Citogenética comparativa: uma prática multidisciplinar para falar sobre evolução*

Camilla Borges Gazolla[1,2], Iraine Duarte de Souza[1,2], Kaleb Pretto Gatto[3], Stenio Eder Vittorazzi[1,4], Iris Hass[1,2], Daniel Pacheco Bruschi[1,2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Genética (PPG-GEN), Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná
[2] Laboratório de Citogenética Evolutiva e Conservação Animal, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná
[3] Universidade Estadual Paulista (Unesp - Rio Claro), Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, São Paulo
[4] Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Departamento de Ciências Biológicas, Tangará da Serra, Mato Grosso

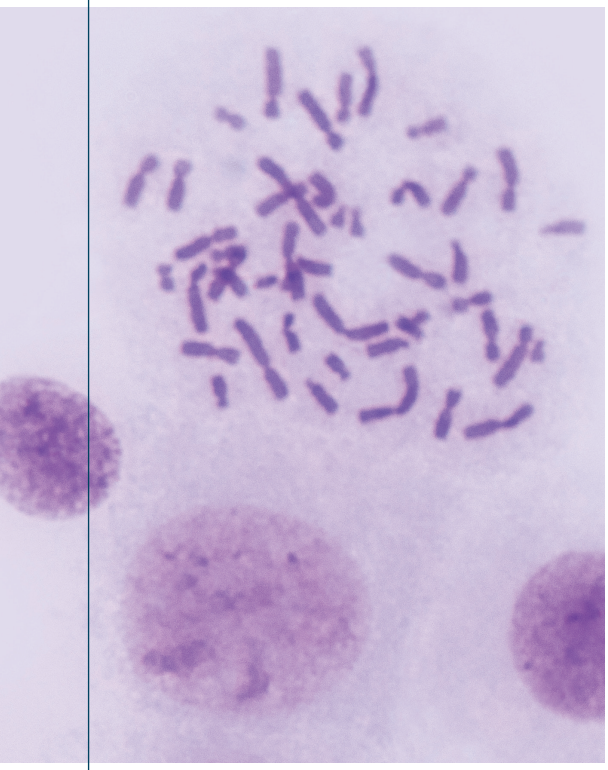
Autor para correspondência - danielpachecobruschi@gmail.com

* Material didático desenvolvido para a disciplina de Genética II, do curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como uma atividade do Estágio Docência dos discentes dos Programas de Pós-Graduação em Genética. Os dois primeiros autores contribuíram igualmente para o artigo.

A atividade proposta tem como função conectar conteúdos ministrados na graduação e pós-graduação das áreas de genética geral, citogenética, genética de populações, evolução, sistemática filogenética e zoologia. Utilizamos um modelo de evolução cromossômica para acessar questões sobre os mecanismos envolvidos na reorganização dos genomas ao longo da diversificação das espécies. Resolvendo uma situação problema os discentes terão a possibilidade de verificar como cada tipo de marcador cromossômico pode ser empregado para solucionar questões taxonômicas e observar que tipos de rearranjos cromossômicos podem ocorrer durante a evolução.

A atividade proposta tem como função conectar conteúdos ministrados na graduação e pós-graduação das áreas de genética geral, citogenética, genética de populações, evolução, **sistemática filogenética** e zoologia. Um modelo de evolução cromossômica foi utilizado para acessar questões sobre os mecanismos envolvidos na reorganização dos genomas ao longo da diversificação das espécies , assim como para demonstrar a utilização do estudo de seus cariótipos como ferramenta taxonômica e evolutiva. Durante a atividade, os discentes verificarão como cada tipo de marcador cromossômico (técnicas de coloração e hibridação "***in situ***" fluorescente - FISH) pode ser empregado para solucionar questões taxonômicas e observar que tipos de rearranjos cromossômicos podem ocorrer durante a evolução. Cabe destacar que o modelo aqui apresentado pode ser também usado como um roteiro descritivo para os discentes pensarem em um projeto de pesquisa envolvendo citogenética, conectando ensino e pesquisa.

Como a maioria das aulas de citogenética baseiam-se exclusivamente na montagem de cariótipos pelo método clássico de "corta e cola", a sugestão apresentada é uma forma alternativa para abordar o tema e deixar mais instigante e dinâmico o ensino da citogenética.



POR QUE E COMO ESTUDAR OS CROMOSSOMOS DE UMA ESPÉCIE?

Ao contrário do que se imaginava, principalmente com o desenvolvimento das metodologias de biologia molecular e sequenciamento de genomas, a citogenética não se tornou uma área obsoleta dentro dos estudos genéticos. Na verdade, o estudo dos cariótipos das espécies ganhou novas perspectivas com inovações metodológicas, o que fez com que esse campo de estudo retomasse sua ascensão.

Estudar o cariótipo de uma espécie é crucial para determinação do grau de ploidia e a composição cromossômica do organismo, e a partir de então, conhecer a diversidade biológica, criar hipóteses evolutivas e entender como as alterações numéricas e estruturais modificam o complemento cariotípico original, podendo resultar no isolamento reprodutivo de populações e, por consequência, levar à especiação.

Os mecanismos que podem alterar a morfologia e o número cromossômico, os métodos de coloração e bandamento dos cromossomos estão resumidamente apresentados no anexo 1. Cada tipo de metodologia oferece um padrão de bandas específico que permite realizar comparações cromossômicas e explorar diferentes aspectos relacionados à evolução cromossômica (veja exemplos na Figura 1).

Adicionalmente aos padrões de coloração diferencial, a metodologia de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) é também uma forma eficiente e precisa de estudar a evolução cromossômica. O princípio da técnica baseia-se na presença de um DNA alvo e de sondas de DNA complementares à sequência de interesse. Essas sondas serão marcadas com agentes fluorescentes que formarão duplex híbridos de DNA após passarem por um processo de **desnaturação** e **renaturação** (para detalhes, veja a Figura 2).

Em seguida é realizada a detecção dos sítios onde ocorreu a hibridação e analisada em microscópio de epifluorescência. Trata-se de um método altamente específico para detectar a distribuição de sequências de interesse ao longo dos cromossomos, desde que o tamanho, em pares de bases, do segmento desejado tenha quantidade suficiente de pares de bases para a resolução do microscópio.

Sistemática – É a ciência dedicada a inventariar e descrever a biodiversidade e compreender as relações filogenéticas entre os organismos.

Filogenética – Trata-se de um ramo da biologia que estuda a origem e evolução das espécies e as relações existentes entre elas.

In situ – Expressão latina que significa "**no lugar**" ou "**no local**". No ramo da biologia, seria o método de estudo em que o objeto é analisado no seu local natural, habitual ou onde se desenvolve.

Desnaturação – Ocorre quando as pontes (interações) de hidrogênio entre as cadeias complementares se rompem e as fitas se separam. A desnaturação é reversível e o DNA, não interfere na composição do esqueleto carbono-fosfato.

Renaturação – É o inverso da desnaturação e permite que todas as propriedades originais da molécula sejam restabelecidas, ocorrendo o restabelecimento das pontes (interações) de hidrogênio entre as cadeias complementares do DNA, no caso das condições originais serem recuperadas.

	Bandamento G	Bandamento C	Impregnação pela Prata	Fluorocromos base-específicos
Objetivo	Evidenciar um padrão de bandas escuras e claras ao longo dos cromossomos, no qual as escuras correspondem a regiões ricas em bases AT e as claras a regiões ricas em bases GC	O método evidencia seletivamente a heterocromatina constitutiva distribuída ao longo dos cromossomos	Detecta, de maneira indireta, o sítio cromossômico portador da região organizadora do nucléolo (NOR)	Marcação fluorescente específica, detectada pelo comprimento de onda do fluorocromo em microscopia de epifluorescência. Servem para caracterização da riqueza de nucleotídeos de uma determinada região cromossômica
Tipos de marcas observadas	Os cromossomos mostram um padrão de bandas longitudinais ao longo de toda a cromátide evidenciando regiões claras e escuras	A heterocromatina constitutiva é revelada como blocos fortemente corados (bandas escuras), distinguindo-se das porções eucromáticas que permanecem levemente coradas (bandas claras)	A precipitação da prata coloidal ocorre nas regiões da NOR, gerando uma marcação ao detectar proteínas argirofílicas	Por exemplo: utilizando o fluorocromo DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) serão evidenciados sinais florescentes azul brilhante mais intenso em regiões ricas em A:T; enquanto que, utilizando o CMA_3 (cromomicina A), sinais fluorescentes verde brilhante indicarão riqueza em G:C naquela região cromossômica
Tratamentos / processos	Os cromossomos são desproteinizados por ação do tratamento com a enzima tripsina e, posteriormente, corados com corante de natureza **basófila** (ex: Giemsa)	Os cromossomos são submetidos a uma depurinação (ácido clorídrico), seguido de um tratamento desnaturante em hidróxido de bário e uma lavagem em solução salina (2xSSC) e corados com corante de natureza basófila	Solução coloidal reveladora preparada com gelatina e ácido fórmico é adicionada diretamente na lâmina, seguido da adição de solução de nitrato de prata 50%	Tratamento das lâminas com solução tampão (ex: McIlvaine) seguido de coloração com os respectivos fluorocromos de interesse. Em um único experimento, mais de um fluorocromo pode ser empregado em uma mesma lâmina
Tipos de informações extraídas	Observação da morfologia cromossômica e detecção de rearranjos cromossômicos dos tipos estruturais e numéricos. Bastante empregada na citogenética clínica humana	Detecção do padrão de heterocromatina como marcador em citogenética comparativa e presença de rearranjos estruturais cromossômicos	Mapear o sítio cromossômico onde se encontra o motivo genético dos genes que codificam para os rRNAs. Padrões de número e localização das NOR são utilizados como marcadores comparativos entre os cariótipos	Permite distinguir porções cromossômicas que apresentam distinta riqueza nucleotídica. Permite caracterizar classes distintas de heterocromatina

Figura 1.
Metodologias utilizadas para comparações cromossômicas.

Basófila – Termo técnico usado por histologistas. Descreve a aparência ao microscópio de células e tecidos, após uma seção histológica ter sido colorida por corantes básicos.

O método de Hibridação "*in situ*" Fluorescente (FISH)

A metodologia de Hibridação "*in situ*" Fluorescente (FISH) está baseada na propriedade físico-química da molécula de DNA de sofrer desnaturação (abertura de cadeia de duplas-fitas) e renaturação (reanelamento das duas cadeias) sem comprometimento de seu esqueleto carbono-fosfato, quando submetida a condições como aumento de temperatura, exposição à agentes desnaturantes (ex: formamida) ou tratamentos com base ou ácido forte.

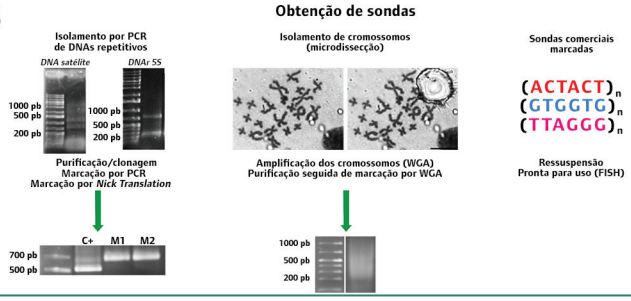
O método é altamente sensível para identificar sequências específicas de DNA ao longo dos cromossomos (mapeamento cromossômico) e utilizado em diferentes campos da biologia. Em estudos evolutivos, essa metodologia é bastante informativa por garantir que o pesquisador possa mapear sequências específicas ao longo dos cromossomos e assim permitir comparar com maior precisão os cromossomos de espécies distintas (reconhecer homologias).

Assim, o primeiro passo consiste em determinar qual a região de interesse que se busca mapear nos cromossomos e obter uma sonda de DNA complementar a essa região (**A**). Essa sonda consiste em uma sequência dupla-fita de DNA que apresenta a incorporação de alguns nucleotídeos marcados, que poderão apresentar sua própria fluorescência (marcação direta) ou que apresentam grupos-funcionais que serão detectados por anticorpos específicos acoplados à fluorocromos e essa associação irá gerar o sinal fluorescente (marcação indireta).

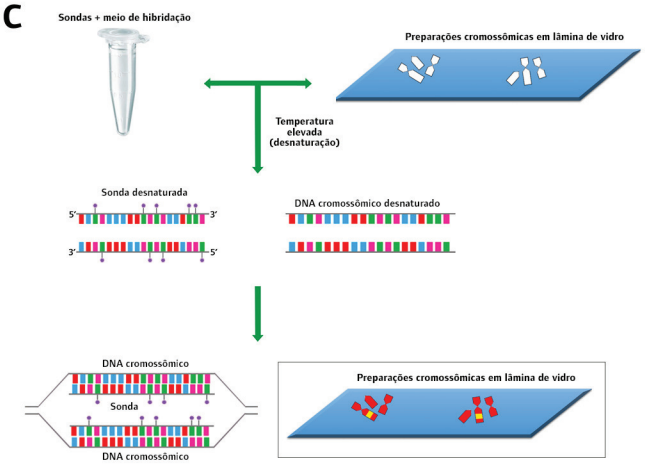
A

As sondas de DNA podem ser obtidas (**B**) por isolamento da sequência de interesse diretamente do genoma das espécies, (**i**) via reação da polimerase em cadeia (PCR) quando a sequência nucleotídica é conhecida e primers específicos podem ser utilizados, (**ii**) via digestão por enzimas de restrição, quando busca-se sequências de DNA altamente repetitivas, como por exemplo, DNAs satélites ou até mesmo através do (**iii**) isolamento individual de cromossomos inteiros, utilizando métodos de microdissecção cromossômica ou citometria de fluxo. Outra possibilidade é a aquisição de sondas comerciais para a utilização em experimentos de FISH, na qual o pesquisador pode mandar sintetizar uma cadeia de oligonucleotídeos de acordo com seu interesse. Tratando-se de cromossomos humanos, sondas comerciais para todos os pares de cromossomos do cariótipo estão disponíveis para aquisição.

B



C



Os procedimentos de FISH incluem a fixação e estabilização da cromatina, desidratação das lâminas seguida de uma desnaturação por temperatura e agentes químicos. Após esses tratamentos, os cromossomos são incubados com a sonda para que, durante o reanelamento das fitas de DNA de ambos (sonda e cromossomos), a sonda possa hibridar com a região cromossômica que carrega o DNA-alvo (**C**). O último passo é detectar a sonda (nos casos de marcação indireta) com anticorpos específicos acoplados com agente fluorescente e por fim contracorar os cromossomos algum fluorocromo que os core uniformemente. Como o comprimento de onda que foi adicionado na sonda é diferente daquele aos quais os cromossomos foram contracorados, a sobreposição de imagens pós captura em filtros distintos do fotomicroscópio de epifluorescência, irá gerar um sinal de hibridação na posição cromossômica específica em que DNA-alvo se encontra (**C**).

Figura 2.
Metodologia de Hibridização *in situ* Fluorescente.

SITUAÇÃO PROBLEMA

Na região da Mata dos Pinhais é possível observar populações de uma espécie de roedor endêmica da região em ambas as margens de uma grande hidrelétrica, construída no local há cerca de 80 anos. No entanto, alguns pesquisadores começaram a descrever pequenas diferenças no uso do ambiente e no padrão de coloração da pelagem entre os indivíduos encontrados em lados opostos dessa barragem, sendo caracterizados como pertencentes à população 01 (indivíduos coletados em um fragmento localizado na margem esquerda da hidrelétrica), ou à população 02 (indivíduos coletados na margem direita) (Figura 3).

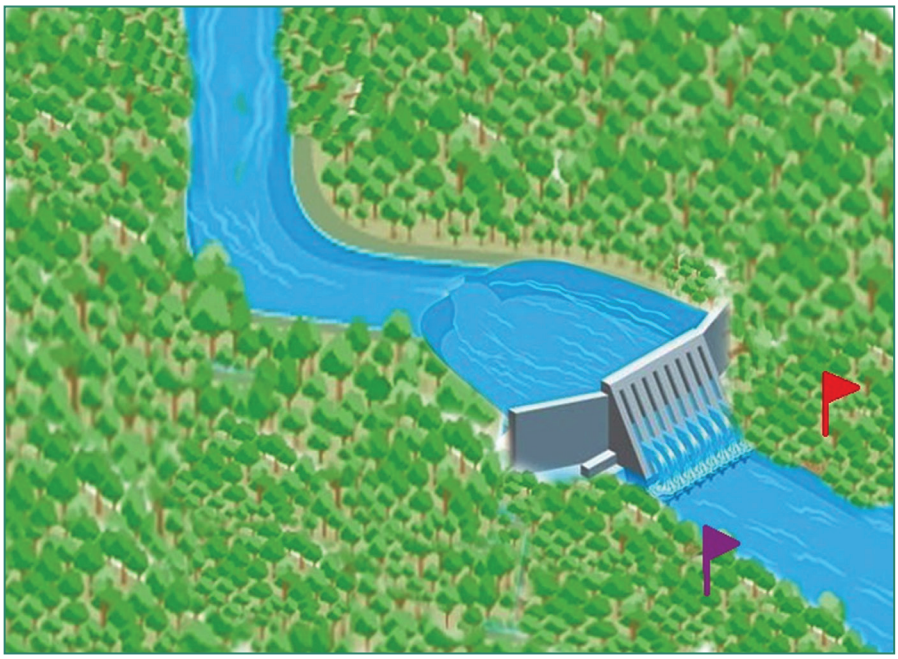


Figura 3.
Esquema representando uma usina hidroelétrica na região da Mata dos Pinhais. A bandeirinha vermelha na margem esquerda indica o local de coleta da população 01 e, a bandeirinha em roxo, do lado direito da margem, indica o local de coleta da população 02.

Apesar dos indivíduos destas duas populações apresentarem variações na coloração da pelagem, os mesmos são morfologicamente indistinguíveis, o que põe em dúvida se tais populações são ou não de uma mesma espécie (Figura 4).

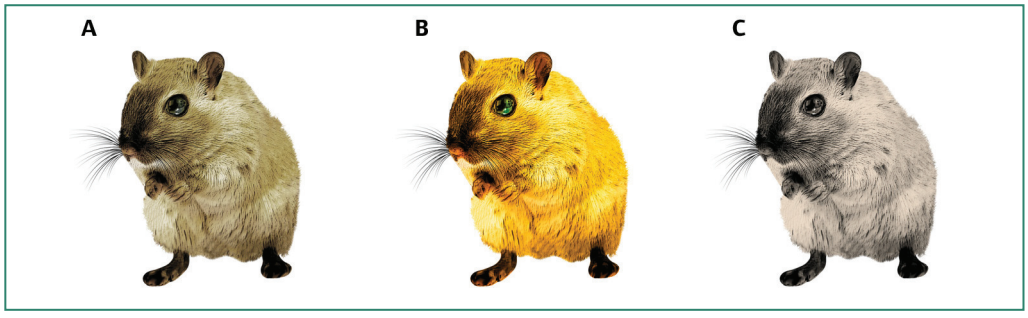


Figura 4.
Variação na coloração da pelagem de uma espécie de roedor endêmica da região da Mata dos Pinhais. (**A**) representa um indivíduo do grupo-irmão (*outgroup*), (**B**) representa um indivíduo da população 01, e (**C**) representa um indivíduo da população 02.

Foram coletados indivíduos das duas populações, de ambos os sexos, e encaminhados ao Laboratório de Citogenética para a obtenção dos cromossomos metafásicos. Esses cromossomos foram submetidos à coloração convencional e ao método de bandamento G e C. Também foram realizados experimentos de FISH, utilizando sondas de DNA telomérico (sequência TTAGGGn) e do cromossomo 4. As sondas do cromossomo 4 foram obtidas a partir do isolamento deste cromossomo de um indivíduo da espécie do grupo-irmão (***outgroup***). Os cromossomos foram fotografados e os resultados estão apresentados nas Figuras 5 a 8.

Outgroup (= grupo-externo) – grupo utilizado na comparação com o grupo que está se analisando e que traz a informação dos caracteres primitivos (plesiomórficos). Em teoria, todos os seres vivos pertencem ao grupo externo, mas na prática é possível delimitar com maior precisão devido ao conhecimento prévio do sistemata.

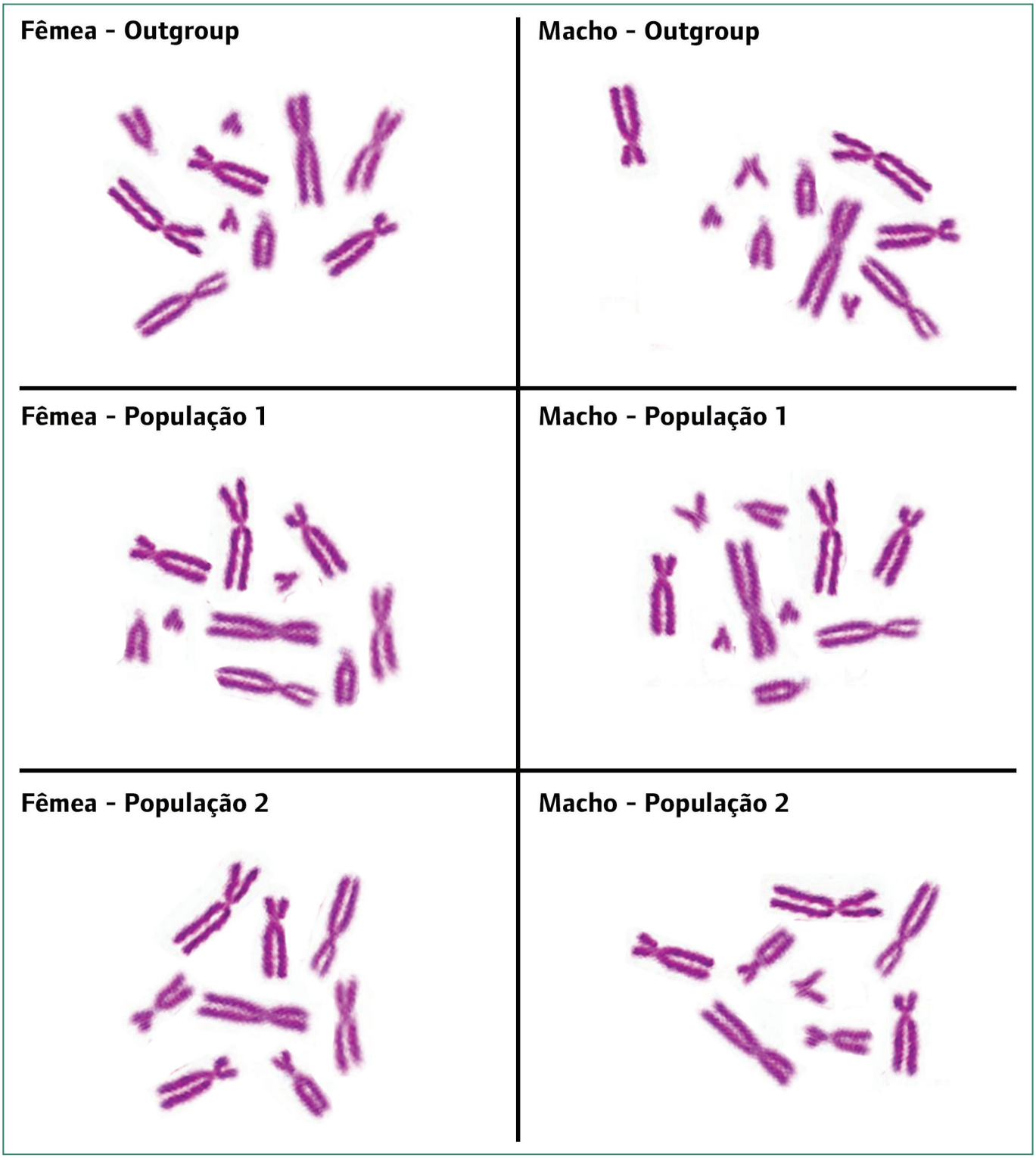


Figura 5.
Fotomicrografia dos cromossomos metafásicos submetidos à coloração convencional (Giemsa) de machos e fêmeas de uma espécie de roedor endêmica da região da Mata dos Pinhais provenientes de populações encontradas em margens opostas da barragem.

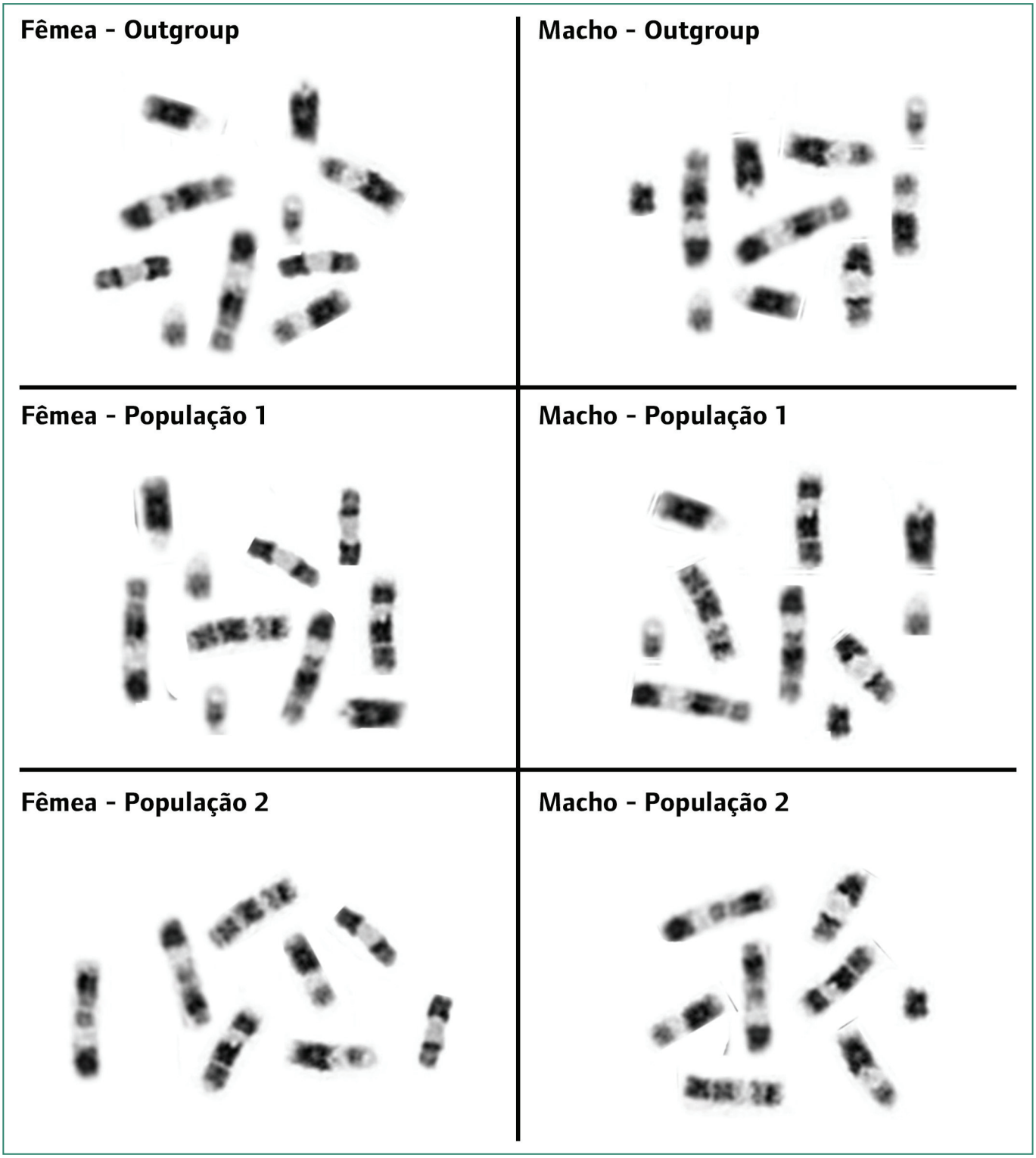


Figura 6.
Fotomicrografia dos cromossomos metafásicos submetidos ao método de bandamento G de machos e fêmeas de uma espécie de roedor endêmica da região da Mata dos Pinhais provenientes de populações encontradas em margens opostas da barragem.

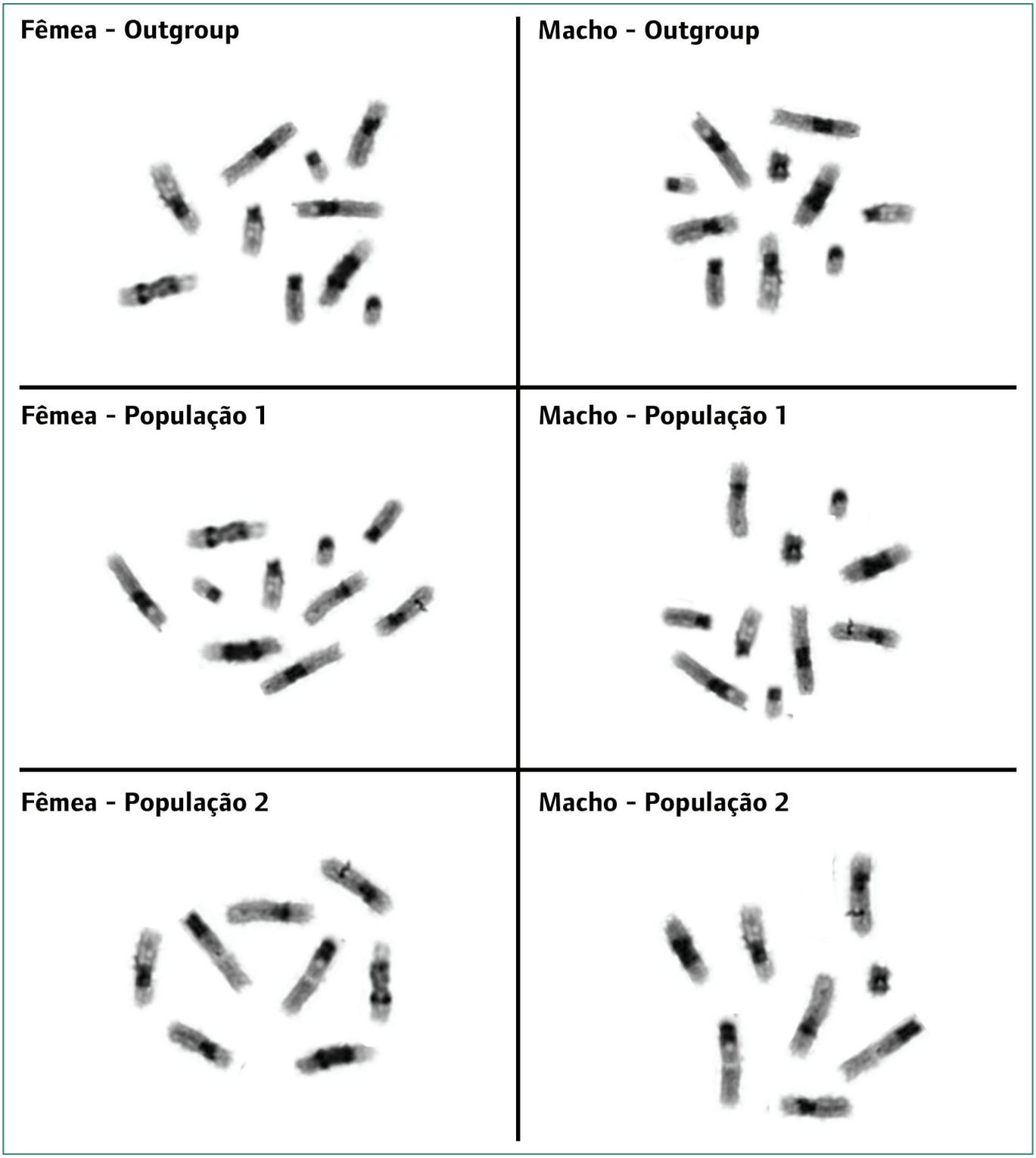


Figura 7.
Fotomicrografia dos cromossomos metafásicos submetidos ao método de bandamento C de machos e fêmeas de uma espécie de roedor endêmica da região da Mata dos Pinhais provenientes de populações encontradas em margens opostas da barragem.

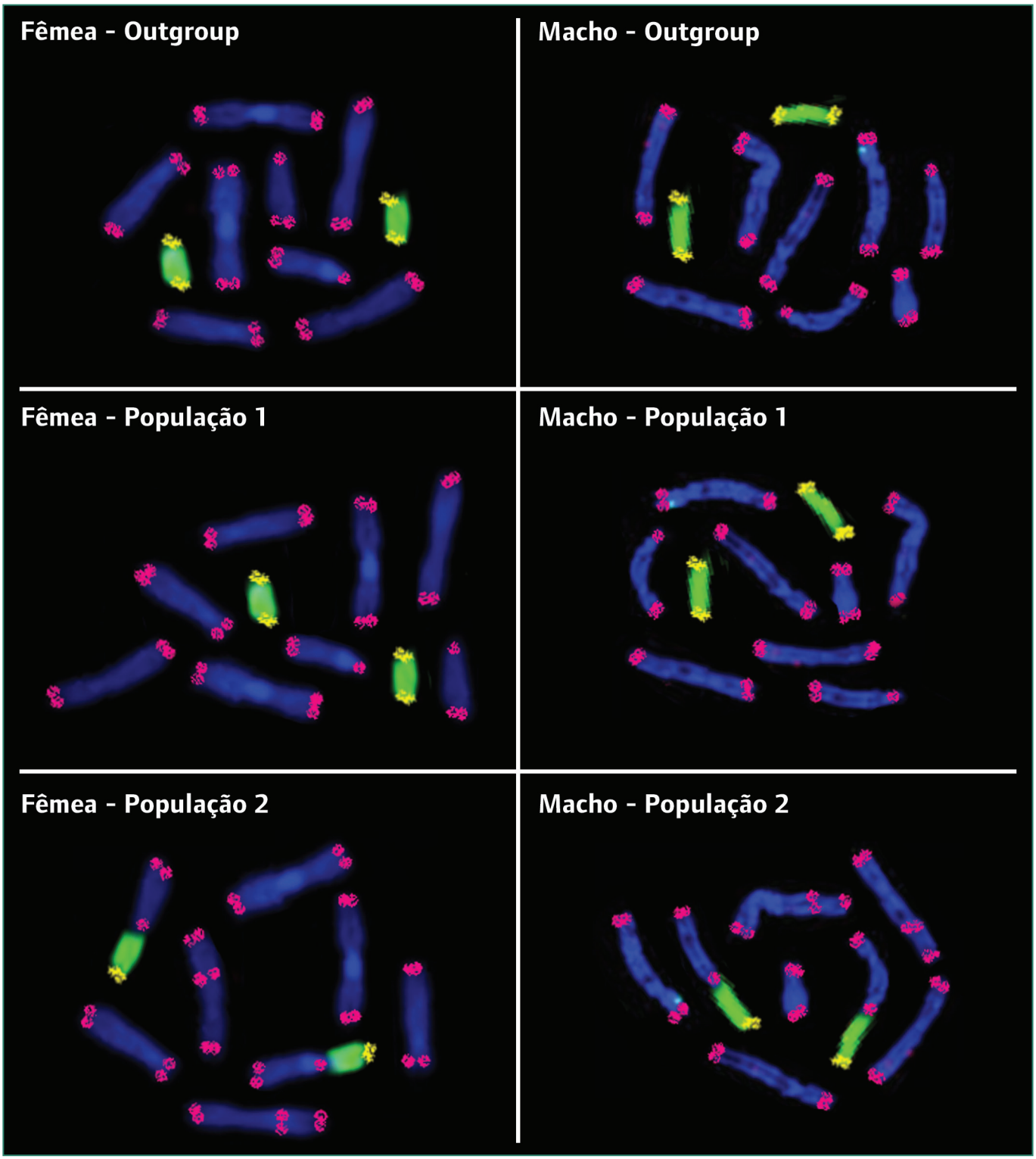


Figura 8.
Fotomicrografia dos cromossomos metafásicos submetidos ao método de FISH utilizando sondas de sequências teloméricas (rosa) e do cromossomo 4 (verde) de machos e fêmeas de uma espécie de roedor endêmica da região da Mata dos Pinhais, provenientes de populações encontradas em margens opostas da barragem. Locais de sobreposição de sinais de hibridação das suas sondas são visualizados em amarelo.

DISTRIBUIÇÃO DO MATERIAL AOS GRUPOS

1) Cada grupo receberá um painel de metal com dimensões: 55 x 80 cm. O painel de metal pode ser substituído por outro material como, por exemplo, isopor, e neste caso, as peças de imã terão que ser adaptadas. Cada grupo receberá também um conjunto de fotomicrografias de cromossomos em metáfase de machos e fêmeas das duas populações analisadas na situação problema (Figuras 5 a 8) e individualmente isolados. Cada metáfase foi submetida a quatro diferentes métodos, conforme descrito nas legendas das figuras. Cada grupo trabalhará com uma população específica, enquanto o terceiro grupo trabalhará com uma espécie que representará o *outgroup*. O professor deverá ter um painel no qual haverá uma árvore filogenética obtida para o grupo em estudo.

2) Após a montagem das pranchas pelos diferentes grupos, distribuir um ideograma do respectivo cariograma para que cada grupo represente os padrões observados pelos métodos de coloração diferencial e FISH (Figura 9). Os ideogramas deverão estar revestidos por contact transparente para que os estudantes possam marcar as bandas respectivas com canetas esferográficas de cores distintas, conforme a legenda recebida.

INSTRUÇÕES PARA OS PROFESSORES

1. Organizar os alunos da classe em três grupos de, no máximo, seis pessoas (o número de integrantes pode variar dependendo do tamanho da turma).
2. Cada grupo deverá receber:
   - a) um painel
   - b) procedimentos para os estudantes
   - c) problema proposto
   - d) as figuras de 5 a 8
   - e) o ideograma (após os estudantes terem analisado os cariótipos)
   - f) jogo de canetas de diferentes cores

É recomendado que o professor aplique esta atividade em turmas que já tiveram contato com os conceitos de genética, evolução e sistemática filogenética, além de permear conceitos de genética de populações e zoologia.

PROCEDIMENTO PARA OS ESTUDANTES

1. Ler com atenção o problema proposto e a situação em análise.
2. Analisar as figuras 5 a 8 e iniciar as montagens dos cariótipos em cada metodologia, reunindo os cromossomos em pares homólogos, organizados em ordem decrescente.
3. Determinar o número de cromossomos e o número fundamental (NFa) de cada população, sendo este último determinado considerando o número de braços cromossômicos de cada cromossomo do complemento de autossomos.
4. Analisar o cariótipo do macho e da fêmea e determinar qual o sistema cromossômico de determinação sexual que ocorre na referida espécie. Identifique qual é o sexo heterogamético.
5. Solicitar ao professor a entrega de um ideograma dos cariótipos analisados e, nele, representar com marcador preto (ou a cor que desejar) o padrão de bandamento G observado no ideograma das respectivas populações.
6. Responder as seguintes questões:
   - **Questão 1:** O padrão de coloração diferencial (bandamento C e bandamento G) ajudou na identificação dos pares de cromossomos homólogos? Se sim, descreva um dos casos em que isso foi possível e justifique o porquê.
   - **Questão 2:** Explique o que representam as bandas claras e as bandas escuras observadas pelo método de bandamento C.
   - **Questão 3:** Observando o cariótipo do sexo heterogamético, descreva quais as principais diferenças entre os pares de cromossomos heteromórficos observados.
7. Posicionar o grupo analisado na filogenia fornecida pelo professor.

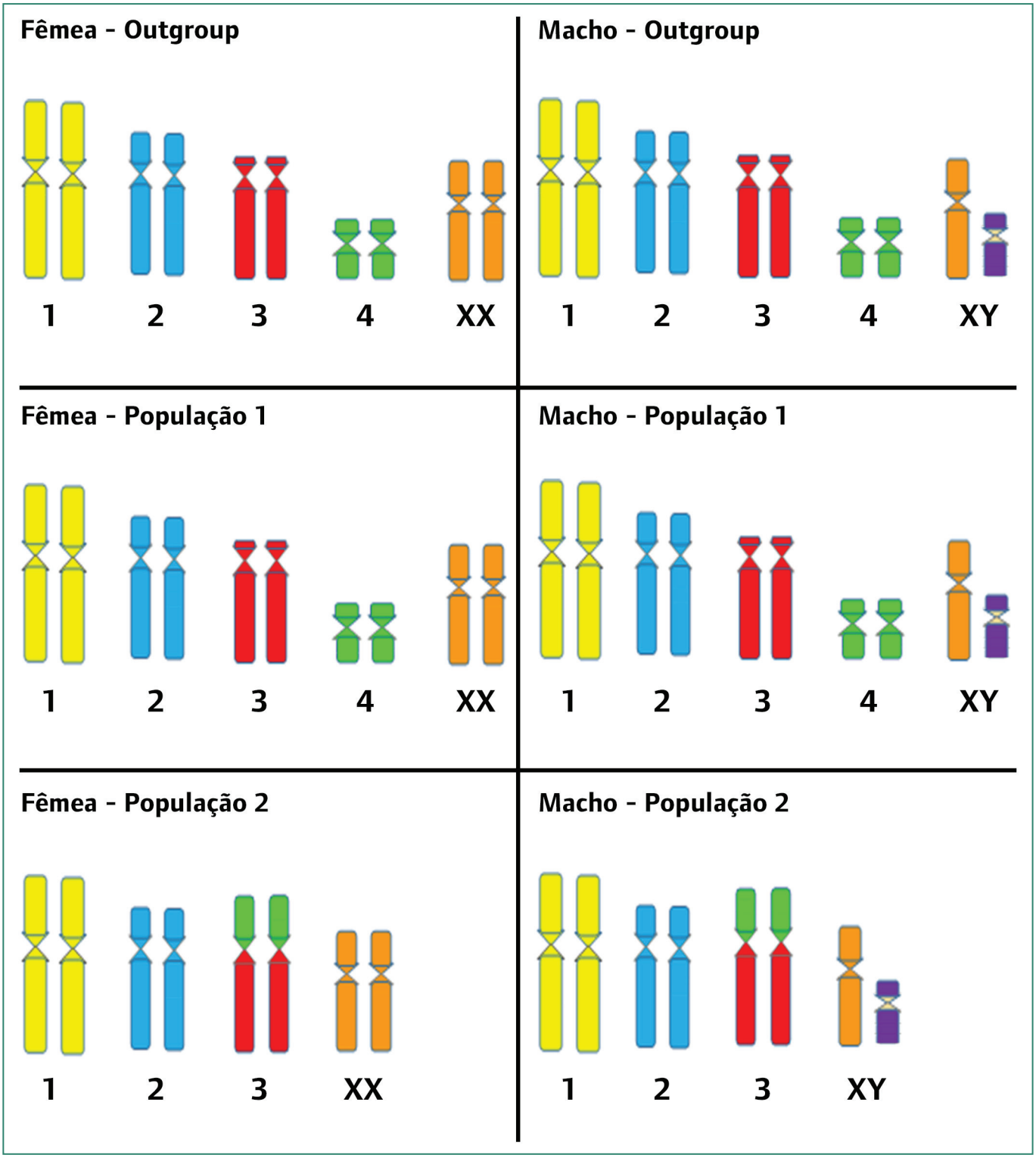


Figura 9.
Ideogramas dos cariótipos analisados – versão para representação do padrão de bandamento G.

Parcimônia – Esse princípio é básico para toda ciência e nos diz para escolher a explicação cientifica mais simples que convenha com as evidências.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Depois que todos os grupos acabarem as análises, é indicado que a turma toda se reúna para realizar a discussão conjunta da atividade. A discussão deverá ser conduzida pelo docente e terá o seguinte roteiro:

Plesiomórfica (= plesiomorfia) – É uma característica primitiva. Ex.: a ausência de coluna vertebral nos vertebrados é uma característica **plesiomórfica**, enquanto a presença é uma característica **apomórfica**.

1. Com o ideograma da população estudada, considerando o ideograma do sexo heterogamético, cada grupo irá posicioná-lo ao lado do nome de sua população (pop. 01 ou 02) na filogenia fornecida pelo professor. Essas filogenias estão disponíveis na figura 15 e 16.

2. Em conjunto, a turma realizará a análise citogenética comparativa entre as espécies. Para isso, serão analisados independentemente cada par de cromossomos entre as espécies e será verificado: (a) existe variação cromossômica numérica entre as populações? (b) existe variação no número fundamental dos cariótipos?

Homologia – Qualidade que identifica as estruturas homólogas, ou seja, aquelas que são encontradas em grupos taxonômicos distintos, podendo executar funções distintas ou não, com aparência semelhante ou não, mas que possuem uma origem embriológica e filogenética comum.

3. Sugerir a **homologia** interespecífica entre os cariótipos. Observar se a morfologia de cada par cromossômico foi mantida conservada em cada espécie e identificar eventuais rearranjos cromossômicos (translocações, inversões, duplicações, deleções etc), levando em consideração o padrão de marcações longitudinais gerado pelos diferentes métodos para cada par de homólogos. Realizar essa tarefa observando a condição observada em relação ao *outgroup* selecionado para a análise.

4. Com base nas análises realizadas até agora, as populações 01 e 02 seriam consideradas como pertencentes a uma mesma espécie? Caso a barreira de dispersão entre as duas populações fosse removida, seria esperado que, do cruzamento entre os indivíduos das duas populações fossem gerados descendentes férteis? Em caso negativo, justifique a resposta.

5. Inferindo que as populações estudadas na verdade são duas espécies distintas e filogeneticamente relacionadas, utilizar o critério da **parcimônia** para indicar qual seria a condição **plesiomórfica** e a condição derivada para os caracteres extraídos dos cariótipos analisados, utilizando o *outgroup* para tal otimização.

RESPOSTAS ESPERADAS

Questão 1

Através da diferença no padrão de bandas claras e escuras do bandamento C e bandamento G, é possível não só encontrar as diferenças entre as populações como, também, identificar de modo preciso os pares homólogos. Um exemplo disso é o par 4 da população 01 e do *outgroup*. Esse cromossomo possui morfologia semelhante ao cromossomo sexual masculino, o que pode gerar erros no emparelhamento. O padrão de bandas do par 4 em ambas as técnicas é bem distinto, o que ajuda na identificação dos pares.

Questão 2

O método de bandamento C marca seletivamente a heterocromatina constitutiva que está localizada primordialmente nas regiões centroméricas dos cromossomos. No entanto, marcações em regiões intersticiais dos cromossomos podem ser observadas também como, por exemplo, a banda escura observada nos braços curtos dos homólogos do par 3 no cariótipo da população 02.

Questão 3

O último par dos cariótipos das espécies compreendem os cromossomos sexuais. No caso do cariótipo masculino, os cromossomos sexuais são heteromórficos, cuja principal diferença é a morfologia. Como o heteromorfismo está presente no cariótipo do macho, ele é considerado como de sexo heterogamético. Compatível com essa observação pode-se dizer que o sistema de determinação sexual que ocorre nessas populações é do tipo XX/XY. Enquanto um dos cromossomos é maior e metacêntrico, o outro cromossomo é consideravelmente menor e acrocêntrico.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS (gabarito)

Questão 1

Se comparada a análise das três populações (pop. 01, pop. 02 e *outgroup*), verifica-se que é possível distingui-las. A população 02 apresenta 2n=8 cromossomos enquanto as demais possuem 2n=10 cromossomos (Figura 10). Outro dado que se pode extrair da análise desses cariótipos por coloração convencional é a determinação do número fundamental de autossomos (NFa), que é determinado considerando o número de braços cromossômicos de cada cromossomo do complemento de autossomos. Por exemplo, os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos apresentam dois braços cromossômicos (braço curto – "p" e braço longo – "q"), enquanto os cromossomos acrocêntricos e telocêntricos apresentam apenas um braço cromossômico (braço longo) (Figura 11).

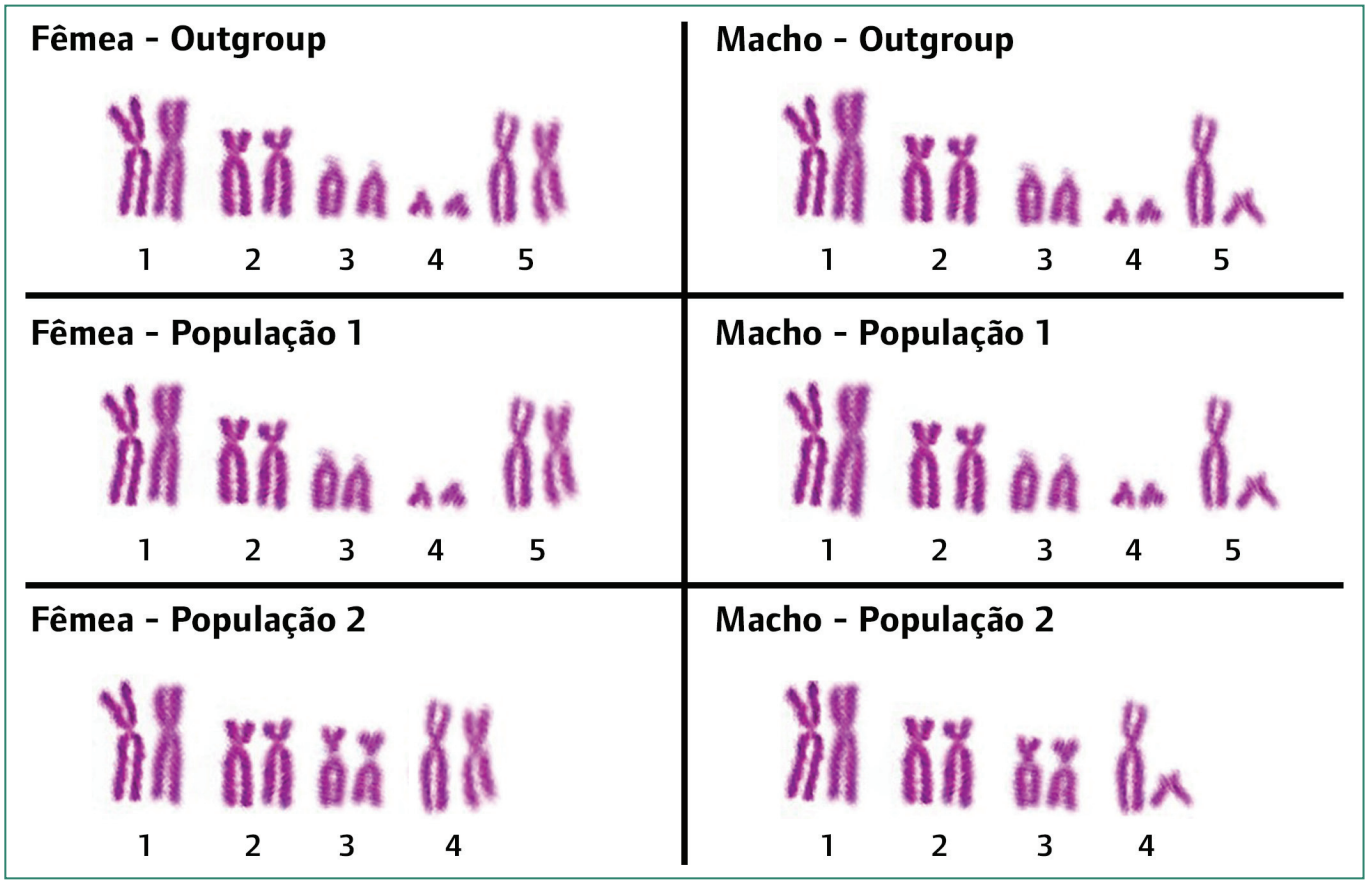


Figura 10.
Cariótipos montados a partir de cromossomos submetidos à coloração convencional.

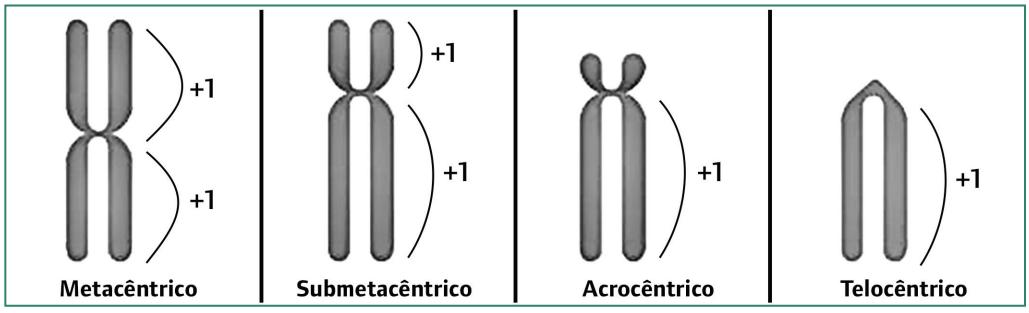


Figura 11.
Método de determinação do número fundamental de autossomos (NFa).

Tabela para cálculo do número fundamental de autossomos (NFa) do cariótipo.

População	2n	Nº de metacêntricos e submetacêntricos x 2		Nº de acrocêntricos e telocêntricos x 1	Resultado
Outgroup			+		
População 1			+		
População 2			+		

Questão 2

Após analisar os cariótipos do *outgroup*, é possível identificar através do bandamento G (Figura 12) a ocorrência de uma inversão paracêntrica nos braços longos do par 1 da população 02. Quando comparado o cariótipo do *outgroup* com o cariótipo da população 02, é possível sugerir que durante a evolução dessa espécie ocorreu uma translocação Robertsoniana entre os cromossomos ancestrais 3 e 4 (fusão de dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos pela região do centrômero). É possível de ser identificada, tal ocorrência, devido às seguintes evidências: (a) redução do número cromossômico, (b) padrão de bandamento G e foram validados por (c) através do experimento de FISH utilizando os cromossomos inteiros como sondas.

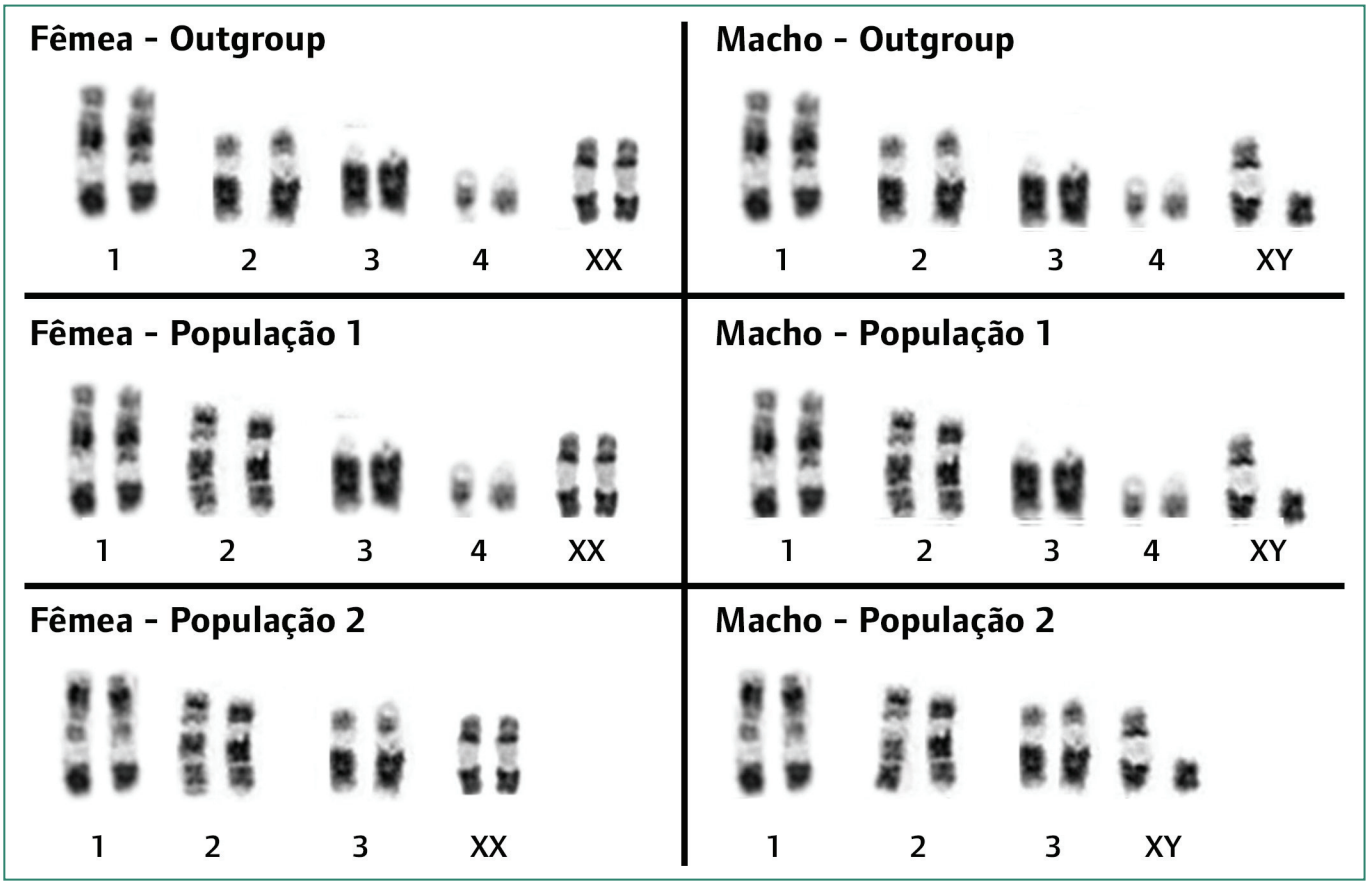


Figura 12.
Cariótipos montados a partir de cromossomos submetidos ao método de bandeamento G.

Questão 3

Inicialmente são comparados os cariótipos das três populações e são estabelecidas as homologias interpopulacionais, levando em consideração: (a) a morfologia dos cromossomos e (b) o padrão de bandamento cromossômico verificado.

A morfologia entre os cromossomos do *outgroup* e da população 1 permanece conservada, apesar uma inversão paracêntrica presente nos cromossomos do par 1 da população 2, detectada principalmente pela posição invertida do padrão de bandas, mesmo não ocorrendo alteração da morfologia desse cromossomo, como esperado para este tipo de rearranjo. Já ao se analisar a morfologia dos cromossomos do cariótipo da população 02 em relação ao *outgroup*, detecta-se uma mudança não só na morfologia do par cromossômico 1 (conforme a descrita acima), mas também uma redução no número de cromossomos para 8. Isso ocorreu devido a uma translocação robertosoniana entre pares 3 e 4 do cariótipo ancestral (*outgroup*). Essa translocação pode ser identificada através do padrão de bandamento C (Figura 13), sendo possível observar mesmo o padrão de bandas escuras (2 bandas) presente no par do cromossomo ancestral 3 do *outgroup*, no braço longo do par 3 da população 02; no par 4 do *outgroup* uma banda heterocromática semelhante ao do braço curto do par 3 da população 02. No bandamento G, também é possivel observar que a região centromérica não se encontra evidenciada somente na constrição principal, mas também há bandas escuras no braço curto do par 3 da espécie 02.

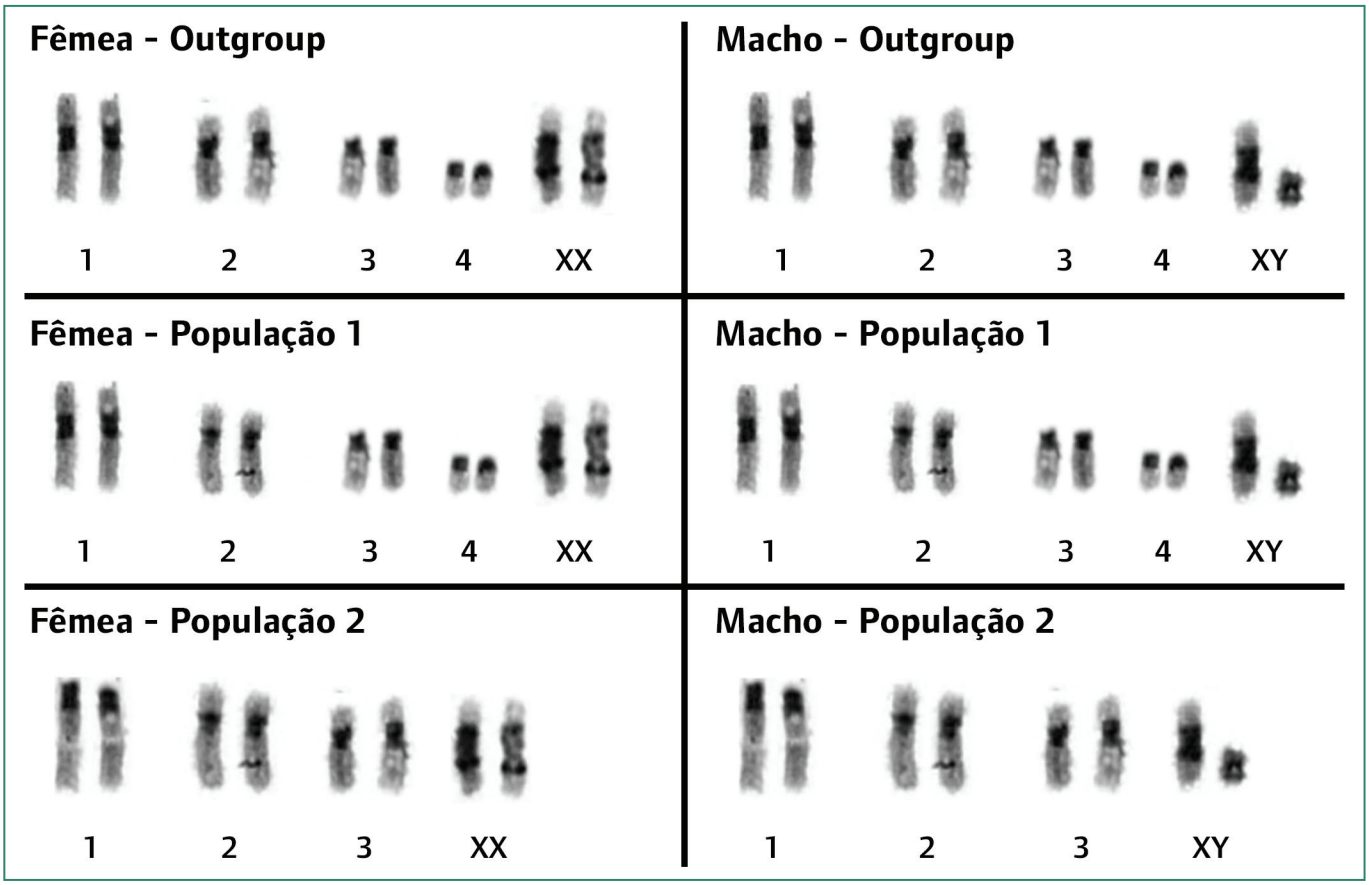


Figura 13.
Cariótipos montados a partir de cromossomos submetidos ao método de bandamento C.

Questão 4

É possível, pois os cromossomos 3 e 4 da população 01, ainda podem emparelhar durante a divisão meiótica com o cromossomo 3 e 4, da população 02, uma vez que, o cromossomo 3 é resultado de uma translocação robertsoniana entre os cromossomos 3 e 4. A Figura 14 esquematiza o possível emparelhamento entre os cromossomos 3 e 4 do *outgroup* e população 01, e cromossomo 3 da população 02.

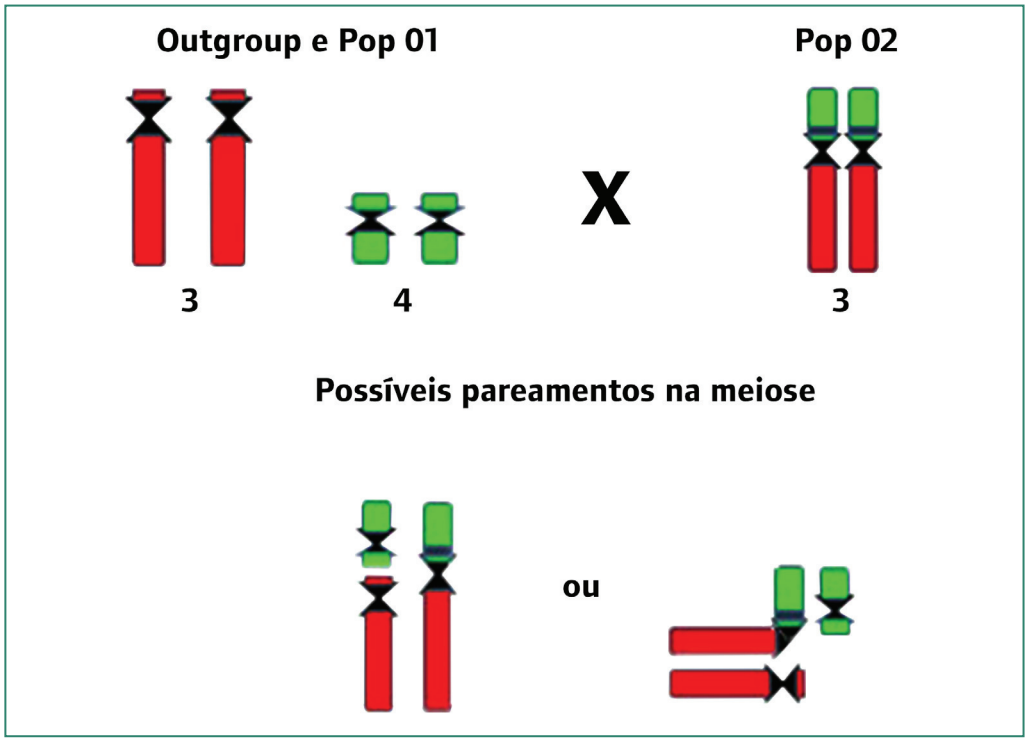


Figura 14.
Possível pareamento entre os cromossomos 3 e 4 do outgroup e população 01, e cromossomo 3 da população 02.

Questão 5

Otimização da mudança de estado de **caráter** do cromossomo 1 baseado nas evidências reveladas pelo bandamento C. A Figura 15 apresenta a filogenia proposta com base no padrão de bandas C.

Caráter – É a diferença entre partes ou entre estruturas de organismos diferentes, ou seja, quando há modificações envolvidas. É, portanto, um conceito abstrato e corresponde àquilo que foi modificado em uma estrutura; é a diferença entre a condição derivada e a primitiva.

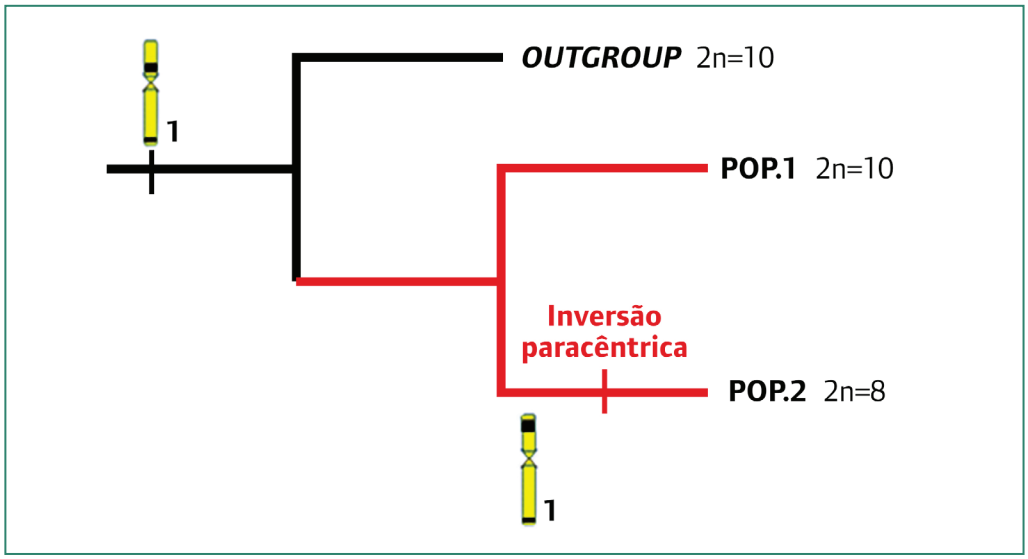


Figura 15.
Filogenia construída baseada nas evidências do bandamento C.

Otimização da mudança de estado de caráter do cromossomo 1 baseado nas evidências reveladas pelo bandamento G e confirmadas pelo FISH (Figura 16).

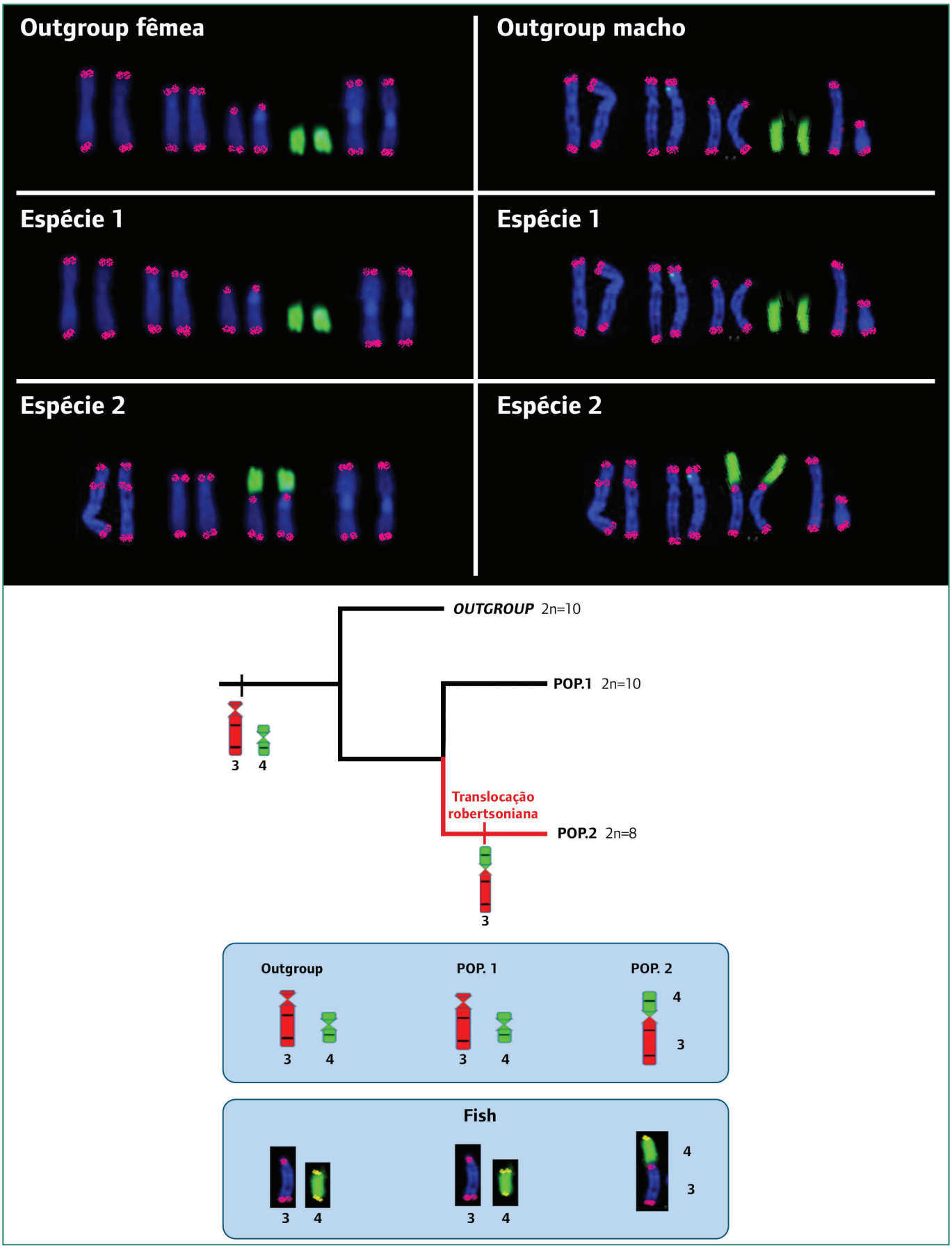


Figura 16.
Filogenia baseada nas evidências reveladas pelo bandamento G e confirmadas pelo FISH e cariótipos montados a partir de cromossomos submetidos ao método de FISH.

ANEXO 1

Rearranjos cromossômicos

Diversos mecanismos podem alterar a morfologia e o número cromossômico das espécies promovendo rearranjos cromossômicos. Estes rearranjos são originados, em geral, de maneira espontânea no genoma interfásico e evidenciados nos cromossomos metafásicos. Os rearranjos podem ser equilibrados como nos casos das inversões e translocações, quando não há perda de informação genética contida no conjunto cromossômico, havendo apenas uma reorganização. As inversões podem ser do tipo pericêntrica, quando envolve a região do centrômero no rearranjo, ou paracêntrica, quando ocorre no mesmo braço cromossômico sem envolver o centrômero. Enquanto que, no caso de uma inversão pericêntrica, ocorre a alteração da morfologia do cromossomo. Um exemplo: um cromossomo metacêntrico pode adquirir uma morfologia telocêntrica, ao passo que no caso de uma inversão paracêntrica não ocorre alteração da morfologia do cromossomo rearranjado. Um outro exemplo de rearranjo equilibrado são as translocações, que podem ser recíprocas quando ocorre a quebra de porções de cromossomos não homólogos e posterior fusão recíproca dos dois segmentos cromossômicos, ou Robertsoniana no caso de ocorrer a fusão total de dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos. Existem também os rearranjos não equilibrados, quando ocorre alteração na informação genética, seja por adição de conteúdo, no caso de duplicações, ou perda de segmento cromossômico em uma deleção.

Existem diferentes métodos de coloração cromossômica que permitem a determinação do número e da morfologia dos pares homólogos e reconhecer possíveis rearranjos estruturais. O método de coloração convencional ou comum utiliza corantes de característica basófila, os quais coloram uniformemente os cromossomos como por exemplo, quando do uso do corante azur-eosina-azul de metileno, conhecido como Giemsa e orceína acética, permitindo um bom reconhecimento em microscopia de luz. Este tipo de coloração representa uma metodologia rápida, eficiente, de fácil aplicação e de baixo custo, principalmente quando empregada em espécies cujas informações cromossômicas são totalmente desconhecidas como ocorre em grande parte de nossa diversidade biológica. No entanto, existem cariótipos em que os elementos são extremamente homogêneos, de forma que a distinção entre os pares cromossômicos ou sua distinção entre espécies requer o uso de métodos de coloração diferencial, conhecidos como bandamentos cromossômicos.

Os métodos de bandamento cromossômico têm como objetivo evidenciar regiões ou porções específicas ao longo dos cromossomos. Nesses métodos, os cromossomos já fixados em lâminas são submetidos a tratamentos que incluem processos de desidratação, envelhecimento, desnaturação e/ou digestão enzimática, seguida de incorporação de corante DNA-específico.

Por exemplo, o bandamento G é a metodologia frequentemente utilizada em estudos de mamíferos, quando primeiramente ocorre um tratamento com a enzima tripsina, seguido de coloração com Giemsa, formando um padrão de marcação longitudinal com regiões G positivas (bandas escuras - sequências ou conteúdo genético rico em nucleotídeos de adenina e timina), e regiões G negativas (bandas claras - sequências ou conteúdo genético rico em nucleotídeos de guanina e citosina). Assim, a comparação entre o padrão de bandas longitudinais de cada cromossomo permite claramente emparelhar os pares de cromossomos homólogos, já que cada par cromossômico apresentará um padrão único de bandas claras e escuras. Um eventual rearranjo, como uma inversão, por exemplo, alterará o padrão de marcação longitudinal desse cromossomo, facilitando a identificação.