



UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

85 ANOS
1934 · 2019



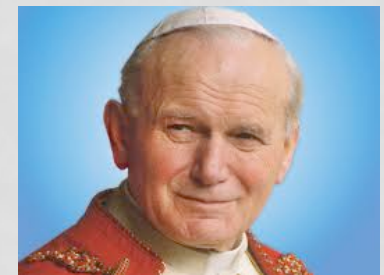
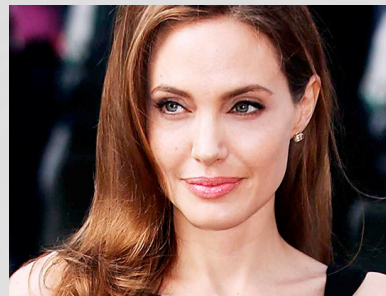
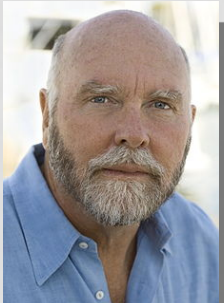
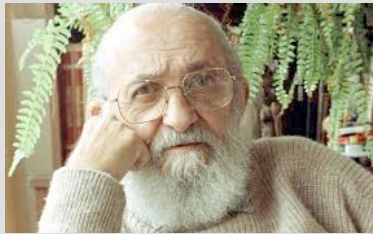
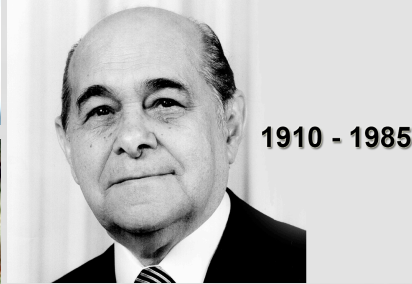
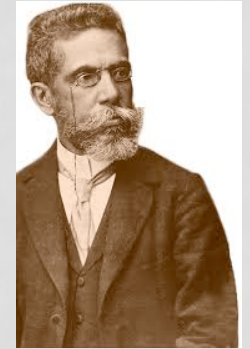
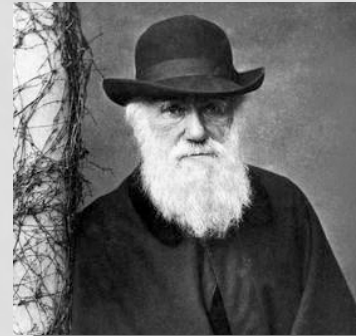
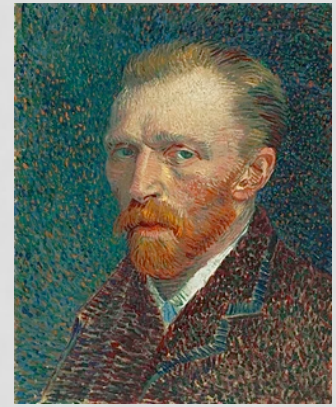
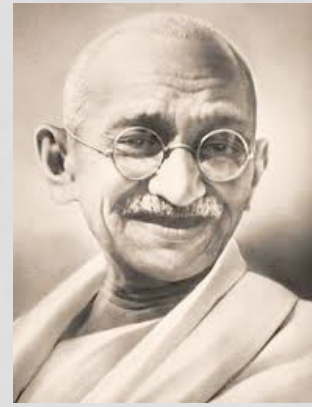
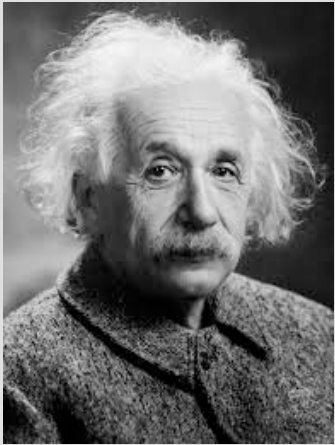
Departamento de Genética
USP Ribeirão Preto-FMRP

T5 - MUTAÇÃO: ORIGEM E VARIABILIDADE GENÉTICA

APARECIDA MARIA FONTES

P
A
R
T
E 1

12 de Setembro de 2019



POR QUE ESTUDAR MUTAÇÃO?

- **Processo absolutamente fundamental na biologia**
- **Fonte de variabilidade genética e em organismos mais complexos responsável por doenças genéticas**
- **Em humanos é responsável pelas variações entre indivíduos (variação polimórfica)**
- **O sequenciamento do genoma humano mostrou-nos o pouco que conhecemos sobre a diversidade genética entre indivíduos, entre populações e entre espécies**
- **A nível populacional é essencial para interpretar padrões de prevalência/incidência observada para doenças genéticas**

Genoma Humano

46 cromossomos, 22 pares cromossomos autossômicos e 1 par de cromossomos sexuais

Genoma haplóide: 3×10^9 bp de DNA

Exoma: 1-2% do genoma humano, o que corresponde a ~35 Mb

Cada célula humana: 2 m DNA, equivalente a 6×10^9 bp DNA

Cariótipo Humano Normal (bandeamento G)



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



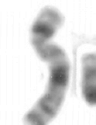
20



21



22



X/Y

Variantes Genômicas no Genoma Humano individual

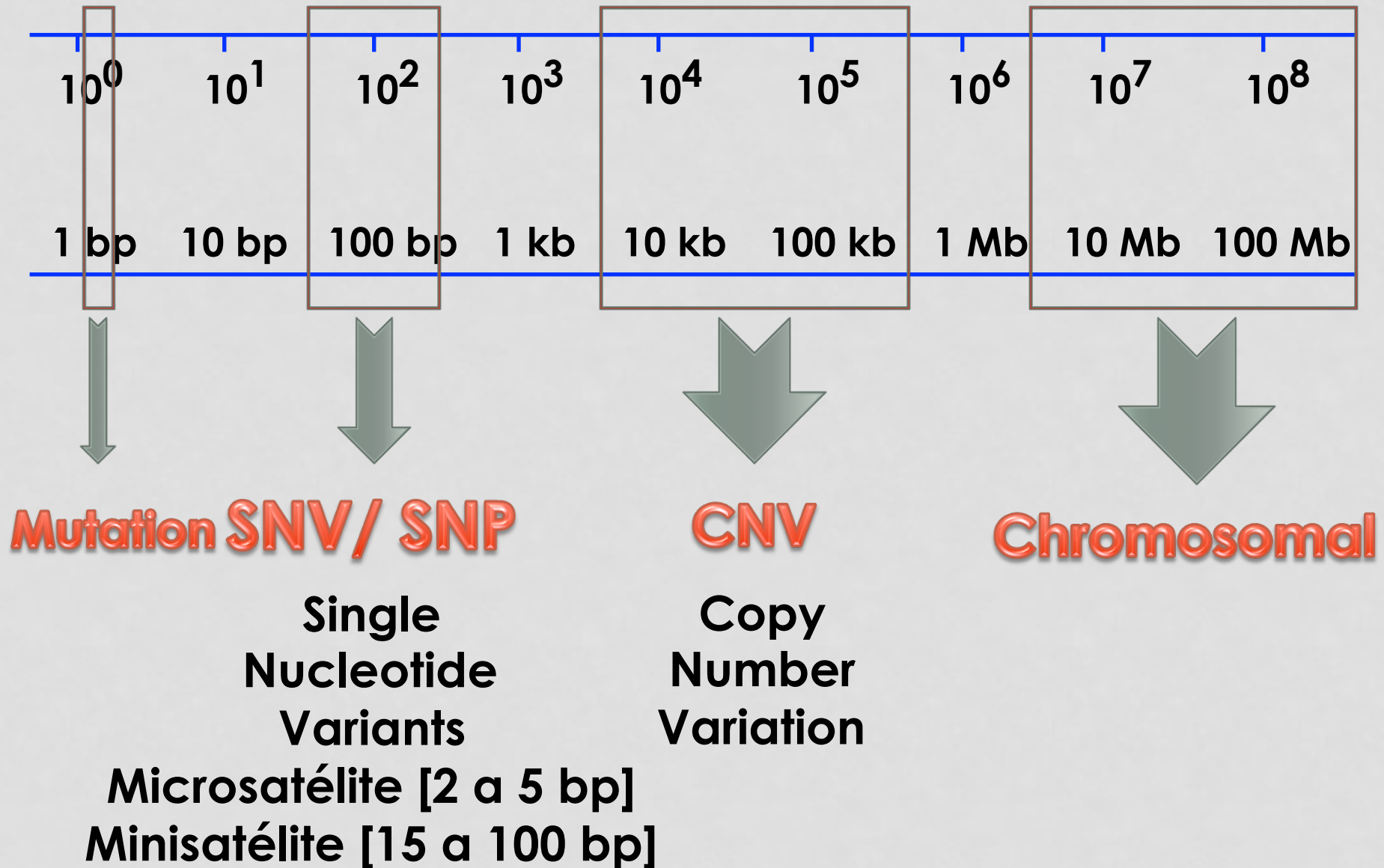
4 a 5 x 10⁶ variantes

Destes 20.000 variantes estão no exoma (inclui 400 variantes raras potencialmente patogênicas)

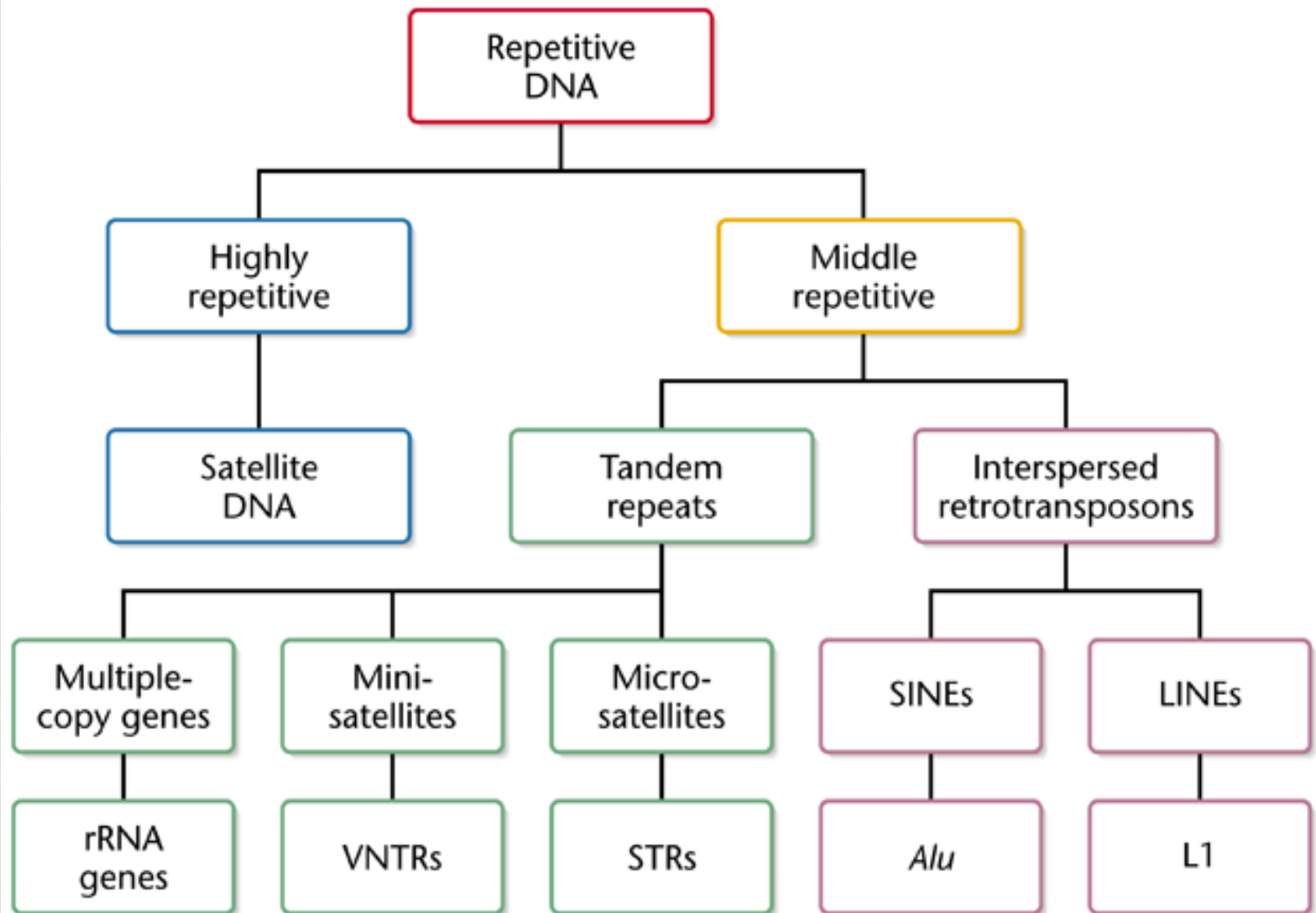
99% das variantes incluem SNPs e curtos *indels*

2.100 a 2.500 variantes estruturais (CNV, Alu (SINE), inserções L1 (LINE), STR (microsatélite) e VNTRs (minisatélite) afetando 20 x 10⁶ bp.

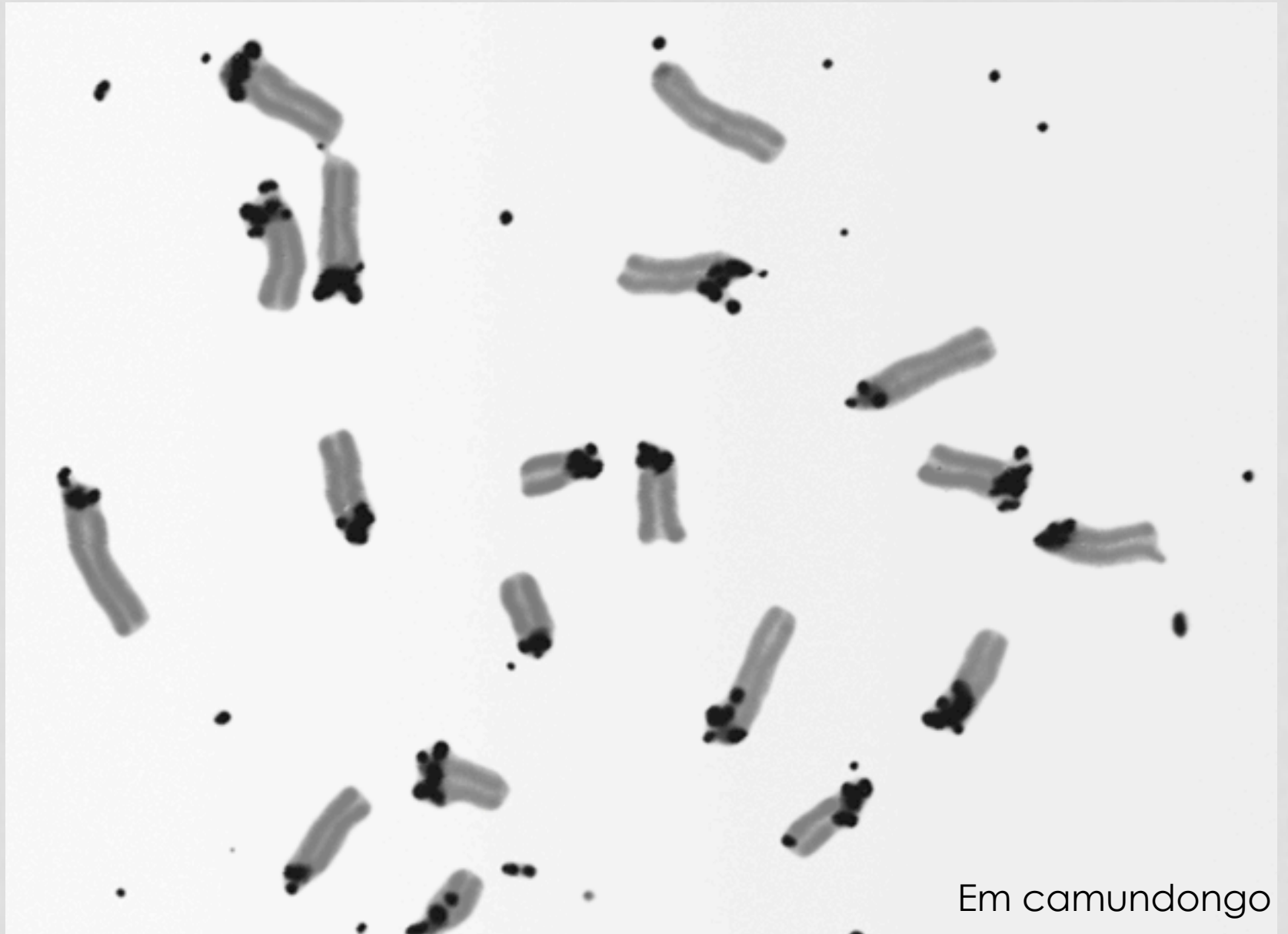
Variação Genômica



CATEGORIAS DE DNA REPETITIVO



Região centrômero: rico em DNA satélite



Em camundongo

MUTAÇÃO: CONCEITOS ASSOCIADOS



DEFINIÇÕES

O que é Mutação?

- ❑ Uma alteração na sequência genômica que provoca alteração fenotípica da sequência “normal” ou “selvagem”.

O que é o polimorfismo?

- ❑ A existência de múltiplas formas de um gene. Em genética de populações, esse termo refere-se quando o alelo mais comum tem uma frequência $< 99\%$ em um *locus* na população.

DEFINIÇÕES

O que é Variante?




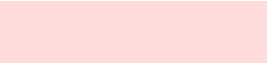



- ❑ Uma mutação que não produz uma alteração fenotípica.

conceito adotado até 2015

- ❑ **Em 2015**, a ACMG (American College Medical Genetics and Genomics) recomendou o uso do termo **variante** ao invés de *mutação* ou *polimorfismo*.

A PARTIR DE 2015: CLASSIFICAÇÃO DAS VARIANTES

- Variantes devem ser classificadas em:
 - Patogênica
 - Provavelmente patogênica (>90% de ser causal)
 - Variante de Significado Incerto
 - Provavelmente benigna (>90% de ser benigna)
 - Benigna
- Critérios para definição em categorias de evidências:

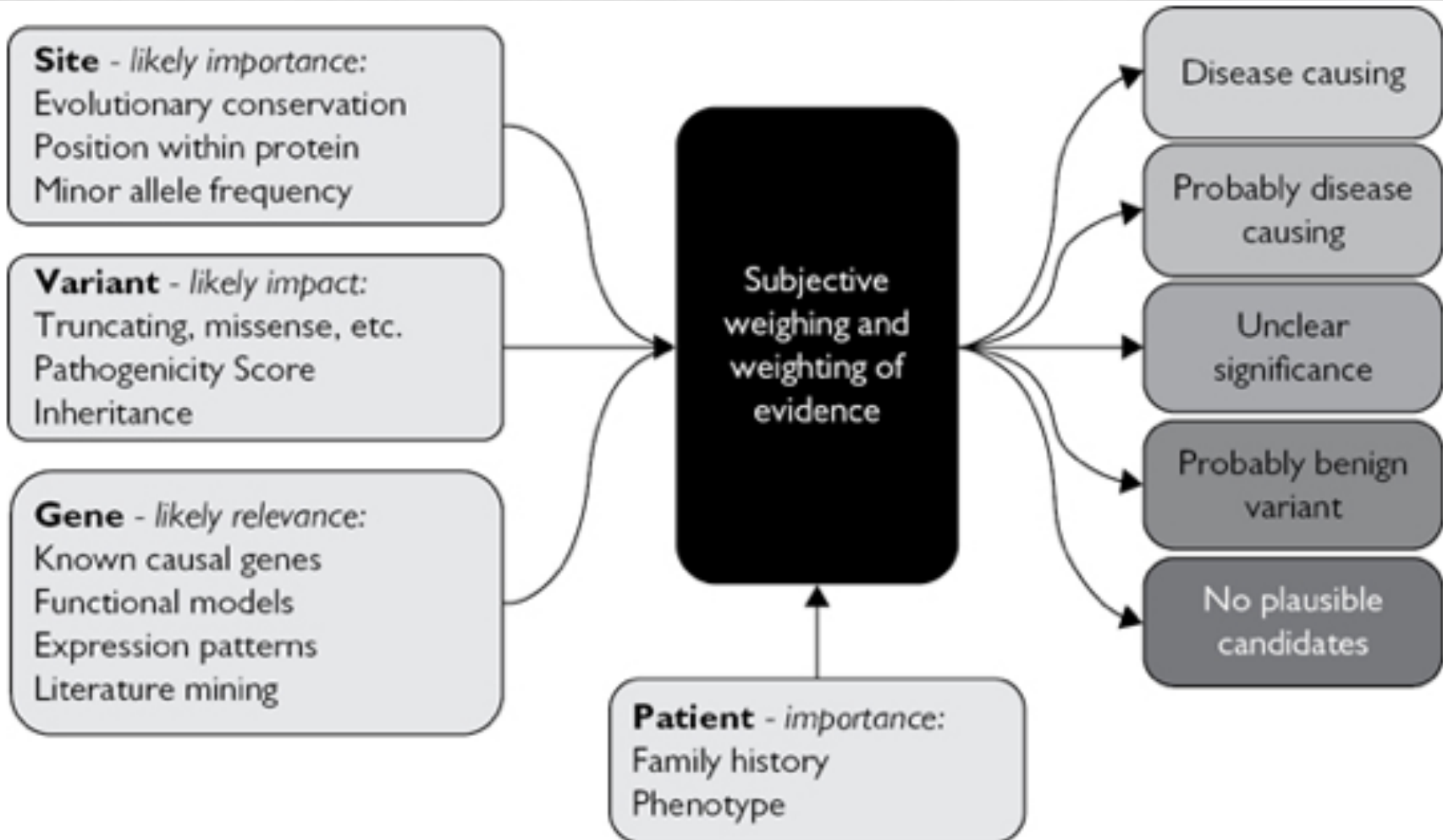
	Muito forte	Forte	Moderada	Suporte
Patogenicidade				
Benignidade				

Como definir se uma mudança na sequência de DNA é uma variante patogênica ou uma variante benigna?

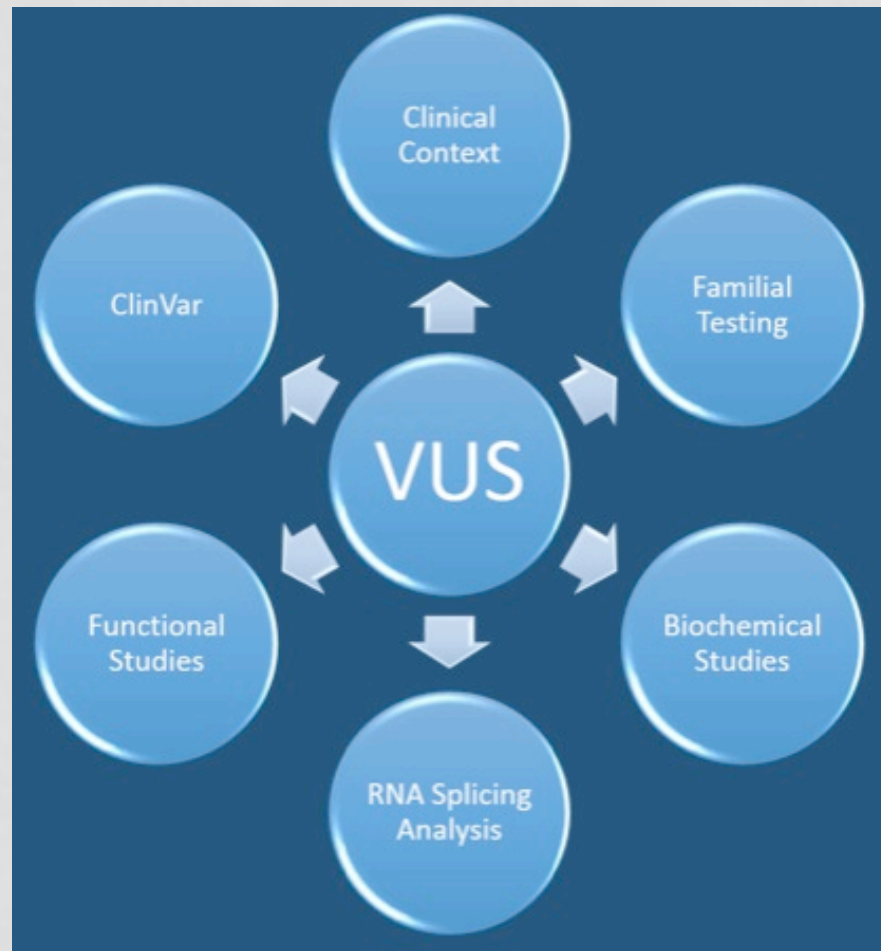
1. A mudança é na região codificadora?
2. A mudança é no sítio de *splicing*?
3. A mudança é na região intrônica?
4. A mudança é na região promotora?

Obrigatoriamente, mutação na região codificadora é uma variante patogênica?

Fatores que devem ser considerados para avaliar se uma sequência variante causa uma doença



Como definir se uma mudança na sequência de DNA é variante patogênica ou variante benigna?



COMO CLASSIFICAR AS MUTAÇÕES?

As mutações podem ser classificadas com base na mudança estrutural que ocorre no gene

MUTAÇÕES HEREDITÁRIAS: qual seu papel?

Fonte de
Variabilidade
Genética

Matéria-
prima da
Evolução

Efeitos
Prejudiciais

Causa de
muitas
doenças
genéticas e
distúrbios

Efeitos
Protetores

Efeitos
protetores
contra
doenças

CLASSIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS MUTAÇÕES

Mutações
de Ponto

Uma única
substituição de
nucleotídeo

INDELS:
Deleções e
Inserções

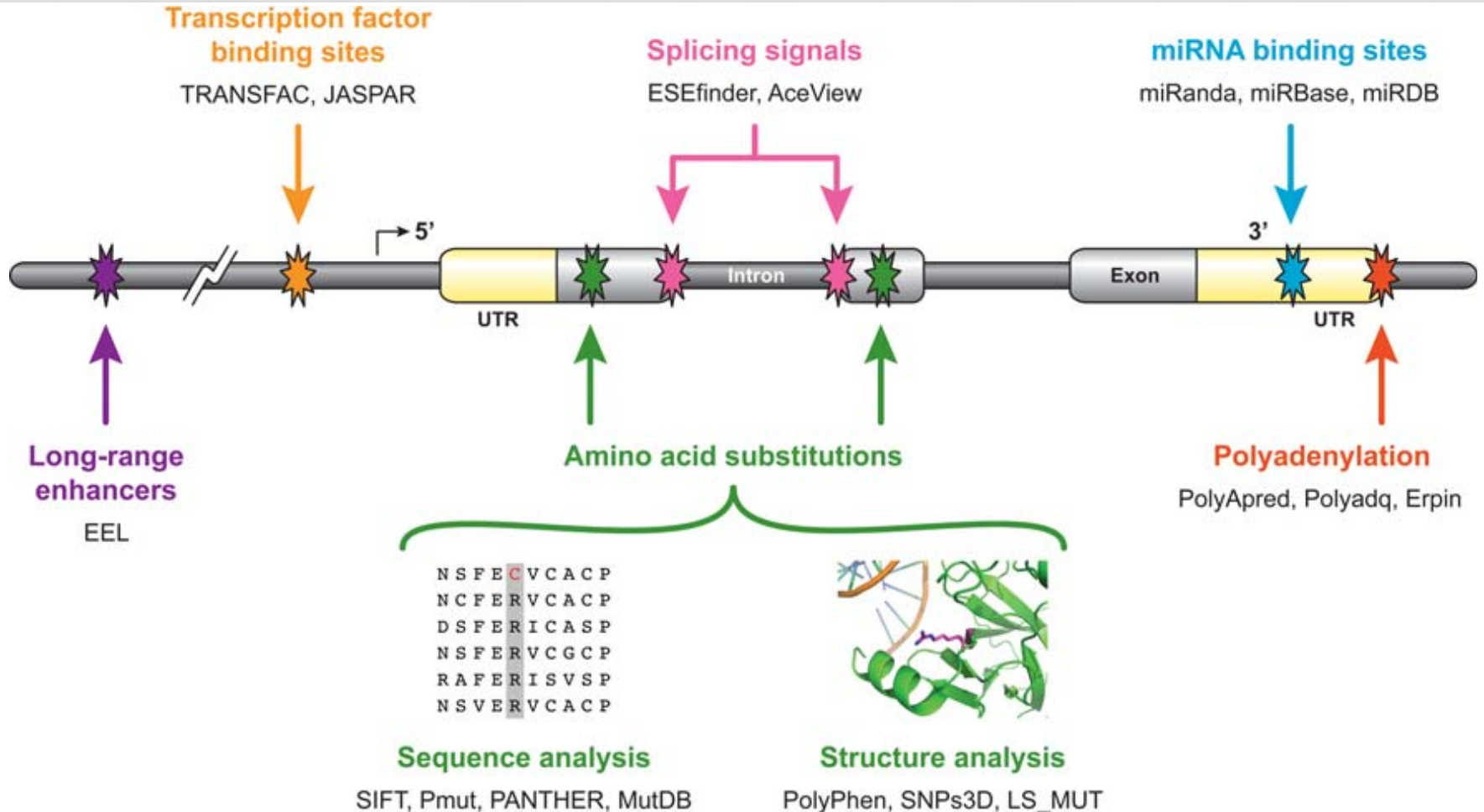
Inserção ou
deleção nas
sequências de
DNA

Repetições
expandidas de
trinucleotídeos

Amplificação de
uma sequência
de repetição de
nucleotídeos
simples

VARIANTES TIPO SNPS
PATOGENCIAS

Regiões gênicas sujeitas a substituições de nucleotídeos



MUTAÇÕES DE PONTO

✧ 1. Transição:

Uma purina é substituída por outra purina (A-G) ou uma pirimidina por outra pirimidina (T-C)

✧ 2. Transversão

Uma purina é substituída por uma pirimidina ou vice-versa

✧ 3. Silenciosa ou sinônima:

Não altera o aminoácido que é incorporado na proteína por conta do código genético degenerado

✧ 4. Mutação de sentido trocado, ou missense ou não sinônima

Alteração de base que se traduz em uma alteração de aminoácido

MUTAÇÕES DE PONTO

✧ 5. Mutação neutra:

Uma mutação de base que resulta em uma mudança de um aminoácido hidrofílico pequeno por outro em uma região inativa da proteína e é improvável que tenha impacto.

✧ 6. Mutação sem sentido ou nonsense:

Uma mutação de base que resulta em códon de parada: UAA, UAG ou UGA

✧ 7. Mutação regulatória:

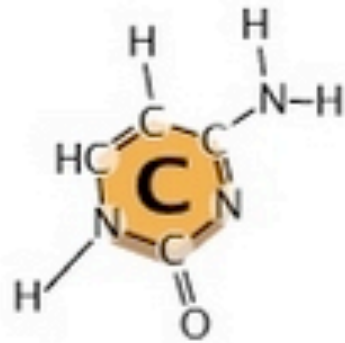
Mutação na região promotora do gene

✧ 8. Mutação de alteração de quadro de leitura ou *frameshift*:

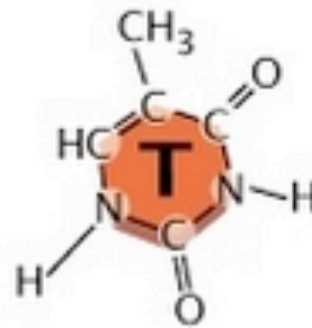
Uma mutação de base que altera o quadro de leitura e será alterado para o restante do gene

TRANSIÇÃO OU TRANSVERSÃO

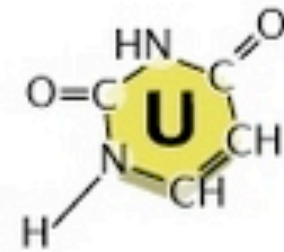
Pyrimidines



Cytosine

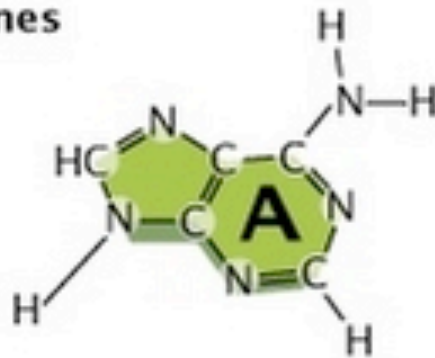


Thymine

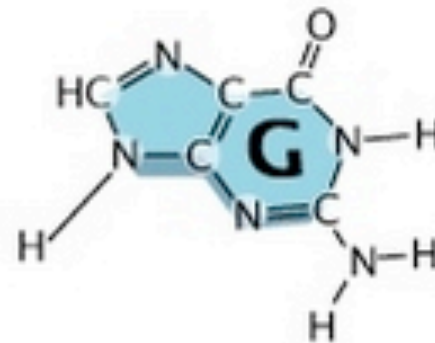


Uracil

Purines



Adenine



Guanine

CÓDIGO GENÉTICO

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
U	First nucleotide	UUU	UCU	UAU	UGU	U	Third nucleotide
		UUC	UCC	UAC	UGC		
		UUA	UCA	UAA STOP	UGA STOP		
		UUG	UCG	UAG STOP	UGG		
C	CUU	CCU	CAU	CGU	U	U	
	CUC	CCC	CAC	CGC	C	C	
	CUA	CCA	CAA	CGA	A	A	
	CUG	CCG	CAG	CGG	G	G	
A	AUU	ACU	AAU	AGU	U	U	
	AUC	ACC	AAC	AGC	C	C	
	AUA	ACA	AAA	AGA	A	A	
	AUG	ACG	AAG	AGG	G	G	
G	GUU	GCU	GAU	GGU	U	U	
	GUC	GCC	GAC	GGC	C	C	
	GUA	GCA	GAA	GGA	A	A	
	GUG	GCG	GAG	GGG	G	G	

Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?



Sequence for Wild-Type Hemoglobin

ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr

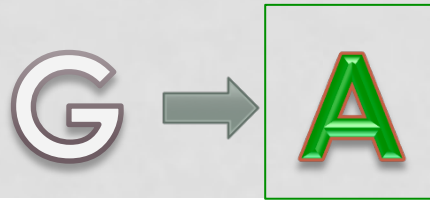


ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAA	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro		Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr

CÓDIGO GENÉTICO

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
U	First nucleotide	UUU	UCU	UAU	UGU	Third nucleotide	U
		UUC	UCC	UAC	UGC		C
		UUA	UCA	UAA STOP	UGA STOP		A
		UUG	UCG	UAG STOP	UGG		G
C	CUU	CCU	CAU	CGU	U		
	CUC	CCC	CAC	CGC	C		
	CUA	CCA	CAA	CGA	A		
	CUG	CCG	CAG	CGG	G		
A	AUU	ACU	AAU	AGU	U		
	AUC	ACC	AAC	AGC	C		
	AUA	ACA	AAA	AGA	A		
	AUG	ACG	AAG	AGG	G		
G	GUU	GCU	GAU	GGU	U		
	GUC	GCC	GAC	GGC	C		
	GUA	GCA	GAA	GGA	A		
	GUG	GCG	GAG	GGG	G		

Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?



Sequence for Wild-Type Hemoglobin

ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr



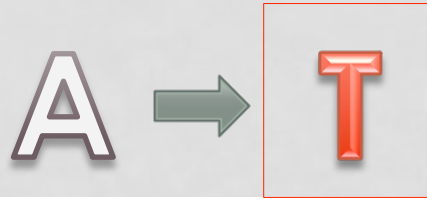
ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAA	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro	GLU	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr



Transição, Silenciosa ou Sinônima e Benigna

QUAL O GENÓTIPO

Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?



Sequence for Wild-Type Hemoglobin

ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr

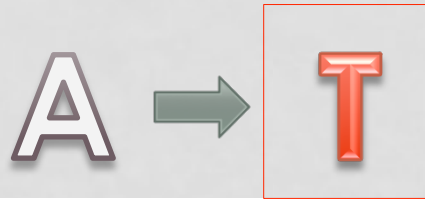


ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro		Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr

CÓDIGO GENÉTICO

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
U	First nucleotide	UUU	UCU	UAU	UGU	Third nucleotide	U
		UUC	UCC	UAC	UGC		C
		UUA	UCA	UAA STOP	UGA STOP		A
		UUG	UCG	UAG STOP	UGG		G
C	CUU	CCU	CAU	CGU	U		
	CUC	CCC	CAC	CGC	C		
	CUA	CCA	CAA	CGA	A		
	CUG	CCG	CAG	CGG	G		
A	AUU	ACU	AAU	AGU	U		
	AUC	ACC	AAC	AGC	C		
	AUA	ACA	AAA	AGA	A		
	AUG	ACG	AAG	AGG	G		
G	GUU	GCU	GAU	GGU	U		
	GUC	GCC	GAC	GGC	C		
	GUA	GCA	GAA	GGA	A		
	GUG	GCG	GAG	GGG	G		

Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?



Sequence for Wild-Type Hemoglobin

ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr



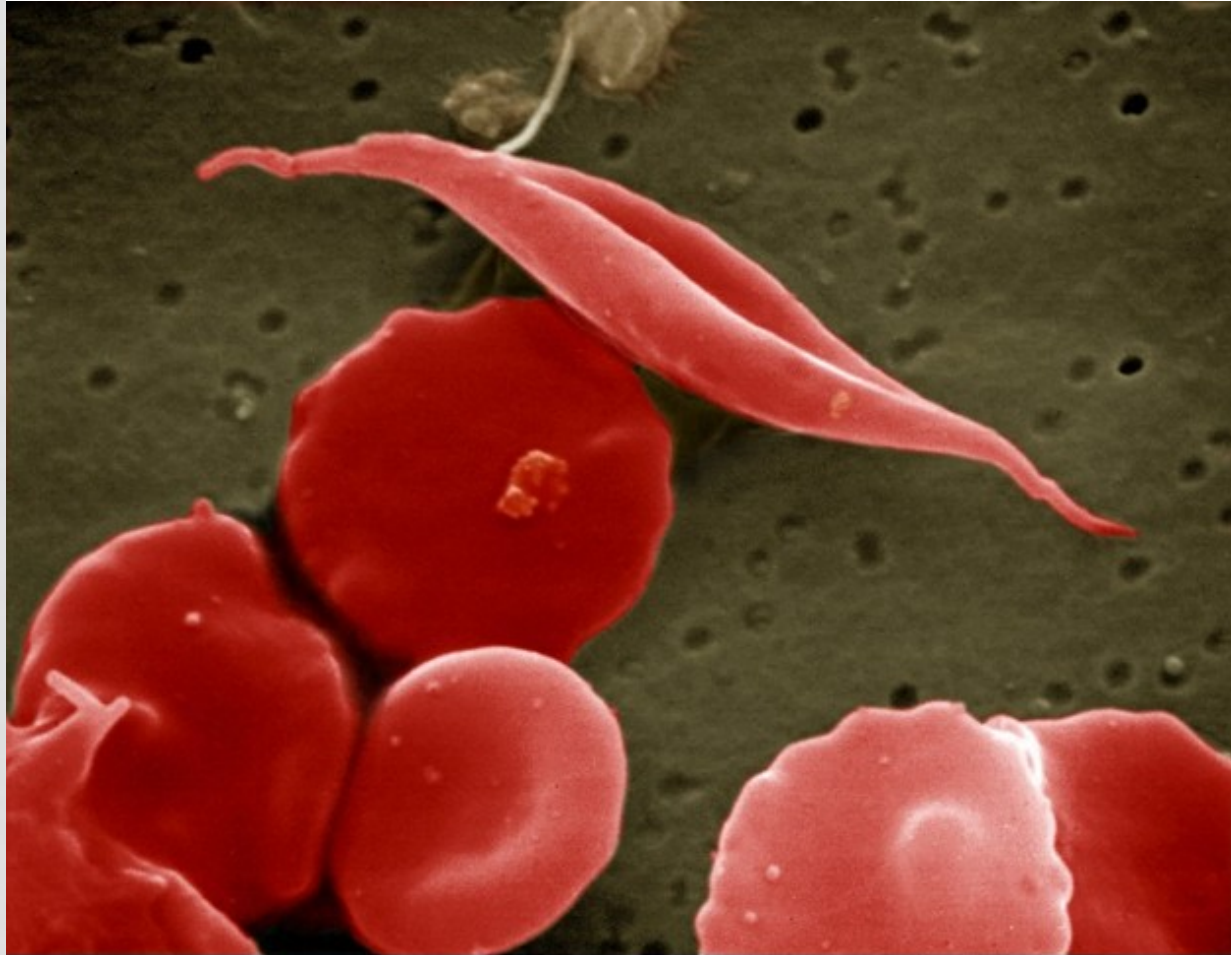
ATG	GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT	GCC	GTT	ACT
Start	Val	His	Leu	Thr	Pro	VAL	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr



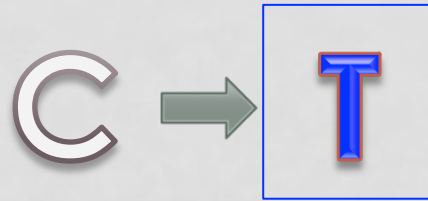
Transversão, missense ou de sentido trocado ou não sinônima e patogênica

QUAL O GENÓTIPO

Qual é o tipo de doença responsável por essa mutação ou variante?



Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?



	38	39	40
Normal β -globin allele	Thr	Gln	Arg
	A C C	C A G	A G G
β^0 -globin allele	Thr	STOP	
	A C C	U A G	A G G

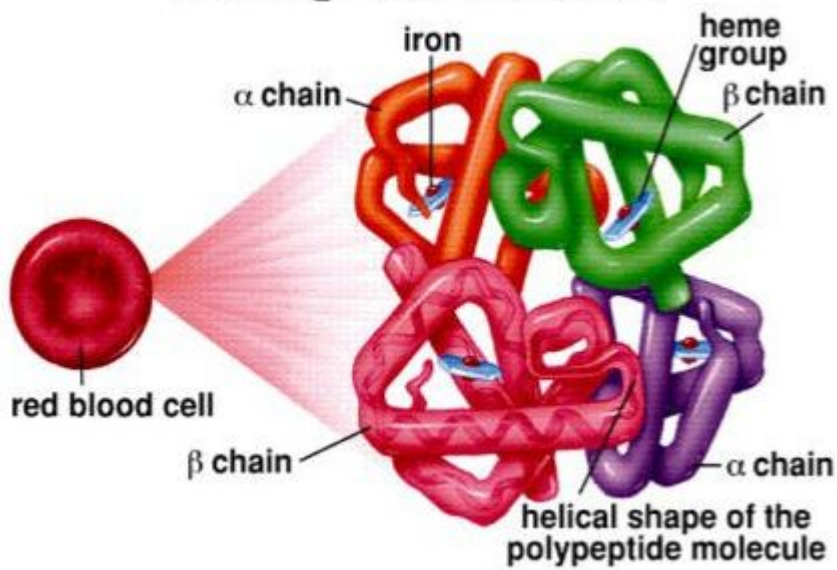


Transição, Nonsense e Patogênica

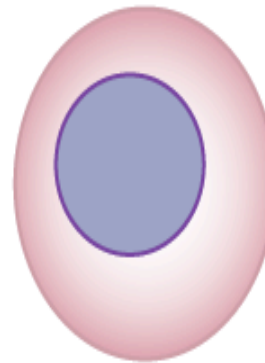
QUAL O GENÓTIPO

Qual é o tipo de doença responsável por essa mutação ou variante?

Hemoglobin Molecule

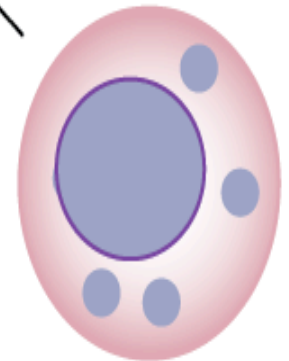


Erythroblast



β thalassemia

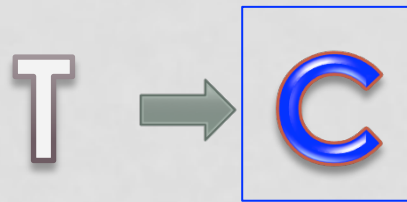
Excess α chains



Thalassemia	Chromosome	Genetic error
Alpha	16	Deletions
Beta	11	Mutations

α hemichromes

Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?



CODON	139		140		141		142		
m-RNAAAA	UAC	CGU	U	AA	GCU	GGA	
 lys tyr arg	...	<u>STOP</u>				<u>α globin</u>

↓

CODON	139		140		141		142		143		144		172		173
m-RNAAAA	UAC	CGU	C	AA	GCU	GGA	GAA	UAA						
 lys tyr arg	<u>gln</u> ala gly	glu	...	<u>STOP</u>					

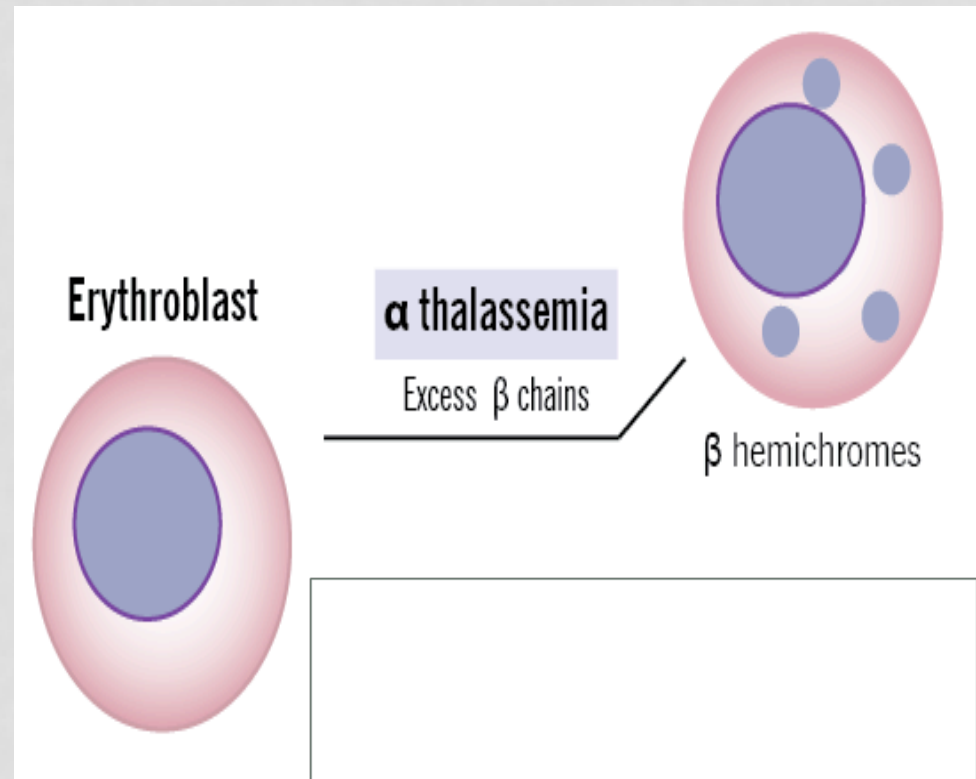
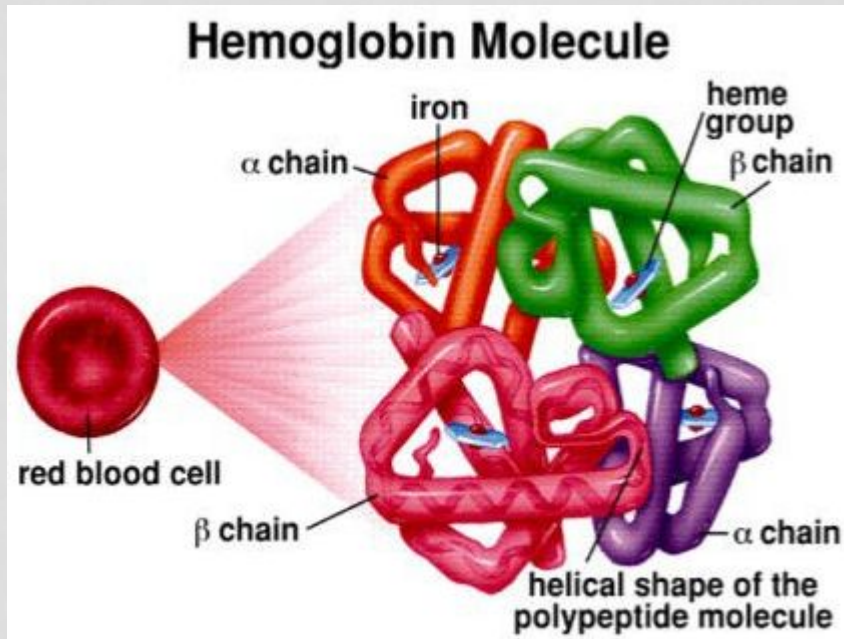
CODON	139		140		141		142		
m-RNAAAA	UAC	CGU	U	AA	GCU	GGA	



Transição, *Frameshift* e patogênica

QUAL O GENÓTIPO

Qual é o tipo de doença responsável por essa mutação ou variante?



INDELS

DELEÇÕES E INSERÇÕES

- ✧ **Deleção ou inserção de base única**
- ✧ **Pequenas deleções e inserções**
- ✧ **Grandes deleções e inserções**
- ✧ ***Crossing-over* desigual**
- ✧ **Retrotransposição**

DELEÇÕES E INSERÇÕES

Sequência de referência ...GGATTCTAGGTAAGTTCAGTCGA...
5 10 15 20

SNP

Alelo 1 ...GGATTCTAGGTAAGTTCAGTCGA...
Alelo 2 ...GGATTCTCAGGTAAGTTCAGTCGA...

Indel A

Alelo 1 ...GGATTCTAGGTAAGTTCAGTCGA...
Alelo 2 ...GGATTCTAGGTAAGTTCAGTCGA...

Indel B

Alelo 1 ...GGATTCTAGGTAAGTTCAGTCGA...
Alelo 2 ...GGATTCTAGGTAAGTTCAGTCGA...

Qual o principal tipo de mutação induzida pela inserção ou deleção de nucleotídeo único (tipo de *indel*)?

Frameshift ou mudança de matriz de leitura

Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?

ACAT



...AUG|CAG|GUG|ACC|UCA|GUG...

....met gln valthr ser val....

Normal protein

...AUG|CAG|GUG|ACA|UAC|CUC|AGU|G...

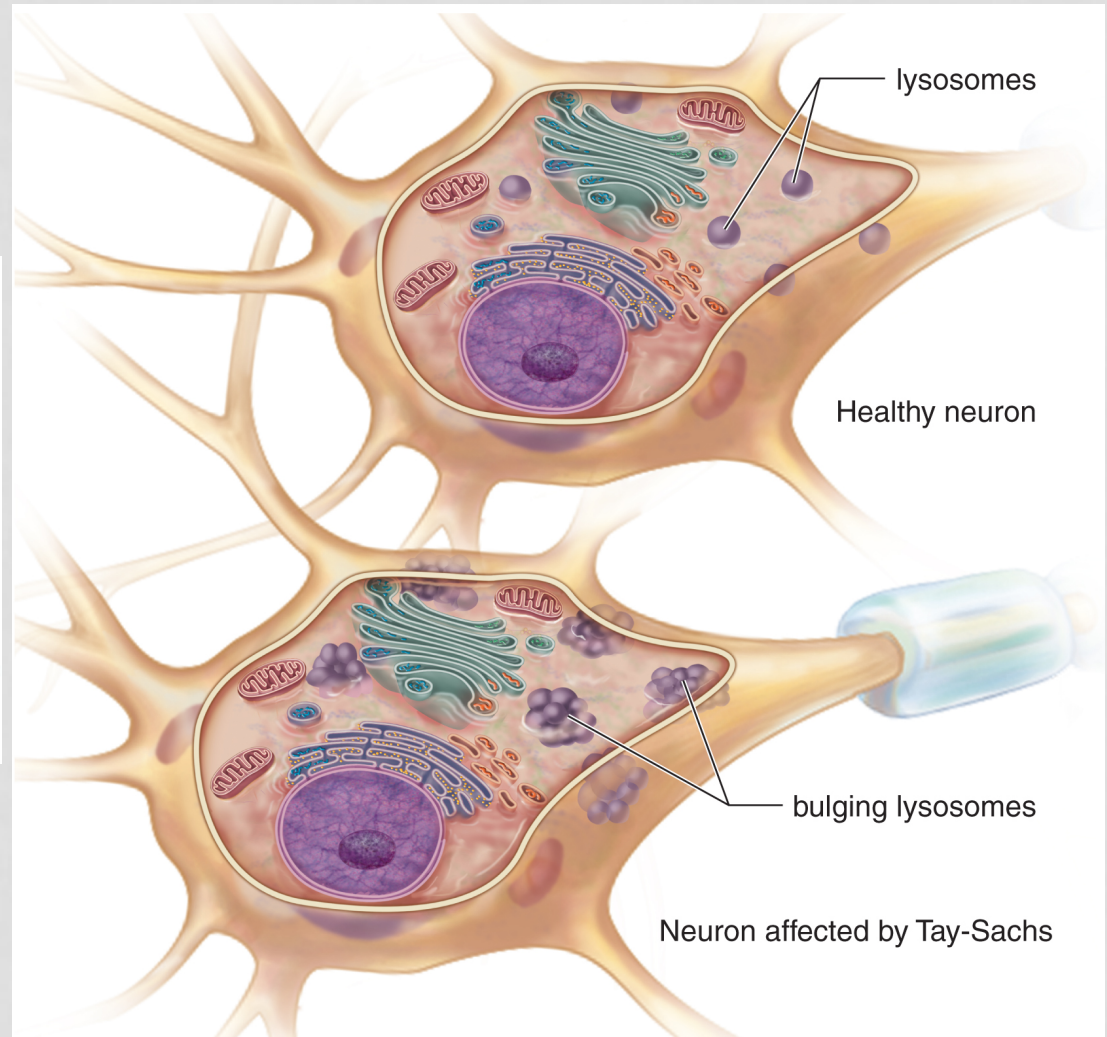
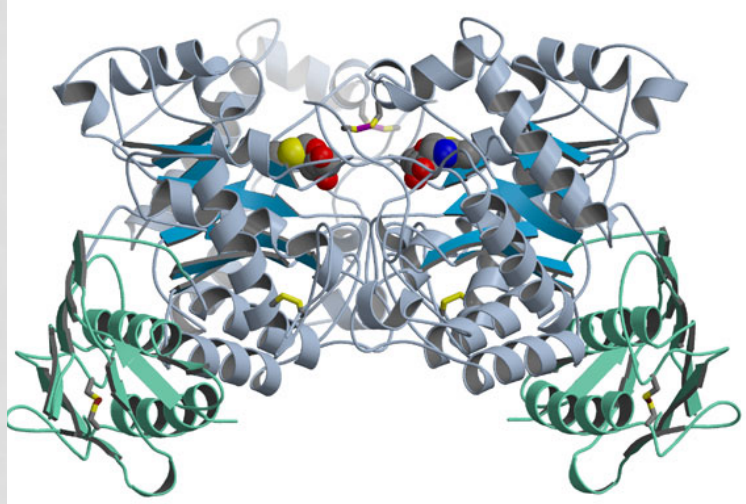
....met gln valthr tyrleu.... ser



Inserção, *frameshift* e patogênica

Qual é o tipo de doença responsável por essa mutação ou variante?

Beta-Hexosaminidase B



Como classificar o seguinte tipo de mutação ou variante?

Normal DNA ... T ATC ATC TTT GGT GTT ...
 - Ile - Ile - Phe - Gly - Val -

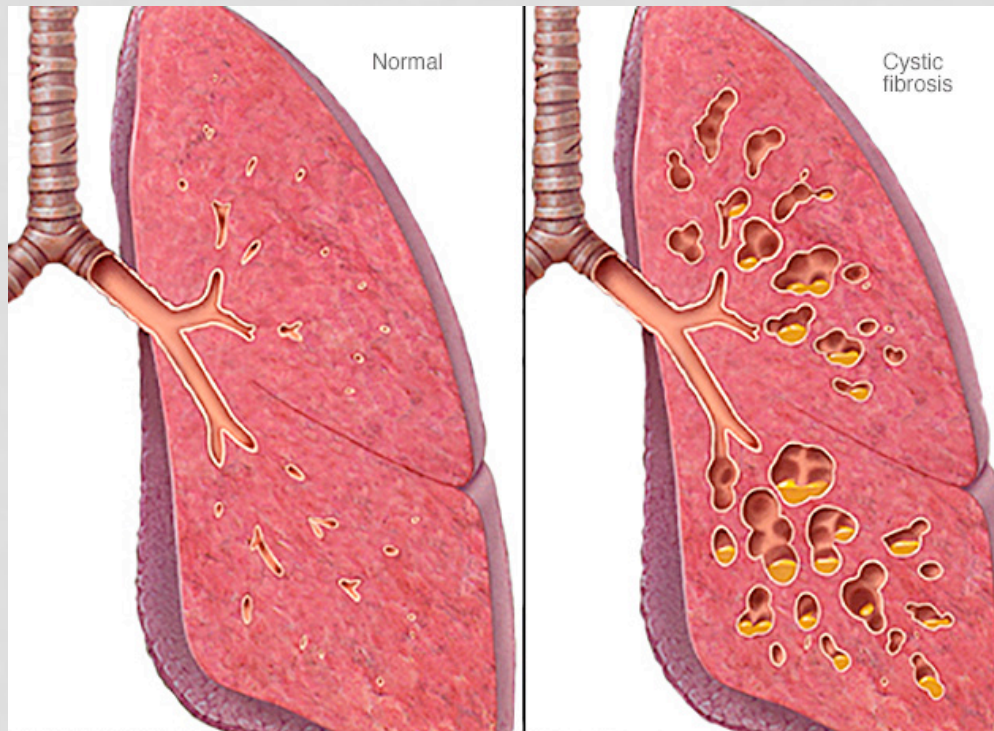
CF DNA ... T ATC AT- ^{ΔF508} ---T GGT GTT ...
 - Ile - Ile - Gly - Val -



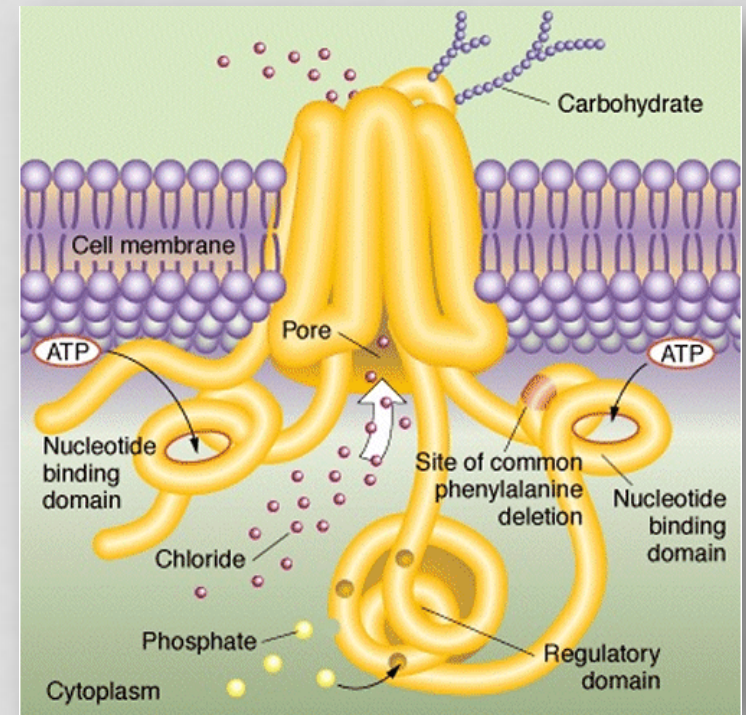
Deleção

Qual é o tipo de doença responsável por essa mutação?

Gene: CFTR (regulador de condutância transmembranaral)



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.



QUAL É A NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES

- ❑ Há um banco de dados onde encontram-se todos os polimorfismos do genoma humano.

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/

- ✧ Inicia com o código **rs** (SNP referência) + **identificador**.
 - Exemplo: **rs76763715**
 - Substituição de aminoácido: **p.N409S**

QUAL É A NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/

- A mudança no nucleotídeo pode ser escrita de diferentes formas:
 - **A/C** **T⇒G** **C>T** **432G>C** **T73C**
- Recomendações HGVS:
 - “**c.**” para sequência codificadora (**c.76A>T**)
 - “**g.**” para sequência genômica (**g.476A>T**)
 - “**m.**” para DNA mitocondrial (**m.8993T>C**)

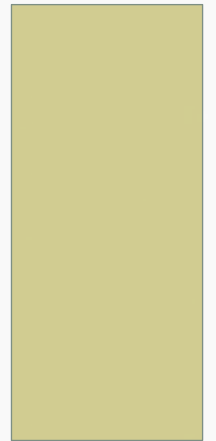
QUAL É A NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES

- “p.” para proteína: Ex. PPARg
 - **p.Pro12Ala**
 - **p.Gln410=**
 - **p.Pro12X**

- Deleções e inserções:
 - **pF508del** em uma proteína (p), deleção de fenilalanina (F) 508
 - **c.6232_6236del** – deleção de cinco nucleotídeos iniciando no nucleotídeo 6232 do cDNA
 - **g.409_410insC** - insere C entre os nucleotídeos 409 e 410 do DNA genômico

EXERCÍCIOS: DINÂMICA DE GRUPO

CORRIDA INTELLECTUAL ACADÊMICA



BIBLIOGRAFIA

- 1. Thompson e Thompson, 2016 – 8ª Edição: Nussbaum, McInnes e Willard - Genética Médica – Capítulo 4: Diversidade Genética Humana: Mutação e Polimorfismo**
- 2. Schaefer e Thompson Jr, 2015 – 1ª Edição: - Genética Médica – Uma Abordagem Integrada – Capítulo 7: Mutação**