

ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM CAMARÕES UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES

Volume II: Marcadores Microsatélites

Manual Prático



Patrícia Domingues de Freitas

São Carlos, São Paulo, agosto de 2005

Prefácio

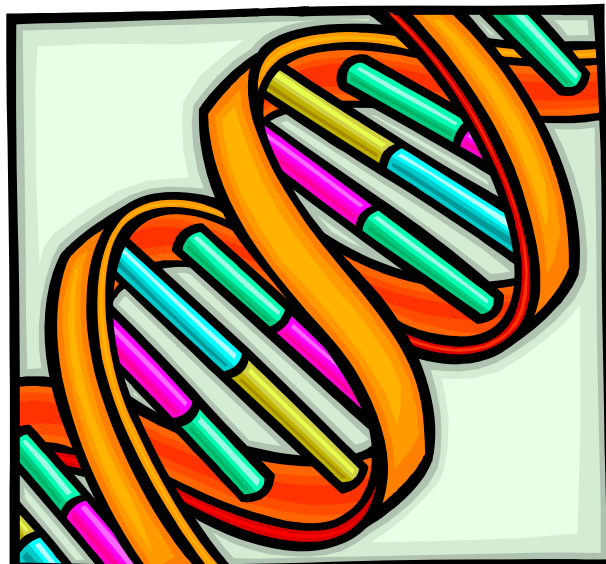
Neste volume, são abordados aspectos básicos relacionados à utilização de marcadores moleculares microssatélites em populações de camarões.

Questões envolvendo a identificação de SSRs (Seqüências Curtas Repetidas) e validação destes locos são ligeiramente discutidas. Metodologias alternativas, incluindo a utilização de kits de PCR e reações 'caseiras', são propostas para que o usuário possa adequar os experimentos às reais condições de seu laboratório.

Uma lista de referências para locos microssatélites em peneídeos, descritos na literatura, é sugerida para que, juntamente com as condições de ciclo e de reação propostas, diferentes possibilidades sejam testadas nos procedimentos experimentais.

Da mesma forma, as análises estatísticas mencionadas, não encontram-se direcionadas para um estudo específico, devendo o pesquisador, procurar se aprofundar, buscando as ferramentas mais adequadas para a abordagem de interesse.

CAPÍTULO I



Caracterizando os Locos de Microssatélites

1. Marcadores Microsatélites

Os marcadores microsatélites, também conhecidos como SSR (Short Sequence Repeats), diferem dos marcadores de RAPD, principalmente, por apresentarem um padrão de comportamento co-dominante, onde podemos observar a presença de no máximo duas bandas em um determinado indivíduo, correspondentes aos diferentes alelos do loco em estudo.

Muitos dos aspectos metodológicos discutidos para técnica de RAPD também são válidos para os marcadores microsatélites, uma vez que ambos se baseiam na reação em cadeia da polimerase (PCR). Entretanto, como mencionado anteriormente, seqüências de microsatélites apresentam comportamento co-dominante, ou seja, indivíduos homocigotos podem ser diferenciados de heterocigotos, diferentemente das marcas de RAPD, que são do tipo dominante ou multilocos.

Na técnica de RAPD um único *primer* de seqüência arbitrária é utilizado para delimitar a reação de PCR e amplificar regiões desconhecidas no genoma da espécie em estudo. Para se amplificar regiões repetitivas do tipo microsatélite, no entanto, é necessário utilizar um par de *primers* específicos que possuam homologia com uma região única no genoma e que flanqueie uma seqüência repetitiva que contenha no máximo seis pares de bases repetidos lado a lado (em 'tandem'), um determinado número de vezes, que pode variar, dependendo de cada indivíduo.

Enquanto o número de repetições em 'tandem' de uma seqüência microssatélite normalmente varia, as regiões que a flanqueiam podem ser únicas e conservadas no genoma de diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Desta forma, a seqüência repetitiva pode ser amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se um par de *primers* específicos (20 a 30 bases), complementares às seqüências que flanqueiam o microssatélite.

A grande limitação desta técnica consiste em obter a seqüência de *primers* que serão utilizados na reação de amplificação. Em geral, a identificação de seqüências microssatélites envolve o desenvolvimento de bibliotecas genômicas, enriquecidas ou não, com posterior clonagem e seqüenciamento dos fragmentos. Metodologias alternativas como a técnica PIMA (*PCR Isolation of Microsatellite Arrays*) e a análise de Datamining em ESTs também estão se mostrando eficientes para a caracterização de marcas SSRs no genoma de diversas espécies, incluindo os camarões peneídeos.

A presença de microssatélites em Seqüências Expressas Marcadas (ESTs), tem possibilitado o desenvolvimento de marcadores SSR de um modo simples e direto, através da busca eletrônica nos bancos de dados de ESTs.

As marcas SSR-EST apresentam um grande potencial de transferabilidade entre espécies relacionadas, uma vez que encontram-se associadas a

regiões transcritas do genoma, sendo, portanto, consideradas mais conservadas entre grupos próximos.

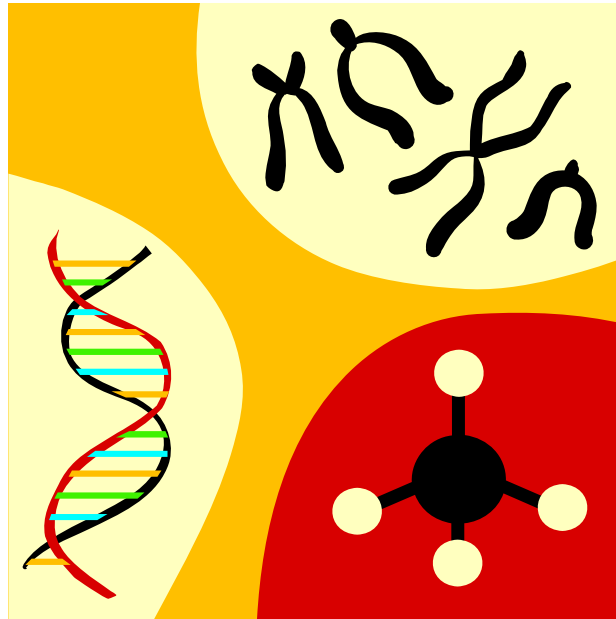
O aproveitamento desta importante fonte de marcadores, entretanto, é obviamente limitado para espécies que possuem bancos de dados disponíveis para análise. Em *Litopenaeus vannamei*, SSRs-ESTs estão sendo caracterizadas a partir de análises de Datamining realizadas nas seqüências ESTs depositadas no banco de dados do Projeto ShEST.

Apesar de haver vários procedimentos metodológicos para a identificação de seqüências microssatélites no genoma de uma espécie, estes estudos são relativamente recentes em camarões e ainda existem poucos locos caracterizados e validados para as diferentes espécies de peneídeos.

A seguir, é citada uma Lista de Referências contendo alguns locos microssatélites descritos na literatura para algumas das principais espécies de peneídeos. Estes locos já foram validados e testados em diferentes populações, tendo se mostrado eficientes para a análise de diversidade genética e estrutura de populações de camarões. Para que estes locos também possam ser utilizados com sucesso em outros estudos, envolvendo outras populações, adaptações nas condições experimentais em laboratório poderão ser feitas.

Referência Bibliográfica	Espécie
Ball et al., 1998	<i>Litopenaeus setiferus</i>
Borrel et al., 2004	<i>Litopenaeus schmitti</i>
Brooker et al., 2000	<i>Penaeus monodon</i>
Cruz et. al., 2002	<i>Litopenaeus vannamei</i>
Wolfus et al., 1997	<i>Litopenaeus vannamei</i>
Maggioni & Rogers, 2002	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>
Maggioni & Rogers, 2002	<i>Farfantepenaeus subtilis</i>
Moore et al., 1999	<i>Penaeus japonicus</i>
Bierne et L., 2000	<i>Litopenaeus stylirostris</i>

CAPÍTULO II



Amplificação de Locos Microsatélites

2. Amplificação de Locos Microsatélites

Para a validação de um loco microsatélite, algumas reações-padrão podem ser inicialmente testadas. A utilização de kits de amplificação que otimizem a reação de PCR pode ser uma alternativa bastante eficiente para amplificar locos SSRs. Um modelo de ciclo de reação padrão pode ser tomado como parâmetro inicial para amplificação de seqüências repetitivas. Em camarões este ciclo tem se mostrado bastante eficiente para amplificação de diferentes locos microsatélites em diferentes espécies, incluindo *L. vannamei*.

A seguir encontram-se descritas algumas sugestões para amplificação de locos microsatélites em camarões. Espera-se que nestas condições, padrões de amplificação eficientes possam ser obtidos. Vale lembrar que modificações nas temperaturas de anelamento podem ser realizadas com base na seqüência de cada um dos pares de oligonucleotídeos utilizados.

A quantidade de *primer* também pode variar de acordo com o tipo de iniciador utilizado e em geral costuma ser especificada pelo autor que descreveu o loco. Da mesma forma, a quantidade de DNA pode variar entre 10 e 100ng, sendo necessário alguns testes para estabelecer a concentração ideal.

2.1. Ciclo Padrão:

Programação do termociclador:

Etapa 1: 5 minutos de desnaturação inicial à 94°C, seguidos de 12 ciclos de:

Etapa 2: 1 minuto em temperatura de desnaturação (94°C);

Etapa 3: 30 segundos em temperatura de anelamento, diminuída em dois graus *celcius* (-2°C), que poderá variar entre 48°C e 58°C;

Etapa 4: 30 segundos **em** temperatura de extensão à 72°C , seguidos por mais 22 ciclos de:

Etapa 5: 30 segundos em temperatura de desnaturação à 94°C;

Etapa 6: 30 segundos em temperatura de anelamento, que poderá variar entre 50°C e 60°C;

Etapa 7: 30 segundos **em** temperatura de extensão à 72°C e para finalizar:

Etapa 8: 10 minutos de extensão final à 72°C.

2.2. Reação Padrão

2.2.1. Reação utilizando-se Kit

Caso haja a possibilidade de se utilizar kits de amplificação, sugere-se o *Kit Master Taq* (Eppendorf), que contém *Taq Master Enhancer* que potencializa a ação da Taq DNA Polimerase durante o processo de amplificação do DNA na PCR.

Tabela 1 : Concentrações dos reagentes do *Kit Master Taq* (Eppendorf) utilizados na reação de amplificação de regiões microssatélites. O volume especificado foi calculado para uma reação de 10 μ l.

Reagente	Concentração	Concentração	Volume pipetado
	Estoque	Reação	
Taq Master	10 X	1 X	1 μ l
Taq Buffer	10 X	1 X	1 μ l
DNTP	1,25 mM	200 μ M	1,6 μ l
Primer	10 μ mol/ μ l	5 a 7,5 μ mol	0,5 a 0,75 μ l
Taq Polimerase	5 U	1 U	0,2 μ l
DNA	-	-	-
H ₂ O	-	-	-

Variações nas concentrações do DNA e dos *primers* utilizados podem ser realizadas a fim de otimizar o padrão de amplificação obtido. Primeiramente deve-se testar diferentes concentrações de DNA, variando-se as aliquotas entre 20 e 100ng. Caso um perfil de reação satisfatório não tenha sido obtido,

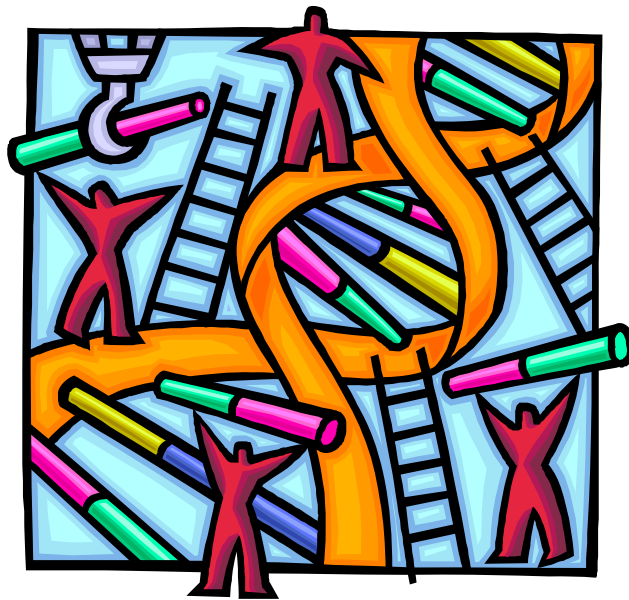
também devem ser feitas modificações nas concentrações dos *primers* (5 a 15pmoles) e do Cloreto de Magnésio.

2.2.2. Reação Caseira (sem utilização de Kits)

Tabela 2 : Concentrações dos reagentes utilizados na reação de amplificação de regiões microssatélites. O volume especificado foi calculado para uma reação de 10 μ l.

Reagente	Concentração Estoque	Concentração Reação	Volume pipetado
Tampão	10 X	1 X	1 μ l
DNTP	1,25 mM	200 μ M	1,6 μ l
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,3 μ l
Taq	5 U	1 U	0,2 μ l
Polimerase			
Primer	10 μ mol/ μ l	5 a 7,5 μ mol	0,5 a 0,75 μ l
DNA	-	-	-
H ₂ O milliQ	-	-	-

CAPÍTULO III



Genotipagem de Locos Microsatélites

Análise Eletroforética

Após a reação de PCR, a visualização dos produtos de amplificação dos locos de microssatélites pode inicialmente ser realizada em gel de agarose 1,5% (para maiores detalhes: consultar o volume1), submetido a uma condição de corrida de 100 Volts por aproximadamente 1 hora. O gel deve ser corado com brometo de etídeo e analisado sob luz Ultra-Violeta. É necessário também utilizar um marcador de peso molecular que pode ser de 50pb. Esta etapa é importante para verificar se de fato houve amplificação dos fragmentos esperados.

Entretanto, devido à pequena diferença de tamanho entre os diferentes alelos produzidos, o padrão de bandas obtido em agarose, em geral, não costuma ser satisfatório, sendo necessária a utilização de técnicas mais resolutivas. Eletroforese em géis de poliacrilamida e análises em sequenciadores automáticos, costumam ser mais eficientes para genotipagem de microssatélites.

Eletroforese de Gel de Poliacrilamida corado com Prata

O preparo do gel de poliacrilamida é um pouco mais trabalhoso que o de agarose, pois envolve uma série de etapas e intervalos de tempo, necessários para a sua confecção e montagem, tais como o preparo das placas e das soluções e a sua revelação. Os itens descritos a seguir resumem as principais etapas envolvidas na eletroforese vertical em poliacrilamida.

Tratamento das Placas:

Primeiramente é necessário fazer uma lavagem no aparato da eletroforese. As placas de vidro (uma maior e outra menor) devem estar limpas e receber tratamento diferenciado. Inicialmente ambas as placas devem ser mergulhadas em NaOH 1N permanecendo nesta solução por 30 minutos.

Posteriormente, estas devem ser lavadas com uma esponja macia contendo detergente comum. Os movimentos devem ser delicados e circulares e alcançar toda a superfície das placas. Em seguida, as placas devem ser enxaguadas, primeiramente, em água corrente utilizando uma esponja e, posteriormente, em água destilada. Após a lavagem estas devem permanecer secando e em seguida devem ser limpas com papel toalha embebido em etanol absoluto.

Posteriormente à lavagem das placas, a placa de maior tamanho deve receber um tratamento especial para que o gel possa permanecer fixado na sua superfície. A preparação da placa maior é bastante simples e consiste em aplicar, com o auxílio de uma pipeta, a solução de "Bind-Silane" (3 μ l de Bind-Silane, 1 ml de etanol absoluto e 5 μ l de ácido acético glacial). Esta solução deve ser espalhada por toda a superfície da placa em um sentido único, podendo-se utilizar um pedaço de papel toalha para auxiliar este procedimento. É importante, entretanto, que a porção superior da placa, onde será encaixado o pente, não contenha "Bind", para que o pente não permaneça aderido à placa.

Após este tratamento, a placa deve permanecer secando por aproximadamente 30 minutos, retirando-se o excesso da solução com papel toalha embebido em etanol absoluto. O papel deve ser passado sobre a placa em sentido perpendicular ao da etapa anterior.

A placa menor também deve receber um tratamento especial, que consiste em utilizar uma solução para evitar a adesão do gel na sua superfície. Cerca de 1 ml de "Repel" puro deve ser espalhado ao longo de toda a superfície da placa, com auxílio de um papel toalha. Este produto deve permanecer secando por um período aproximado de 10 minutos. Em seguida, o excesso de "Repel" deve ser retirado com papel umedecido em álcool absoluto. Após a preparação das placas, estas podem ser encaixadas e montadas de forma apropriada para receber o gel de poliacrilamida.

Preparação do Gel:

A preparação do gel de poliacrilamida consiste em misturar em um becker 4,73 g de Acrilamida; 0,16 g de bisacrilamida; 3,3 ml de TBE 20x modificado; 84 µl de TEMED; 700 µl de persulfato de amônia e água milliQ (q.s.p 70 ml). É importante ressaltar que durante este processo o TEMED e o persulfato devem ser colocados por último, pois eles aceleram o processo de polimerização.

Após o preparo da solução, esta deve ser aspirada, com o auxílio de uma seringa de 60 ml e injetada no espaço formado entre as placas. Nesta etapa, a placa deve permanecer inclinada para facilitar a aplicação do gel. Quando a solução preencher todo o espaço das placas, deve-se colocar o pente invertido (com os dentes voltados para cima) e esperar por aproximadamente 30 minutos para que ocorra sua polimerização. Para controlar este processo pode-se monitorar o restante do gel que ficou no becker, observando a sua solidificação.

Montagem do Gel na Cuba:

A placa contendo o gel polimerizado deve ser devidamente encaixada no suporte da cuba de eletroforese. Em seguida deve-se adicionar TBE 1,2X (modificado) no local adequado e retirar o pente com bastante cuidado, limpando os pocinhos formados, para que não restem pedacinhos de gel que possam vir a atrapalhar a aplicação das amostras de DNA. Para a limpeza dos pocinhos pode-se utilizar o próprio pente e também uma pipeta contendo TBE da própria cuba, fazendo movimentos rápidos e precisos para que um jato seja criado no local.

Em seguida os eletrodos devem ser encaixados e a placa deve ser pré-aquecida durante 1 hora a 55 W. Posteriormente, com a fonte desligada, deve-se colocar o pente com os dentes voltados para o gel, de modo que estes apenas encostem na sua superfície. O gel estará pronto para receber as amostras de DNA

Aplicação e Corrida do DNA:

Deve-se aplicar de 1 a 5 μ l de produto de PCR (dependendo da intensidade da banda amplificada) misturado com 1 μ l de tampão de corrida (azul de bromofenol). Recomenda-se não utilizar os primeiros pocinhos, os quais podem apresentar leves distorções após a corrida eletroforética. Deve-se fazer uso também de um marcador de peso molecular para identificar o tamanho dos diferentes alelos. Os eletrodos devem ser devidamente encaixados na cuba e a fonte deve permanecer ligada por 1 h e 30 min a 55W.

Após a corrida do gel, as placas devem ser retiradas da cuba para que o gel seja corado com prata. Antes de iniciar a coloração, porém, lave todos os recipientes (bandejas) que serão utilizados com água destilada e preencha um deles com aproximadamente um litro e meio de água destilada e reserve-o. As etapas a seguir resumem os principais passos envolvidos no processo de coloração do gel de poliacrilamida com prata.

Coloração do Gel de poliacrilamida:

1) Pré-tratamento: Fixação do Gel

Em um recipiente prepare o fixador: 1,5 litros de solução 10% de etanol e ácido acético (150 ml de álcool + 150 ml de ácido acético + q.s.p 1,5 litros de água destilada) e espere alguns minutos (para que o gel esfrie) antes de colocá-lo submerso. Separe as placas com o auxílio de uma espátula e mantenha a placa maior (onde está aderido o gel) mergulhada na solução por cerca de 20 minutos.

2) Lavagem e Oxidação:

Em seguida retire o gel do fixador e lave-o em água destilada por 1 minuto e meio. Posteriormente, coloque o gel em 1,5 litros de ácido nítrico 1% (23 ml de ácido nítrico 65% + 1477 ml de água) por 3 minutos e torne-o a lavar em água destilada por 1,5 minutos.

3) Impregnação com Nitrato de Prata:

Coloque o gel em 1,5 litros de solução contendo 1,5 g de nitrato de prata e 2 ml de formaldeído 37% por cerca de 30 minutos. Lave-o em água destilada por 30 segundos. Até esta etapa o gel permanecerá praticamente inalterado. Porém todos estes tratamentos químicos são cruciais para que a revelação ocorra com sucesso.

4) Revelação:

Durante sua revelação, o gel deve permanecer submerso em 1,5 litros de solução contendo 11,13 g de carbonato de sódio anidro + 2 ml de formaldeído 37% + 7,5 ml de tiosulfato de sódio pentahidratado 200 mg/l. Nesta etapa, os diferentes alelos poderão ser visualizados aos poucos, assumindo uma coloração acinzentada, que irá se acentuando conforme permanecer na solução. Deve-se monitorar o tempo e a coloração do gel, interrompendo o processo de revelação quando as bandas assumirem o padrão desejado

5) Interrupção e Lavagem:

A placa deve ser colocada em 1,5 litros da solução de fixação utilizada no pré-tratamento e em seguida lavada em 1,5 litros de NaOH 1% até que o gel se desgrude da superfície da placa maior.

A seguir encontram-se descritas algumas das soluções utilizadas na eletroforese e coloração do gel de poliacrilamida

- TBE Buffer (20x)
 - 242,2 g Tris base
 - 12 g de ácido bórico
 - 5,8 g de EDTA dissódico
 - água destilada q.s.p 1 l

- Tampão de corrida TBE (1,2x)
 - 60 ml de TBE (20x)
 - água destilada q.s.p 1 litro

Gentotipagem em Seqüenciador automático

A automatização do processo de genotipagem, através da utilização de seqüenciadores possibilitou uma maior agilidade e precisão na determinação dos diferentes alelos de microssatélites. Entretanto, este método, apesar de eficiente, apresenta um custo bastante elevado e necessita que o laboratório possua um equipamento dessa natureza ou então que se trabalhe em colaboração com outros grupos que possam auxiliar esta etapa de trabalho.

Neste processo, para identificar o tamanho do fragmento é preciso marcar um dos *primers* a ser utilizado na PCR com um fluorocromo específico (NED, FAM, JOE, etc.) para que assim, as novas fitas sintetizadas possam acoplar uma molécula fluorescente. Esta marcação tem um custo bastante elevado e pode ser muitas vezes inviável para grande parte dos centros de pesquisa.

Dessa forma, uma alternativa muito interessante proposta por Schuelke (2000) é utilizar três *primers* em uma reação: um único *primer* universal, o M13, marcado com fluorescência, um *primer forward* específico com a cauda M13 em seu final 5' e um *primer* específico *reverse*.

Além de ser mais econômico, o primer M13 marcado pode ser utilizado para várias espécies, bastando construir o primer forward específico com a cauda M13. Isso também evita o desperdício de primers específicos marcados, que muitas vezes são usados para poucas reações e depois permanecem armazenados no freezer.

No seqüenciador automático, uma amostra deste fragmento de DNA contendo moléculas fluorescentes é aplicado no gel de sequenciamento que emite um feixe de laser e excita os fluorocromos. As ondas emitidas são registradas e as informações transferidas para um programa no computador.

Como existe uma série de particularidades envolvidas na utilização de um seqüenciador automático (cada modelo necessita de um treinamento especializado para o seu manuseio), neste tópico, serão abordados apenas aspectos gerais sobre alguns procedimentos básicos do processo de seqüenciamento, utilizando-se o Sequenciador ABI 377, como o preparo das amostras que serão submetidas à análise, o tratamento das placas, a confecção do gel de seqüenciamento e algumas considerações sobre as análises.

A seguir encontram-se descritas as principais etapas envolvidas em cada um dos passos acima mencionados.

Preparação das Amostras:

Antes de iniciar a genotipagem é necessário preparar as amostras de DNA que serão seqüenciadas. Assim, após a amplificação dos locos de microssatélites, os produtos de PCR devem ser submetidos a um tratamento apropriado para que possam ser utilizadas.

As amostras devem ser previamente preparadas da seguinte forma:

- 1) 2 μ l do produto de PCR devem ser diluídos em aproximadamente 12 μ l de água milliQ (caso o produto de amplificação esteja fraco, pode-se diluir a amostra em um volume de 6 μ l). Posteriormente, 0,5 μ l da diluição deve ser misturado em 2 μ l de tampão de corrida (58 μ l de formamida deionizada, 10 μ l de *loading buffer* e 12 μ l de Rox), utilizando-se o Kit Rox™ Size Standard (Applied Biosystems).
- 2) Em seguida, as amostras devem ser mantidas com a tampa aberta em termociclador por 5 minutos a 95°C para que ocorra a desnaturação. Após este tempo é importante fazer com que a temperatura decaia lentamente para que haja tempo suficiente das amostras serem retiradas e colocadas imediatamente no gelo sem que renaturem.

A desnaturação deve ser feita minutos antes das amostras serem aplicadas no gel, geralmente costuma-se realizar esta etapa durante o tempo de polimerização do gel na câmara de luz Ultra-Violeta.

Preparo das Placas:

Inicialmente, as placas que irão reter o gel, devem ser lavadas delicadamente, somente com água milliQ fervente, sem jamais utilizar detergente ou sabão. Posteriormente, estas devem permanecer em local apropriado para que sequem sem a utilização de pano ou papel. Deve-se procurar mantê-las apoiadas o mínimo possível, para que haja o menor contato com outras superfícies. Após a secagem, caso permaneçam sobre as placas algumas gotículas de água ou impurezas, estas devem ser retiradas delicadamente com o auxílio de papel absorvente apropriado.

Preparo e Montagem do Gel:

Após a limpeza das placas, estas deverão ser devidamente montadas para que o gel seja aplicado. Deve-se encaixar os espaçadores de maneira apropriada, para que o gel permaneça retido sem que ocorra vazamentos. O gel mais comumente utilizado é o ReproGel™ 377 (Amersham Biosciences), que costuma ser preparado de modo bastante simples e rápido, sendo necessário apenas misturar as soluções A e B em quantidades apropriadas: 7 ml da Solução A (Acrilamida/Bisacrilamida) mais 7ml da Solução B (TBE1X, agente desnaturador, iniciador de UV).

O gel pode então ser vertido imediatamente por entre as placas e o pente colocado invertido (os dentes para cima), para que assim se forme o espaço onde serão aplicadas as amostras. Em seguida, o gel é colocado em uma câmara de luz ultravioleta por aproximadamente 20 minutos para que ocorra sua polimerização. Após a polimerização, deve-se encaixar o pente na parte superior do gel, onde serão aplicadas as amostras.

A placa contendo o gel deve ser devidamente acoplada no sequenciador. Feito isso, as soluções tampões previamente preparadas devem ser colocadas nos diferentes compartimentos do aparelho.

Preparo dos Tampões:

TBE 10X: 100,6 g de Tris,
51,3 g de Ácido Bórico
7,45 g EDTA com q.s.p.
1 litro de água milliQ q.s.p

TBE 1X: uma parte de TBE 10X para 9 partes de água milliQ.

Observação: os tampões devem ser previamente filtrados.

'Plate Check'

Antes de iniciar a corrida, as placas devem ser analisadas por um programa computacional específico a fim de verificar sua limpeza. Caso elas ainda estejam com algumas manchas ou impurezas, serão observados picos mais altos nos resultados gerados pelo computador. Para solucionar esse problema, basta retirá-las do sequenciador e limpá-las com um pouco de água destilada e papel absorvente apropriado.

Aplicação das Amostras:

Após a conclusão do Plate Check e estando o gel devidamente montado no sequenciador, as amostras podem ser aplicadas com o auxílio de uma pipeta preferencialmente de volume de 0,1 a 2µl ou 0,1 a 10µl. Antes de iniciar a aplicação é necessário fazer a limpeza dos pocinhos para retirar restos de gel ou uréia que podem interferir na entrada das amostras. Para isso, utiliza-se uma seringa com agulha e faz-se um fluxo de TBE para dentro dos pocinhos.

A aplicação deve ser feita de forma intercalada ou seja, um pocinho com amostra e outro sem, seguido de outro com amostra e assim por diante. Esse procedimento tem a função de evitar que as amostras se misturem e conseqüentemente, gerem confusão no momento da genotipagem, uma vez que durante a aplicação é normal ocorrer um pequeno vazamento do produto aplicado para os poços vizinhos. Estando concluída a aplicação, resta ainda um procedimento a ser realizado que é a limpeza dos pocinhos que não contém amostras. Isso deve ser feito da mesma forma citada anteriormente.

Preparação do Sequenciador para a Corrida

Antes de iniciar a eletroforese é necessário definir alguns parâmetros como número de amostras, a matriz que será utilizada, o tipo de fluorocromo (NED, FAM, JOE), o tempo de corrida, etc. Geralmente o laboratório possui essas informações já especificiadas para cada tipo de experimento.

O tempo de corrida deve ser ajustado de acordo com o tamanho do fragmento que está sendo analisado, variando em torno de 1 h a 1,3 horas.

Análise dos fragmentos obtidos ou Traqueamento

O programa GeneScan 2.1(Applied Biosystems)capta a imagem do gel e configura o padrão do Rox a partir de informações que são fornecidas pelo pesquisador. Em seguida, para que possa ser obtido o tamanho do fragmento de interesse, deve-se alinhar as bandas geradas pelo Rox, que é o marcador de tamanho molecular, com a banda obtida no gel.

Dando continuidade a esta análise, o programa Genotyper 2.5.2 (Applied Biosystems) compara as bandas do Rox com os fragmentos no gel e gera o eletroferograma, que são gráficos que informam sobre o tamanho (em pares de base) dos fragmentos obtidos e sobre a qualidade de definição da banda e, portanto, sobre sua confiabilidade. Valores de picos acima de 1000 geralmente são os mais confiáveis, entretanto, valores menores podem ser aceitos, dependendo do tipo de *primer* que está sendo utilizado e de testes preliminares que confirmam a reprodutibilidade do padrão obtido.

CAPÍTULO IV



Análise Estatística Unilocus

Análises estatísticas Unilocos

Existe uma infinidade de ferramentas estatísticas apropriadas e *softwares* desenvolvidos para a análise de dados moleculares utilizando marcadores de microssatélites. A determinação de qual pacote estatístico utilizar dependerá do objetivo particular de cada trabalho. Quando estamos interessados em avaliar o nível de diversidade e diferenciação genética em diferentes populações podemos:

- 1) testar o déficit de heterozigotos, através do cálculo do coeficiente de endocruzamento F_{is} , sendo que os locos podem ser analisados individualmente e também conjuntamente.
- 2) verificar se as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- 3) determinar as freqüências alélicas e compará-las entre as populações
- 4) identificar as diferenças no número médio de alelos por loco.
- 5) estimar as distâncias genéticas através da determinação da distância genética de Nei e do índice de fixação F_{st} .
- 6) Estimar fluxo gênico, migração e tamanho populacional efetivo.

Entretanto, como mencionado anteriormente cada estudo de caso deve ser tratado de modo apropriado e conveniente, levando-se em consideração a abordagem do trabalho, a meta proposta e as características de cada uma das populações que estão sendo analisadas.

No caso de populações naturais, estes estudos em geral costumam abordar três aspectos básicos:

1) Qual número de populações diferentes que de fato estão sendo estudadas?

A idéia básica deste abordagem é caracterizar os indivíduos amostrados com base nas frequências alélicas das diferentes populações e dos indivíduos pertencentes a elas. Os programas STRUCTURE, PARTITION e o BAPS, fornecem uma estimativa do número de sub-populações existentes entre as suas amostras, assumindo-se que estas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação.

2) A qual população determinado indivíduo pertence?

Esta pergunta está relacionada ao estudo de migração e dispersão e sua resposta pode ser obtida através dos valores determinados com o "Assignment Tests", que podem ser obtidos utilizando-se o programa GENECLASS. Essas informações podem ainda ser complementadas determinando-se a taxa de migração, o fluxo gênico e o tamanho efetivo da população, utilizando-se o programa MIGRATE.

3) A população está em declínio ou em expansão?

Esta abordagem encontra-se intimamente relacionada com o nível de variação genética existente na população atual. Neste caso, há a necessidade de distinguir populações naturalmente pequenas, daquelas que reduziram sua variação genética, devido a eventos que afetaram o seu tamanho populacional.

Além disso, existe a possibilidade da população ser grande em número de indivíduos (censo), porém, reduzida em relação ao seu tamanho efetivo, ocasionado devido a um efeito de *Bottleneck* ocorrido no passado.

Em ambos os casos, a influência de eventos demográficos passados sobre o nível de variação genética existente na população atual pode ter importantes implicações. A estabilidade genética das populações e o potencial impacto da depressão por endocruzamento encontram-se intimamente relacionados com a viabilidade que esta população apresenta.

Um dos programas que podem detectar a existência de reduções populacionais é o BOTTLENECK. Além disso, estimativas sobre a taxa de mutação e de crescimento, o tamanho populacional efetivo, o tempo do evento de divisão populacional e o tempo do mais recente ancestral comum, podem ser obtidas com o programa BATWING.

Todos estes métodos estatísticos aqui mencionados encontram-se baseados no alto polimorfismo evidenciado pelos locos de microssatélites e nas expectativas de equilíbrio das frequências alélicas e genotípicas observadas nas populações. Entretanto, uma variedade muito grande de métodos de análise estatística vem sido desenvolvidos para esses marcadores, a fim de se obter melhores respostas para os diferentes problemas relacionados à genética de populações. (para revisão consultar Pearse, D. E. & Crandall, K. A. 2004. Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5: 585 – 602).