

# Estrutura e Função dos Cromossomos

# 2

## CONCEITOS PRINCIPAIS

- Os cromossomos possuem duas funções fundamentais: a transmissão fiel e a expressão apropriada da informação genética.
- Os cromossomos procarióticos incluem moléculas de DNA circular de dupla-fita, que são relativamente livres de proteínas, e os cromossomos eucarióticos consistem em moléculas de DNA linear de dupla-fita complexadas a proteínas por toda a sua extensão.
- Cromatina é o complexo de DNA e proteínas dos cromossomos eucarióticos. As proteínas complexadas possuem funções estruturais, incluindo a compactação do DNA de diferentes maneiras, e também funções regulatórias.
- Os cromossomos passam por grandes mudanças durante o ciclo celular, particularmente na fase S, quando eles se replicam, e na fase M, quando os cromossomos replicados se separam e são distribuídos para duas células-filhas.
- A replicação do DNA na fase S produz duas moléculas filhas de DNA dupla-fita que se mantêm unidas em uma região especializada: o centrômero. Quando as moléculas filhas de DNA ficam unidas dessa maneira, elas são conhecidas como cromátides-irmãs, mas uma vez que elas se separam na fase M, se tornam cromossomos individuais.
- Na metáfase, etapa da fase M, os cromossomos encontram-se tão altamente condensados que a expressão gênica é uniformemente interrompida. No entanto, esse é o momento ideal para sua visualização em microscópio. Colorações com corantes que se ligam preferencialmente a regiões ricas em GC ou AT podem fornecer padrões de bandas cromossômicas reprodutíveis que permitem a identificação dos diferentes cromossomos.
- Durante a interfase, longo período do ciclo celular que separa sucessivas fases M, os cromossomos geralmente possuem conformações longamente estendidas e não são visíveis sob microscopia óptica. A estrutura estendida significa que os genes podem ser expressos de maneira eficiente.
- Até mesmo durante a interfase algumas regiões cromossômicas permanecem sempre altamente condensadas e transcricionalmente inativas (heterocromatina), enquanto outras são estendidas para permitir a expressão gênica (eucromatina).
- Espermatozoides e ovócitos secundários possuem uma cópia de cada cromossomo (eles são haploides), mas a maioria das células são diploides, possuindo dois conjuntos cromossômicos.
- A fertilização de um ovócito secundário haploide por um espermatozoide haploide dá origem a um zigoto diploide, a partir do qual surgem, por divisão celular, todas as outras células do corpo.
- Na mitose, uma célula se divide para dar origem a duas células-filhas, cada uma com o mesmo número e com os mesmos tipos de cromossomos da célula original.
- A meiose é uma forma especializada de divisão celular que ocorre em determinadas células dos testículos e dos ovários para produzir espermatozoides e ovócitos secundários haploides. Durante a meiose, novas combinações genéticas são randomicamente criadas, em parte, pela troca de sequências entre os cromossomos maternos e paternos.
- Três tipos de elementos funcionais são necessários para os cromossomos eucarióticos transmitirem fielmente o DNA das células-mães para as células-filhas: o centrômero (assegura a segregação cromossômica correta durante a divisão celular); as origens de replicação (desencadeiam a replicação do DNA); e os telômeros (cobrem as pontas dos cromossomos para impedir que o DNA interno seja degradado por nucleases).
- Algumas vezes um número anormal de cromossomos pode ocorrer, mas essa anomalia é frequentemente letal se presente na maioria das células do corpo.
- Anomalias cromossômicas estruturais decorrentes de quebras cromossômicas podem causar a deleção ou a expressão incorreta de genes.
- Possuir o número e a estrutura correta dos cromossomos não é suficiente. Eles também devem possuir a origem parental correta, pois alguns genes são expressos preferencialmente em cromossomos herdados ou paternalmente ou maternalmente.

A estrutura básica e as funções fundamentais do DNA – replicação e transcrição – foram introduzidas no capítulo anterior. No entanto, o DNA opera em um contexto. Nas células eucarióticas, as longas moléculas de DNA no núcleo estão complexadas com uma variedade de proteínas estruturais e regulatórias, estruturadas em cromossomos lineares. As moléculas de DNA mitocondrial são diferentes: elas são comparativamente pequenas, possuem poucas proteínas associadas e são circulares.

Este capítulo introduz o ciclo de vida dos cromossomos em células eucarióticas, as quais são formadas, geralmente, a partir da divisão de outras células. O processo de divisão celular é um pequeno componente do ciclo celular, no qual os cromossomos e as moléculas de DNA que os constituem devem fazer cópias perfeitas deles mesmos e, então, segregam em/para células-filhas. Existem diferenças importantes entre como isso ocorre em divisões celulares de rotina e na forma especializada de divisão celular que dá origem a espermatozoides e ovócitos secundários.

Um aspecto comum de ambos os tipos de divisão celular é a importância da condensação cromossômica para as células. Ela afeta a expressão da informação codificada no DNA e torna os longos e frágeis fios de ácido desoxirribonucleico resistentes à quebra durante os drásticos rearranjos que ocorrem na divisão celular. A utilização de corantes que evidenciam cromossomos condensados revela padrões que, como impressões, podem ser utilizados na diferenciação dos cromossomos. A análise cuidadosa destes e de outros padrões pode revelar evidências de anomalias cromossômicas, tais como quebras e rearranjos, que tenham ocorrido e se mantido, podendo causar enfermidades.

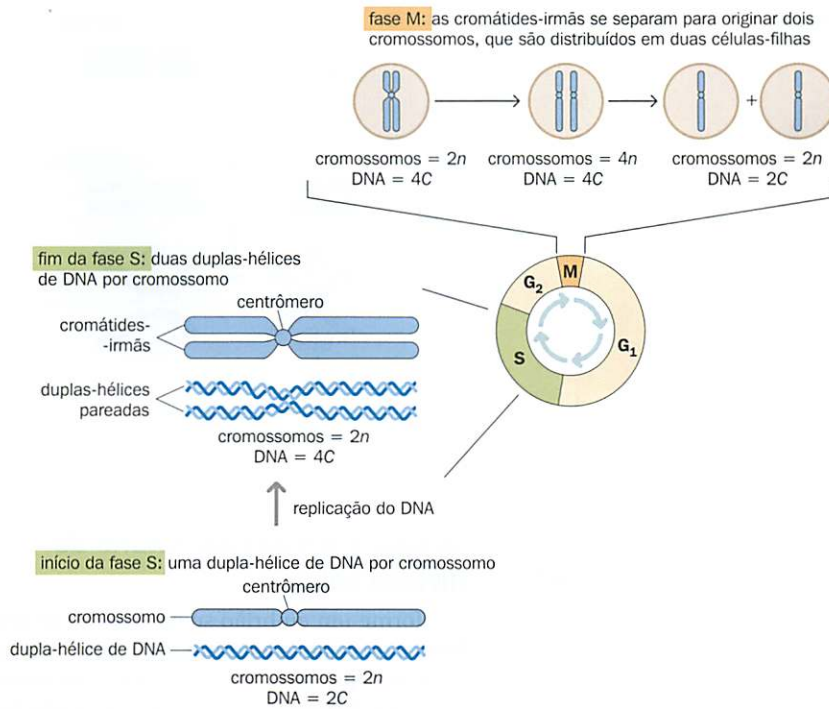
## 2.1 PLOIDIA E CICLO CELULAR

O conteúdo de cromossomos e DNA das células é definido pelo número ( $n$ ) de cromossomos diferentes, pelo **conjunto cromossômico** e pelo conteúdo de DNA associado ( $C$ ). Para células humanas,  $n = 23$  e  $C$  é cerca de 3,5 pg ( $3,5 \times 10^{-12}$  g). Diferentes tipos celulares em um organismo, entretanto, podem diferir em **ploidia** – número de cópias de cada conjunto cromossômico que elas possuem. Espermatozoides e ovócitos secundários portam um único conjunto cromossômico e são ditos **haploides** (eles possuem  $n$  cromossomos e um conteúdo de DNA de  $C$ ). A maioria das células de humanos e mamíferos leva duas cópias do conjunto cromossômico e é **diploide** (possuindo  $2n$  cromossomos e um conteúdo de DNA de  $2C$ ). No entanto, em diversas espécies animais que não os mamíferos a maioria das células somáticas não é diploide, mas, em vez disso, é haploide ou poliploide. Em se tratando do último caso, algumas espécies são tetraploides ( $4n$ ), e outras possuem ploidia de mais de  $4n$ , mas a triploidia ( $3n$ ) é menos comum em animais, pois pode gerar problemas na produção de espermatozoides e ovócitos secundários.

As células do corpo humano são, em última análise, derivadas de uma única célula diploide, o **zigoto**, que é formado quando um espermatozoide fertiliza um ovócito secundário. Começando a partir do zigoto, os organismos crescem por repetidos eventos de divisão celular. Cada evento de divisão celular é um **ciclo celular**, que inclui uma fase  $M$  curta, durante a qual ocorre a divisão celular propriamente dita, e uma fase intermediária mais longa, a **interfase**, que possui três partes (**Figura 2.1**). São elas: fase  $S$  (durante a qual ocorre a síntese de DNA), fase  $G_1$  (intervalo entre a fase  $M$  e a fase  $S$ ) e fase  $G_2$  (intervalo entre a fase  $S$  e a fase  $M$ ).

Será descrita a biologia celular que permeia as fases do ciclo celular em um capítulo posterior. Neste capítulo, o foco é o ciclo de vida dos cromossomos. Durante cada ciclo celular, os cromossomos passam por profundas modificações quanto à sua estrutura, número e distribuição dentro da célula. Do final da fase  $M$  até a duplicação do DNA na fase  $S$ , um cromossomo de uma célula diploide contém uma única dupla-hélice de DNA e o conteúdo total de DNA é  $2C$  (ver **Figura 2.1**). Após a duplicação do DNA, o conteúdo total de DNA é  $4C$ , mas as duplas-hélices duplicadas ficam unidas ao longo de sua extensão de forma que cada cromossomo possua o dobro do conteúdo de DNA no início da fase  $S$ . Durante a fase  $M$ , as duplas-hélices duplicadas se separam, gerando dois cromossomos-filhos e um total de  $4n$  cromossomos. Após a divisão uniforme dos cromossomos para as duas células-filhas, ambas as células terão  $2n$  cromossomos e um conteúdo de DNA de  $2C$  (ver **Figura 2.1**).

O estado normal de uma célula é  $G_1$ , que é, em longo prazo, o estado final de células as quais não continuam se dividindo. As células só entram na fase  $S$  se estiverem comprometidas a sofrer mitose; como será descrito com mais detalhes no Capítulo 4, células que não estão programadas para se dividir permanecem em um estado modificado de  $G_1$ , algumas vezes chamado de fase  $G_0$ . O diagrama do ciclo celular pode dar a impressão de que todas as ações interessantes acontecem nas fases  $S$  e  $M$  – mas isso é uma ilusão. Uma



**Figura 2.1** Mudanças nos cromossomos e no conteúdo de DNA durante o ciclo celular. O ciclo celular mostrado à direita inclui uma fase M bastante curta, quando os cromossomos se tornam altamente condensados como preparação para as divisões nuclear e celular. Mais tarde, as células entram em um longo período de crescimento chamado de interfase, durante o qual os cromossomos se encontram extremamente distendidos de forma que os genes possam ser expressos. A interfase é dividida em três fases: G<sub>1</sub>, S (quando o DNA se replica) e G<sub>2</sub>. Os cromossomos possuem uma única dupla-hélice de DNA do final da fase M até a duplicação do DNA na fase S. Após a dupla-hélice de DNA ser duplicada, as duas duplas-hélices resultantes ficam fortemente unidas ao longo de sua extensão (por meio de complexos proteicos especializados chamados de coesinas) até a fase M. À medida que os cromossomos se condensam na fase M, é possível visualizar que eles se constituem de duas cromátides-irmãs, cada uma contendo um dúplex de DNA, que são mantidas unidas apenas nos centrômeros. Durante a fase M, as duas cromátides-irmãs se separam para formar dois cromossomos independentes, que são, então, igualmente distribuídos nas células-filhas.

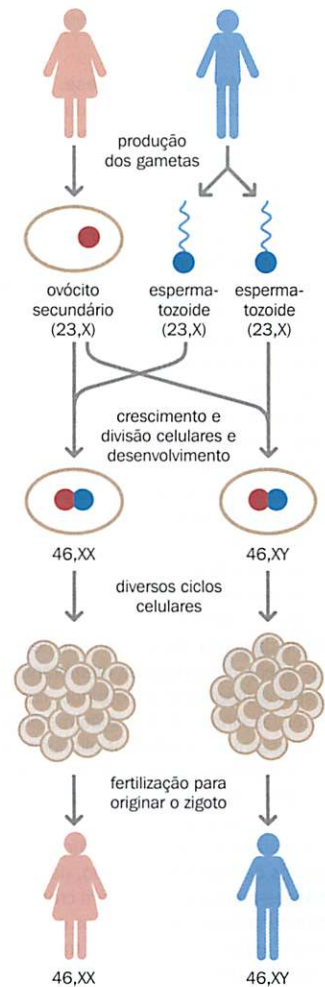
célula passa a maior parte da sua vida nas fases G<sub>0</sub> ou G<sub>1</sub>, e é nesses estágios que o genoma trabalha mais intensamente.

Um pequeno subconjunto de células diploides do corpo constitui a **linhagem germinativa**, a qual dá origem aos **gametas** (espermatozoides ou ovócitos secundários). Em humanos, nos quais  $n = 23$ , cada gameta contém um cromossomo sexual mais 22 cromossomos não sexuais (**autossomos**). Nos ovócitos secundários, o cromossomo sexual é sempre um X; nos espermatozoides, pode haver tanto um X como um Y. Após um espermatozoide haploide fecundar um ovócito II haploide, o zigoto diploide resultante e praticamente todas as células descendentes dele possuem constituição cromossômica 46,XX (sexo feminino) ou 46,XY (sexo masculino) (Figura 2.2).

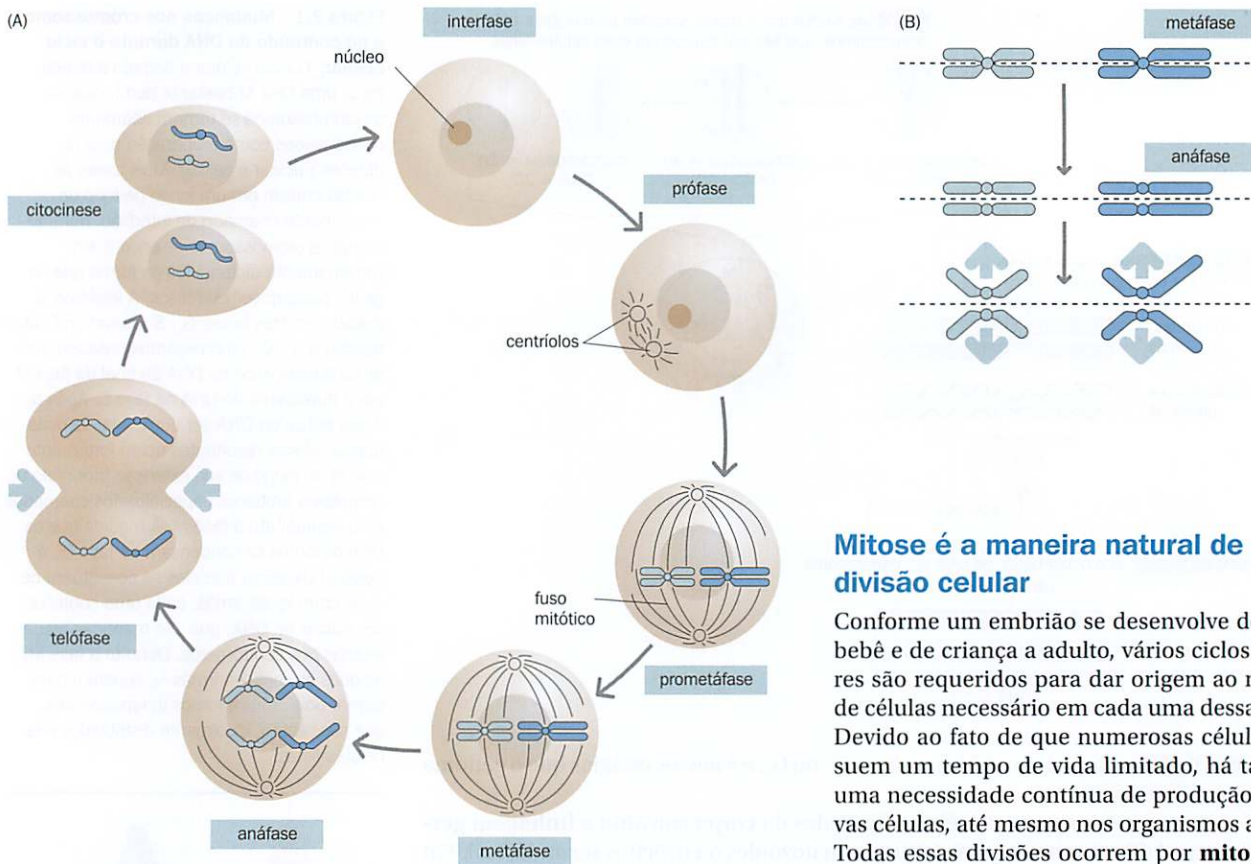
As células que não fazem parte da linhagem germinativa são as **células somáticas**. As células somáticas humanas são geralmente diploides, mas, como será descrito posteriormente, existem exceções eminentes. Alguns tipos de células que não estão programadas para se dividir não possuem núcleo nem tampouco cromossomos e são chamadas de nuliploides. Outros tipos celulares possuem múltiplos conjuntos cromossômicos; eles são naturalmente poliploides, como resultado de múltiplas replicações do DNA sem que haja divisão celular.

## 2.2 MITOSE E MEIOSE

Mitose e meiose são dois processos de divisão celular que envolvem replicação cromossômica e divisão celular. Entretanto, os produtos da mitose possuem o mesmo nível de ploidia da célula inicial, enquanto a meiose diminui pela metade o nível de ploidia das células. Além disso, enquanto a mitose dá origem a produtos geneticamente idênticos, a meiose gera diversidade genética para garantir que a prole seja geneticamente diferente da geração parental.



**Figura 2.2** O ciclo de vida humano sob um ponto de vista cromossômico. Ovócitos secundários e espermatozoides são originados a partir de precursores diploides nos ovários e nos testículos em mulheres e homens, respectivamente. Todos os ovócitos secundários possuem um conjunto cromossômico de 23,X, representando 22 autossômicos, mais um único cromossomo sexual X. Um espermatozoide pode carregar qualquer um dos dois cromossomos sexuais, de forma que sua constituição cromossômica pode ser 23,X (50%), ou 23,Y (50%). Após a fertilização e a fusão dos núcleos do ovócito secundário e do espermatozoide, o zigoto diploide poderá ter tanto uma constituição cromossômica 46,XX, como 46,XY, dependendo de qual cromossomo sexual o espermatozoide envolvido na fertilização carregava. Após diversos ciclos celulares, o zigoto dá origem a todas as células do corpo adulto, a maioria das quais possuirá o mesmo complemento cromossômico do zigoto a partir do qual elas se originaram.



**Figura 2.3 Mitose e citocinese.** (A) Fases da mitose e citocinese. No final da intérfase, os cromossomos duplicados ainda estão dispersos no núcleo, e o nucléolo ainda é distinguível. No início da prófase – primeira fase da mitose –, os centríolos (os quais foram previamente duplicados na intérfase) começam a se separar e migrar para polos opostos da célula, onde formarão os polos do fuso. Na prometáfase, o envelope nuclear se desfaz, e os cromossomos, os quais se encontram altamente condensados nesta etapa, se ligam pelo centrômero ao arranjo de microtúbulos que se estendem a partir do fuso mitótico. Na metáfase, todos os cromossomos se posicionam ao longo do centro do fuso mitótico. Na anáfase, as cromátides-irmãs se separam e começam a migrar em direção a polos opostos da célula, como resultado do encurtamento dos microtúbulos e também da separação dos polos do fuso. Durante a telófase, o envelope nuclear é formado novamente em torno dos núcleos das células-filhas, e os cromossomos se descondesam, completando a mitose, e, a partir daí, começa o processo de contração da célula. Durante a citocinese, filamentos que se encontram abaixo da membrana plasmática contraem o citoplasma, produzindo, finalmente, duas células-filhas. (B) Transição metáfase-anáfase. Os cromossomos metafásicos alinhados ao longo da placa equatorial (linha tracejada) possuem cromátides-irmãs fortemente unidas (por complexos proteicos de coesina) nos centrômeros. A transição para a anáfase é marcada pela ruptura dos complexos de coesina, liberando, dessa forma, as cromátides-irmãs para formarem cromossomos independentes com seus próprios centrômeros, os quais são, então, puxados pelos microtúbulos do fuso em direção a polos opostos (setas).

### Mitose é a maneira natural de divisão celular

Conforme um embrião se desenvolve de feto a bebê e de criança a adulto, vários ciclos celulares são requeridos para dar origem ao número de células necessário em cada uma dessas fases. Devido ao fato de que numerosas células possuem um tempo de vida limitado, há também uma necessidade contínua de produção de novas células, até mesmo nos organismos adultos. Todas essas divisões ocorrem por **mitose**, que é o processo natural de divisão celular ao longo do ciclo de vida humano. A mitose assegura que uma única célula dê origem a duas células-filhas

que são geneticamente idênticas à célula-mãe, bloqueando quaisquer erros que possam ter ocorrido durante a replicação do DNA. Durante a vida de um humano, podem ocorrer cerca de  $10^{17}$  divisões mitóticas.

A fase M do ciclo celular compreende vários estágios de divisão nuclear (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e também de divisão celular (**citocinese**), a qual ocorre concomitantemente com os estágios finais da mitose (Figura 2.3). Em preparação para a divisão celular, os cromossomos duplicados – anteriormente altamente distendidos – contraem-se e condensam-se, de forma que no estágio de metáfase da mitose são facilmente visualizados sob microscopia.

Os cromossomos do início da fase S possuem uma dupla-hélice de DNA, mas, após a replicação, duas duplas-hélices idênticas de DNA são produzidas (ver Figura 2.1). Elas permanecem unidas ao longo de toda a sua extensão por meio de complexos proteicos formados por multissubunidades chamados de coesinas. Dados recentes sugerem que subunidades individuais de coesina ligam-se entre si para formar grandes anéis proteicos. Alguns modelos sugerem que múltiplos anéis de coesina circundam as duas duplas-hélices de DNA envolvendo-as ao longo de toda sua extensão ou que os anéis de coesina circundam cada uma das duas duplas-hélices individualmente e então interagem para assegurar que as duas duplas-hélices fiquem fortemente unidas.

Mais tarde, quando os cromossomos já passaram pelo processo de compactação, preparando-se para a divisão celular, as coesinas são removidas de todas as partes do cromossomo, com exceção do centrômero. Conseqüentemente, na prometáfase, quando é possível visualizar os cromossomos por meio de microscopia de luz, pode-se ver que cada cromossomo possui duas **cromátides-irmãs** as quais se ligam ao centrômero por remanescentes dos complexos de coesina que continuam a vincular as duas hélices de DNA nesta posição.

Ainda mais tarde, no início da anáfase, os complexos de coesina remanescentes que unem as cromátides na região do centrômero são removidos. As duas cromátides-irmãs podem, então, se separar, tornando-se cromossomos indepen-

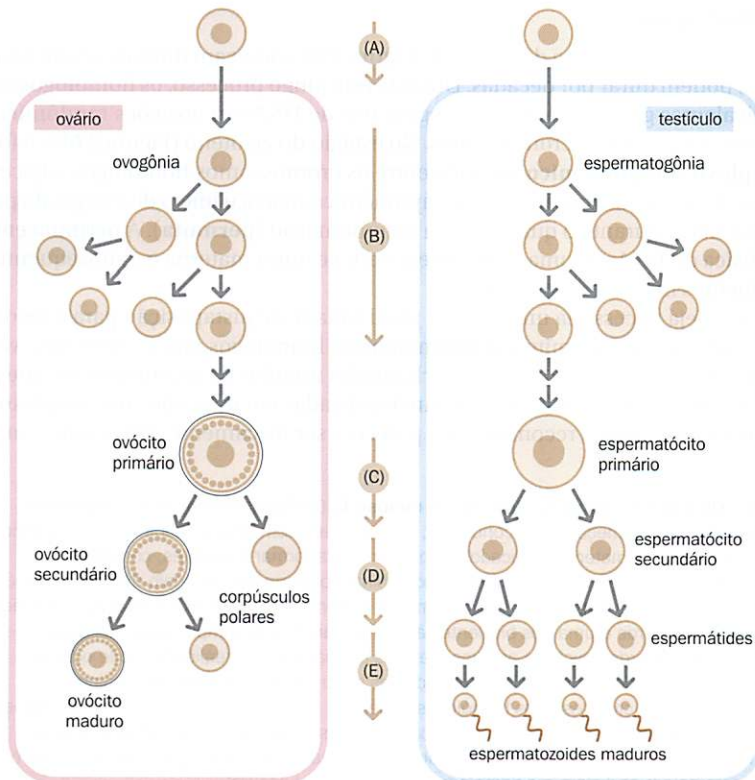
mentos que serão puxados para polos oposto da célula e, posteriormente, igualmente distribuídos nas células-filhas (ver Figura 2.3). A interação entre o fuso mitótico e o centrômero é crucial para esse processo e será considerada em detalhes na Seção 2.3.

### Meiose é uma divisão celular reducional especializada que dá origem a ovócitos secundários e espermatozoides

As células germinativas primordiais diploides migram para as gônadas embrionárias e dão início a repetidos ciclos mitóticos que geram espermatogônias nos homens e ovogônias nas mulheres. O crescimento e a diferenciação posteriores produzem espermatócitos nos testículos e ovócitos primários nos ovários. Neste processo, são necessárias numerosas divisões a mais em homens do que em mulheres e isso, provavelmente, contribui para as diferenças nas taxas de mutação entre os sexos.

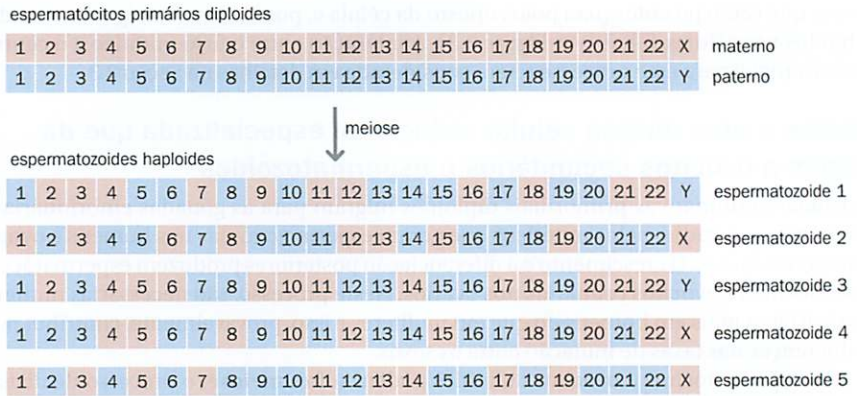
Os espermatócitos e ovócitos diploides podem sofrer **meiose**, o processo de divisão celular que produz gametas haploides. A meiose é uma divisão *reducional* porque envolve duas divisões celulares sucessivas (conhecidas como meiose I e II), mas somente um evento de duplicação de DNA. Conseqüentemente, ela dá origem a quatro células haploides. Nos homens, as duas divisões celulares meióticas são simétricas, produzindo, ao final, quatro espermatozoides funcionalmente equivalentes. A meiose nas mulheres é diferente, pois tanto na meiose I como na meiose II há uma divisão celular assimétrica que resulta em uma divisão desigual de citoplasma. Os produtos da meiose I nas mulheres (a primeira divisão meiótica) são um grande ovócito secundário e uma pequena célula (**corpúsculo polar**) que é descartada. Durante a meiose II são originados, então, o grande ovócito secundário maduro e um segundo corpúsculo polar, o qual é novamente descartado (Figura 2.4).

Em humanos, os ovócitos primários entram na meiose I durante o desenvolvimento fetal, mas são, então, mantidos em prófase até pouco depois do começo da puberdade. Depois da puberdade, nas mulheres, um ovócito primário completa a meiose a cada ciclo menstrual. Devido ao fato de que a ovulação pode continuar ocorrendo até a quinta - e algumas vezes até a sexta - década da vida, a meiose pode ser detida por muitas décadas nos ovócitos primários, que passarão pelo processo de ovulação mais tarde na vida. Enquanto detidos na prófase, os ovócitos primários continuam crescendo, adquirindo um revestimento externo gelatinoso, grânulos corticais e reservas de ribossomos, mRNA, nutrientes e outros recursos citoplasmáticos necessários para sustentar um embrião inicial. Nos homens, um grande número de espermatozoides é continuamente produzido da puberdade em diante.



**Figura 2.4** Desenvolvimento das linhagens germinativas e gametogênese em homens e mulheres. (A) Células germinativas primordiais diploides migram para as gônadas embrionárias [ovário nas mulheres (à esquerda) ou testículo nos homens (à direita)] e passam por vários ciclos mitóticos até se estabelecerem as espermatogônias (nos homens) e as ovogônias (nas mulheres). (B) As espermatogônias e as ovogônias sofrem divisões mitóticas adicionais, crescem e se diferenciam para produzir espermatócitos primários diploides e ovócitos primários diploides, sem sofrer meiose. (C) Meiose I. Após as duplicações de DNA, as células tornam-se tetraploides, mas em seguida elas se dividem para dar origem a duas células diploides. Na gametogênese masculina, a divisão celular é simétrica, gerando espermatócitos secundários diploides idênticos. Na meiose I, em mulheres, por outro lado, a divisão é assimétrica; o ovócito secundário é bem maior que o primeiro corpúsculo polar, o qual é descartado. (D) Meiose II. O espermatócito secundário e o ovócito secundário (ambos diploides) se dividem sem síntese prévia de DNA para originar produtos celulares haploides. Na gametogênese masculina, essa divisão é novamente simétrica, produzindo duas espermátides haploides a partir de cada espermatócito secundário. Na meiose II feminina, o ovócito secundário gerado após essa segunda etapa de divisão é muito maior que o segundo corpúsculo polar (que também é descartado). (E) A maturação das espermátides produz quatro espermatozoides.

**Figura 2.5 Segregação independente dos homólogos maternos e paternos durante a meiose.** A figura mostra uma seleção randômica de apenas cinco das 8.388.608 ( $2^{23}$ ) combinações teoricamente possíveis dos homólogos que podem ocorrer em um espermatozoide humano após a meiose em um espermátocito primário diploide. Os homólogos de origem materna estão representados por caixas rosa, e os de origem paterna por caixas azuis. Para simplificação, o diagrama ignora a possibilidade de recombinação.



A segunda divisão da meiose é idêntica à mitose, mas a primeira divisão possui diferenças importantes, pois seu propósito é gerar *diversidade genética* entre as células-filhas. Isso acontece por meio de dois mecanismos: segregação independente dos homólogos paternos e maternos e recombinação.

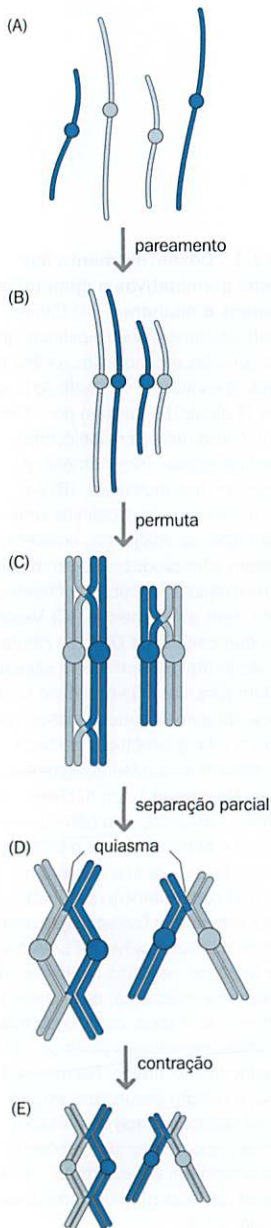
### Segregação independente

Toda célula diploide contém dois conjuntos cromossômicos, possuindo, dessa forma, duas cópias (**homólogos**) de cada cromossomo (exceto no caso especial do X e do Y em homens). Um homólogo é herdado paternalmente, e o outro maternalmente. Durante a meiose I, os homólogos materno e paterno de cada par dos cromossomos replicados sofrem **sinapse** por meio de seu pareamento para formar **bivalentes**. Após a replicação do DNA, cada cromossomo homólogo possui duas cromátides-irmãs. Sendo assim, cada bivalente é uma estrutura composta por quatro fitas na placa metafásica. As fibras do fuso puxam, então, um cromossomo completo (duas cromátides) para cada polo. Em humanos, para cada um dos 23 pares de homólogos, a escolha de qual célula-filha ficará com cada um dos cromossomos é independente. Isso permite cerca de  $8,4 \times 10^6$  ou  $2^{23}$  diferentes possíveis combinações dos cromossomos parentais nos gametas que podem ser originados de uma única divisão meiótica (Figura 2.5).

### Recombinação

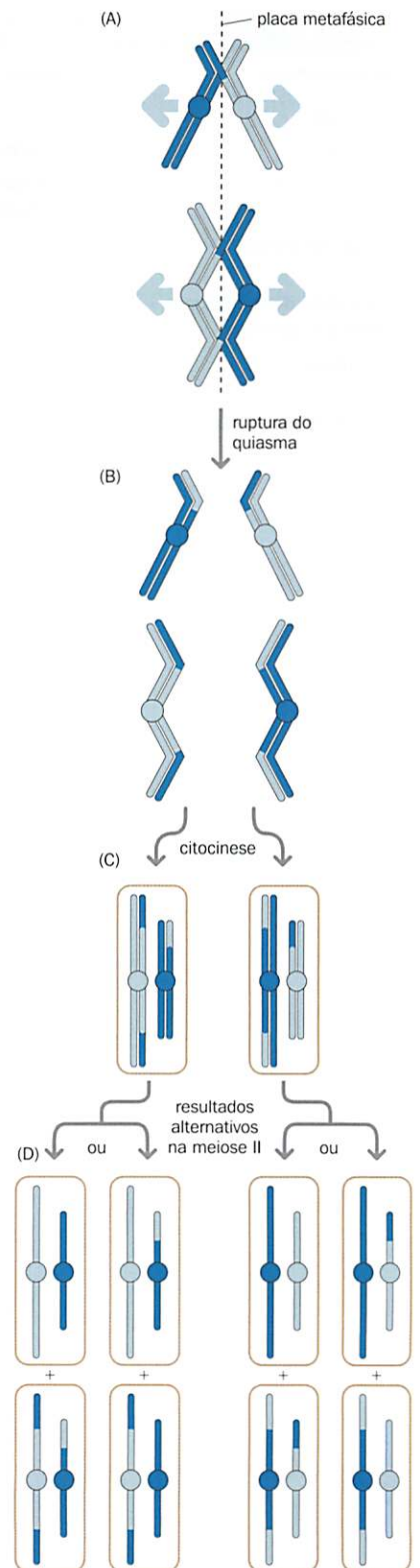
Os cinco estágios da prófase da meiose I (Figura 2.6) começam durante a vida fetal e, em mulheres, podem durar por décadas. Durante este longo processo, os homólogos em cada par de bivalentes geralmente trocam segmentos de DNA em posições randômicas, mas correspondentes nos dois cromossomos. No estágio do zigóteno (Figura 2.6B), é formado um **complexo sinaptonêmico** proteico entre os cromossomos homólogos adjacentes. A conclusão da formação do complexo sinaptonêmico marca o início do estágio do paquíteno (Figura 2.6C), durante o qual ocorre a recombinação (**permuta**). A permuta envolve a ruptura física do DNA em uma cromátide paterna e outra materna e a subsequente união dos fragmentos materno e paterno.

Embora seja necessária uma grande proximidade de justaposição para a recombinação, o mecanismo que permite o alinhamento dos homólogos não é conhecido (ver Figura 2.6A, B). Assembleias multiproteicas, chamadas **nódulos de recombinação**, que podem mediar os eventos de recombinação, ficam localizadas em intervalos no complexo sinaptonêmico. Os homólogos recombinados parecem ser fisicamente conectados em pontos



**Figura 2.6 Os cinco estágios da prófase na meiose I.** (A) No leptóteno, os cromossomos homólogos duplicados começam a se condensar, mas permanecem despareados. (B) No zigóteno, os homólogos paterno e materno duplicados se pareiam para formar bivalentes, constituindo quatro cromátides. (C) No paquíteno, ocorre a recombinação (*permuta*) por meio da ruptura física e subsequente junção dos fragmentos cromossômicos materno e paterno. Há duas recombinações nos bivalentes à esquerda e uma nos bivalentes à direita. Para fins de simplificação, as duas recombinações à esquerda envolvem as duas mesmas cromátides. Na realidade, pode ocorrer mais *permuta*, envolvendo três ou até mesmo todas as quatro cromátides em um bivalente. (D) Durante o diploteno, os cromossomos homólogos podem se separar um pouco, exceto nas regiões dos quiasmas. (E) A diacinese é marcada pela contração dos bivalentes e é a transição para a metáfase I. Nesta figura são ilustrados apenas dois dos 23 pares de homólogos possíveis (com o homólogo materno em azul claro e o homólogo paterno em azul escuro).

**Figura 2.7 Metáfase I para a produção de gametas.** (A) Na metáfase I, os bivalentes alinham-se na placa metafásica, no centro do aparato do fuso. A contração das fibras do fuso puxa os cromossomos em direção aos polos do fuso (setas). (B) A transição para a anáfase I ocorre na ruptura consequente dos quiasmas. (C) A citocinese segrega os dois conjuntos cromossômicos, cada um para um espermatócito primário diferente. Observe que, como mostrado neste painel, após a recombinação durante a prófase I, as cromátides compartilham um único centrômero, mas não são mais idênticas. (D) A meiose II em cada espermatócito primário, a qual não inclui replicações de DNA, gera combinações genéticas únicas nos espermatócitos secundários haploides. Somente duas das 23 combinações cromossômicas possíveis em humanos são retratadas, para maior clareza; então, apenas  $2^2$  (i.e. 4) das  $2^{23}$  (8.388.608) possíveis combinações são ilustradas. Embora a oogênese possa produzir apenas um gameta haploide funcional por divisão meiótica (ver Figura 2.4), os processos pelos quais a diversidade genética surge são os mesmos da espermatogênese.



específicos. Cada uma dessas conexões marca um ponto de permuta e é conhecida como **quiasma**. Há uma média de 55 quiasmas por célula na meiose masculina e talvez 50% a mais na meiose feminina.

Além de seu papel na recombinação, acredita-se que os quiasmas sejam essenciais para a segregação correta dos cromossomos durante a meiose I. Por manterem unidos no fuso os homólogos materno e paterno de cada par cromossômico até a anáfase I, eles possuem um papel análogo ao dos centrômeros na mitose e na meiose II. Já foi geneticamente demonstrado que crianças com um número incorreto de cromossomos são, muitas vezes, o produto de gametas nos quais houve falta de quiasmas em um bivalente.

A meiose II assemelha-se à mitose, exceto pelo fato de que há apenas 23 cromossomos em vez de 46. Cada cromossomo já se constitui de duas cromátides que se separam na anáfase II. Entretanto, enquanto as cromátides-irmãs de um cromossomo mitótico são geneticamente idênticas, as duas cromátides de um cromossomo entrando na meiose II (Figura 2.7) são, geralmente, geneticamente diferentes uma da outra, como resultado dos eventos de recombinação que ocorrem durante a meiose I.

Juntos, os efeitos da recombinação entre os homólogos (durante a prófase I), assim como a segregação independente dos cromossomos (durante a anáfase I), garantem que um único indivíduo possa produzir um número quase ilimitado de gametas geneticamente distintos. As consequências genéticas da recombinação serão consideradas de forma mais completa em um capítulo posterior.

### Pareamento X-Y

Durante a meiose em um ovócito primário humano, cada cromossomo possui um parceiro inteiramente homólogo os dois cromossomos X sofrem sinapse e passam por permuta como qualquer outro par de homólogos. Já na meiose masculina há um problema: os cromossomos sexuais X e Y humanos são muito diferentes um do outro. Não só o cromossomo X é bem maior, mas também possui conteúdo de DNA bastante diferente e um número bem maior de genes que o cromossomo Y. Ainda assim, os cromossomos X e Y pareiam durante a prófase I, garantindo, de tal forma, que na anáfase I cada célula-filha possua um cromossomo sexual, seja ele X ou Y.

Os cromossomos X e Y humanos pareiam nas suas extremidades em vez de ao longo de todo o seu comprimento, graças a pequenas regiões de homologia nesses pontos. O pareamento é mantido por uma permuta obrigatória em uma região de homologia de 2,6 Mb nas terminações dos braços curtos de ambos os cromossomos, mas a permuta também pode ocorrer algumas vezes em uma segunda região de homologia, com 0,32 Mb de comprimento, localizada nas terminações dos braços longos de ambos os cromossomos. Os genes presentes na região terminal X-Y possuem algumas propriedades interessantes:

- Eles estão presentes como cópias homólogas nos cromossomos X e Y.
- A maioria deles não está sujeita à inativação transcricional que afeta grande parte dos genes ligados ao X como resultado da descondensação natural de um dos cromossomos X em células femininas de mamíferos (**inativação do X**).
- Eles apresentam padrões de herança semelhantes aos dos genes presentes em cromossomos autossômicos, em vez de genes ligados ao X ou Y.

Como resultado de seu padrão de herança semelhante ao de genes autossômicos, as regiões terminais de homologia entre os cromossomos X e Y são conhecidas como **regiões pseudoautossômicas**. Elas serão descritas mais detalhadamente em um capítulo posterior, no qual será considerado como os cromossomos sexuais evoluíram nos mamíferos.

TABELA 2.1 Comparação de mitose e meiose

Características	Mitose	Meiose
Localização	todos os tecidos	células de linhagens germinativas especializadas nos testículos e nos ovários
Produtos	células somáticas diploides	espermatozoides e ovócitos secundários haploides
Replicação de DNA e divisão celular	normalmente um ciclo de replicação por divisão celular	somente um ciclo de replicação a cada duas divisões celulares
Duração da prófase	curta (~ 30 min em células humanas)	pode levar décadas para ser completada
Pareamento dos homólogos maternos e paternos	não	sim, durante a meiose I
Recombinação	rara e anormal	durante cada meiose: normalmente ocorre pelo menos uma em cada braço cromossômico após o pareamento dos homólogos maternos e paternos
Relação entre as células-filhas	geneticamente idênticas	geneticamente diferentes devido à segregação independente dos homólogos e à recombinação

### A mitose e a meiose possuem semelhanças e diferenças-chave

A mitose envolve uma única passagem pelo ciclo celular. Após a replicação do DNA na fase S, as duas cromátides-irmãs de cada cromossomo são igualmente distribuídas entre as células-filhas durante a fase M. A divisão celular meiótica também envolve um momento de síntese de DNA, mas é seguida por duas divisões celulares sem que haja uma nova etapa de síntese de ácido desoxirribonucleico, permitindo que células diploides deem origem a derivados haploides. Embora a segunda divisão da meiose seja idêntica à que ocorre na mitose, a primeira divisão meiótica possui características diferentes que permitem o surgimento de diversidade genética, a qual se baseia em dois mecanismos: segregação independente dos homólogos paternos e maternos e recombinação (Tabela 2.1).

## 2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS CROMOSSOMOS

Os cromossomos possuem dois papéis fundamentais: transmissão fiel e expressão apropriada da informação genética. Os processos de divisão celular são fascinantes, as mudanças nos arranjos cromossômicos podem ter importantes consequências médicas e o conhecimento detalhado da estrutura dos cromossomos é crucial para o entendimento dos processos vitais.

A estrutura cromossômica geralmente ilustrada em livros didáticos representa apenas o estado no qual os cromossomos se encontram durante a metáfase, quando as células estão se preparando para passar pelos últimos estágios da divisão celular. Nesta etapa, as cromátides ainda estão conectadas umas às outras na região do centrômero e estão tão condensadas que podem ser visualizadas por microscopia de luz. No entanto, os cromossomos metafásicos são tão hermeticamente empacotados que seus genes não podem ser expressos. Os cromossomos possuem uma estrutura bastante diferente durante a maior parte do ciclo celular. Durante a interfase, a maioria das regiões cromossômicas está, comparativamente, altamente estendida, permitindo que os genes sejam expressos.

Para que um cromossomo seja copiado e transmitido de forma precisa para as células-filhas, são necessários apenas três tipos de elementos estruturais diferentes, cada um dos quais é discutido nessa sessão do capítulo:

- Um centrômero, o qual é mais evidente na metáfase, é a parte mais estreita do cromossomo e também a região onde as fibras do fuso se ligam.
- Origens de replicação, que são certas sequências de DNA ao longo de cada cromossomo onde a replicação do DNA pode ser iniciada.
- Telômeros, que são as regiões finais dos cromossomos lineares e possuem uma estrutura especializada para impedir que o DNA interno seja degradado por nucleases.

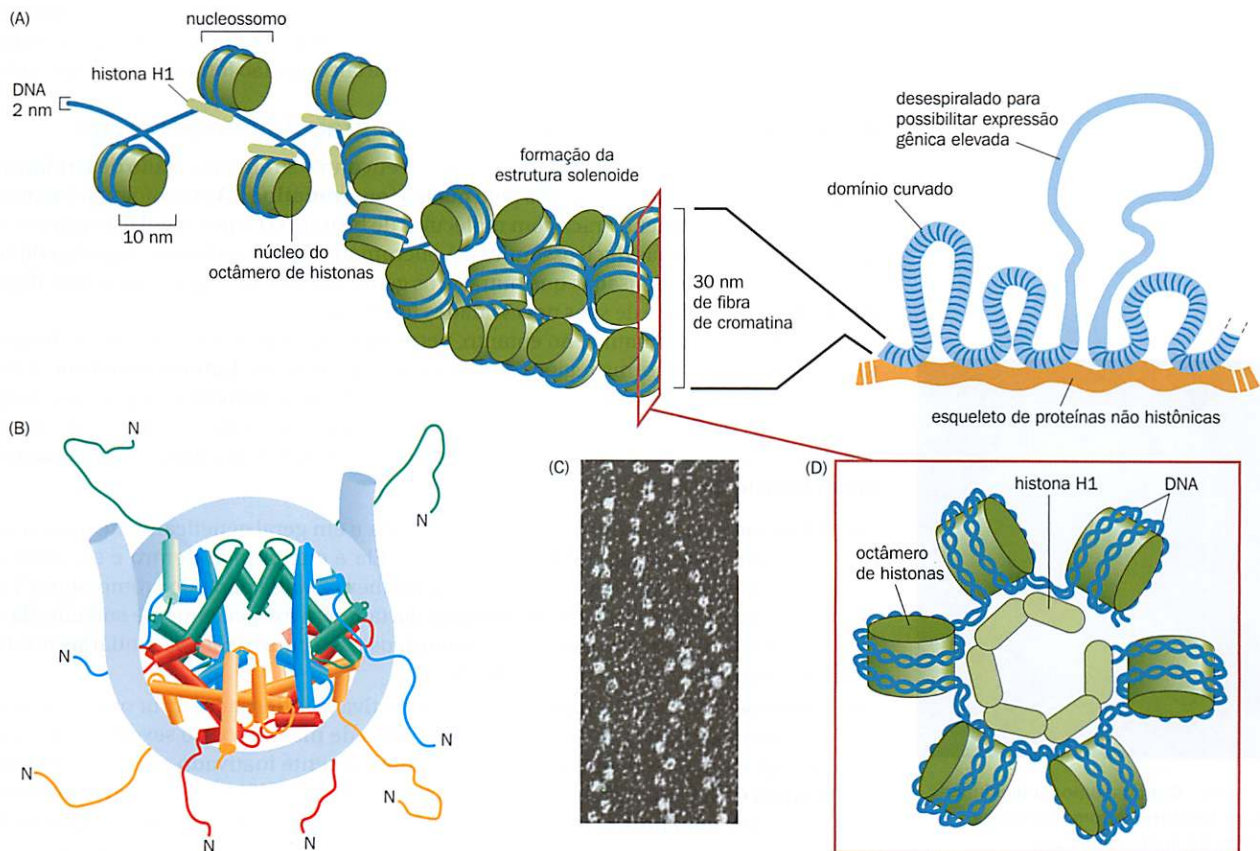
Cromossomos artificiais que incluam grandes fragmentos de DNA inseridos em sua estrutura funcionam normalmente tanto em células de leveduras como em de mamíferos se, e somente se, eles contiverem todos esses três elementos.



## O DNA cromossômico é espiralado hierarquicamente

Na célula eucariótica, os cromossomos são altamente estruturados, e, durante a mitose, cada cromossomo passa por vários níveis diferentes de compactação. Para que isso ocorra, o DNA é complexado com diversas proteínas e sujeito à espiralização e superespiralização para formar a **cromatina**. Até mesmo no núcleo interfásico, quando o DNA se encontra em uma forma altamente distendida, a dupla-hélice de 2 nm de diâmetro passa por, pelo menos, dois níveis de espiralização que são controlados pela ligação a proteínas histônicas básicas. Primeiramente, é formada uma fibra de 10 nm, que é posteriormente compactada em uma fibra de cromatina de 30 nm. Essa estrutura forma, então, alças unidas na base por um suporte de proteínas não histônicas (**Figura 2.8A**).

O **nucleossomo** é a unidade fundamental do empacotamento do DNA: uma extensão de 147 pb de DNA dupla-fita é enrolada menos de duas vezes ao redor de um núcleo central de oito histonas (duas moléculas de cada uma das seguintes histonas: H2A, H2B, H3 e H4 – sendo todas as proteínas altamente conservadas) (**Figura 2.8B**). Nucleossomos adjacentes são conectados entre si por uma região curta (8-114 pb) de DNA espaçador; o comprimento do DNA espaçador varia tanto entre espécies como entre regiões do genoma. Micrografias eletrônicas de preparações apropriadas mostram que os nucleossomos possuem uma aparência de *colar de contas* (**Figura 2.8C**). Este primeiro nível de compactação do DNA é o único que ainda permite atividade transcricional.



**Figura 2.8 Do DNA dupla-hélice à cromatina interfásica.** (A) Arranjo das proteínas histônicas básicas. A dupla-hélice compacta de DNA de 2 nm se liga às histonas básicas para sofrer espiralamento, formando um filamento nucleossômico espesso de 10 nm, o qual é adicionalmente espiralado em uma fibra de cromatina de 30 nm. Na interfase, a fibra de cromatina está organizada em domínios em forma de gancho com ~50-200 kb de DNA ligados a um esqueleto de proteínas ácidas não histônicas. Níveis altos de expressão gênica requerem desespiralamento local das fibras de cromatina para dar origem a filamentos nucleossômicos de 10 nm. (B) Um nucleossomo consiste em quase duas voltas de DNA envoltas ao redor de um octâmero de histonas centrais (duas de cada H2, H3A, H3B e H4). Note a estrutura extensiva de  $\alpha$ -hélice das histonas e de suas caudas N-terminais salientes. (C) Eletromicrografia de filamentos nucleossômicos de 10 nm. (D) Seção transversal da fibra de cromatina de 30 nm mostrando uma volta do solenoide [a caixa externa vermelha corresponde àquela mostrada em (A)]. A histona adicional H1, a qual se liga ao DNA de ligação, é importante na organização da estrutura de 30 nm da fibra de cromatina. [(A) Adaptada de Grunstein M (1992) *Sci. Am.* 267, 68. Com a permissão da Scientific American Inc., e Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science/Taylor & Francis LLC. (B) Adaptada de Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science/Taylor & Francis LLC de figuras por Jacob Waterborg, University of Missouri – Kansas City. (C) Cortesia de Jakob Waterborg, University of Missouri – Kansas City. (D) Adaptada de Klug A (1985) *Proceedings, RW Welch Federation Conference, Chem. Res.* 39, 133. Com permissão de Welch Foundation.]

As caudas N-terminais do núcleo de histonas projetam-se para fora dos nucleossomos (ver Figura 2.8B). Aminoácidos específicos nas caudas das histonas podem passar por vários tipos de mudanças pós-transcricionais, especialmente acetilação, fosforilação e metilação. Como consequência, diferentes proteínas podem ser ligadas à cromatina, afetando sua condensação e o nível local de atividade transcricional. Genes adicionais de histonas codificam formas variantes das histonas que constituem o interior dos nucleossomos, os quais podem estar associados com regiões cromossômicas particulares e funções especializadas. Os centrômeros, por exemplo, possuem uma variante da histona H3 conhecida como CENP-A e uma variante da histona H2 conhecida como H2AX é associada com reparo de DNA e recombinação.

Além das quatro histonas do interior do nucleossomo e de suas variantes, uma quinta histona, H1, liga-se à região do DNA espaçador. Acredita-se que ela seja importante para a condensação cromossômica e, em particular, para a formação da fibra de cromatina de 30 nm. Nessa estrutura, os nucleossomos são empacotados em um arranjo em espiral ou *solenóide*, com seis a oito nucleossomos por volta, e as proteínas H1 são ligadas ao DNA no interior do solenoide, com uma H1 associada a cada nucleossomo (Figura 2.8D).

O empacotamento do DNA, primeiro em nucleossomos e posteriormente em solenóides de fibras de cromatina de 30 nm, resulta em uma condensação linear de aproximadamente 50 vezes. Durante a fase M, o DNA em cromossomos metafásicos humanos é compactado ainda mais, em cerca de 1/10.000 de seu comprimento distendido. O esqueleto proteico que sustenta os cromossomos metafásicos contém altos níveis de topoisomerasas II e especialmente condensinas, complexos proteicos que são tanto estruturalmente como evolutivamente relacionados a coesinas. As condensinas organizam o empacotamento firme da cromatina, mas ainda não se entende bem como a cromatina se encontra tão fortemente compactada.

### A cromatina interfásica varia em seu grau de compactação

Durante a interfase, a maior parte da cromatina encontra-se em um estado distendido que é corado de forma difusa e dispersa pelo núcleo (**eucromatina**). A eucromatina é marcada pela ligação relativamente fraca com moléculas de histona H1 e por acetilação extensa dos quatro tipos de histonas nucleossômicas. A eucromatina não é uniforme. Algumas de suas regiões são mais condensadas que outras e os genes podem ser expressos ou não, dependendo do tipo celular e de suas necessidades funcionais.

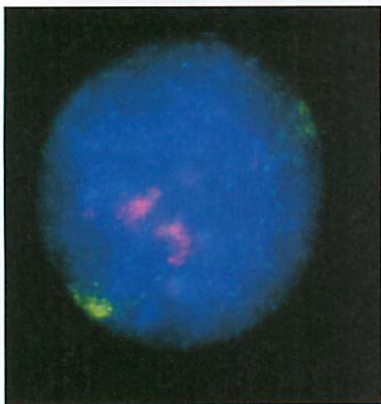
Um pouco de cromatina, no entanto, permanece altamente condensado ao longo de todo o ciclo celular e forma regiões de coloração mais intensa (**heterocromatina**). Os genes que são naturalmente localizados nas regiões de heterocromatina ou que são incorporados a essas regiões por meio dos rearranjos cromossômicos são, em geral, não expressos. A heterocromatina é associada com histonas H1 fortemente ligadas, e duas classes já foram bem definidas:

- A heterocromatina constitutiva é condensada e em geral geneticamente inativa, amplamente constituída por DNA repetitivo. Ela é encontrada dentro e ao redor dos centrômeros e nos telômeros e constitui também grande parte do cromossomo Y nos mamíferos. Nos cromossomos humanos ela também é especialmente encontrada nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos e em constrições secundárias nos braços longos dos cromossomos 1, 9 e 16.
- A heterocromatina facultativa é por vezes inativa (condensada) e por outras vezes ativa (descondensada). Em cada célula somática de mamíferos do sexo masculino, por exemplo, um dos cromossomos X é randomicamente inativado e condensado (**inativação do X**). Além disso, ambos os cromossomos X e Y tornam-se reversivelmente inativados por aproximadamente 15 dias durante a meiose na espermatogênese, formando o corpo XY, que é segregado em um compartimento nuclear especial.

### Cada cromossomo possui seu próprio território no núcleo interfásico

O núcleo é altamente organizado, com vários compartimentos subnucleares, além do nucléolo, onde o rRNA é transcrito e subunidades ribossomais são montadas. O posicionamento dos cromossomos dentro do núcleo é, também, altamente organizado, como já foi revelado por técnicas especializadas que analisam os movimentos dos cromossomos individuais durante a interfase em células vivas.

Os centrômeros dos diferentes cromossomos interfásicos em células humanas são menos claramente alinhados do que em outros organismos. Eles tendem a se agrupar na periferia do núcleo durante a fase G<sub>1</sub>, antes de se tornarem significativamente mais dispersos durante a fase S. Embora os cromossomos estejam todos em uma forma altamente



**Figura 2.9** Cromossomos individuais ocupam territórios cromossômicos distintos no núcleo interfásico. O núcleo desta célula humana em interfase aparece em azul como resultado da coloração com DAPI, um corante fluorescente que se liga ao DNA. Sondas de DNA específicas para os cromossomos humanos 18 e 19 foram marcadas, respectivamente, com corantes verde e vermelho. Dentro do núcleo, ambas as cópias do cromossomo 18 (sinal verde) têm sua localização visualizada na periferia, mas as cópias do cromossomo 19 (sinal vermelho) se mostram no interior. (Cortesia de Wendy Bickmore, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh.)

distendida, não são extensivamente emaranhados. Em vez disso, eles parecem ocupar territórios relativamente pequenos, nos quais não há sobreposição (Figura 2.9).

Ainda que os cromossomos metafásicos, aparentemente, não possuam localizações nucleares preferenciais, o posicionamento cromossômico não é randômico. Os cromossomos humanos que possuem maior densidade gênica tendem a se concentrar no centro do núcleo, enquanto genes com densidade gênica inferior ficam localizados nas proximidades do invólucro nuclear. Os movimentos cromossômicos são, provavelmente, controlados pela interação entre o telômero e o envelope nuclear e também por estruturas nucleares internas (incluindo o nucléolo, no caso de cromossomos que possuem genes de RNA ribossomal).

### Os centrômeros possuem um papel essencial no movimento cromossômico, mas evoluíram de formas diferentes nos diferentes organismos

Os cromossomos geralmente possuem um único **centrômero**, a região na qual as cromátides-irmãs duplicadas permanecem unidas até a anáfase. Em cromossomos metafásicos, o centrômero é facilmente identificado como a constrição primária que separa o braço longo e o braço curto, sendo essencial para unir os cromossomos ao fuso mitótico e para a segregação cromossômica durante a divisão celular. Fragmentos cromossômicos anormais que não possuam um centrômero (fragmentos **acêntricos**) não conseguem se ligar ao fuso e, conseqüentemente, não segregam corretamente para o núcleo de uma célula-filha ou outra.

Mais tarde, na prófase, grandes complexos multiproteicos, conhecidos como **cinetocoros**, são formados em cada centrômero, cada um ligado a uma cromátide-irmã. Os microtúbulos se unem a cada cinetocoro, ligando os centrômeros aos polos do fuso (Quadro 2.1).

#### QUADRO 2.1 Componentes do fuso mitótico

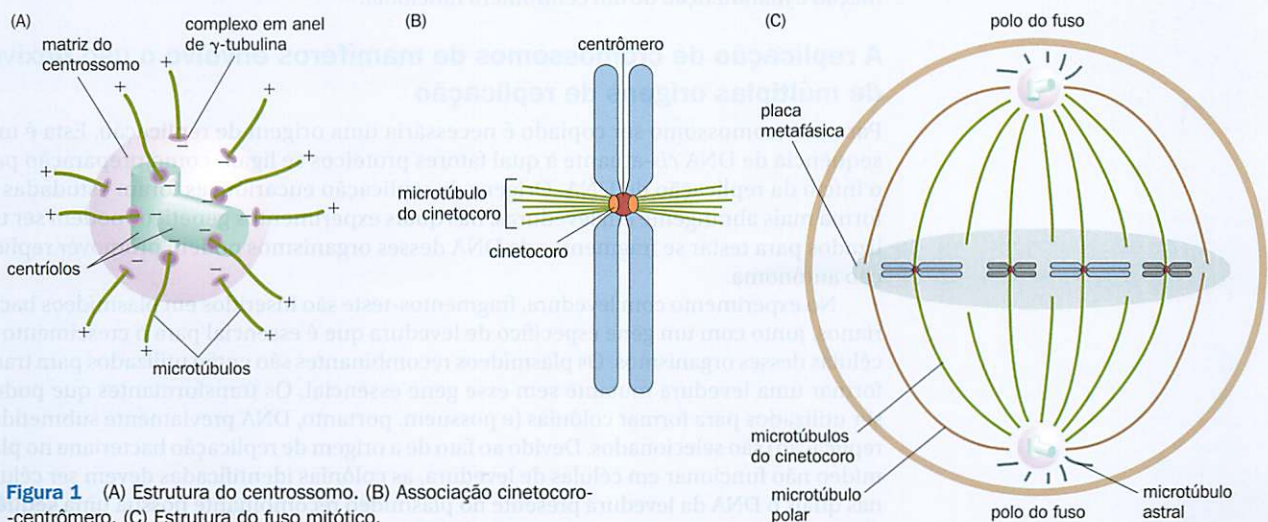
O fuso mitótico é formado a partir de microtúbulos (polímeros de um heterodímero de  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina) e proteínas associadas aos microtúbulos. Em cada um dos dois polos do fuso de uma célula em divisão localiza-se um centrômero que promove o crescimento das fibras dos microtúbulos em direção ao exterior e é o principal centro de organização dos microtúbulos da célula. Devido ao fato de suas tubulinas constituintes serem sintetizadas em uma direção particular, as fibras dos microtúbulos são polares, com uma extremidade negativa (que fica próxima ao centrômero) e uma extremidade positiva (a extremidade de crescimento distal).

Cada centrômero é composto por uma matriz fibrosa contendo um par de centríolos, que são estruturas cilíndricas curtas, compostas por microtúbulos e proteínas associadas; os dois centríolos são dispostos perpendicularmente (Figura 1A). Durante a fase G<sub>1</sub>, os dois centríolos do par se separam, e durante a fase S, um centríolo-filho começa a crescer na base de cada centríolo-mãe até que esteja completamente formado

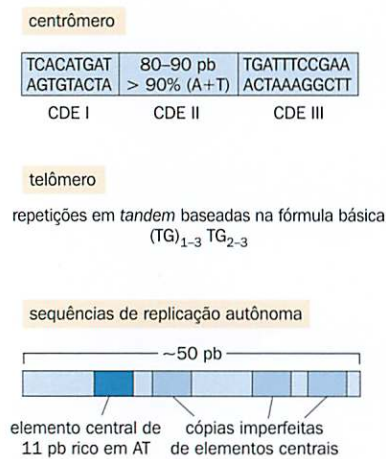
durante a fase G<sub>2</sub>. Os dois pares de centríolos permanecem próximos em um único complexo centrôssômico até o início da fase M. Neste ponto, o complexo centrôssômico se divide em dois, e as metades começam a se separar. Cada centrôssomo-filho desenvolve seu próprio arranjo de microtúbulos e começa a migrar para uma das extremidades da célula, onde irá formar um polo do fuso (Figura 1C).

Três formas diferentes de fibras de microtúbulos ocorrem no fuso mitótico completamente formado:

- Fibras polares, que se desenvolvem na prófase, se estendem a partir dos dois polos do fuso em direção ao equador.
- Fibras do cinetocoro, que se desenvolvem na prometáfase, se conectam à grande estrutura multiproteica no centrômero de cada cromátide (o cinetocoro; Figura 1B) e aos polos do fuso.
- As fibras astrais se formam ao redor de cada centrôssomo e se estendem até a periferia da célula.



**Figura 1** (A) Estrutura do centrôssomo. (B) Associação cinetocoro-centrômero. (C) Estrutura do fuso mitótico.



**Figura 2.10** Em *S. cerevisiae*, a função cromossômica é exclusivamente dependente de elementos de sequência de DNA curtos e definidos. Os centrômeros de *S. cerevisiae* são bastante curtos (geralmente, 100–110 pb) e, fora do comum para centrômeros eucarióticos, são compostos por elementos de sequência definidos. Existem três elementos de DNA centromérico contíguos (CDEs), dos quais CDE II e CDE III são os mais importantes funcionalmente. Os telômeros são compostos de repetições em *tandem* ricas em TG. Sequências de replicação autônoma são definidas por sequências curtas ricas em AT. Os três tipos de sequências curtas podem ser combinados com DNA alheio para fazer um cromossomo artificial em células de levedura.

Na anáfase, os microtúbulos do cinetocoro puxam as cromátides-irmãs anteriormente pareadas em direção aos polos opostos do fuso. Os cinetocoros localizados nos centrômeros controlam a montagem e a desmontagem dos microtúbulos associados, os quais conduzem o movimento cromossômico.

Na levedura que se reproduz por brotamento, *Saccharomyces cerevisiae*, as sequências que especificam a função do centrômero são muito pequenas, assim como as de outros elementos cromossômicos funcionais (Figura 2.10). O elemento do centrômero (CEN) possui cerca de 120 pb e contém três elementos de sequências principais, dos quais o central, CDE II, é particularmente importante por unir os microtúbulos ao cinetocoro. Um fragmento centromérico CEN derivado de um cromossomo de *S. cerevisiae* pode substituir o centrômero de um cromossomo de outra levedura sem consequências aparentes.

Os centrômeros de *S. cerevisiae* são bastante incomuns por serem muito pequenos e por sequências de DNA especificarem os locais de formação dos centrômeros. Não existem sequências homólogas nos centrômeros da levedura que se reproduzem por fissão, *Schizosaccharomyces pombe*, nem nos centrômeros de animais multicelulares. O tamanho dos centrômeros aumentou durante a evolução eucariótica, e, em organismos complexos, o DNA centromérico é dominado por sequências repetitivas que evoluíram rapidamente e são espécie-específicas. A evolução relativamente rápida do DNA centromérico e de proteínas associadas pode contribuir para o isolamento reprodutivo em espécies emergentes.

Embora o DNA centromérico demonstre uma heterogeneidade notável de sequências entre os eucariotos, os centrômeros são universalmente marcados pela presença de uma variante centrômero-específica da histona H3, genericamente conhecida como CenH3 (a forma humana da CenH3 é chamada CENP-A). Nos centrômeros, CenH3/CENP-A substituem a histona habitual H3 e são essenciais para a união com os microtúbulos do fuso. Dependendo da organização do centrômero, ele pode se ligar a diferentes números de microtúbulos do fuso (Figura 2.11).

Centrômeros de mamíferos são particularmente complexos. Eles frequentemente se prolongam por diversas megabases e contêm algum DNA cromossomo específico, bem como DNA repetitivo. Um dos componentes principais do DNA centromérico humano é o DNA  $\alpha$ -satélite, cuja estrutura é baseada em repetições em *tandem* de um monômero de 171 pb. Unidades repetitivas adjacentes podem apresentar pequenas variações em sequência, e ampliações em *tandem* ocasionais de uma sequência de várias repetições contíguas levemente diferentes resultam em uma organização repetitiva de ordem superior. Esse tipo de DNA  $\alpha$ -satélite é característico de centrômeros e é marcado por regiões de reconhecimento de 17 pb pela proteína de ligação ao centrômero CENP-B.

Ao contrário dos centrômeros muito pequenos e discretos de *S. cerevisiae*, os cromossomos notavelmente maiores dos outros eucariontes não são dependentes apenas da organização sequencial. As sequências específicas de DNA (p. ex., DNA  $\alpha$ -satélite) ou a proteína de ligação ao DNA CENP-B não são essenciais nem ao menos suficientes para ditar a formação de um cromossomo de mamífero. Características ainda pobremente compreendidas do DNA especificam uma determinada conformação da cromatina que, de alguma forma, por meio de mecanismos independentes de sequência, controla a formação e manutenção de um centrômero funcional.

## A replicação de cromossomos de mamíferos envolve o uso flexível de múltiplas origens de replicação

Para um cromossomo ser copiado é necessária uma origem de replicação. Esta é uma sequência de DNA *cis*-atuante à qual fatores proteicos se ligam como preparação para o início da replicação do DNA. Origens de replicação eucarióticas foram estudadas de forma mais abrangente em leveduras, nas quais experimentos genéticos podem ser utilizados para testar se fragmentos de DNA desses organismos podem promover replicação autônoma.

No experimento com levedura, fragmentos-teste são inseridos em plasmídeos bacterianos, junto com um gene específico de levedura que é essencial para o crescimento de células desses organismos. Os plasmídeos recombinantes são então utilizados para transformar uma levedura mutante sem esse gene essencial. Os transformantes que podem ser utilizados para formar colônias (e possuem, portanto, DNA previamente submetido à replicação) são selecionados. Devido ao fato de a origem de replicação bacteriana no plasmídeo não funcionar em células de levedura, as colônias identificadas devem ser células nas quais o DNA da levedura presente no plasmídeo recombinante possui uma **sequência de replicação autônoma**, do inglês **ARS** (*autonomously replicating sequence*).

Os elementos ARS de levedura são funcionalmente equivalentes às origens de replicação e acredita-se que sejam derivados de origens de replicação autênticas. Eles possuem apenas cerca de 50 pb e consistem em uma região rica em AT com uma sequência conservada de 11 pb mais algumas cópias imperfeitas desta sequência (ver Figura 2.10). Uma ARS codifica sítios de ligação tanto para um fator de transcrição como para um complexo de origem de replicação multiproteico (ORC).

Em células de mamíferos, a ausência de uma análise genética tem dificultado a definição das origens de replicação de DNA, mas o DNA é replicado em múltiplos pontos de iniciação ao longo de cada cromossomo. As origens de replicação relatadas em humanos possuem, frequentemente, uma extensão de várias quilobases, e seus sítios ORC de ligação parecem ser menos específicos que os das leveduras. Ao contrário das leveduras, os cromossomos artificiais de mamíferos parecem não exigir sequências ARS específicas. Em vez disso, a velocidade com a qual a forquilha de replicação se move em células de mamíferos parece determinar o espaçamento entre as regiões às quais as alças de cromatina são ancoradas, e esse espaçamento, por sua vez, controla a escolha de sítios nos quais a replicação do DNA é iniciada.

### Os telômeros possuem estruturas especializadas para preservar as extremidades dos cromossomos lineares

Os telômeros são complexos DNA-proteína heterocromáticos especializados localizados nas extremidades dos cromossomos eucarióticos lineares. Como nos centrômeros, os nucleossomos ao redor dos quais o DNA telomérico é enrolado possuem histonas modificadas que promovem a formação da heterocromatina constitutiva.

#### Estrutura, função e evolução do telômero

Sequências de DNA telomérico são quase sempre compostas por arranjos moderadamente longos de pequenas repetições em *tandem* que foram, em geral, bem conservadas durante a evolução, diferentemente do DNA centromérico. Em todos os vertebrados já estudados, a sequência repetitiva é TTAGGG (Tabela 2.2). As repetições são ricas em G em uma das fitas de DNA (a fita G) e ricas em C na fita complementar. No lado centromérico das repetições teloméricas humanas TTAGGG ficam de 100 a 300 kb adicionais de sequências repetitivas associadas ao telômero (Figura 2.12A). Estas não foram conservadas durante a evolução, e sua função ainda não é compreendida.

O arranjo (TTAGGG)<sub>n</sub> do telômero humano abrange cerca de 10 a 15 kb (ver Figura 2.12A). Um complexo proteico bastante extenso (chamado “shelterina” ou **telossomo**) contém vários componentes que reconhecem e se ligam ao DNA telomérico. Destes componentes, dois fatores de ligação às repetições teloméricas (TRF1 e TRF2) se ligam a sequências TTAGGG de dupla-fita.

Como resultado da dificuldade natural na replicação da fita descontínua no final extremo de um telômero (discutido na próxima sessão), a fita rica em G tem uma sobressalência

**Figura 2.11** Diferenças na organização eucariótica do centrômero. Em todos os centrômeros eucarióticos, uma variante centrômero-específica da histona H3 (genericamente chamada de CenH3) está envolvida na ligação aos microtúbulos. Entretanto, o ponto de extensão do centrômero por meio do DNA de um cromossomo e o número de microtúbulos envolvidos pode variar amplamente. (A) A levedura de brotamento *S. cerevisiae* possui a forma mais simples de organização centromérica, um centrômero pontual, com apenas 125 pb de DNA envolvidos ao redor de um único centrômero; cada cinetocoro liga-se estavelmente a apenas um microtúbulos durante a metáfase. (B) Na fissão dos centrômeros da levedura *S. pombe*, os centrômeros possuem sítios múltiplos de ligação agrupados em uma região que ocupa de 35 a 110 kb de DNA (um cromossomo possui em média mais de 4 Mb de DNA). Os sítios de ligação do microtúbulos estão agrupados em uma sequência nuclear não repetitiva, a qual é flanqueada por diferentes tipos de sequências repetitivas (IMR, mais interiores; OTR, mais periféricas). (C) Os centrômeros humanos possuem múltiplos sítios de ligação com microtúbulos e estão agrupados ao longo de regiões de até 4 Mb de DNA. Repetições de DNA  $\alpha$ -satélite de ordem maior são proeminentes nos centrômeros. Além de se ligarem aos nucleossomos que contêm a proteína CenH3, CENP-A, eles também possuem sítios de ligação para a proteína CENP-B. (D) Em algumas espécies eucarióticas, tais como o nematoide *Caenorhabditis elegans*, o centrômero é bastante difuso: os cinetocoros que se ligam aos microtúbulos do fuso são distribuídos ao longo de todo o comprimento do cromossomo, e se diz que os cromossomos são *holocêntricos*. [Adaptada de Vagnarelli P, Ribeiro SA & Earnshaw WC (2008) *FEBS Lett.* 582, 1950–1959. Com permissão de Elsevier.]

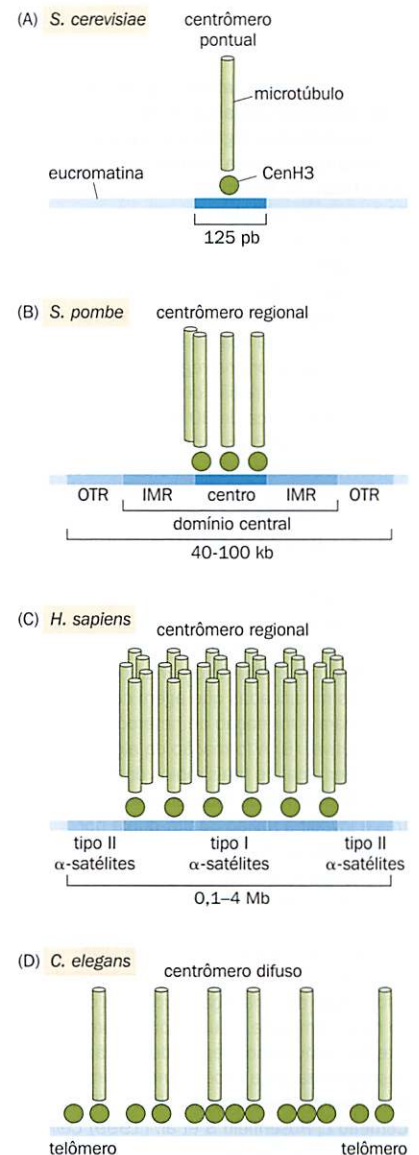


TABELA 2.2 Conservação evolutiva de sequências teloméricas repetitivas

Ocorrência	Sequência repetitiva telomérica consenso <sup>a</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG <sub>1-3</sub>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTACAG <sub>1-8</sub>
<i>Neurospora crassa</i>	TTAGGG
<i>Paramecium</i>	TTGGGG
<i>Trypanosoma</i>	TAGGGG
<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
<i>Arabidopsis</i>	TTTTAGGG
Nematoides	TTAGGC
Vertebrados	TTAGGG

<sup>a</sup> Em direção à extremidade cromossômica. Observar: embora a função telomérica seja conservada nos eucariotos e as sequências teloméricas repetitivas sejam, em geral, fortemente conservadas, os telômeros de artrópodes, tais como *Drosophila*, são radicalmente diferentes em estrutura, sendo compostos por longas repetições de DNA que não são relacionadas com as repetições oligonucleotídicas ricas em TG encontradas em outros eucariotos.

**Figura 2.12** Nos telômeros, repetições oligonucleotídicas altamente conservadas são ligadas por proteínas especializadas para formar uma alça protetora.

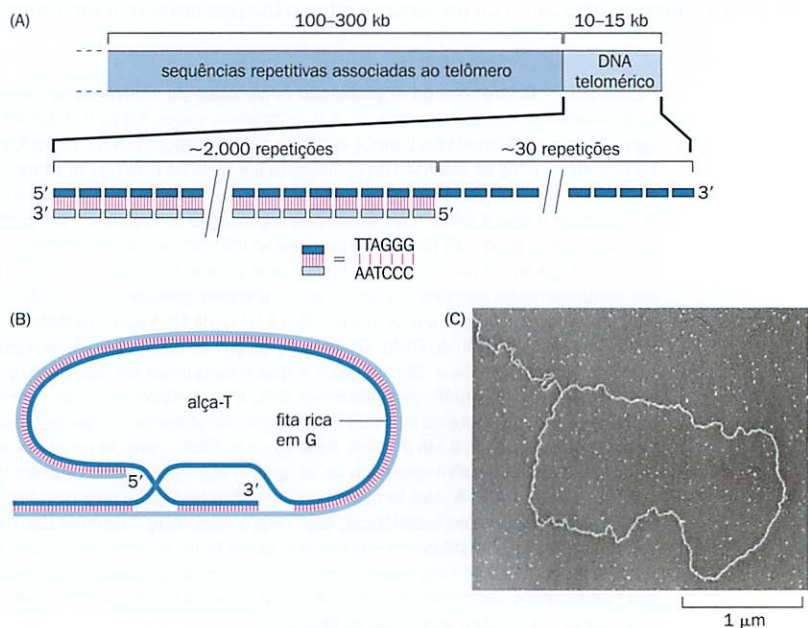
(A) Estrutura do telômero. O DNA nas extremidades dos cromossomos humanos é definido por um arranjo em *tandem* de 1.700-2.500 cópias grosseiras do hexanucleotídeo TTAGGG (que é conservado em vertebrados; ver Tabela 2.2). A fita rica em G, no entanto, projeta-se para fora na região terminal para formar uma região de fita simples composta de cerca de 30 repetições de TTAGGG. O arranjo de repetições curtas conservadas características é delimitado por um complexo protetor (ou **telossomo**) o qual não é mostrado, para simplificar; duas das subunidades deste complexo, os fatores de ligação repetitiva telomérica TRF1 e TRF2, ligam-se diretamente a regiões de dupla-fita, enquanto POT1 pode se ligar a repetições de fita simples. Como o DNA centromérico, o DNA telomérico possui histonas modificadas que agem como sinais para a formação de heterocromatina constitutiva. (B) A formação da alça-T. A região terminal de fita simples da fita rica em G também pode fazer uma volta para trás e invadir a região de fita-dupla por pareamento entre bases com a sequência complementar da fita rica em C. Acredita-se que a alça-T resultante proteja o DNA telomérico dos mecanismos celulares naturais que reparam quebras de DNA dupla-fita. (C) Eletromicrografia mostrando a formação de uma alça-T grosseira de 15 kb na extremidade de um cromossomo interfásico humano (depois de fixação, desproteção e espessamento artificial para auxiliar a visualização). [De Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S et al. (1999) *Cell* 97, 503-514. Com permissão de Elsevier.]

de fita simples na sua extremidade 3', que possui, geralmente, 150 a 200 nucleotídeos (ver Figura 2.12A). Esta pode se dobrar para trás e formar pares de base com a outra fita rica em C para formar uma alça telomérica conhecida como "alça - T" (*T-loop*) (Figura 2.12B, C).

A alça-T provavelmente representa um mecanismo conservado para a proteção das extremidades dos cromossomos. Se um telômero é perdido após uma quebra cromossômica, a extremidade do cromossomo resultante é instável; ela tende a se fundir com as extremidades de outros cromossomos fragmentados, a se envolver em eventos de recombinação ou a ser degradada. Proteínas de ligação ao telômero, principalmente a POT1, que compõe o telossomo, ligam-se a repetições TTAGGG de fita simples e podem proteger o DNA terminal *in vitro* e, possivelmente, também *in vivo*.

### A telomerase e o problema da replicação do final do cromossomo

Durante a síntese de DNA, a DNA-polimerase amplia as fitas crescentes de DNA na direção 5'→3'. Uma das novas fitas de DNA, a fita líder, cresce na direção 5'→3' da síntese de DNA, mas a outra fita, a fita atrasada, é sintetizada em partes (fragmentos de Okazaki) porque ela deve crescer na direção oposta a 5'→3' (direção da síntese do DNA). A síntese dessa fita é atrasada e gera fragmentos de DNA cujas extremidades são, então, fechadas pela DNA-ligase (ver Figura 1.11).



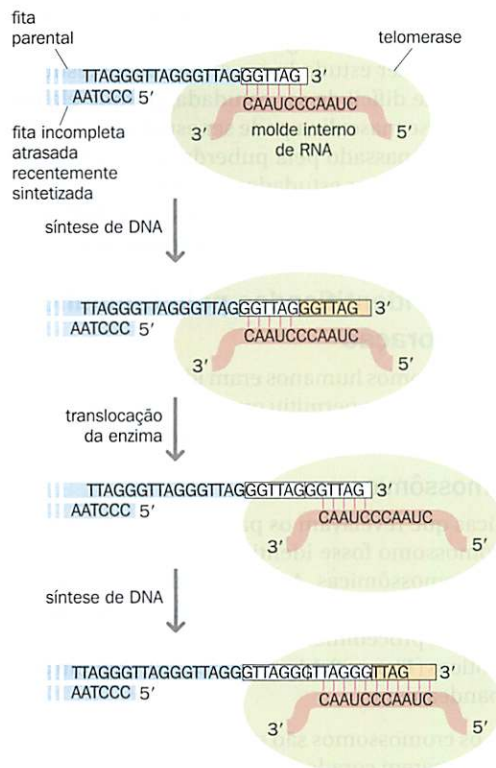
Ao contrário da RNA-polimerase, as DNA-polimerases *realmente* requerem um grupo 3' - OH livre a partir do qual possam estender a síntese. Isto é alcançado por meio do emprego da RNA-polimerase para sintetizar um *primer* complementar de RNA que dá início à síntese de cada um dos fragmentos de DNA usados para formar a fita líder. Nesses casos, o *primer* de RNA exige a presença de algum DNA *à frente* da sequência a ser copiada, para servir como seu molde. Entretanto, na extremidade de uma molécula linear de DNA, nunca pode haver um molde como esse, e um mecanismo diferente é necessário para resolver o problema de completar a replicação nas extremidades das moléculas lineares de DNA.

Uma solução para o **problema da replicação nas extremidades** é fornecida por uma transcriptase reversa especializada (DNA-polimerase dependente de RNA) que completa a síntese da fita líder. A telomerase é uma enzima - ribonucleoproteína - cuja função de polimerase é criticamente dependente de uma subunidade de RNA, TERC (componente de RNA da telomerase), e uma subunidade proteica, TERT (transcriptase reversa da telomerase). Na extremidade 5' de vertebrados, a TERC RNA é uma sequência de seis nucleotídeos que é complementar à sequência repetitiva do telômero (Figura 2.13). Ela atuará como um molde para dar início à síntese de DNA alongado das sequências de DNA telomérico na fita líder. O molde necessário para a DNA-polimerase completar a síntese da fita atrasada é fornecido por uma extensão adicional da fita líder.

Em humanos, sabe-se que o comprimento do telômero é altamente variável e que a atividade da telomerase é inexistente na maioria das células adultas, exceto por determinadas células localizadas em tecidos altamente proliferativos, tais como linhagens germinativas, sangue, pele e intestino. Em células sem telomerase, as extremidades do DNA telomérico não são replicadas na fase S, e seus telômeros encurtam progressivamente. A diminuição do telômero é, efetivamente, uma maneira de contagem de divisões celulares e tem sido relacionada com a senescência celular e o envelhecimento. Células cancerosas encontram vias de ativação da telomerase, levando à replicação descontrolada.

## 2.4 ESTUDO DOS CROMOSSOMOS HUMANOS

Os cromossomos humanos têm sido analisados por muitas décadas com propósitos de pesquisa e diagnóstico. Uma sucessão de avanços tecnológicos permitiu análises cromossômicas com uma resolução e diferenciação estruturais cada vez maiores.



**Figura 2.13 Replicação do DNA telomérico.** O exemplo mostra a situação para telômeros humanos; como em outros vertebrados, o DNA telomérico consiste em repetições TTAGGG (Figura 2.12). A extremidade 3' do DNA parental é estendida por síntese de DNA utilizando o componente de RNA da telomerase como molde. O componente de RNA da telomerase humana possui uma repetição em *tandem* quase perfeita (CUAACCCUAACG) próxima à extremidade 5' que contém uma sequência molde complementar para guiar a síntese de sequências de hexanucleotídeos teloméricos adicionais na extremidade terminal. As repetições de hexanucleotídeos recentemente sintetizadas são mostradas em uma caixa aberta, e as repetições mais recentemente sintetizadas são mostradas com sombreado laranja; aqui, sugere-se que o arranjo seja estendido por cópias em *tandem* de um hexanucleotídeo GGTTAG, mas as repetições teloméricas de vertebrados podem ser igualmente representadas tanto por  $(GGTTAG)_n$  como por  $(TTAGGG)_n$ . Por meio da extensão da fita líder nesse sentido, a telomerase fornece um molde para a fita atrasada ser estendida (por uma polimerase de DNA padrão DNA-dependente). Por fim, após a telomerase finalizar a adição de repetições de hexanucleotídeos, a fita atrasada não pode ser estendida até o fim da extremidade 5', deixando a fita rica em G com uma extremidade 3' sobressaliente com um comprimento de aproximadamente 200 nucleotídeos (como mostrado na Figura 2.12).

## A análise cromossômica é mais fácil para a mitose do que para a meiose

A análise dos cromossomos (**citogenética**) normalmente requer a visualização de células em divisão, mas obter essas células diretamente do corpo humano pode ser difícil. A medula óssea é uma possível fonte, mas é mais simples obter células interfásicas e então propagá-las em culturas celulares sob condições de laboratório. Células da circulação sanguínea e fibroblastos na pele são as fontes de células humanas mais comumente utilizadas para análises citogenéticas. As pessoas raramente se importam em fornecer uma pequena amostra de sangue, e os linfócitos T no sangue podem ser facilmente induzidos à divisão pelo tratamento com lectinas (tais como a fito-hemaglutinina). De forma alternativa, fibroblastos obtidos de biópsias de pele são mantidos em cultura. Além disso, o diagnóstico pré-natal rotineiramente envolve análises cromossômicas em células fetais imersas em líquido amniótico ou separadas das vilosidades coriônicas.

Embora os cromossomos tenham sido detalhadamente descritos em alguns organismos tão cedo como nos anos 1880, por muitas décadas todas as tentativas de se prepararem lâminas de cromossomos humanos produziram um emaranhado que desafiava as análises. Para se obter lâminas com cromossomos analisáveis, as células eram crescidas em líquido de suspensão e então tratadas com solução salina hipotônica para fazê-las inchar. Isso permitiu que as primeiras preparações de boa qualidade fossem obtidas em 1956. Células brancas do sangue são colocadas em um meio de cultura enriquecido com fito-hemaglutinina, permitindo seu crescimento por 48 a 72 horas, tempo durante o qual as células devem se dividir livremente. Mesmo assim, devido ao fato de a fase M ocupar somente uma pequena parte do ciclo celular, poucas células estarão efetivamente em divisão ao mesmo tempo.

A proporção de células em divisão (índice mitótico) pode ser aumentada por meio do tratamento da cultura com agentes inibidores do fuso mitótico, tais como a demecolcina. As células entram em metáfase, mas são impossibilitadas de seguir adiante na fase M, então se acumulam no estágio de metáfase de a mitose.

Os cromossomos de uma fase ligeiramente anterior à metáfase (prometáfase) são menos contraídos e mostram mais detalhes, tornando a análise mais fácil. Para se obter um número considerável de células, elas são sincronizadas pela prevenção temporária do progresso ao longo do ciclo celular. Geralmente isso é atingido pela adição de timidina (para provocar um decréscimo na concentração de dCTP, causando uma diminuição na síntese de DNA, a fim da permanência das células na fase S). Quando o efeito da timidina é retirado, o progresso celular ao longo do ciclo é sincronizado. Após serem liberadas da detenção à fase S, por tentativa e erro pode-se determinar um tempo ideal no qual um uma boa porção de células esteja no estágio desejado de prometáfase.

A meiose pode somente ser estudada em amostras de testículos e ovários. A meiose feminina é especialmente difícil de ser estudada, porque ela ocorre apenas em ovários fetais, enquanto a meiose masculina pode ser estudada em uma biópsia testicular de qualquer homem que tenha passado pela puberdade e esteja disposto a fornecer uma. Os resultados da meiose podem ser estudados por meio da análise dos cromossomos de espermatozoides, embora a metodologia para isso seja trabalhosa. A análise meiótica é utilizada em algumas investigações de infertilidade masculina.

## Os cromossomos são identificados pelo tamanho e pelo padrão de coloração

Até os anos 1970, os cromossomos humanos eram identificados com base no seu tamanho e na posição dos centrômeros. Isso permitiu que os cromossomos fossem classificados em grupos (**Tabela 2.3**), mas não inequivocadamente identificados.

### Bandeamento cromossômico

A introdução de técnicas que revelavam os padrões de bandejamento dos cromossomos permitiu que cada cromossomo fosse identificado e proporcionou uma definição mais precisa das anomalias cromossômicas. As técnicas de bandejamento exigem que os cromossomos sofram desnaturação ou digestão enzimática seguida por exposição a um corante específico de DNA. Os procedimentos produzem bandas claras e escuras alternadas nos cromossomos mitóticos (**Figura 2.14** e **Figura 2.15**). Seguem abaixo características de algumas técnicas de bandejamento.

- **Bandeamento G** – os cromossomos são submetidos à digestão enzimática controlada com tripsina antes de serem corados com Giemsa, um corante químico de ligação ao



TABELA 2.3 Grupos de cromossomos humanos

Grupo	Cromossomos <sup>a</sup>	Descrição
A	1 – 3	o maior; 1 e 3 são metacêntricos, <sup>b</sup> mas o 2 é submetacêntrico <sup>c</sup>
B	4, 5	grande; submetacêntricos com dois braços bastante diferentes em tamanho
C	6 – 12, X	de tamanho médio; submetacêntricos
D	13 – 15	de tamanho médio; acrocêntricos <sup>d</sup> com satélites <sup>e</sup>
E	16 – 18	pequeno; 16 é metacêntrico, mas o 17 e o 18 são submetacêntricos
F	19, 20	pequeno; metacêntrico
G	21, 22, Y	pequeno; acrocêntrico, com satélites no 21 e no 22, mas não no Y

<sup>a</sup> Os autossomos são numerados do maior para o menor, exceto pelo cromossomo 21, que é menor que o cromossomo 22. <sup>b</sup> Um cromossomo metacêntrico possui seu centrômero no meio ou próximo a ele. <sup>c</sup> Um cromossomo submetacêntrico possui seu centrômero posicionado de forma que os dois braços sejam de comprimento claramente desigual. <sup>d</sup> Um cromossomo acrocêntrico possui seu centrômero na extremidade ou próximo a ela. <sup>e</sup> Um satélite, neste contexto, é um pequeno segmento separado por uma constrição não centromérica do resto do cromossomo; isso ocorre nos braços curtos na maioria dos cromossomos acrocêntricos humanos.

DNA. As bandas positivamente coradas (escuras) são conhecidas como bandas G. As bandas sem coloração são G negativas.

- **Bandeamento Q** – os cromossomos são corados com um corante fluorescente que se liga, preferencialmente, a regiões de DNA ricas em AT, especialmente quinacrina, DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) ou Hoechst 33258, e são visualizados por fluorescência ultravioleta. As bandas fluorescentes são chamadas de bandas Q e marcam os mesmos segmentos cromossômicos que as bandas G.
- **Bandeamento R** – esse é, essencialmente, o oposto do padrão do bandamento G. Os cromossomos sofrem desnaturação por calor em solução salina antes de serem corados com Giemsa. O tratamento com calor desnatura as regiões do DNA ricas em AT e as bandas R são bandas Q negativas. O mesmo padrão pode ser produzido pela ligação de corantes específicos GC, tais como cromomicina A<sub>3</sub>, olivomicina ou mithramicina.
- **Bandeamento T** – identifica um subconjunto de bandas R que ficam concentradas principalmente perto dos telômeros. As bandas T são as bandas mais intensamente coradas das bandas R e são reveladas tanto usando um tratamento com calor, particularmente severo com os cromossomos antes de serem corados com Giemsa, como com a combinação de corantes-padrão e corantes fluorescentes.
- **Bandeamento C** – acredita-se que mostre a heterocromatina constitutiva, principalmente nos centrômeros. Os cromossomos são, em geral, expostos à desnaturação com uma solução saturada de hidróxido de bário antes da coloração com Giemsa.

Os padrões de coloração são correlacionados com elementos funcionais da estrutura cromossômica. O DNA das bandas G é replicado no fim da fase S e é relativamente condensado, enquanto o DNA das bandas R (as quais são G negativas) geralmente se replica no início da fase S e é menos condensado. O DNA das bandas G contém relativamente poucos genes e é menos transcricionalmente ativo. Embora o conteúdo AT das bandas G do DNA humano seja levemente maior que o do DNA das bandas R, bandas G individuais possuem consistentemente menor conteúdo GC que suas sequências flanqueadoras imediatas. Isso pode estar relacionado com a maneira como o DNA se organiza e condensa.

O poder de resolução do bandamento pode ser aumentado por meio do uso de cromossomos mais alongados, antes da ou na pró-metáfase. Procedimentos de alta definição para cromossomos humanos podem identificar 400, 550 ou 850 bandas (ver Figuras 2.14 e 2.15; ver contracapa interior deste livro para um ideograma de todos os cromossomos humanos). Análises de bandamento cromossômico também podem ser utilizadas para investigar anomalias cromossômicas envolvendo material genético perdido ou mal posicionado.

### Relatos de análises citogenéticas

Um relato mínimo de análise citogenética fornece uma confirmação apenas textual que sempre dá o número total de cromossomos e a constituição sexual cromossômica (um **cariótipo**). Os kariótipos normais para humanos são 46,XX (para mulheres) e 46,XY (para homens). Quando existe uma anomalia cromossômica, o kariótipo também descreve o tipo de anomalia e as bandas cromossômicas ou subcromossômicas afetadas (**Quadro 2.2**).

### QUADRO 2.2 Nomenclatura dos cromossomos humanos

O Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) é fixado pelo Comitê Permanente de Nomenclatura Citogenética Humana, que expede relatórios detalhados de nomenclatura, mais recentemente em 2005 (ver Leitura adicional). A terminologia básica para bandamento cromossômico foi decidida em uma reunião em Paris, em 1971, e é referida como nomenclatura de Paris.

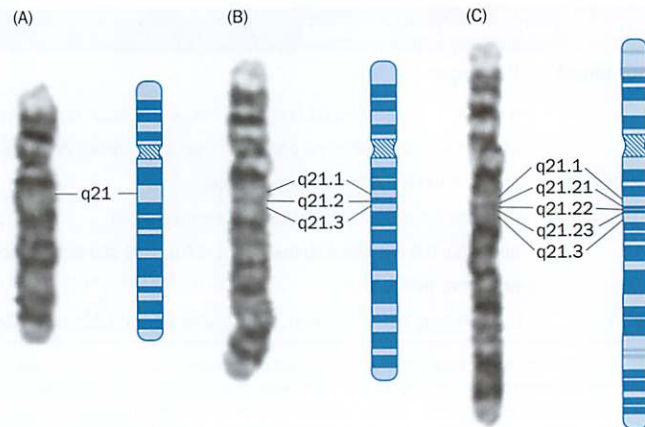
Os locais correspondentes ao braço curto são classificados como **p** (*petit*), e ao braço longo como **q** (*queue*). Cada braço cromossômico é dividido em regiões classificadas como p1, p2, p3, etc., e q1, q2, q3, etc., contando em direção ao exterior a partir do centrômero. As regiões são delimitadas por marcas específicas, as quais são consistentes, e por características morfológicas distintas, tais como as extremidades dos braços cromossômicos, o centrômero e certas bandas. As regiões são divididas em bandas classificadas como p11 (um-um, e não onze!), p12, p13, etc., sub-bandas classificadas como p11.1, p11.2, etc., e sub-sub-bandas, por exemplo, p11.21, p11.22, em cada caso contando em direção exterior a partir do centrômero (ver Figura 2.14 e também a contracapa deste livro, onde são mostrados ideogramas para todos os cromossomos humanos).

A distância relativa do centrômero é descrita pelas palavras **proximal** e **distal**. Então, proximal Xq significa o segmento do braço longo do X que fica *mais próximo do centrômero*, e distal 2p significa a porção do braço curto do cromossomo 2 que fica *mais distante do centrômero* e, então, fica mais próxima do telômero.

Quando se comparam cromossomos humanos com aqueles de outras espécies, a convenção é utilizar a primeira letra do nome do gênero e as duas primeiras letras do nome da espécie, por exemplo:

- HSA18: cromossomo 18 humano (*Homo sapiens*)
- PTR10: cromossomo 10 de chimpanzé (*Pan troglodytes*)
- MMU6: cromossomo 6 de camundongo (*Mus musculus*)

**Figura 2.14** Diferentes resoluções de bandeamento cromossômico podem decifrar bandas, sub-bandas e sub-sub-bandas. Os padrões de bandeamento G para o cromossomo 4 humano (com ideograma anexo à direita) são mostrados em níveis crescentes de resolução. Os níveis correspondem aproximadamente a (A) 400, (B) 550 e (C) 850 bandas por conjunto haploide, permitindo a subdivisão visual de bandas em sub-bandas, e de sub-bandas em sub-sub-bandas, ao passo que a resolução aumenta. [Adaptada de Cross & Wolstenholme (2001). *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis*, 3rd ed. (DE Rooney, ed.). Com permissão de Oxford University Press.]



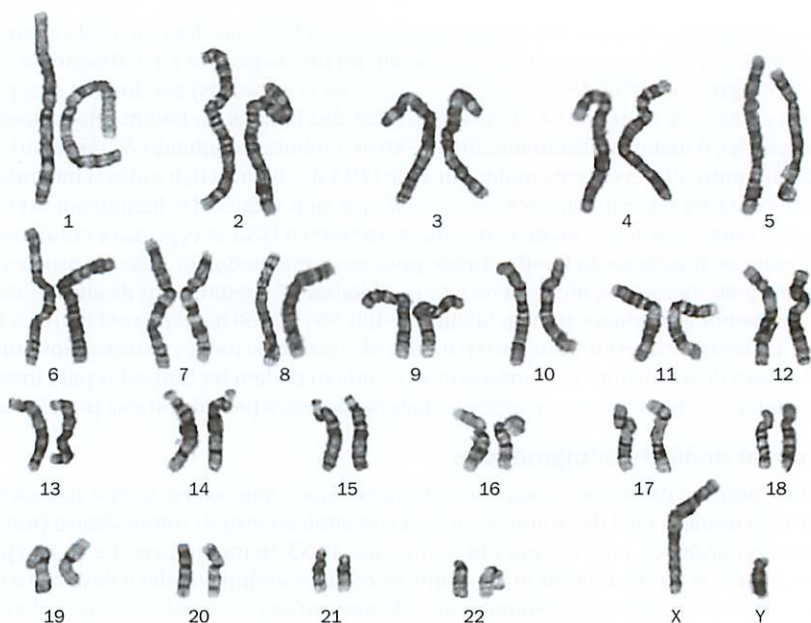
Relatos citogenéticos mais informativos também mostram a estrutura das bandas dos cromossomos individuais. Um **cariograma** é uma representação gráfica do conjunto de cromossomos metafásicos de um indivíduo exibido como pares de homólogos (ver Figura 2.15); confusamente, isso também é frequente e erroneamente chamado de cariótipo. Os cariogramas costumavam ser preparados cortando-se uma fotografia de cromossomos metafásicos que tivessem sido espalhados em uma lâmina de microscopia (um *espalhamento cromossômico*) e pareando-se os cromossomos homólogos; hoje, programas de análise de imagem são utilizados como alternativa.

Como será descrito na próxima seção, análises de citogenética molecular são atualmente amplamente utilizadas, particularmente em análises de cromossomos de células tumorais.

### A citogenética molecular localiza seqüências específicas de DNA nos cromossomos

As técnicas de bandeamento cromossômico permitem análises brutas da organização estrutural dos cromossomos, com uma resolução de diversas megabases. Para análises com resolução mais alta, faz-se necessária a detecção de seqüências específicas de DNA nos cromossomos.

Para detectar se uma seqüência de DNA desejada (a seqüência de DNA-**alvo**), um oligonucleotídeo ou seqüência curta de DNA complementar é primeiramente marcado de alguma maneira para gerar uma **sonda** de oligonucleotídeo ou ácido nucleico. Quanto maior a sonda, mais específica sua ligação. Sondas de oligonucleotídeos possuem, em



**Figura 2.15** Cromossomos em prometáfase mitótica de linfócitos de um homem normal. O cariograma mostra bandeamento G de alta resolução (entre 550 e 850 bandas por conjunto haploide). Comparar com o ideograma idealizado na contracapa deste livro. [De Cross & Wolstenholme (2001). *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis*, 3rd ed. (DE Rooney, ed.). Com permissão de Oxford University Press.]

geral, de 15 a 50 nucleotídeos e são quimicamente sintetizadas. Sondas de ácidos nucleicos variam em tamanho de várias centenas de nucleotídeos a algumas quilobases e são muitas vezes fragmentos de DNA genômico purificado ou cópias de DNA feitas a partir de transcritos de RNA.

Se a sonda for inicialmente de dupla-fita, ela é transformada em fita simples e então adicionada a uma preparação cromossômica ou a células que tenham sido tratadas para fazer o DNA cromossômico se tornar de fita simples (**desnaturação**). O objetivo é possibilitar que as sequências de DNA fita simples das sondas se liguem especificamente por pontes de hidrogênio a sequências alvo de DNA de fita simples presentes nos cromossomos (**hibridização molecular**). Durante esse processo, os cromossomos são, de alguma maneira, imobilizados, tanto em uma preparação cromossômica com células como em uma sem células.

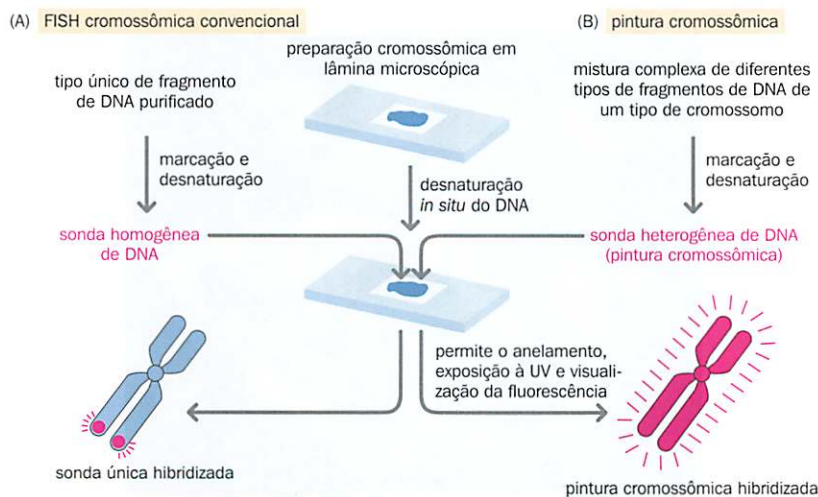
### Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)

Na hibridização *in situ* padrão, uma sonda marcada é hibridizada ao DNA de um cromossomo desnaturado presente em uma preparação metafásica de cromossomos, em uma lâmina microscópica seca ao ar. Métodos modernos utilizam um sistema de marcação fluorescente de maneira que um **fluorocromo** (corante fluorescente) se ligue a uma sequência-alvo de DNA, possibilitando que esta seja rastreada por microscopia de fluorescência. A sonda pode ser marcada diretamente por meio da incorporação de um precursor de nucleotídeo marcado com fluorescência. De forma alternativa, um nucleotídeo contendo uma *molécula repórter* (tal como biotina ou digoxigenina) é incorporado no DNA e, após isso, pode ser especificamente ligado por *afinidade a uma molécula* marcada por fluorescência.

Na hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) convencional, sondas homogêneas de DNA são hibridizadas a cromossomos de metáfases e pró-metáfases fixados em uma lâmina de vidro. A hibridização da sonda ao DNA investigado é marcada como pontos duplos, indicando que a sonda marcada se ligou às duas cromátides-irmãs (**Figura 2.16A** e **Figura 2.17A**). Por meio do uso de equipamentos sofisticados de processamento de imagem e moléculas-repórter de ligação contendo diferentes cores de fluorescência, várias sondas de DNA podem ser simultaneamente hibridizadas, de forma que as localizações de sequências específicas possam ser identificadas umas em relação às outras.

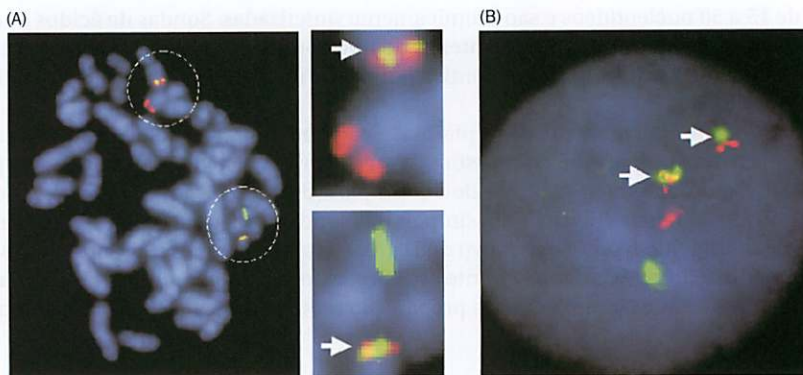
A resolução máxima da FISH em cromossomos metafásicos é de várias megabases, mas a utilização de cromossomos em prometáfase, mais estendidos, pode permitir uma resolução de 1 Mb. Variações no método padrão envolvem alongamento artificial do DNA ou das fibras de cromatina (**FISH fibrosa**), de maneira que a resolução pode ser aumentada ao nível de quilobase.

A **FISH interfásica** também oferece uma alta resolução cromossômica porque, durante a interfase, os cromossomos são naturalmente muito menos condensados que durante a metáfase. Nesta técnica, as sondas hibridizam ao DNA cromossômico alvo em preparações celulares ou nucleares que são tratadas com enzimas digestivas para permitir o acesso da sonda - ver Figura 2.17B para aplicação. FISH interfásica pode ser realizada em amostras frescas ou congeladas ou em material que tenha sido preservado em blocos de parafina.



**Figura 2.16 Base da FISH cromossômica e métodos de pintura cromossômica.** Ambos os métodos são utilizados tanto em cromossomos interfásicos como em cromossomos metafásicos, como ilustrado aqui, onde os espalhamentos cromossômicos são preparados e fixados em uma lâmina de microscopia e o DNA é desnaturado *in situ*. (A) Em FISH cromossômica convencional, sondas homogêneas de DNA são utilizadas para hibridizar a um único tipo de sequência de DNA cromossômico. Sondas individuais são marcadas com um fluoróforo específico, e cada sonda possui a possibilidade de hibridizar a duas cromátides-irmãs para dar um sinal duplo. Aplicações práticas da FISH cromossômica utilizadas em cromossomos metafásicos e interfásicos são mostradas nas Figuras 2.17 e 2.17B, respectivamente. (B) A pintura cromossômica utiliza uma coleção heterogênea de sondas de DNA marcadas que derivam, originalmente, de regiões múltiplas de um tipo definido de cromossomo. Os fragmentos no coquetel de sondas são simultaneamente marcados com um único tipo de fluoróforo e vão hibridizar a múltiplas regiões de um único cromossomo. As Figuras 2.18 e 2.9 mostram aplicações práticas de pintura de cromossomos metafásicos e interfásicos, respectivamente.

**Figura 2.17 FISH de duas cores para detectar rearranjos *BCR-ABL1* em leucemia mieloide crônica.** A maioria dos casos de leucemia mieloide crônica (CML) resulta de uma t(9;22) translocação recíproca, com pontos de quebra que interrompem o oncogene *ABL1* no 9q34 e o gene *BCR* no 22q11. Como resultado da translocação do CML, existe uma cópia normal de cada cromossomo 9 e 22 carregando alelos normais de *ABL1* e *BCR*, respectivamente, e dois cromossomos derivados carregando os genes fusionados *ABL1-BCR* e *BCR-ABL1*. A figura mostra exemplos de análises de FISH cromossômica de CML utilizando (A) FISH metafásica e (B) FISH interfásica com uma sonda de *ABL1* (sinal vermelho) e uma sonda de *BCR* (sinal verde). Os alelos normais *ABL1* e *BCR* fornecem sinais padrão, vermelho e verde, respectivamente [com sinais de ambas as cromátides-irmãs visíveis para pelo menos *ABL1* em (A)]. Os painéis à direita representam ampliações das áreas nos círculos tracejados em (A). As flechas brancas mostram sinais característicos para a fusão dos genes nos dois cromossomos translocados [der(9) e der(22)]. Isso pode ser identificado devido ao posicionamento muito próximo dos sinais verde e vermelho, com sinais verdes e vermelhos que se sobrepõem, aparecendo em laranja-amarelo. (Cortesia de Fiona Harding, Northern Genetics Service, Newcastle upon Tyne.)



### Pintura cromossômica e cariotipagem molecular

Na **pintura cromossômica**, uma aplicação especial da FISH, a sonda é um coquetel de múltiplos fragmentos de DNA que derivam de diversas localizações diferentes em um único tipo de cromossomo (**Figura 2.16B**). O sinal de hibridização agregado resultante geralmente abrange todo o cromossomo, proporcionando sua fluorescência.

A **Figura 2.9** mostra um exemplo de pintura cromossômica em núcleo interfásico, mas a maioria das pinturas cromossômicas é realizada em cromossomos metafásicos. A técnica é amplamente empregada em investigações e definições de rearranjos cromossômicos anormais em citogenética clínica e de câncer (**Figura 2.18**) e é particularmente útil em preparações de tumor, as quais são, muitas vezes, de baixa qualidade.

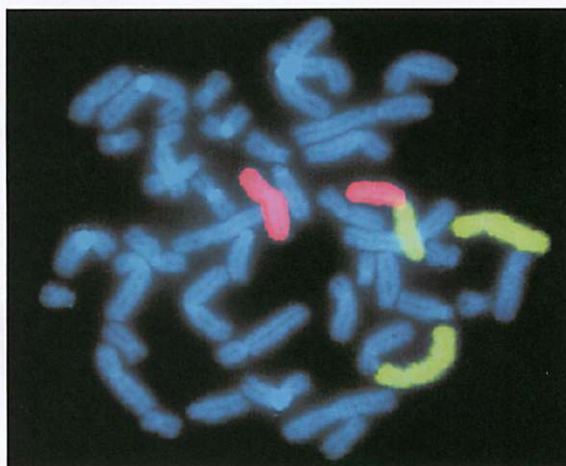
A pintura cromossômica era inicialmente limitada pelo pequeno número de fluoróforos coloridos disponíveis. Hoje, múltiplos alvos podem ser detectados simultaneamente, por meio do uso de diversas sondas, cada uma marcada com seu próprio fluorocromo, ou por meio do emprego de diferentes *balanços* de fluorocromo particulares. A análise das misturas de cores resultantes requer uma análise digital automatizada de imagem, na qual combinações particulares de fluorocromos são atribuídas a *pseudocores* artificiais.

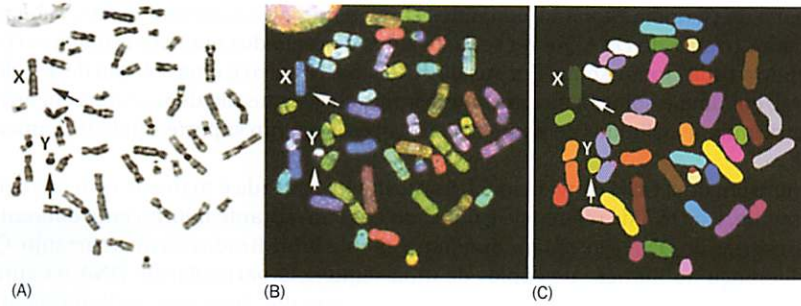
Uma aplicação é a pintura cromossômica de todo o genoma. Então, 24 pinturas diferentes podem ser usadas para distinguir entre os 24 diferentes tipos de cromossomos humanos. Este método FISH multiplex (M-FISH) constitui uma forma de cariotipagem molecular que às vezes é chamada de cariotipagem espectral (SKY) (**Figura 2.19**). A M-FISH/SKY é de grande valor na análise de amostras de tumores. Rearranjos cromossômicos complexos ocorrem com frequência em tumores e são, geralmente, difíceis de interpretar por cariotipagem padrão com bandeamento G, mas a utilização de 24 diferentes pinturas cromossômicas facilita a interpretação.

### Hibridização genômica comparativa (CGH)

Algumas vezes uma forma de *pintura genômica* é realizada com coquetéis de fragmentos de DNA representando todos os cromossomos, mas marcados com um único fluorocromo. O objetivo é comparar o DNA genômico de duas fontes de DNA celular proximamente

**Figura 2.18 Definindo rearranjos cromossômicos por pintura cromossômica.** Por cariotipagem de uma amostra de sangue periférico, um cromossomo X anormal foi identificado com material extracromossômico presente no braço curto. As investigações por pintura cromossômica que seguiram mostraram que o material adicional presente no braço curto do cromossomo X se originou do cromossomo 4, como revelado aqui com uma pintura do cromossomo X (sinal vermelho) e uma pintura do cromossomo 4 (sinal verde). A coloração cromossômica de fundo é o corante azul DAPI. (Cortesia de Gareth Breese, Northern Genetics Service, Newcastle upon Tyne.)



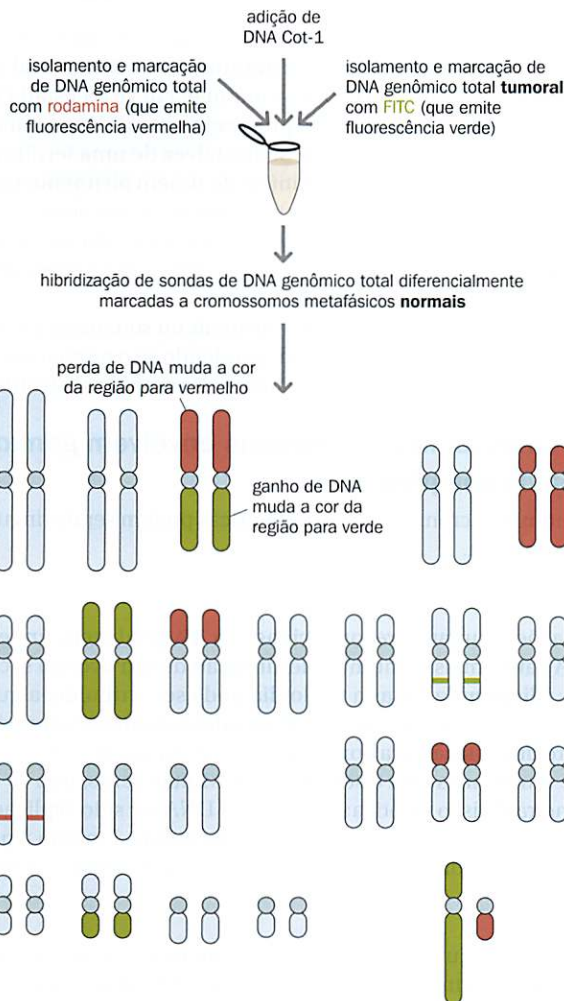


**Figura 2.19 Cariotipagem molecular com o procedimento SKY.** Os cromossomos analisados são de um homem normal. (A) Bandeamento cromossômico metafásico por método de DAPI invertido, o qual é similar ao bandeamento G, mas acentua a região heterocromática de alguns cromossomos (p. ex., 1, 9, 16 e Y). (B) A mesma metafase de (A) após a hibridização com pintura cromossômica. Para se obter sondas apropriadas, os cromossomos humanos foram primeiramente fracionados de acordo com o tamanho e a composição de bases por citometria de fluxo e classificados em grupos do mesmo tipo cromossômico. O DNA foi purificado e amplificado a partir dos grupos cromossômicos individuais e então marcado por fluorescência para utilização como sondas para hibridização. As sondas foram marcadas com, no mínimo, uma e, no máximo, cinco combinações de fluoróforos e então foram agrupadas e hibridizadas aos cromossomos metafásicos. As saídas são exibidas em cores RGB. (C) O mesmo espalhamento metafásico, mas, aqui, a imagem digital permite que as saídas fluorescentes de cada sinal de pintura cromossômica diferente em (B) sejam atribuídas a pseudocores artificiais. As pseudocores são atribuídas de acordo com os valores de limiar de comprimento de onda para a fluorescência detectada e ajudam a distinguir os diferentes cromossomos. Flechas indicam os cromossomos sexuais. [De Padilla-Nash HM, Barenboim-Stapleton L, Difilippantonio MJ & Ried T (2007) *Nature Protocols* 1, 3129-3142. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.]

relacionadas, as quais se espera que sejam diferentes, tanto devido à perda ou ao ganho de regiões subcromossômicas como de cromossomos inteiros.

Em **hibridizações genômicas comparativas (CGH)** padrão, o DNA genômico total é isolado de duas fontes celulares, independentemente marcado com dois fluorocromos diferentes e simultaneamente hibridizado a metáfases cromossômicas normais. A taxa dos sinais das duas cores é então comparada ao longo do comprimento de cada cromossomo para identificar diferenças cromossômicas ou subcromossômicas entre as duas fontes. Frequentemente uma fonte teste, tal como DNA de uma célula tumoral, é confrontada com uma fonte controle normal, para identificar regiões do genoma que tenham sido amplificadas ou perdidas na amostra teste (Figura 2.20).

Como alternativa à CGH padrão, foram desenvolvidos mais recentemente métodos variantes nos quais os dois DNAs genômicos a serem comparados são hibridizados a grandes coleções de fragmentos de DNA purificados que representam regiões do genoma uniformemente espaçadas, em vez de cromossomos metafásicos. Como um desdobramento



**Figura 2.20 Hibridização genômica comparativa (CHG) usando sondas de todo o DNA genômico.** ACHG começa com o isolamento de DNA genômico de uma amostra tumoral e de DNA genômico de um indivíduo que possui cariótipo normal (DNA controle). A seguir, os dois genomas são diferencialmente marcados; por exemplo, o DNA controle com o fluorocromo vermelho rodamina, e o DNA tumoral com o fluorocromo verde isotiocianato de fluoresceína (FITC). DNA Cot-1 é uma fração de DNA purificado que é experimentalmente enriquecido para DNA altamente repetitivo. Um excedente de DNA humano Cot-1 não marcado é adicionado à mistura de sondas marcadas para suprimir as sequências repetitivas de DNA que estão presentes em ambos os genomas (para se obterem os sinais de hibridização desejados com o mínimo ruído possível). Os genomas diferencialmente marcados são então combinados e hibridizados a cromossomos metafásicos normais. As intensidades relativas dos fluorocromos verde e vermelho refletem as mudanças efetivas que ocorreram no número de cópias do genoma tumoral. Perdas e ganhos de DNA são indicadas por mudanças para fluorescência vermelha e verde, respectivamente. [De McNeil & Ried (2000) *Expert Rev. Mol. Med.* 14, 1-14. Com permissão de Cambridge University Press.]

do Projeto do Genoma Humano, conjuntos abrangentes de fragmentos de DNA altamente purificados (*clones* de DNA) foram sequenciados e ordenados em mapas lineares correspondendo a cada cromossomo. Em **ensaios CGH**, o DNA-alvo é uma coleção destes clones, em geral, em uma resolução de um clone por megabase, que são depositados em arranjos geometricamente definidos de pontos microscópicos em um suporte sólido (um **microarranjo**).

Como em uma CGH convencional, a amostra investigada é marcada com um corante fluorescente, e o DNA de referência é marcado com um corante fluorescente diferente. As duas amostras de DNA são, então, simultaneamente hibridizadas ao microarranjo. Qualquer diferença no número de cópias de uma sequência particular de DNA na amostra desconhecida *versus* o DNA de referência afetará a taxa dos dois corantes fluorescentes ligados. Embora seja tecnicamente exigente, tanto para aceitar como para analisar os resultados, o arranjo CGH está começando a ser amplamente desenvolvido e utilizado devido ao seu potencial diagnóstico considerável.

## 2.5 ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

Anomalias cromossômicas podem ser definidas como mudanças que produzem uma alteração visível dos cromossomos. O quanto pode ser visto depende da técnica utilizada. A menor perda ou ganho de material visível por métodos tradicionais em preparações citogenéticas padrão é de cerca de 4 Mb de DNA. No entanto, FISH permite que mudanças muito menores sejam visualizadas, e o uso de citogenética molecular acabou com qualquer limiar que distinguisse claramente entre mudanças descritas como anomalias cromossômicas e mudanças encaradas como defeitos moleculares ou de DNA.

Uma definição alternativa de anomalia cromossômica é uma produzida por mecanismos cromossômicos específicos, tais como falha no reparo de quebras cromossômicas, ou eventos impróprios de recombinação, ou segregação incorreta dos cromossomos durante a mitose ou a meiose.

As anomalias cromossômicas podem ser classificadas em dois tipos, dependendo da sua distribuição nas células do corpo. Uma **anomalia constitucional** está presente em todas as células do corpo. Onde isso ocorre, a anomalia deve ter estado presente nos primeiros estágios do desenvolvimento, mais provavelmente como resultado de um espermatozoide ou ovócito secundário anormal, senão talvez de uma fertilização anormal ou, até mesmo, de um evento anormal logo no início do desenvolvimento embrionário.

Uma anomalia somática (ou adquirida) está presente em somente algumas células ou tecidos de um indivíduo. Um indivíduo com uma anomalia somática é chamado de **mosaico**, já que possui duas populações de células com constituições cromossômicas diferentes, sendo as duas derivadas do mesmo zigoto.

Anomalias cromossômicas, sejam constitucionais ou somáticas, podem ser classificadas, na grande maioria, em duas categorias, dependendo se o número de cópias é alterado (anomalias numéricas) ou se sua estrutura é anormal (anomalias estruturais) (**Tabela 2.4**).

### Anomalias cromossômicas numéricas envolvem ganho ou perda de cromossomos completos

Três classes de anomalias cromossômicas numéricas podem ser distinguidas: poliploidia, aneuploidia e mixoploidia.

#### Poliploidia

De todas as gestações humanas reconhecidas, 1 a 3% produzem um embrião triploide (**Figura 2.21A**). A causa mais comum é a fertilização de um ovócito secundário por dois espermatozoides (**dispermia**), mas a triploidia pode ser atribuída, algumas vezes, à fertilização envolvendo um gameta diploide. Triploides raramente sobrevivem até o fim do primeiro trimestre de gestação, e a condição não é compatível com a vida. A tetraploidia (**Figura 2.21B**) é muito mais rara e sempre letal. Muitas vezes, isso se deve a falhas em completar a primeira divisão zigótica: apesar de o DNA ter sido replicado para gerar um conteúdo de 4C, a divisão celular não ocorre normalmente. Embora a poliploidia constitucional seja rara e letal, todas as pessoas normais possuem algumas células poliploides.

#### Aneuploidia

**Euploidia** significa ter conjuntos cromossômicos *completos* ( $n$ ,  $2n$ ,  $3n$  e assim por diante). **Aneuploidia** é o oposto, um ou mais cromossomos individuais estão representados em

TABELA 2.4 Nomenclatura de anomalias cromossômicas

Tipo de anomalia	Exemplos	Explicações/observações
<b>NUMÉRICAS</b>		
Triploidia	69,XXX, 69,XXY, 69,XYY	um tipo de poliploidia
Trissomia	47,XX, + 21	ganho de um cromossomo é indicado por +
Monossomia	45,X	um tipo de aneuploidia; a perda de um cromossomo é indicada por -
Mosaïcismo	47,XXX/46,XX	um tipo de mixoploidia
<b>ESTRUTURAIS</b>		
Deleção	46,XY,del(4)(p16.3)	deleção terminal (ponto de quebra em 4p16.3)
	46,XX,del(5)(q13q33)	deleção intersticial (5q13-q33)
Inversão	46,XY,inv(11)(p11p15)	inversão paracêntrica (pontos de quebra no mesmo braço)
Duplicação	46,XX,dup(1)(q22q25)	duplicação de região abrangendo de 1q22 a 1q25
Inserção	46,XX,ins(2)(p13q21q31)	um rearranjo de uma cópia do cromossomo 2 por inserção do segmento 2q21-q31 em um ponto de quebra em 2p13
Cromossomo em anel	46,XY,r(7)(p22q36)	união de extremidades quebradas em 7p22 e 7q36
Cromossomo marcador	47,XX,+mar	indica uma célula que contém um cromossomo marcador (um cromossomo extra não identificado)
Translocação recíproca	46,XX,t(2;6)(q35;p21.3)	uma translocação recíproca equilibrada com pontos de quebra em 2q35 e 6p21.3
Translocação robertsoniana (dá origem a um cromossomo derivado)	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	um portador balanceado de uma translocação robertsoniana 14;21. q10 não é exatamente uma banda cromossômica, mas indica o centrômero; der é utilizado quando um cromossomo de uma translocação está presente
	46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21	um indivíduo com Síndrome de Down possuindo um cromossomo 14 normal, um cromossomo com translocação 14;21 e duas cópias normais do cromossomo 21

Essa é uma breve nomenclatura; uma nomenclatura mais complexa é definida pelo ISCN, que permite a descrição completa de qualquer anomalia cromossômica; ver Shaffer LG, Tommerup N (eds) (2005) ISCN 2005: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Karger.

uma cópia extra ou estão faltando. Na trissomia, existem três cópias de um cromossomo particular em uma célula que seria diploide; um exemplo é a trissomia do 21 (47,XX, + 21 ou 47,XY, + 21) na síndrome de Down. Na monossomia, existe um cromossomo faltando em uma célula que, de outra forma, seria diploide, como na monossomia do X (45,X) na síndrome de Turner. Células cancerosas frequentemente demonstram aneuploidia extrema e múltiplas anomalias cromossômicas.

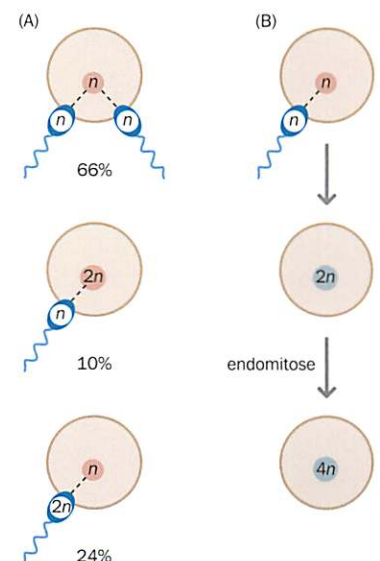
Células aneuploides surgem por dois mecanismos principais: um mecanismo é a **não disjunção**, na qual cromossomos pareados falham na sua separação durante a anáfase I da meiose ou cromátides-irmãs falham na sua separação, tanto na meiose II como na mitose. A não disjunção durante a meiose produz gametas, tanto com 22 como com 24 cromossomos, os quais, após a fertilização com um gameta normal, produzem um zigoto monossômico ou trissômico. A não disjunção durante a mitose produz um indivíduo em mosaico.

O **atraso na anáfase** também é outro mecanismo que resulta em aneuploidia. Se um cromossomo ou uma cromátide tem seu movimento atrasado durante a anáfase e fica atrasado em relação aos outros, pode haver uma falha na sua incorporação em um dos dois núcleos das duas células-filhas. Os cromossomos que não entram nos núcleos de uma célula-filha são, por fim, degradados.

### Mixoploidia

Na mixoploidia existem duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes dentro de um indivíduo. As populações de células geneticamente diferentes geralmente surgem de um mesmo zigoto (**mosaicismo**). Mais raramente, elas se originam de zigotos diferentes (**quimerismo**); o quimerismo espontâneo geralmente ocorre por meio da agregação

**Figura 2.21** Origens da triploidia e da tetraploidia. (A) Origens da triploidia humana. A dispermia é a principal causa, contabilizando 66% dos casos. A triploidia também é causada por gametas diploides que surgem por falhas ocasionais na meiose; a fertilização de um ovócito secundário diploide e a fertilização por um espermatozoide diploide contabilizam 10 e 24% dos casos, respectivamente. (B) A tetraploidia envolve fertilização e fusão normais de gametas para dar origem a um zigoto normal. Subsequentemente, no entanto, a tetraploidia surge por endomitose, quando o DNA replica sem divisão celular subsequente.



de dois zigotos gêmeos fraternos ou de células imediatamente descendentes destes no interior do embrião. Anomalias que seriam, de outra maneira, letais (como a triploidia) podem não ser letais em indivíduos mixoploides.

Mosaicos aneuploides são comuns. Por exemplo, mosaicismos resultando em uma proporção de células normais e uma proporção de células aneuploides (p. ex., trissômicas) pode ser atribuído à não disjunção cromossômica ou ao atraso no movimento cromossômico em uma das divisões mitóticas do embrião (quaisquer células monossômicas que sejam formadas normalmente são descartadas). Mosaicos poliploides (p. ex., mosaicos humanos diploides/triploides) são, ocasionalmente, encontrados. Como a perda ou o ganho de conjuntos cromossômicos haploides por não disjunção mitótica são extremamente improváveis, mosaicos humanos diploides/poliploides, mais provavelmente surgem pela fusão do segundo corpúsculo polar com um dos núcleos em fase de clivagem de um zigoto diploide normal.

### Consequências clínicas

Ter o número errado de cromossomos causa consequências sérias e, geralmente, letais (**Tabela 2.5**). Mesmo que o cromossomo 21 extra em pessoas com trissomia do 21 (síndrome de Down) seja um cromossomo perfeitamente normal, herdado de um progenitor normal, sua presença causa anomalias múltiplas que estão presentes desde o nascimento (congênitas). Embriões com trissomia do cromossomo 13 ou trissomia do cromossomo 18 também podem sobreviver, mas ambos resultam em diversas malformações de desenvolvimento, síndrome de Patau e síndrome de Edwards, respectivamente. Outras trissomias cromossômicas não são compatíveis com a vida. Monossomias autossômicas possuem consequências ainda mais catastróficas que as trissomias e, são invariavelmente letais nos primeiros estágios de vida do embrião.

As anomalias de desenvolvimento associadas com monossomias e trissomias devem ser as consequências de um desequilíbrio no nível dos produtos gênicos, codificados em diferentes cromossomos. O desenvolvimento e o funcionamento normais dependem de inúmeras interações entre produtos gênicos que são, frequentemente, codificados por diferentes cromossomos. Para pelo menos algumas dessas interações, o balanceamento dos níveis de produtos gênicos codificados por genes em cromossomos diferentes é criticamente importante; cada cromossomo contém, provavelmente, vários genes para os quais a quantidade de produto gênico produzida é fortemente regulada. Alterar o número relativo de cromossomos afetará essas interações, e poderia se esperar que a redução do

**TABELA 2.5** Consequências clínicas de anomalias cromossômicas numéricas

Anomalia	Consequência clínica
<b>POLIPLÓIDIA</b>	
Triploidia (69,XXX ou 69,XXY)	1 a 3% de todas as concepções; quase nunca nascem vivos e não sobrevivem por muito tempo
<b>ANEUPLOIDIA (AUTOSSOMOS)</b>	
Nulissomia (falta de um par de homólogos)	letal no estágio de pré-implantação
Monossomia (falta de um cromossomo)	letal durante o desenvolvimento embrionário
Trissomia (um cromossomo extra)	geralmente letal durante os estágios embrionários ou fetais, <sup>a</sup> mas indivíduos com trissomia do 13 (síndrome de Patau) e trissomia do 18 (síndrome de Edwards) podem sobreviver até o fim da gestação; aqueles com trissomia do 21 (síndrome de Down) podem sobreviver além dos 40 anos de vida
<b>ANEUPLOIDIA (CROMOSSOMOS SEXUAIS)</b>	
Cromossomo sexual adicional	indivíduos com 47,XXX, 47,XXY, ou 47,XYY possuem problemas relativamente menores e tempo de vida normal
Falta de um cromossomo sexual	embora 45,Y nunca sejam viáveis, nos 45,X (síndrome de Turner), cerca de 99% dos casos são abortados espontaneamente; os sobreviventes possuem inteligência normal, mas são inférteis e mostram características físicas diagnósticas secundárias

<sup>a</sup> Em humanos, o período embrionário vai da fertilização ao fim da 8ª semana do desenvolvimento. O desenvolvimento fetal começa aí e dura até o nascimento.



número de cópias gênicas em 50% poderia ter consequências mais graves do que possuir três cópias de um mesmo gene em vez de duas.

Ter cromossomos sexuais extras pode causar muito menos efeito do que ter um cromossomo autossomo extra. Pessoas com cariótipos 47,XXX ou 47,XXY geralmente “funcionam” dentro da normalidade, e homens 47,XXY têm problemas relativamente menores quando comparados a pessoas com qualquer trissomia autossômica. Até mesmo a monossomia (em mulheres 45,X) pode ter poucas consequências importantes – embora 45,Y seja sempre letal.

Devido ao fato de pessoas normais poderem possuir tanto um cromossomo X como nenhum, como um cromossomo Y ou nenhum, deve haver um mecanismo especial que permita o funcionamento normal com números variáveis de cópias de cromossomos sexuais. Para o cromossomo Y, isso se deve ao fato de que, os poucos genes que o mesmo carrega são amplamente focados na determinação da masculinidade. O cromossomo X de mamíferos também é um caso especial, pois a inativação do X em fêmeas controla o nível de produtos gênicos codificados pelo X independentemente do número de cromossomos X na célula.

Não é óbvio por que a triploidia é letal em humanos e em outros animais. Com três cópias de cada autossomo, a dosagem de genes autossomos é balanceada não devendo causar problemas. Triploides são sempre estéreis, pois um tríplex de cromossomos não pode parear e segregare corretamente na meiose, mas muitas plantas triploides são saudáveis e vigorosas em todos os outros aspectos. A letalidade nos animais pode se dever ao fato da existência de um desequilíbrio entre os produtos codificados pelo cromossomo X e pelos autossomos, os quais a inativação do cromossomo X não seria capaz de compensar.

### Uma variedade de anomalias cromossômicas estruturais é resultado de falhas no reparo ou erros de recombinação

Quebras cromossômicas ocorrem tanto como resultado de um dano ao DNA (por radiação ou químicos, por exemplo) como por falhas no processo de recombinação. Quebras cromossômicas que ocorrem durante a fase  $G_2$  afetam somente uma das duas cromátides-irmãs e são chamadas de **quebras cromatídicas**. Quebras que surgem durante a fase  $G_1$ , se não reparadas antes da fase S, tornam-se *quebras cromossômicas* (afetando ambas as cromátides). Sistemas enzimáticos celulares reconhecem e tentam reparar cromossomos quebrados. O reparo envolve a união de duas extremidades quebradas ou a adição de um telômero a uma extremidade quebrada.

Durante o ciclo celular, mecanismos especiais normalmente evitam que células com cromossomos não reparados entrem na mitose. Entretanto, desde que não haja extremidades livres, as células podem seguir em direção à divisão celular quando necessário. Quando mecanismos de reparo celular se defrontam com extremidades cromossômicas indesejadas produzidas por quebras cromossômicas, há três resultados possíveis. Primeiramente, o dano pode ser irreparável, situação na qual a célula é programada para se autodestruir. Alternativamente, o dano pode ser corretamente reparado ou pode ser incorretamente reparado, podendo resultar em cromossomos com anomalias estruturais.

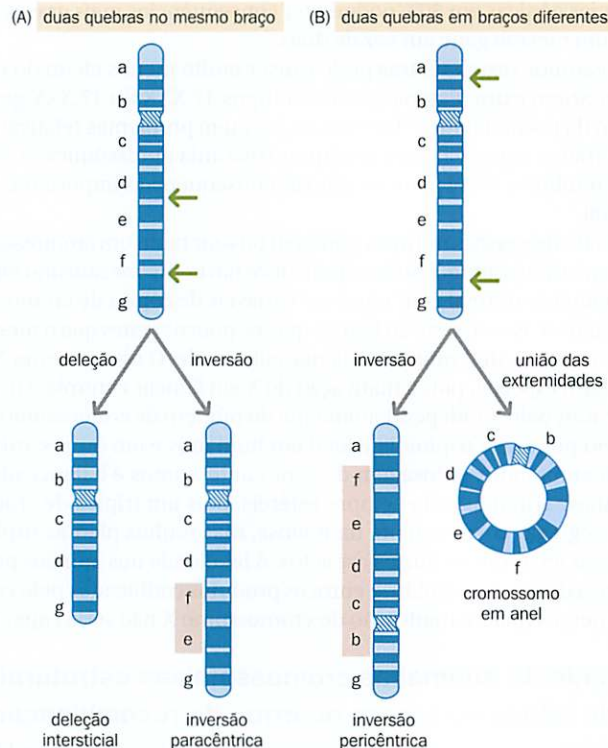
Além de falhas no reparo do DNA, erros na recombinação também produzem anomalias cromossômicas estruturais. Após o pareamento dos homólogos na meiose, ficam sujeitos a mecanismos de recombinação que garantem a quebra e a junção das cromátides (que não são as cromátides-irmãs). Se, no entanto, a recombinação ocorrer entre homólogos com falha no pareamento, os produtos resultantes podem possuir anomalias estruturais.

Além da recombinação meiótica, outros processos celulares naturais envolvem a quebra e a junção de DNA. Notavelmente, uma forma de recombinação também ocorre naturalmente em células B e T, nas quais o DNA celular passa por rearranjos programados para fabricar anticorpos e receptores de células T. Anomalias, nesses processos de recombinação, também podem causar anomalias cromossômicas estruturais, podendo estar associadas ao câncer.

Anomalias cromossômicas estruturais são frequentemente o resultado de uma junção incorreta de duas extremidades de cromossomos quebrados. Se um único cromossomo sofre duas quebras, a junção incorreta dos fragmentos pode resultar em um material cromossômico perdido (deleção), segmento trocado na direção oposta (inversão) ou incluído em um cromossomo circular (cromossomo em anel) (**Figura 2.22**). Cromossomos com anomalias estruturais e com um único centrômero podem ser propagados de forma estável por ciclos sucessivos de mitose. Entretanto, qualquer cromossomo que não possua centrômero (acêntrico) ou que possua dois centrômeros (dicêntrico) não vai segregare normal e estávelmente na mitose e será, por fim, perdido.

**Figura 2.22 Resultados estáveis de reparo incorreto de duas quebras em um único cromossomo.**

(A) Reparo incorreto de duas quebras (setas verdes) ocorrendo no mesmo braço cromossômico pode envolver a perda do fragmento central (aqui contendo as regiões hipotéticas e e f) e a união dos fragmentos terminais (deleção) ou a inversão do fragmento central em 180° e a união das extremidades aos fragmentos terminais (chamada de inversão paracêntrica porque não envolve o centrômero). (B) Quando duas quebras ocorrem em braços diferentes do mesmo cromossomo, os fragmentos centrais (abrangendo as regiões hipotéticas de b a f, neste exemplo) podem ser invertidos e unidos novamente aos fragmentos terminais (inversão pericêntrica). De forma alternativa, porque o fragmento central contém um centrômero, as duas extremidades podem ser unidas, formando um cromossomo em anel estável, enquanto os fragmentos distais acêntricos são perdidos. Como outros cromossomos reparados que preservam um centrômero, os cromossomos em anel podem ser transmitidos de forma estável para as células-filhas.



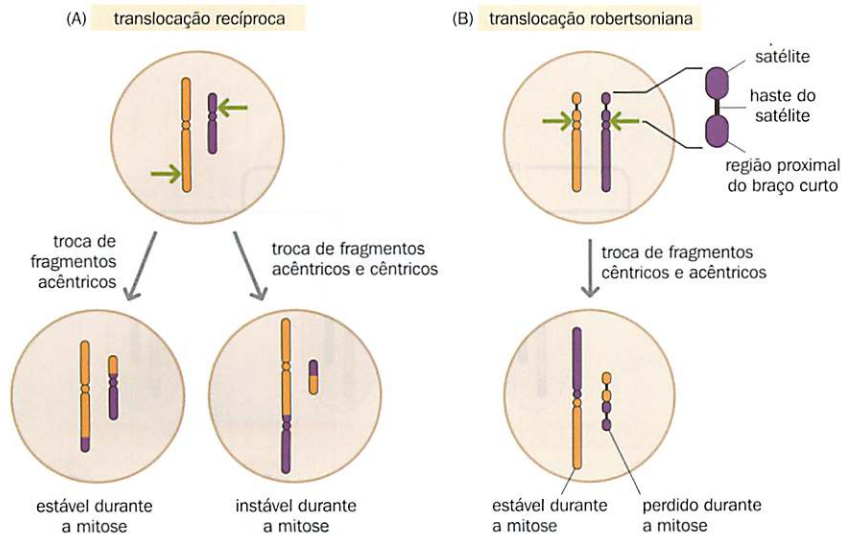
Se dois cromossomos diferentes sofrem, cada um, uma quebra, a junção equivocada das extremidades quebradas pode resultar em um movimento de material cromossômico entre cromossomos (**translocação**). Uma *translocação recíproca* é o termo geral utilizado para descrever uma troca de fragmentos entre dois cromossomos (**Figura 2.23A**). Se um fragmento acêntrico de um cromossomo é trocado por um fragmento cromossômico de outro cromossomo, os produtos são estáveis na mitose. No entanto, a troca de um fragmento acêntrico por um fragmento cêntrico resulta em um cromossomo acêntrico e outro cêntrico que são instáveis na mitose.

Uma *translocação robertsoniana* é um tipo especializado de translocação entre dois dos cinco tipos de cromossomos acrocêntricos em humanos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22). O braço curto de cada um desses cromossomos é muito pequeno, sendo bastante similares em termos de conteúdo de DNA: cada um contém de 1 a 2 Mb de genes de RNA ribossomal repetidos em *tandem*, localizados entre dois blocos de DNA heterocromático (**Figura 2.23B**). Quebras nos braços curtos de dois cromossomos acrocêntricos seguidas por troca de fragmentos acêntricos e cêntricos resultam em produtos acêntricos e dicêntricos.

O cromossomo acêntrico produzido por uma translocação robertsoniana contém apenas genes de DNA e rRNA não codificantes, altamente repetitivos, que também estão presentes em um alto número de cópias nos outros cromossomos humanos acrocêntricos. Ele é perdido durante a mitose sem consequências. O outro produto é um cromossomo dicêntrico incomum, estável na mitose. Nesse caso, os dois centrômeros ficam bastante próximos (fusão cêntrica) e, frequentemente, funcionam como um grande centrômero de modo que o cromossomo segregue regularmente. Ainda assim, como será descrito na próxima sessão, este cromossomo pode representar problemas durante a gametogênese.

Translocações mais complexas podem envolver múltiplas quebras cromossômicas. As inserções geralmente exigem pelo menos três quebras – um cromossomo liberado por duas quebras em um braço cromossômico e inserido em outra quebra podendo ser localizada em outra região do mesmo cromossomo ou de outro cromossomo.

Uma classe adicional rara de anomalia estrutural pode surgir a partir de recombinação após uma divisão cromossômica aberrante. O produto é um **isocromossomo** simétrico, constituído por dois braços longos ou por dois braços curtos de um cromossomo particular. Isocromossomos humanos são raros, exceto pelo i (Xq) e pelo i (21q), um contribuinte ocasional para a síndrome de Down.



**Figura 2.23 Translocações recíprocas e robertsonianas.** (A) Translocação recíproca. Os cromossomos derivados são estáveis na mitose quando um fragmento acêntrico é trocado por outro; quando um fragmento centrômero é trocado por um fragmento acêntrico, um cromossomo acêntrico e um cromossomo dicêntrico instáveis são produzidos. (B) Translocação robertsoniana. Esta é uma translocação recíproca altamente especializada, na qual a troca de fragmentos centrícos e acêntricos produz um cromossomo dicêntrico que, apesar disso, é estável na mitose e um cromossomo acêntrico que é perdido durante a mitose sem nenhum efeito fenotípico. Isso ocorre exclusivamente após quebras nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos humanos 13, 14, 15, 21 e 22. Como ilustrado à direita, o braço curto dos cromossomos acrocêntricos consiste em três regiões: uma região heterocromática proximal (composta por DNA não codificante altamente repetitivo), uma região heterocromática distal (chamada de satélite cromossômico) e uma região conectora tênue de eucromatina (a haste do satélite) composta por genes de rRNA em *tandem*. Quebras que ocorrem próximas ao centrômero podem resultar em um cromossomo dicêntrico, no qual os dois centrômeros estão tão próximos que podem funcionar como um único centrômero. A perda de um pequeno fragmento acêntrico não tem consequências fenotípicas porque os únicos genes perdidos são genes de rRNA que também estão presentes em grande número de cópias nos outros cromossomos acrocêntricos.

### Diferentes fatores contribuem para as consequências clínicas de anomalias cromossômicas estruturais

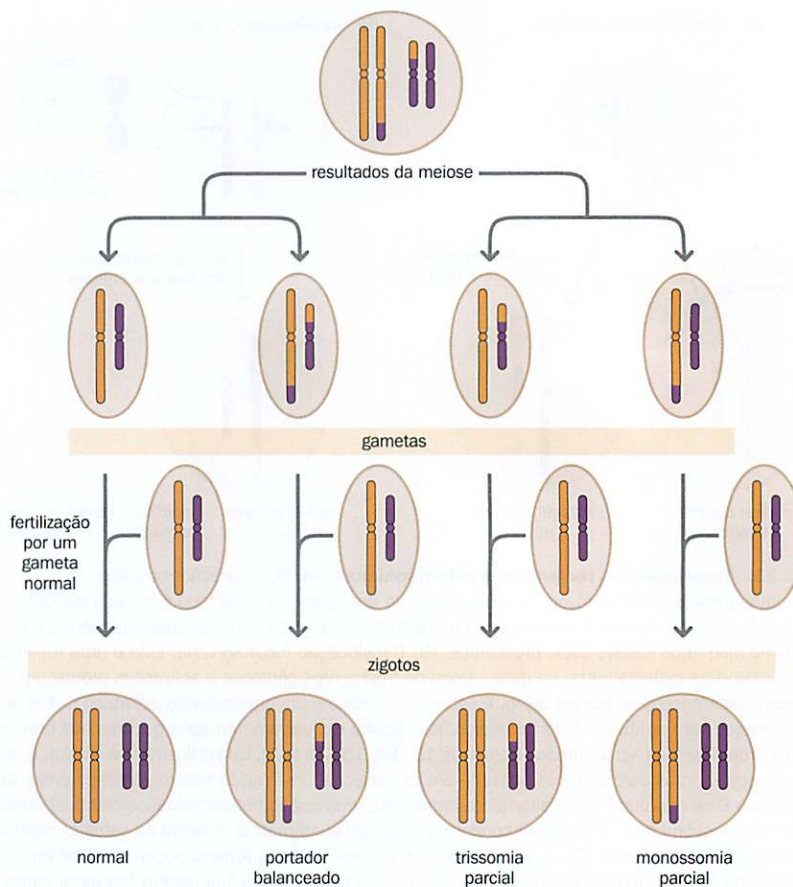
Anomalias cromossômicas estruturais são balanceadas se não existem ganho ou perda de líquidos de material cromossômico e não são balanceadas se existem ganho ou perda de líquidos. Análises citogenéticas padrão têm sido utilizadas rotineiramente para definir se uma anomalia cromossômica é balanceada ou não, mas análises de maior resolução (particularmente ensaio CGH) podem detectar perdas ou ganhos submicroscópicos no que, inicialmente, pareciam ser anomalias cromossômicas balanceadas. Anomalias realmente balanceadas (algumas inversões e translocações balanceadas) são menos prováveis de afetarem o fenótipo, exceto nas seguintes circunstâncias:

- Uma quebra cromossômica interrompe um gene importante.
- Uma quebra cromossômica afeta a expressão de um gene sem interromper a sequência codificadora pela, por exemplo, separação de um gene de um elemento de controlador ou pela translocação de um gene ativo em uma região de heterocromatina.
- Translocações X-autossomo balanceadas causam inativação não randômica do X.

Embora algum material cromossômico seja perdido em translocações robertsonianas (ver Figura 2.23B), elas são consideradas balanceadas porque não há efeito fenotípico; a perda de genes de rRNA em produtos de recombinação acêntrica não é significativa porque outros cromossomos acrocêntricos preservam genes de rRNA suficientes.

Anomalias cromossômicas não balanceadas podem surgir diretamente por deleção ou, raramente, por duplicação. Elas também podem surgir indiretamente devido a má segregação dos cromossomos durante a meiose, em um portador de uma anomalia balanceada. Em tais portadores, a meiose é anormal porque as estruturas dos pares de homólogos não correspondem a uma variedade de consequências possíveis, tais como as que seguem:

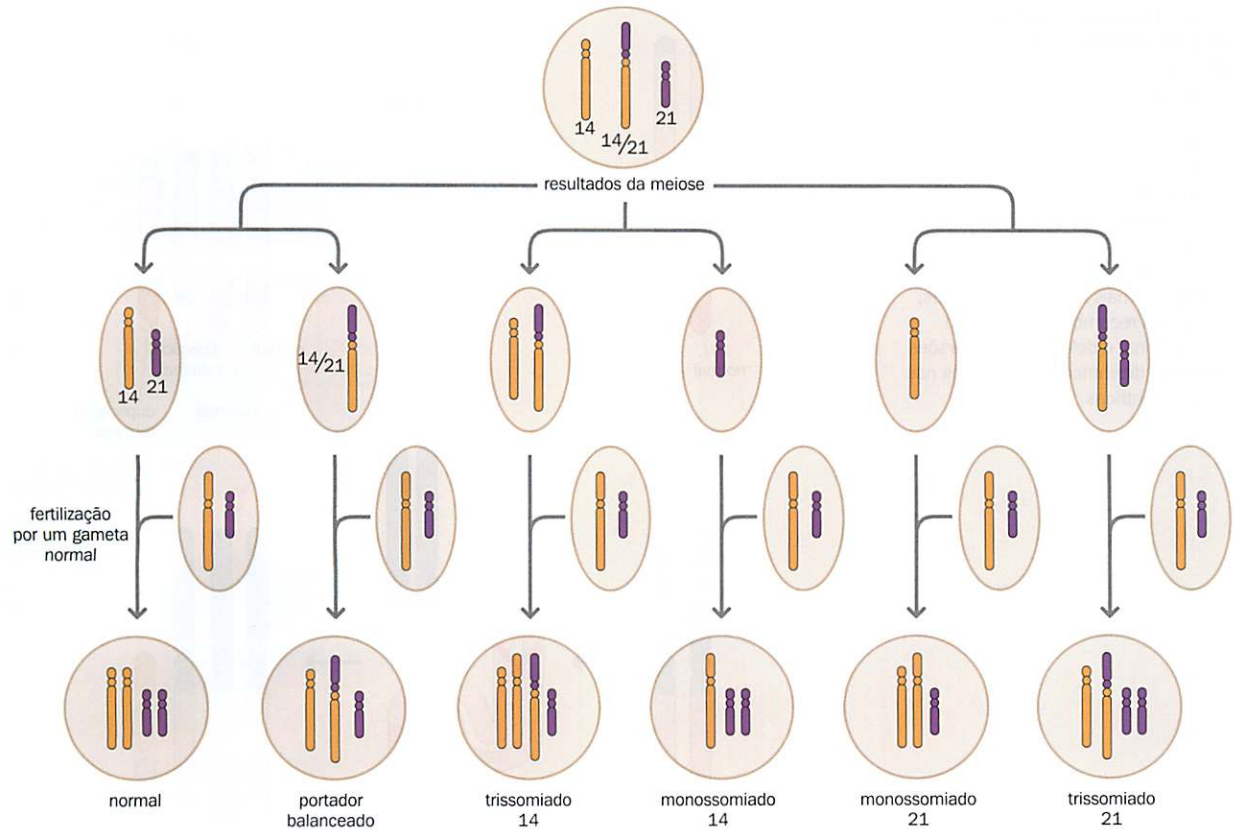
**Figura 2.24 Possíveis resultados da meiose em um portador de uma translocação recíproca balanceada.** Outras formas de segregação também são possíveis, por exemplo, a segregação 3:1. A frequência relativa de cada gameta possível não é facilmente previsível. O risco de um portador ter um filho com cada um dos resultados possíveis depende da frequência de cada um deles nos gametas e também da probabilidade de um conceito que possua uma anomalia sobreviver até o final da gestação. Ver o livro de Gardner e Sutherland (na Leitura adicional) para discussão.



- Um portador de translocação recíproca balanceada pode produzir gametas que dão origem a uma criança inteiramente normal, a um portador balanceado fenotipicamente normal ou a vários cariótipos não balanceados que, sempre combinam monossomia para parte de um dos cromossomos com trissomia para parte do outro (Figura 2.24). Não é possível fazer declarações gerais sobre as frequências relativas desses eventos. O tamanho dos segmentos não balanceados depende da posição dos pontos de quebra. Se os segmentos não balanceados são grandes, o feto será, provavelmente, abortado espontaneamente; um não balanceamento menor pode resultar em um bebê que nasça vivo com anomalias.
- Um portador de translocação robertsoniana balanceada pode produzir gametas que, após a fertilização, dão origem a uma criança inteiramente normal, a um portador fenotipicamente normal balanceado ou a um conceito com trissomia ou monossomia completas para um dos cromossomos envolvidos (Figura 2.25).
- Um portador de inversão pericêntrica pode produzir prole com segmentos cromossômicos duplicados ou deletados. Isso porque, quando os homólogos invertidos e não invertidos pareiam durante a meiose, eles formam uma alça para possibilitar que os segmentos correspondentes pareiem ao longo de todo o seu comprimento (Figura 2.26A). Se a recombinação ocorre dentro dessa alça, a consequência é uma deleção não balanceada e uma duplicação. Inversões paracêntricas formam alças similares, mas qualquer recombinação dentro da alça gera um cromossomo acêntrico ou dicêntrico (Figura 2.26B), os quais, provavelmente, não se mantêm.

### Origem parental incorreta dos cromossomos pode resultar em desenvolvimento anormal e doenças

Certas anomalias raras demonstram que não é suficiente ter o número e a estrutura corretos dos cromossomos: eles também devem possuir origem parental correta. Raros conceitos 46,XX nos quais o genoma haploide completo se origina do mesmo pai (**diploide uniparental**) nunca se desenvolvem corretamente, e diploides uniparentais experimen-



**Figura 2.25** Possíveis resultados da meiose em um portador de uma translocação robertsoniana. Os portadores são assintomáticos, mas, muitas vezes, produzem gametas desbalanceados que podem resultar em zigotos monossômicos ou trissômicos. Acredita-se que os dois zigotos monossômicos e o zigoto com trissomiado 14 neste exemplo, não sobreviveriam até o final da gestação.

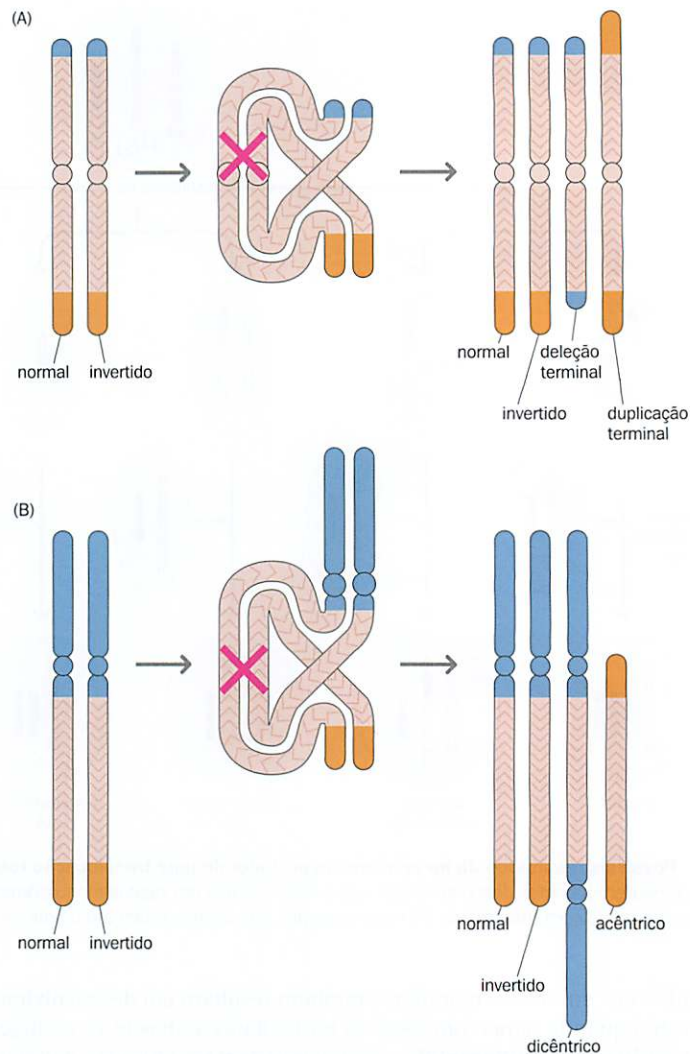
talmente induzidos em outros mamíferos também resultam em desenvolvimento anormal. Até mesmo quando para cromossomos particulares ambos os homólogos derivam do mesmo pai (**dissomia uniparental**), anomalias podem ser causadas. A origem parental dos cromossomos é importante porque alguns genes são diferencialmente expressos de acordo com o pai do qual se originam; tais genes estão sujeitos a **imprinting**.

A diploidia uniparental em humanos surge mais por fertilização de um ovócito secundário defeituoso, o qual não possui cromossomos, por um espermatozoide (o qual tenha sido produzido, por acaso, com o dobro dos cromossomos) ou pela ativação de um ovócito secundário não fecundado (partenogênese), resultando em cada caso um cariótipo 46,XX. Os conceitos resultantes desenvolvem-se normalmente.

O desenvolvimento normal de humanos e mamíferos envolve a produção tanto de um embrião que se desenvolva em feto como de membranas extraembrionárias, incluindo o trofoblasto, que auxilia no desenvolvimento e dá origem à placenta. A diploidia uniparental muda o importante equilíbrio entre o embrião ou feto e as membranas que os sustentam. A diploidia uniparental paterna produz gravidez molar, conceitos anormais que desenvolvem hiperplasia generalizada (crescimento excessivo) do trofoblasto, mas sem partes fetais; eles têm uma chance significativa de se transformarem em coriocarcinoma. A diploidia uniparental materna resulta em teratoma do ovário, tumores ovarianos raros que consistem em tecidos embrionários desorganizados desprovidos das membranas extraembrionárias.

Acredita-se que a dissomia uniparental surja, na maioria dos casos, por um mecanismo de resgate trissômico. Em tais casos, um conceito trissômico, que, de outra maneira, provavelmente morreria antes do nascimento, dá origem a um embrião 46,XX ou 46,XY por perda de cromossomos. A perda de cromossomos ocorre por meio de divisões mitóticas defeituosas logo no início do desenvolvimento em uma célula que possui a capacidade de dar origem a todos os diferentes tipos celulares do organismo (uma célula **totipotente**). A descendência desta célula é euploide e forma o embrião, e todas as células aneuploides morrem. Se cada uma das três cópias de um cromossomo trissômico possui uma chance

**Figura 2.26 Possíveis resultados da meiose em portadores de inversão.** Durante a meiose em portadores de uma inversão cromossômica, o pareamento dos homólogos requer a formação de uma alça na região invertida. A figura mostra os quatro produtos meióticos possíveis após uma única permuta (cruz vermelha) ocorrendo na alça com inversões (A) pericêntrica e (B) paracêntrica. Além dos cromossomos com inversão e dos cromossomos normais não recombinantes, os cromossomos recombinantes sofrem duplicação terminal e deleção nas inversões pericêntricas ou dicêntricos e acêntricos nas inversões paracêntricas.



igual de ser perdida, existe uma chance de dois terços de uma única perda cromossômica resultar em uma constituição cromossômica normal e uma chance de um terço de resultar em dissomia uniparental (seja paterna ou materna).

A dissomia uniparental pode, frequentemente, não ser diagnosticada devido ao fato de que não há efeitos fenotípicos óbvios, ela só é detectada quando resulta em síndromes características. Em tais casos, o cromossomo envolvido contém genes sob *imprinting* que são erroneamente expressos. A dissomia uniparental pode envolver heterodissomia (um pai colabora com homólogos não idênticos, mais provavelmente por resgate trissômico). Algumas vezes, no entanto, as duas cópias cromossômicas herdadas de um pai são idênticas (isodissomia). Isso pode acontecer por resgate de monossomia quando um embrião monossômico que, de outra forma, morreria alcança a euploidia por duplicação seletiva do cromossomo monossômico.

## CONCLUSÃO

Neste capítulo foram descritos os aspectos fundamentais da estrutura e da função cromossômica com ênfase em cromossomos humanos e na produção de anomalias cromossômicas em humanos. Existem grandes similaridades na forma como os cromossomos eucarióticos são estruturados, especialmente na maneira como o DNA é complexado com histonas e organizado em estruturas de ordem maior.

No entanto, existem, também, diferenças importantes. Durante a evolução eucariótica, os centrômeros se tornaram progressivamente maiores e mais complexos e, em eucariotos mais complexos, eles são dominados por sequências repetitivas de DNA que evoluem rapi-

damente. Os cromossomos sexuais de mamíferos possuem características únicas, que serão vistas em detalhes no Capítulo 10, quando será abordada a evolução cromossômica. A inativação-X especializada que ocorre em mamíferos e os sistemas de *imprinting* também serão mais detalhadamente explorados no contexto da expressão gênica, no Capítulo 11, assim como a relação entre a estrutura da cromatina e a expressão gênica.

Serão fornecidos também diversos exemplos ilustrativos de como as anomalias cromossômicas causam doenças hereditárias e câncer nos Capítulos 16 e 17, os quais também contêm descrições mais completas de algumas das tecnologias utilizadas para analisar cromossomos, tais como o ensaio CGH.

## LEITURAS ADICIONAIS

### Estrutura e função cromossômicas

- Belmont AS (2006) Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 632–638.
- Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661–673.
- Courbet S, Gay S, Arnoult N et al. (2008) Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455, 557–560.
- Haering CH, Farcas AM, Arumugam P et al. (2008) The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454, 297–301.
- Herrick J & Bensimon A (2008) Global regulation of genome duplication in eukaryotes: an overview from the epifluorescence microscope. *Chromosoma* 117, 243–260.
- Louis EJ & Vershinin AV (2005) Chromosome ends: different sequences may provide conserved functions. *BioEssays* 27, 685–697.
- Meaburn KJ & Misteli T (2007) Chromosome territories. *Nature* 445, 379–381.
- Riethman H (2008) Human telomere structure and biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 1–19.
- Vagnarelli P, Ribeiro SA & Earnshaw WC (2008) Centromeres: old tales and new tools. *FEBS Lett.* 582, 1950–1959.

### Análises de cromossomos humanos e anomalias cromossômicas

- Gardner RJM & Sutherland GR (2003) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling, 3rd ed. Oxford University Press.
- McNeil N & Ried T (2000) New molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Med.* 14, 1–14.

- Padilla-Nash H, Barenboim-Stapleton L, Difilippantonio MJ & Ried T (2006) Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes. *Nat. Protoc.* 1, 3129–3142.
- Rooney DE (2001) (ed.) Human Cytogenetics: Constitutional Analysis, 3rd ed. Oxford University Press.
- Rooney DE (2001) (ed.) Human Cytogenetics: Malignancy and Acquired Abnormalities, 3rd ed. Oxford University Press.
- Schinzel A (2001) Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. Walter de Gruyter.
- Shaffer LG & Bejani BA (2006) Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet. Genome Res.* 115, 303–309.
- Therman E & Susman M (1992) Human Chromosomes: Structure, Behavior and Effects, 3rd ed. Springer.
- Trask BJ (2002) Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat. Rev. Genet.* 3, 769–778.

### Nomenclaturas citogenéticas humanas

- Shaffer LG & Tommerup N (eds) (2005) ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger.

### Informações citogenéticas na Web

- Compilações úteis estão disponíveis em alguns sites, como [www.kumc.edu/gec/prof/cytogene.html](http://www.kumc.edu/gec/prof/cytogene.html)