>	<p>ct+ v+ cv+</p> <p>ct v cv</p>
<p>ct+ cv+ v</p> <p>ct cv v+</p>	<p>ct+ cv v</p> <p>ct cv+ v+</p>

A detecção de classes recombinantes duplas mostra que podem ocorrer *crossing-over* duplos.

- Um *crossing-over* em uma determinada região do cromossomo afeta a probabilidade de ocorrência de outro *crossing* em uma região adjacente, ou seja, esses fenômenos não são independentes. Essa interação é chamada de interferência.
- Se os *crossings* em duas regiões são independentes, então, a frequência de recombinantes duplos seria igual ao produto das frequências de recombinantes nas regiões adjacentes.

Interferência (I): um *crossing* reduz a probabilidade de outro *crossing* em uma região adjacente.

Coincidência (C): proporção de recombinantes duplos observados em relação ao esperado.

Assim:

- $I = 1 - C$, em que:
- $C = (\text{n}^\circ \text{ observado de recombinantes duplos} - \text{FRDO}) / \text{n}^\circ \text{ esperado de recombinantes duplos} - \text{FRDE}$.
- No exemplo de *Drosophila*:
- FRDO = 8.
- FRDE = $0,064 \times 0,132 = 0,0084$ (8% de $1448 = 12$).
- $I = 1 - 8/12 = 4/12 = 1/3 = 33\%$.

$C = 0$ (interferência completa, $I = 1$).

- Nesse caso não são observados duplo recombinantes

- $C = 1$ (ausência de interferência, $I = 0$).

- Nesse caso o número de duplo recombinantes observado é igual ao número esperado de duplos recombinantes.



ATIVIDADES

1. Analisando-se dois pares de genes em ligamento fatorial (*linkage*) representados pelo híbrido BR/br, uma certa espécie apresentou a seguinte proporção de gametas:

48,5% BR

48,5% br

1,5% Br

1,5% bR

Pela análise dos resultados, pode-se concluir que a distância entre os genes B e R é de:

a. 48,5 cM

b. 97 cM

c. 1,5 cM

d. 3 cM.

e. 50 cM

2. O daltonismo *dentan* é um caráter determinado por gene recessivo ligado ao sexo. A doença *retinitis pigmentosum* (cegueira completa ou parcial) é determinada por gene dominante parcialmente ligado ao sexo. Uma mulher não daltônica e com retinite, cuja mãe é daltônica e sem retinite e o pai não daltônico e com retinite, homocigoto, casa-se com um homem daltônico e sem retinite. Considerando que a distância entre os dois locos, no X, é de 10 unidades de mapa? Responda:

a) Qual a proporção genotípica esperada na descendência?

b) Qual a proporção fenotípica esperada na descendência?

c) Se o casal deseja ter dois filhos, qual a probabilidade de ocorrer um menino normal e uma menina normal, para as duas características?

AUTOAVALIAÇÃO

Após estudar esta aula, consigo saber:

1. O que caracteriza um gene ligado?
2. Quantos e quais arranjos um gene ligado pode ter?
3. Qual a função do percentual de recombinação em um cruzamento para a construção de um mapa genético?
4. O que significa Interferência?
5. O que significa Coincidência?

**PRÓXIMA AULA**

Trataremos da herança ligada ao sexo e dos mecanismos de determinação sexual

**REFERÊNCIAS**

GRIFFITHS AJF, MILLER JH, SUZUKI DT, LEWONTIN RC, GELBART WM. 2009. Introdução à Genética. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 794p.

PIERCE BA. 2004. Genética: um enfoque conceitual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 758p.

SNUSTAD DP, SIMMONS MJ. 2008. Fundamentos de Genética. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 903p.

Vídeos sugeridos

http://www.youtube.com/watch?v=f18U__0nBxQ&feature=Playlist&p=36C97B9652CDB3E9&index=32