

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Denise Fabiano do Nascimento

**Identificação de mutações na sequência reguladora ZRS do gene *Shh* relacionada à polidactilia em uma gata doméstica (*Felis catus*) e aplicação deste estudo de caso no ensino de Genética**

Florianópolis

2023

Denise Fabiano do Nascimento

**Identificação de mutações na sequência reguladora ZRS do gene *Shh* relacionada à polidactilia em uma gata doméstica (*Felis catus*) e aplicação deste estudo de caso no ensino de Genética**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ramos

Florianópolis

2023

Nascimento, Denise Fabiano do

Identificação de mutações na sequência reguladora ZRS do gene Shh relacionada à polidactilia em uma gata doméstica (*Felis catus*) e aplicação deste estudo de caso no ensino de Genética / Denise Fabiano do Nascimento ; orientador, André Ramos, 2023. 49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Genética Molecular. 3. Genética Básica. 4. Genética Populacional. 5. Polidactilia. I. Ramos, André. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Denise Fabiano do Nascimento

**Identificação de mutações na sequência reguladora ZRS do gene *Shh* relacionada à polidactilia em uma gata doméstica (*Felis catus*) e aplicação deste estudo de caso no ensino de Genética**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de junho de 2023.

Prof. Dra. Daniela Cristina de Toni  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Banca examinadora**

Prof. Dr. André de Avila Ramos  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Aline Guimarães Pereira  
Membro titular  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Flávia Lucena Zacchi  
Membro titular  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez  
Membro suplente  
Universidade Federal de Santa Catarina

A todos os animais que contribuíram  
para o progresso da ciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. André Ramos, que vem me acompanhando desde a terceira fase do Curso de Biologia: nas aulas de Biomol 1 e 2, em dois semestres de monitoria de Biomol 1 e agora na escrita deste trabalho. Obrigada por todas as reuniões, experimentos, ensinamentos e todo o conhecimento que construímos juntos. Hoje, sinto que sou uma cientista melhor, e devo muito disso a você.

Ao meu supervisor Dr. John Cobb, por me acolher tão prontamente ao seu laboratório na Universidade de Calgary, e tão graciosamente compartilhar sua experiência e grande parte do projeto que originou este trabalho. Eu aprendi muito na minha experiência de intercâmbio no Canadá, e fazer pesquisa sob sua orientação foi uma das experiências mais interessantes e recompensadoras que tive. Agradeço também aos colegas do Cobb Lab: Isabella, Carly, Tabitha, Greg, Berna e Merrit – vocês fizeram eu me sentir em casa, e aprendi muito com todos vocês. Agradeço também a Denisse, uma amiga querida que a UCalgary me deu de presente. Obrigada por me permitir compartilhar com você um pouco da minha experiência na Biologia. Tenho certeza de que você será uma ótima bióloga!

A minha família, que sempre me dá forças para continuar e que me apoia, desde muito pequena, na minha jornada em busca do conhecimento. A minha mãe Roseli, por ser o meu porto seguro e me manter motivada durante toda a minha graduação. Suas palavras de incentivo sempre foram meu motor, mami, e eu serei eternamente grata por tudo o que você fez e faz por mim - você é minha inspiração. Ao meu pai Márcio, que está sempre me perguntando se estou precisando de algo e que nunca mediu esforços para me proporcionar uma educação de qualidade e um futuro promissor. Obrigada por tudo, papai - você é meu exemplo. Ao meu irmão Marcelo, que me inspirou a encontrar paixão na minha profissão, assim como ele a encontra nas nuvens ao pilotar um avião. Tenho muito orgulho de você!

Ao meu noivo Eduardo, que há 11 anos me faz muito feliz e que é dono do abraço mais acolhedor e quentinho do mundo. Obrigada pelo apoio, meu amor. Por sempre estar ao meu lado me encorajando e me fazendo rir. Sua presença tranquila me firma e me motiva a seguir, e sua força e inteligência me admiram e me inspiram. Amo você!

Ao meu quarteto fantástico da graduação, Ana Paula, Iasmin e Laura, pela amizade e companheirismo. Vocês são incríveis e eu sempre admirei muito a inteligência e o talento de vocês. Vocês são profissionais maravilhosas, e pessoas ainda mais maravilhosas. Tenho muito orgulho de cada uma. Obrigada por fazerem as aulas mais divertidas e por sempre me apoiarem e incentivarem.

Aos colegas da turma 17.1 da Biologia, por todos os ótimos debates em sala de aula e PPCCs elaborados em conjunto. Obrigada por compartilharem suas ideias e fazerem da nossa passagem pela Biologia um tempo de muito aprendizado e conquistas.

A Laís Andrade Ferreira, minha eterna co-orientadora que também se tornou uma amiga muito querida. Você é uma pesquisadora nata, e eu sou extremamente grata por ter tido a honra e o privilégio de ser sua orientada no LACERT. Obrigada por todas as conversas e trocas, e por ser esse grande exemplo de cientista. Por mais um ano juntas nos EUA!

Aos colegas do LACERT e do REMA – meus períodos de Iniciação Científica foram repletos de novas experiências e oportunidades, e agradeço a vocês por tudo o que vivemos e aprendemos juntos.

A prof. Aline, minha supervisora na monitoria de Genética 1 – obrigada por ser essa pessoa tão acolhedora e querida. Eu adorei trabalhar com você, prof, e nossas aulas práticas reacenderam em mim a vontade de ser professora.

A prof. Carla, minha professora de História no Ensino Fundamental e Médio, por ir além do que é esperado e por nos desafiar a sermos pessoas melhores; por não se contentar em apenas transmitir conteúdo, mas também lições de vida valiosas aos seus alunos. O grupo de teatro *Ágora* me formou como pessoa, e sinto que devo muito do que sou hoje às nossas peças e nossas músicas. Você foi, para mim, o mais marcante exemplo de docência libertadora, exemplo este que espero levar para minha prática docente. Obrigada!

Aos professores do curso de Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina, que foram essenciais na minha formação. Obrigada pela dedicação e por me ensinarem tantas coisas sobre os seres vivos e sobre a vida.

A UFSC, minha querida *alma mater*, por ser minha segunda casa durante esses quase seis anos de graduação, e pelas inúmeras oportunidades que ela me proporcionou.

A Universidade Estadual de Londrina, que foi palco da minha primeira experiência acadêmica – obrigada por me iniciar nesse mundo.

A CNPq e a FEESC, agradeço pelas bolsas de Iniciação Científica que recebi durante a graduação. Ao governo do Canadá, agradeço pela bolsa ELAP que recebi para a realização de intercâmbio de pesquisa na Universidade de Calgary.

Por fim, agradeço a Deus por todas as bênçãos e por ter me mantido firme até aqui – obrigada, Senhor. Obrigada por me permitir integrar e investigar esta maravilha a que chamamos natureza.

*“A cat has absolute emotional honesty: human beings, for one reason or another,  
may hide their feelings, but a cat does not.”*

“Um gato possui honestidade emocional absoluta: seres humanos, por um motivo ou  
outro, podem esconder os seus sentimentos, mas um gato, não.”

(HEMINGWAY, Ernest; 1899-1961)

## RESUMO

O desenvolvimento de membros nos tetrápodes é complexo e envolve diversas moléculas de sinalização que caracterizam centros de sinalização em eixos distintos. No eixo anteroposterior, a molécula sinalizadora Sonic hedgehog (SHH) é a principal responsável pela especificação dos dígitos nos membros. SHH é expressa na zona de atividade polarizante (ZPA), localizada na margem posterior do membro em formação. O gene *Shh* é influenciado por diversas sequências reguladoras, dentre elas a sequência ZRS. Mutações pontuais de substituição de base na sequência ZRS causam expressão ectópica de SHH, levando à polidactilia em inúmeras espécies. A polidactilia é uma condição caracterizada por dígitos extras nos membros e a polidactilia pré-axial ocorre quando os dígitos extras se localizam na região anterior do membro. Em gatos domésticos (*Felis catus*), há três mutações conhecidas na sequência ZRS que causam polidactilia pré-axial: Hw, UK1 e UK2. O presente trabalho teve como objetivo genotipar uma gata doméstica canadense chamada Isabella, que apresenta um dígito extra em todas as patas, em relação a tais polimorfismos. Para isso, realizou-se a extração de seu DNA a partir de tecido ovariano, a amplificação da sequência ZRS por PCR e o sequenciamento desta região pelo método de Sanger. A hipótese levantada foi a de que a gata em estudo seria portadora do alelo Hw, já que esta é a mutação mais comum em gatos polidáctilos da América do Norte. A análise do sequenciamento confirmou que ela é heterozigota para o alelo Hw. A gata também apresentou uma outra mutação, ainda não descrita, na posição 148 de ZRS. Estudos anteriores com gatos polidáctilos de linhagens canadenses demonstraram uma alta prevalência de dedos extras em todos os membros, o que é condizente com o fenótipo da gata Isabella. No entanto, os gatos estudados não apresentavam nenhuma das três mutações já conhecidas em ZRS. Por isso, sugere-se que o novo polimorfismo aqui encontrado na posição 148 de ZRS poderia estar envolvido na determinação do fenótipo daqueles animais, assim como no da gata em estudo. Este trabalho também utilizou o estudo de caso da gata Isabella para o desenvolvimento de três atividades didáticas a serem aplicadas no ensino de Genética a nível superior e médio, abordando as principais subáreas deste campo de conhecimento: Genética Básica, Biologia Molecular e Genética Populacional.

**Palavras-chave:** Desenvolvimento de membros; Zona de atividade polarizante, Sequência reguladora de ZPA; Sonic hedgehog; recursos didáticos.

## ABSTRACT

Limb development in tetrapods is complex and involves several signaling molecules that characterize signaling centers in distinct axes. In the anteroposterior axis, the signaling molecule Sonic hedgehog (SHH) is primarily responsible for specifying the digits in the limbs. SHH is expressed in the zone of polarizing activity (ZPA), located at the posterior margin of the developing limb. The *Shh* gene is influenced by an array of regulatory sequences, including the ZRS sequence. Point mutations (base substitutions) in the ZRS sequence cause ectopic expression of SHH, leading to polydactyly in many species. Polydactyly is a condition characterized by extra digits in the limbs, and preaxial polydactyly occurs when those extra digits appear in the anterior region of the limb. In domestic cats (*Felis catus*), there are three known mutations in the ZRS sequence that cause preaxial polydactyly: Hw, UK1 and UK2. This study aimed at genotyping a Canadian female domestic cat named Isabella that has an extra digit in all paws, regarding these three polymorphisms. To that end, DNA extraction from ovarian tissue, ZRS amplification by PCR and ZRS sequencing using the Sanger method were performed. The hypothesis raised was that the cat under study would bear an Hw allele, since this is the most common mutation in polydactyl cats in North America. Sequencing analysis confirmed that the cat is heterozygous for the Hw allele. She also presented another mutation, which had not yet been described, at the position 148 of the ZRS sequence. Previous analyzes of polydactyl cats from Canadian lineages have shown a high prevalence of extra toes in all limbs, which is consistent with Isabella's phenotype. However, polydactyl cats from the Canadian lineage did not show any of the three previously known mutations in ZRS, thus suggesting that the new mutation at position 148 of the ZRS sequence may be involved in determining the phenotype of these animals, as well as that of the cat studied herein. This work also used the present case study in the development of three didactic activities to be applied in Genetics teaching, at higher and secondary education, addressing the main subareas of this field of knowledge: Mendelian Genetics, Molecular Biology and Population Genetics.

**Keywords:** Limb development; Zone of polarizing activity, ZPA regulatory sequence; Sonic hedgehog; didactic resources.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do membro superior humano ( <i>Homo sapiens</i> ) ilustrando eixos, segmentos e ossos formados no desenvolvimento dos membros em tetrápodes .....	18
Figura 2 – Principais centros de sinalização no membro em desenvolvimento .....	19
Figura 3 – Papel de <i>Shh</i> na identificação dos dígitos no membro em desenvolvimento.....	20
Figura 4 – Algumas mutações descritas na sequência ZRS em humanos ( <i>Homo sapiens</i> ), camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) e gatos domésticos ( <i>Felis catus</i> ) .....	21
Figura 5 – Fotos da gata Isabella .....	26
Figura 6 – Localização dos <i>primers</i> utilizados em relação à sequência ZRS .....	27
Figura 7 – Quatro fragmentos da sequência ZRS amplificados por PCR usando cinco amostras de DNA de gatos WT .....	30
Figura 8 – Quatro fragmentos da sequência ZRS amplificados por PCR usando a amostra de DNA da gata Isabella .....	31
Figura 9 – Mutações presentes na sequência ZRS da gata Isabella .....	32
Figura 10 – Eletroferogramas da sequência ZRS da gata Isabella nas regiões das mutações identificadas .....	33
Figura 11 – Heredograma da família da gata Isabella (Atividade 1) .....	39
Figura 12 – Gabarito do heredograma da família da gata Isabella (Atividade 1) .....	40
Figura 13 – Gabarito da questão 3 (Atividade 1) .....	40
Figura 14 – Sequências ZRS WT e ZRS da gata Isabella (Atividade 2) .....	41

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Informações sobre os <i>primers</i> utilizados .....	27
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µl	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius
A	Adenina
AER	Crista ectodérmica apical
AP	Anteroposterior
BEG	Biologia Celular, Embriologia e Genética
C	Citosina
CA	Califórnia
CMMB	<i>Cell, Molecular and Microbial Biology</i>
COVID-19	Doença Coronavírus 19
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr	Doutor/Doutora
DV	Dorsoventral
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
ETS	<i>E26 Erythroblast transformation-specific</i>
ETV4/5	<i>ETS translocation variant 4/5</i>
F	<i>Forward</i> ou Senso
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
g	Força da gravidade
G	Guanina
GABPα	<i>GA-binding protein alpha chain</i>
HnRNP K	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
Hox	Homeobox
Hw	Hemingway
Hx	<i>Hemimelic extra toes</i>
KY	Kentucky
LMBR1	<i>Limb development membrane protein 1</i>
Min	Minuto
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
Mb	Megabase
MA	Massachusetts
MD	Maryland
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
OER	<i>Open Educational Resource</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Próximo-distal
PPD	Polidactilia pré-axial
Prof	Professor/Professora
PZ	Zona de progresso
pZRS	Pré-ZRS
R	<i>Reverse</i> ou Antissenso

REA	Recurso Educacional Aberto
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
SARS-Cov-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SHH	Sonic hedgehog
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SRD	Sem raça definida
T	Timina
TAE	Tampão (Tris, Ácido acético e EDTA)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tbx4	<i>T-box 4</i>
Tbx5	<i>T-box 5</i>
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
u	Unidade
UK1	Reino Unido 1
UK2	Reino Unido 2
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
V	Volt
WT	<i>Wild Type</i>
ZPA	Zona de Atividade Polarizante
ZRS	Sequência Reguladora da Zona de Atividade Polarizante

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
2.1	DESENVOLVIMENTO DO MEMBRO TETRÁPODE.....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Eixo Anteroposterior (AP).....</b>	<b>19</b>
2.2	A SEQUÊNCIA REGULADORA ZRS E A POLIDACTILIA.....	20
2.3	A POLIDACTILIA EM GATOS DOMÉSTICOS ( <i>FELIS CATUS</i> ) .....	22
2.4	O ENSINO DE GENÉTICA: IMPORTÂNCIA E DESAFIOS .....	23
2.5	OBJETIVOS.....	25
<b>2.5.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>A GATA POLIDÁCTILA ISABELLA: UM ESTUDO DE CASO .....</b>	<b>25</b>
3.1	METODOLOGIA.....	25
<b>3.1.1</b>	<b>Sujeito do estudo.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Extração de DNA .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3</b>	<b>PCR seguida de eletroforese .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Purificação dos fragmentos de ZRS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Quantificação e sequenciamento dos fragmentos de ZRS .....</b>	<b>29</b>
3.2	RESULTADOS .....	29
<b>3.2.1</b>	<b>PCR e eletroforese .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Quantificação dos fragmentos de ZRS da gata Isabella .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Sequenciamento dos fragmentos de ZRS da gata Isabella .....</b>	<b>31</b>
3.3	DISCUSSÃO.....	33
<b>4</b>	<b>A GATA ISABELLA ENSINANDO GENÉTICA: TRÊS ATIVIDADES DIDÁTICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
	<b>APÊNDICE A – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA ZRS DA GATA POLIDÁCTILA ISABELLA (ZRSISA) E DA SEQUÊNCIA ZRS WT (<i>WILD-TYPE</i>).....</b>	<b>49</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Durante a minha trajetória acadêmica no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), cursei as disciplinas das duas habilitações oferecidas pela instituição: bacharelado e licenciatura. Meu interesse em pesquisa esteve presente desde o início; já o interesse pela docência foi surgindo ao longo da jornada pela Biologia. Realizei iniciação científica em diversos laboratórios da Universidade e atuei como monitora de disciplinas relacionadas a Genética e Biologia Molecular. Nessas experiências, tive a felicidade de poder exercitar essas duas facetas da profissão de Bióloga: o pesquisar e o ensinar, atividades estas que foram se interligando de um modo muito natural.

Na monitoria de Biologia Molecular I, tive a oportunidade de colaborar com um projeto de extensão chamado Projeto Imagine, que conta com iniciativas que visam à popularização científica (PROJETO IMAGINE, 2023). Como monitora, pude participar da otimização e adaptação do protocolo de extração de DNA que hoje é utilizado nas aulas práticas da disciplina e nas práticas do Módulo “DNA, Diversidade e Hereditariedade”, realizado pelo Projeto em escolas de educação básica. O kit comercial de extração adotado naquele novo protocolo (*Monarch® Genomic DNA Purification*) também foi empregado no presente trabalho. Além disso, realizei a edição de uma série de vídeos educativos chamada “A Ciência na Pandemia”, criada em 2020 com o intuito de fornecer material de apoio para professores da educação básica, auxiliando-os na busca de informações acuradas sobre o vírus SARS-Cov-2 e a COVID-19 (PROJETO IMAGINE, 2020). Minha participação no Projeto Imagine foi a ponte para meu contato e posterior contribuição com a extensão universitária, atividade fundamental para aproximarmos do público geral o conhecimento gerado através de pesquisas na Universidade, destacando a sua importância e como ele se traduz em melhorias para a sociedade.

À luz de todas estas experiências, e partindo do princípio da indissociabilidade entre ensino, pesquisa e extensão, assim como preconizado pelo artigo 207 da Constituição Brasileira (BRASIL, [2016]), a proposta deste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) é integrar estas três esferas, refletindo, assim, a natureza da minha formação. Para este fim, este trabalho conta com a seguinte organização: 1) uma seção de introdução geral sobre os assuntos abordados, além dos objetivos almejados; 2) uma seção intitulada “A gata polidáctila Isabella: um estudo de caso”, que apresenta metodologia, resultados e discussão da pesquisa que realizei na *University of Calgary* (Alberta, Canadá) entre setembro e dezembro de 2021, enquanto em intercâmbio naquela instituição; e 3) uma seção intitulada “A gata Isabella ensinando genética: três atividades didáticas”, na qual apresento uma aplicação prática da pesquisa realizada na forma de exercícios didáticos, que podem ser empregados no ensino de Genética nos níveis

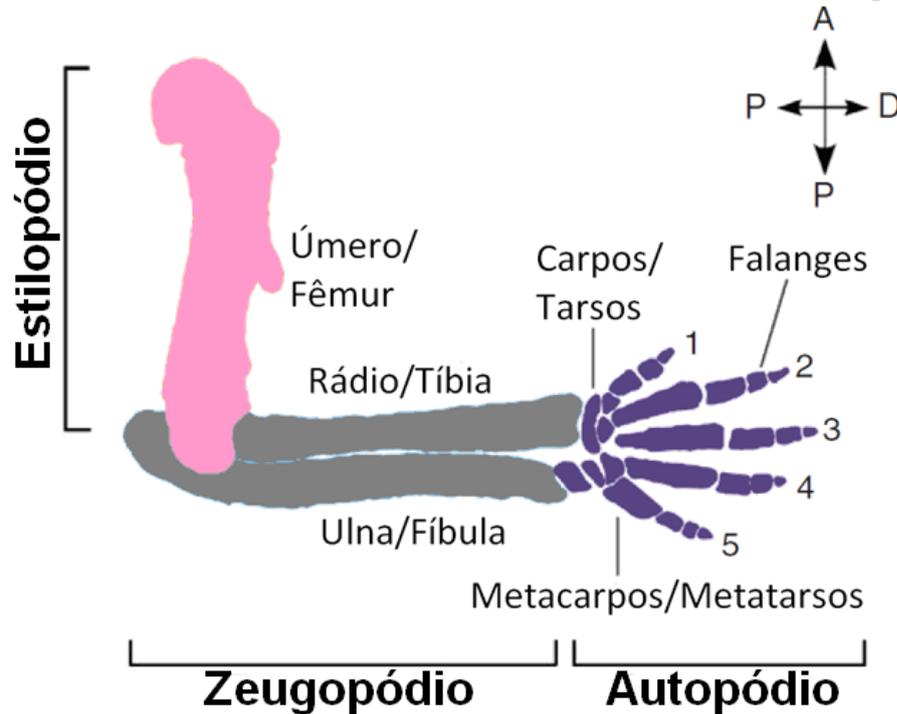
superior e médio. Estes exercícios também serão posteriormente publicados como Recursos Educacionais Abertos (REAs ou OERs, do inglês *Open Educational Resources*) no *website* do Projeto Imagine (PROJETO IMAGINE, 2023), ficando disponíveis para serem aplicados por professores de todo o mundo.

## **2 INTRODUÇÃO**

### **2.1 DESENVOLVIMENTO DO MEMBRO TETRÁPODE**

O desenvolvimento de membros nos tetrápodes (vertebrados com quatro membros, a saber: anfíbios, répteis, aves e mamíferos) sofre a influência de diversos fatores e se dá ao longo de três eixos: próximo-distal (PD), dos ombros/quadril para os dedos; anteroposterior (AP), do polegar para o dedo mínimo; e dorsoventral (DV), do dorso para a palma da mão e planta do pé, respectivamente. Ao longo do eixo PD, pode-se reconhecer três segmentos distintos (Figura 1): o mais proximal, chamado de estilopódio (o úmero no membro anterior e o fêmur no membro posterior); o intermediário, chamado de zeugopódio (rádio e ulna no membro superior (humanos)/anterior (demais tetrápodes) e tibia e fíbula no membro inferior/posterior) e o mais distal, chamado de autopódio (carpos, metacarpos e falanges no membro superior/anterior e tarsos, metatarsos e falanges no membro inferior/posterior) (TICKLE, 2003; BUTTERFIELD et al., 2010; DELGADO & TORRES, 2016).

Figura 1 – Anatomia do membro superior humano (*Homo sapiens*) ilustrando eixos, segmentos e ossos formados no desenvolvimento dos membros em tetrápodes



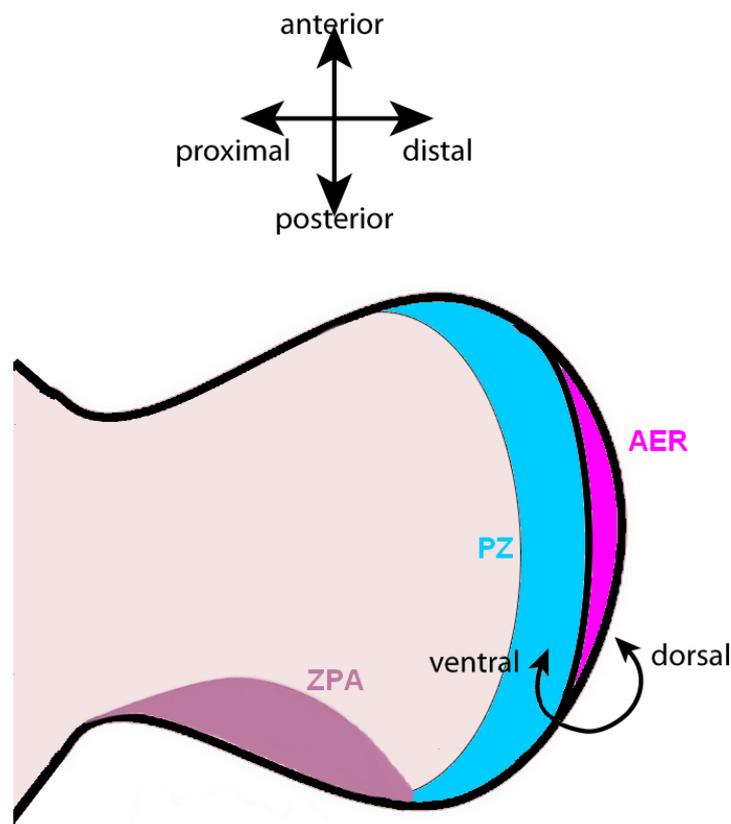
Em um modelo de membro maduro, tem-se o estilopódio (úmero no membro superior/anterior e fêmur no membro inferior/posterior); o zeugopódio (rádio e ulna no membro superior/anterior, tíbia e fíbula no membro inferior/posterior); e o autopódio (carpos, metacarpos e falanges no membro superior/anterior e tarsos, metatarsos e falanges no membro inferior/posterior). A-P: eixo anteroposterior; P-D: eixo próximo-distal. Adaptado de BUTTERFIELD et al., 2010.

Em embriões de camundongo, os fatores de transcrição Homeobox, ou genes *Hox*, atuam no eixo PD especificando a identidade das células mesenquimais que originarão estilopódio (*Hox9* e *Hox10*), zeugopódio (*Hox11*) e autopódio (*Hox12* e *Hox13*) (DAVIS *et al.*, 1995; WELLIK & CAPECCHI, 2003). Já ao longo do eixo AP, no tronco do embrião, o padrão de expressão dos genes *Hox* também determina as regiões específicas nas quais se formarão os brotos dos membros (BURKE *et al.*, 1995; COHN & TICKLE, 1999). Os fatores de transcrição *Tbx5* (T-box 5) e *Tbx4* (T-box 4) são responsáveis pela especificação dos campos de desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores, respectivamente (AGARWAL *et al.*, 2003).

A especificação das estruturas relacionadas aos eixos do membro acontece principalmente a partir de centros de sinalização: 1) a crista ectodérmica apical (AER, do inglês *apical ectodermal ridge*) para o eixo PD; 2) a ectoderme dorsal para o eixo DV; 3) e a zona de ação polarizante (ZPA, do inglês *zone of polarizing activity*) para o eixo AP (Figura 2). A AER é constituída por uma camada distal de células epiteliais que secretam fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs, do inglês *fibroblast growth factors*), enquanto a ZPA é caracterizada por um conjunto de células mesenquimais posteriores à AER que secretam o morfógeno Sonic

hedgehog (SHH). A zona de progresso (PZ) é constituída por células mesenquimais que contribuem para o crescimento em extensão do membro em desenvolvimento (Figura 2; TICKLE, 2003; BUTTERFIELD et al., 2010; DELGADO & TORRES, 2016). A complexa interação entre as moléculas expressas nesses centros garante a correta padronização do membro, além de haver um grau significativo de redundância na sinalização envolvida - em muitos casos, uma mesma molécula contribui para o desenvolvimento de mais de um eixo no membro em formação.

Figura 2 – Principais centros de sinalização no membro em desenvolvimento



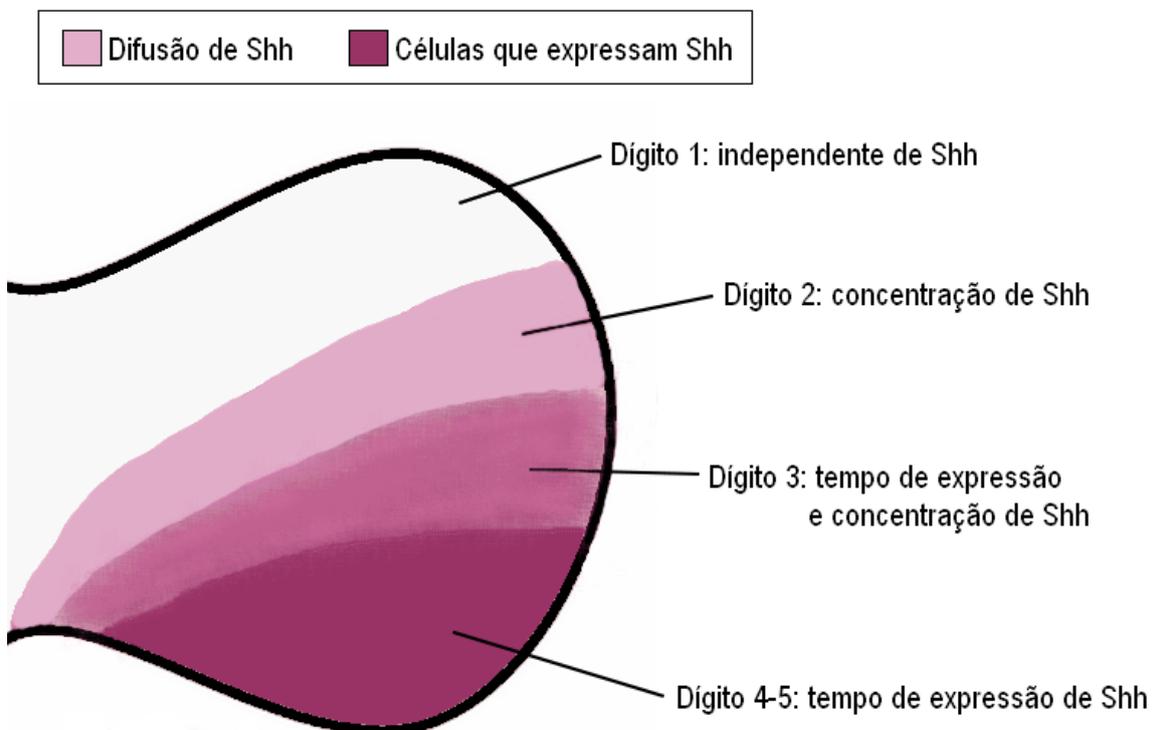
No broto do membro em desenvolvimento, tem-se a crista ectodérmica apical (AER), um epitélio espesso localizado na região mais distal do membro; a zona de progresso (PZ, do inglês *progress zone*), constituída por um mesênquima altamente proliferativo que contribui para o crescimento do membro; e a zona de ação polarizante (ZPA), na região posterior do membro. A-P: eixo anteroposterior; P-D: eixo próximo-distal. D-V: eixo dorsoventral. Adaptado de CHEN, 2010.

### 2.1.1 Eixo Anteroposterior (AP)

Como mostrado nas Figura 2 e 3, o eixo AP é especificado a partir da ZPA, localizada na região posterior do membro e caracterizada pela expressão do gene *Shh*, com um gradiente de SHH se estabelecendo da região posterior à anterior. As células secretoras de SHH e suas

descendentes dão origem a células ósseas e musculares nos membros. A identidade dos dígitos é definida, principalmente, pelo tempo de expressão de *Shh* (sinalização autócrina) e, em menor grau, pela concentração de SHH (sinalização parácrina). Os dígitos 4 e 5 dependem da expressão local de *Shh*, sendo que o dígito 5 é exposto a SHH por mais tempo do que o dígito 4; o dígito 3 é composto por células que apresentam certa expressão de *Shh*, mas também dependem da difusão de *Shh* a partir da ZPA; já o dígito 2 é totalmente dependente da difusão de *Shh* a partir da ZPA, enquanto o dígito 1 é especificado independentemente de *Shh*. (Figura 3; AHN & JOYNER, 2004; HARFE et al., 2004; SCHERZ et al., 2007; BUTTERFIELD et al., 2010; DELGADO & TORRES, 2016; GILBERT & BARRESI, 2016).

Figura 3 – Papel de *Shh* na identificação dos dígitos no membro em desenvolvimento



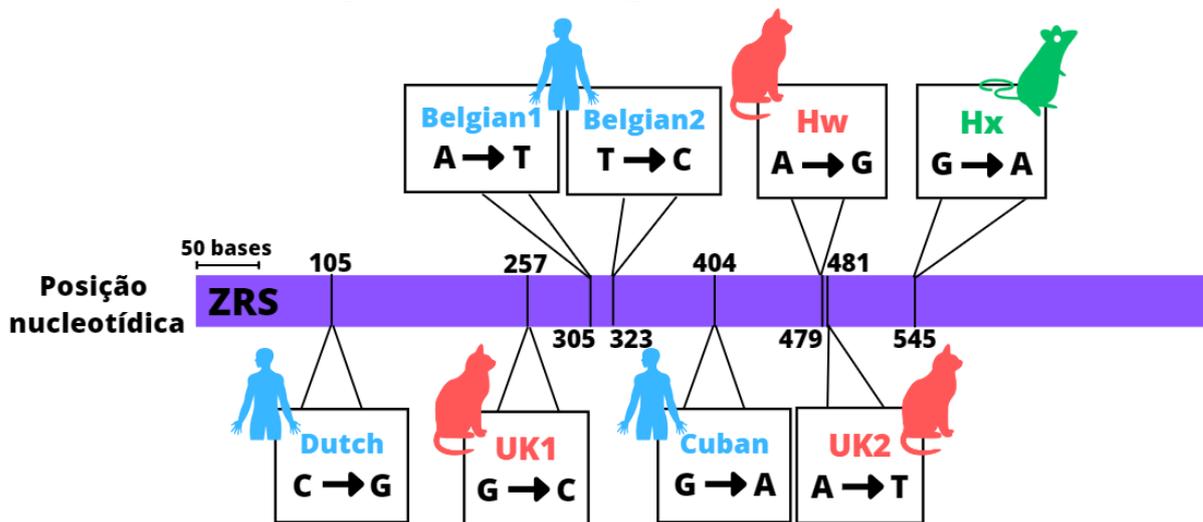
Esquema que representa o modo como *Shh* define a identidade dos dígitos. Os dígitos 4 e 5 são especificados pelo tempo da expressão local de *Shh* (sinalização autócrina). O dígito 3 é especificado tanto pelo tempo de expressão local (sinalização autócrina) quanto pela concentração de *Shh* (sinalização parácrina) difundida. O dígito 2 é especificado apenas pela concentração de *Shh* (sinalização parácrina) difundida e o dígito 1 é especificado de modo independente de *Shh*. Adaptado de GILBERT & BARRESI, 2019.

## 2.2 A SEQUÊNCIA REGULADORA ZRS E A POLIDACTILIA

O gene *Shh* apresenta um padrão complexo de expressão e é influenciado por diversas sequências reguladoras. Uma destas sequências, denominada ZRS (sequência reguladora de ZPA, do inglês *ZPA regulatory sequence*), regula a expressão de *Shh* na ZPA e é tida como um regulador de longo alcance, já que está localizada a uma distância de aproximadamente 1 Mb

(megabase, ou um milhão de pares de base) de *Shh*. ZRS está localizada no íntron 5 do gene *LMBR1* (do inglês *limb development membrane protein 1*) e é altamente conservada em diversas espécies, tendo sido descrita em humanos, camundongos, galinhas, peixes e gatos (LETTICE *et al.*, 2002; LETTICE *et al.*, 2003, LETTICE *et al.*, 2008). Alterações (mais especificamente, mutações pontuais de substituição de base) em posições nucleotídicas espécie-específicas da sequência ZRS (Figura 4) causam uma expressão ectópica de SHH na região anterior do membro em desenvolvimento, levando à presença de dedos extras em diversas espécies, condição conhecida como polidactilia (LETTICE *et al.*, 2008).

Figura 4 – Algumas mutações descritas na sequência ZRS em humanos (*Homo sapiens*), camundongos (*Mus musculus*) e gatos domésticos (*Felis catus*)



A sequência ZRS é representada pela barra roxa. As mutações estão destacadas em quadros. As que ocorrem em humanos têm seus nomes representados em azul; as que ocorrem em gatos, em vermelho; e a que ocorre em camundongo, em verde. O nucleotídeo antes da seta é o encontrado na sequência ZRS selvagem daquela espécie, e o nucleotídeo após a seta é o encontrado no alelo mutante. A: adenina. T: timina. C: citosina. G: guanina. As posições nucleotídicas das mutações estão indicadas. Esta figura não exaure todas as mutações de ZRS descritas em humanos e camundongos. Adaptado de LETTICE *et al.*, 2003 e LETTICE *et al.*, 2008.

A polidactilia é caracterizada pela presença de um ou mais dedos excedentes nos membros de vertebrados quando considerado o número de dedos que o fenótipo “selvagem” de uma dada espécie apresenta (i.e., o ser humano possui cinco dedos em cada membro, por isso, a polidactilia nesta espécie seria apresentar seis ou mais dedos nas mãos e/ou nos pés). Há diferentes tipos de polidactilia: 1) polidactilia pré-axial (a mais comum), quando os dedos adicionais estão localizados anteriormente ao eixo medial do membro (i.e., dedos adicionais na região do polegar/indicador); 2) polidactilia pós-axial, quando os dedos adicionais se localizam posteriormente ao eixo medial do membro (i.e., dedos adicionais na região do dedo anelar/mínimo); 3) polidactilia central (a mais rara), quando os dedos adicionais se formam

próximos ao eixo medial do membro (i.e., dedos adicionais na região do dedo médio). A polidactilia pode ocorrer em um único membro ou em vários, e pode aparecer isoladamente ou relacionada a síndromes. Além disso, os dedos supernumerários podem possuir estrutura anatômica normal ou desvios anatômicos, apresentando diferentes graus de integração com os tecidos relacionados. O padrão de herança varia entre os diferentes tipos de polidactilia, sendo que a polidactilia pré-axial (PPD) apresenta herança autossômica dominante (DANFORTH, 1947; LANGE & MÜLLER, 2017).

### 2.3 A POLIDACTILIA EM GATOS DOMÉSTICOS (*FELIS CATUS*)

Especificamente em gatos, foram descritas três mutações para PPD (Figura 4): a primeira consiste em uma substituição de uma guanina por uma citosina (C) na posição 257, denominada de UK1 (do inglês *United Kingdom 1*); a segunda consiste em uma substituição do nucleotídeo adenina (A) pelo nucleotídeo guanina (G) na posição 479 de ZRS, denominada de mutação Hw (Hemingway); e a terceira consiste em substituição de uma adenina por uma timina (T) na posição 481, denominada de UK2 (do inglês *United Kingdom 2*) (LETTICE *et al.*, 2008).

Os gatos portadores das mutações UK1 e UK2 são provenientes de linhagens da Grã-Bretanha. Já a mutação Hw foi nomeada em referência ao autor americano Ernest Hemingway (1899 – 1961). Ernest era um apaixonado por gatos domésticos, e na época em que vivia com a família na ilha de Key West (Flórida, EUA), conheceu um capitão de navio chamado Stanley Dexter. Dexter era dono de uma gata branca polidáctila, a qual conquistou a afeição de Hemingway – ao final da visita de Dexter, ele presenteou a gata a Hemingway, que a batizou de *Snow White* (Branca de Neve em inglês). Esta gata reproduziu-se com outros felinos da ilha, dando origem a uma população de gatos polidáctilos conhecida como “gatos de Hemingway”, os quais vivem na antiga casa do autor, em Key West, que se tornou um museu (HEMINGWAY HOME, 2021).

Os gatos com polidactilia eram tidos por capitães de navio e marinheiros como amuletos que traziam boa sorte às viagens, além de controlarem pragas a bordo, o que explicaria a alta ocorrência de gatos polidáctilos em regiões costeiras e ao redor de portos (LETTICE *et al.*, 2008). Análises genéticas realizadas na década de 1970 estimaram uma alta frequência de um alelo dominante característico de polidactilia em populações de gatos de cidades costeiras, como a canadense Halifax e a norte-americana Boston (TODD & TODD, 1976).

A PPD em gatos apresenta expressividade variável: alguns animais apresentam dedos extras em todas as patas, enquanto outros apresentam dígitos extras apenas nas patas anteriores, sendo este último o caso mais comum. Alguns ainda apresentam apenas uma falange a mais no

dígito 1, enquanto outros possuem dedos extras apenas nas patas posteriores (o caso mais raro de todos) (LETTICE *et al.*, 2008; HAMELIN *et al.*, 2020). Além disso, apesar da PPD geralmente apresentar herança autossômica dominante, foram descritas ninhadas de gatos polidáctilos provenientes de pais não-polidáctilos heterozigotos para o alelo Hw, sugerindo penetrância incompleta para a característica (HAMELIN *et al.*, 2020).

Apesar da estrutura dos membros diferir entre espécies, a sinalização molecular é bem conservada, possibilitando a realização de análises complementares entre diferentes espécies (BUTTERFIELD *et al.*, 2010). A sequência ZRS é homóloga em camundongos (*Mus musculus*), gatos (*Felis catus*), humanos (*Homo sapiens*) e até peixes (*Fugu rubripes*), evidenciando a história evolutiva comum destas espécies e atribuindo à expressão de *Shh* um papel central na transição nadadeira-para-membro em tetrápodes (LETTICE *et al.*, 2003; GILBERT & BARRESI, 2016).

A alteração na regulação de genes devida a mutações pontuais pode ter um papel importante na variação entre indivíduos de uma determinada população, demonstrando que até mesmo pequenas mudanças na regulação de um gene podem ter impactos significativos na morfologia dos animais (LETTICE *et al.*, 2008). A polidactilia é um bom exemplo disto e o estudo desta condição pode esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na regulação de longo alcance.

Diante do exposto e com o intuito de expandir o conhecimento sobre as diferentes formas da polidactilia, este trabalho, em sua primeira parte, investigou a sequência ZRS de uma gata com polidactilia chamada Isabella proveniente da região de Halifax, cidade localizada na província de Nova Scotia, Canadá.

A hipótese deste estudo de caso era que este indivíduo apresentaria a mutação Hw, já que esta é a mutação mais comum em gatos polidáctilos da América do Norte (LETTICE *et al.*, 2008; LANGE *et al.*, 2013). Esta hipótese foi testada e os experimentos realizados para este fim foram descritos no capítulo 3 deste trabalho.

## 2.4 O ENSINO DE GENÉTICA: IMPORTÂNCIA E DESAFIOS

A Genética é uma área do conhecimento de extrema importância para a sociedade, contribuindo para a compreensão dos processos hereditários e evolutivos, da biodiversidade, além de possibilitar diversos avanços como a terapia gênica, organismos geneticamente modificados, clonagem, fertilização *in vitro* e muitos outros processos biotecnológicos que podem trazer benefícios aos seres humanos e que permitem a investigação de diversos mecanismos fundamentais para a manutenção da vida (ARAÚJO *et al.*, 2018; MACHADO,

2021). As técnicas citadas acima causam polêmica e são centro de diversos debates que questionam a ética em sua utilização, ganhando espaço na mídia e tendo presença marcante no cotidiano das pessoas. Por isso, é fundamental que os estudantes de Ensino Médio e graduandos das áreas biológicas sejam capazes de se posicionar diante desses debates de forma crítica e cientificamente embasada (MACHADO, 2021).

Um dos principais objetivos do ensino de Genética deve ser o de combater o determinismo genético, que postula que as características dos seres vivos são definidas por seu material genético, sem considerar a significativa influência que o ambiente exerce sobre o fenótipo (PENCHASZADEH, 2004). Esse importante objetivo não pode ser alcançado com um ensinar enciclopédico, que tem o aluno como um mero depósito de informações, e que ainda é muito presente, não só nas escolas, mas também nas universidades (CARDOSO & OLIVEIRA, 2010). É necessário que os alunos sejam capazes de desenvolver uma visão crítica sobre o assunto, integrando os diversos mecanismos genéticos e evolutivos e levando à compreensão de que as características dos seres vivos das mais diversas espécies, inclusive a nossa, são o resultado de complexas interações entre material genético e ambiente, com regulação igualmente complexa. Desse modo, estes estudantes tornar-se-ão profissionais éticos, combatendo simplificações exageradas do assunto e visões deterministas, que já foram usadas como justificativa pseudocientífica para discriminação racial e marginalização de minorias, culminando no genocídio de grupos inteiros, como o de judeus na Alemanha nazista da década de 1930-1940 (PENCHASZADEH, 2004).

O ensino de Genética vem acompanhado de inúmeros desafios: conceitos abstratos e considerados de difícil assimilação e compreensão, vocabulário específico com excesso de termos técnicos, falta de recursos didáticos, descontextualização e abordagem fragmentada dos conteúdos, necessidade de conhecimentos prévios em matemática, bioquímica e biologia celular, além da constante atualização e novas descobertas na área (GOLDBACH *et al.*, 2009; CARDOSO & OLIVEIRA, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2020; MACHADO, 2021). Para superar esses desafios, é preciso fazer uso de estratégias para envolver os alunos, facilitando a aprendizagem e contextualizando esse conhecimento (PALMEIRA *et al.*, 2020).

Entre essas estratégias, destacam-se as metodologias ativas, que têm como base engajar o aluno, tornando-o ator principal do processo de aprendizagem, despertando sua curiosidade e promovendo sua autonomia. As metodologias ativas podem fazer uso de experiências reais ou simuladas, estimulando os alunos a resolverem problemas advindos de atividades da prática social essenciais para o avanço da sociedade (PALMEIRA *et al.*, 2020). No presente trabalho, foram propostas três atividades didáticas que se enquadram na estratégia

de metodologia ativa, tomando como base o estudo de caso real da gata Isabella. Tais atividades estão descritas na sessão 4.

## 2.5 OBJETIVOS

### 2.5.1 Objetivo geral

Caracterizar genotipicamente uma gata com polidactilia, verificando se ela apresenta uma das mutações conhecidas na sequência ZRS e utilizar este estudo de caso como ponto de partida para desenvolver recursos didáticos que apoiem o ensino de Genética, tanto na graduação quanto no ensino médio.

### 2.5.2 Objetivos específicos

- Sequenciar a região ZRS da gata Isabella;
- Analisar a sequência obtida e identificar a(s) mutação(ões) envolvida(s) no fenótipo da gata;
- Desenvolver exercícios didáticos que tenham o estudo de caso da gata Isabella como pano de fundo e que possam ser empregados no ensino de Genética nos níveis superior e médio, abordando conceitos de Genética Básica, Biologia Molecular e Genética de Populações.

## 3 A GATA POLIDÁCTILA ISABELLA: UM ESTUDO DE CASO

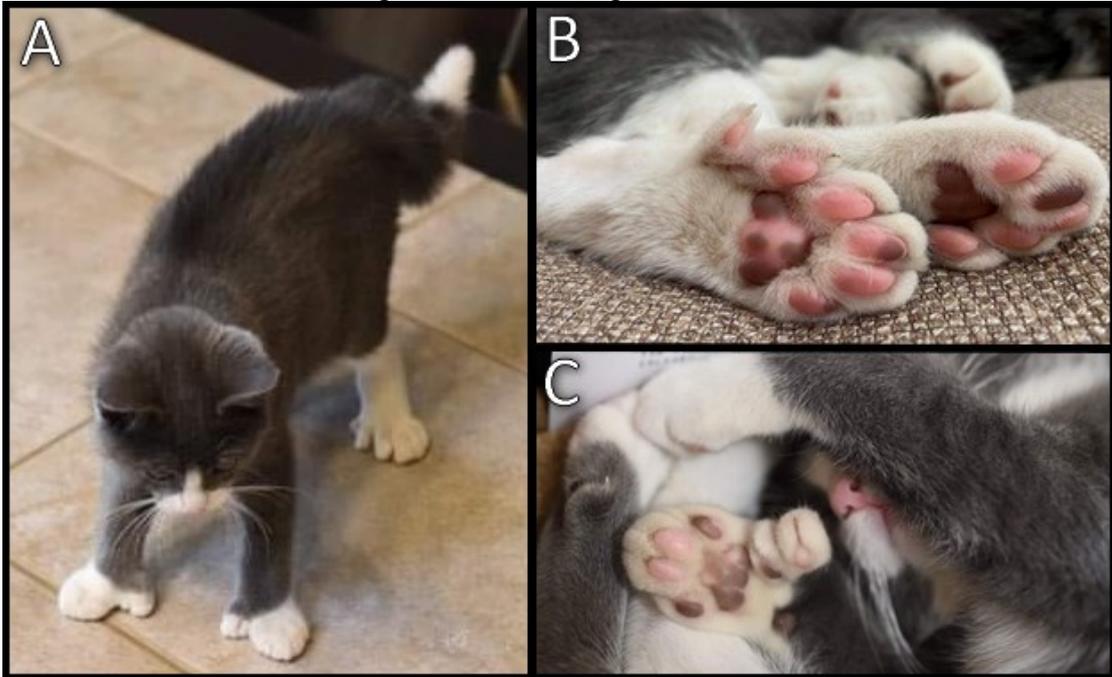
### 3.1 METODOLOGIA

#### 3.1.1 Sujeito do estudo

O indivíduo estudado é uma fêmea sem raça definida (SRD) pertencente à espécie *Felis catus* (gato doméstico) proveniente da cidade portuária de Halifax, capital da província de Nova Scotia, no Canadá. A gata, chamada Isabella, é portadora de polidactilia, apresentando um dígito extra em todas as patas (Figura 5). O tipo de polidactilia apresentado é a chamada polidactilia pré-axial, com o dígito extra ocorrendo na região do dígito 1 ou polegar (LETTICE *et al.*, 2008; LANGE & MÜLLER, 2017; HAMELIN *et al.*, 2020). Todos os experimentos a seguir foram realizados no laboratório coordenado pelo prof. Dr. John Andrew Cobb, localizado no departamento de Ciências Biológicas da *University of Calgary*, em Alberta, no Canadá, entre novembro e dezembro de 2021. Estes experimentos consistiram na extração de DNA da gata Isabella e posterior reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar a sequência ZRS; seguida de eletroforese, purificação e sequenciamento desta sequência, com o intuito de

verificar se alguma mutação presente em ZRS poderia ser responsável pelo fenótipo de polidactilia apresentado.

Figura 5 – Fotos da gata Isabella



As imagens evidenciam a polidactilia presente em todos os membros da gata Isabella. A: visão dorsal das patas anteriores e posterior esquerda apresentando dígito extra. B e C: visão das almofadas (ou coxins) da gata, evidenciando o dígito extra nas patas posteriores (B) e anterior esquerda (C). Fotos cedidas pelo tutor David Bininda e publicadas com autorização.

### 3.1.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de tecido ovariano da gata Isabella, coletado em uma ovariectomia (cirurgia de esterilização) e gentilmente cedido pelo tutor do animal, David Bininda, que também autorizou todas as análises realizadas. O kit *Monarch® Genomic DNA Purification* (New England Biolabs, MA, EUA) foi utilizado para a extração, segundo protocolo detalhado a seguir. Colocou-se 15 mg de tecido em um microtubo de 1,5 ml livre de DNase. Em seguida, foram adicionados 10 µl de Proteinase K e 200 µl de Tampão de lise tecidual. O microtubo foi então agitado em um vórtex e incubado a 56 °C em bloco térmico com agitação a 1400 rpm por aproximadamente 1 hora. Após a dissolução, foi feita uma centrifugação por 3 min a 12.000 x g com posterior adição de 3 µl de RNase A, seguida de agitação e incubação por 5 minutos a 56 °C no mesmo bloco térmico (1400 rpm). Na sequência, foram adicionados 400 µl de tampão de ligação, seguido de agitação por 10 s. A amostra foi então transferida para uma coluna de purificação com tubo de coleta acoplado, e submetida a duas centrifugações consecutivas: a 1.000 x g por 3 min e a 12.000 x g por 1 min,

respectivamente. A coluna foi transferida para um novo tubo de coleta, recebeu 500 µl de tampão de lavagem e foi invertida algumas vezes. Após esse processo, realizou-se nova centrifugação a 12.000 x g por 1 min e o conteúdo do tubo de coleta foi descartado, repetindo-se o passo anterior na sequência. Posteriormente, a coluna foi acoplada a um novo microtubo e adicionou-se 50 µl de tampão de eluição previamente aquecido a 60 °C. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e centrifugada a 12.000 x g por 1 min, descartando-se a coluna e mantendo-se o conteúdo do microtubo a -20 °C.

### 3.1.3 PCR seguida de eletroforese

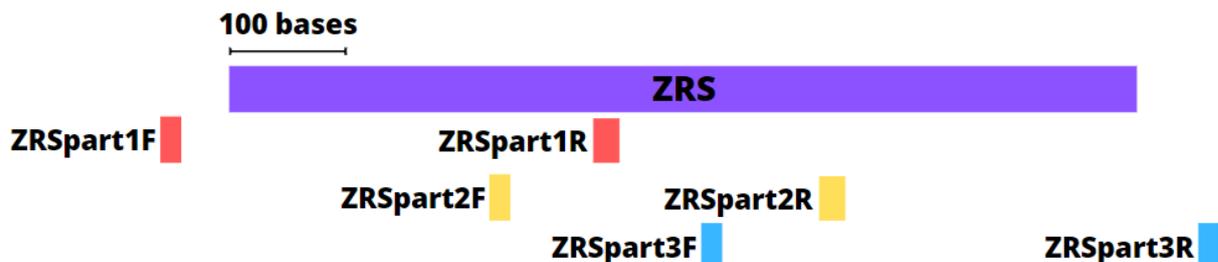
Para a amplificação da sequência ZRS, foram utilizados 3 pares de *primers* ou iniciadores definidos por Hamelin e colaboradores (2020), que dividem ZRS em três partes. Esta estratégia, comum quando se utiliza posteriormente o método de sequenciamento de Sanger, resulta em 3 fragmentos de PCR sobrepostos, visando garantir sequenciamento de boa qualidade em ambos os sentidos de cada fragmento (DENG *et al.*, 2015; ARSENIC *et al.*, 2015). As sequências dos *primers* estão descritas a seguir (Quadro 1), assim como a localização dos *primers* em relação à sequência ZRS no cromossomo A2 de gatos (Figura 6).

Quadro 1 – Informações sobre os *primers* utilizados

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')
ZRSpart1F (parte 1, sentido)	ATCGGGGGCAGATGAAATCAC
ZRSpart1R (parte 1, antissenso)	CACAGGATAGAAACACATGGAACGA
ZRSpart2F (parte 2, sentido)	ACTGACCAGGTGGCAGCAAAG
ZRSpart2R (parte 2, antissenso)	TCCAACAATTTATGGATGATCAGTGG
ZRSpart3F (parte 3, sentido)	TTTGTCTCAGGCCTCCGTCTT
ZRSpart3R (parte 3, antissenso)	GGGGAGGGCAGAGGAATTCTA

*Primers* desenhados por Hamelin e colaboradores (2020).

Figura 6 – Localização dos *primers* utilizados em relação à sequência ZRS



O esquema evidencia a localização dos *primers* em relação à sequência ZRS do gato doméstico (*Felis catus*). A sequência ZRS em gatos localiza-se no cromossomo A2, no íntron 5 do gene *LMBR1*. Adaptado da ferramenta “Genome Browser” da *University of California Santa Cruz* (<https://genome.ucsc.edu/>).

Foram realizadas duas séries de reações: a primeira teve o intuito de verificar se os *primers* (Eurofins Genomics, KY, EUA) amplificariam efetivamente a região ZRS de gatos domésticos (*Felis catus*) nas condições experimentais locais. Para isso, utilizou-se cinco amostras de DNA de gatos *wild type* (WT), ou seja, com fenótipos do tipo selvagem, que não apresentam polidactilia. As amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Isabella Skuplik e nomeadas com as letras de A a E, apresentaram as seguintes concentrações de DNA: A) não especificada; B) 500 ng/μl; C) 2 ng/μl; D) 20 ng/μl; E) 100 ng/μl.

A segunda série de PCR, realizada após a confirmação da qualidade dos produtos da primeira série de reações, partiu da amostra de DNA da gata Isabella, usando as mesmas condições de amplificação da etapa anterior, que são descritas a seguir.

Foram feitas quatro soluções contendo todos os reagentes da PCR, excetuando-se o DNA genômico. Estas soluções diferiam apenas em sua combinação de *primers*:

1) **solução “ZRS”**, contendo os *primers* ZRSpart1F (F, do inglês *Forward* ou senso) e ZRSpart3R (R, do inglês *Reverse* ou antissenso), que amplificariam a sequência ZRS em sua totalidade, resultando em um produto de PCR esperado de 916 pares de base (pb);

2) **solução “ZRSpart1”**, com os *primers* ZRSpart1F e ZRSpart1R, e um produto esperado de 403 pb;

3) **solução “ZRSpart2”**, com os *primers* ZRSpart2F e ZRSpart2R, e um produto esperado de 354 pb;

4) **solução “ZRSpart3”**, com os *primers* ZRSpart3F e ZRSpart3R, e um produto esperado de 407 pb (vide Figura 6).

Ambas as séries de reações utilizaram, por reação, 2,5 u da enzima Taq DNA polimerase no tampão do fabricante (Qiagen, MD, EUA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada dNTP (Qiagen), 0,5 μM de cada *primer* e 4 μl de DNA genômico, em um volume final de 50 μl. O perfil térmico de amplificação consistiu em: a) um ciclo a 94 °C por 4 min; b) 30 ciclos das seguintes condições: 94 °C por 45 s, 56,5 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; c) um ciclo a 72 °C por 9 min.

Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese (90 V por 35 min.) em gel de agarose 1,5 % corado por brometo de etídio (0,1 μl/ml) adicionado diretamente no gel. Para a confecção do gel e para a corrida de eletroforese, utilizou-se o tampão TAE 1 X, que é composto por Tris (tris(hidroximetil)aminometano) a 40 mM, ácido acético a 20 mM e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 1 mM. Aplicou-se 20 μl das amostras, e 4 μl do marcador de peso molecular ou *ladder*, e os resultados foram registrados através de um fotodocumentador, com posterior impressão das imagens em papel fotográfico.

### 3.1.4 Purificação dos fragmentos de ZRS

Após a amplificação por PCR e posterior visualização através da eletroforese, os quatro fragmentos de ZRS da gata Isabella (ZRS, ZRSpart1, ZRSpart2 e ZRSpart3) foram purificados e, para isso, utilizou-se o kit *GeneClean® Turbo Kit* (MP Biomedicals, CA, EUA), segundo instruções do fabricante, resumidas a seguir.

Adicionou-se 150 µl de solução salina a 30 µl de produto de PCR, que foram transferidos à coluna acoplada a um tubo de coleta. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 14.000 x g por 30 s, com posterior descarte do conteúdo do tubo. Adicionou-se 500 µl da solução de lavagem à coluna, que foi submetida a outras duas centrifugações a 14.000 x g por 30 s e 4 min, respectivamente. A coluna foi então transferida para novo tubo de coleta e 30 µl da solução de eluição foram adicionados e o tubo incubado à temperatura ambiente por 5 min. Uma última centrifugação a 14.000 x g por 1 min foi realizada e a coluna, descartada. O tubo contendo a amostra foi então armazenado a -20 °C.

### 3.1.5 Quantificação e sequenciamento dos fragmentos de ZRS

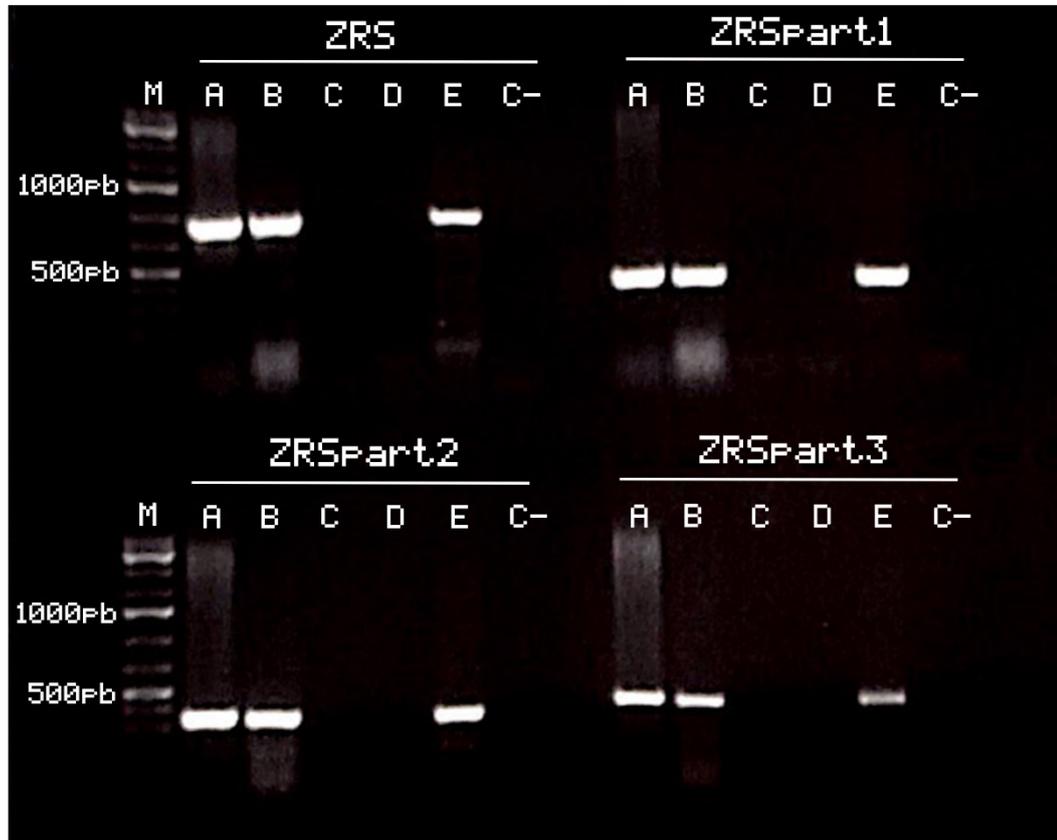
Após a purificação, as amostras foram analisadas por espectrofotometria a fim de mensurar a concentração do DNA. Posteriormente, as amostras foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger em ambos os sentidos (senso e antissenso) pela empresa Eurofins Genetics (KY, EUA). Os eletroferogramas dos oito fragmentos resultantes foram inspecionados manualmente (sequências contínuas com *quality value* ou valores de qualidade > 40 foram considerados aceitáveis, o restante delas sendo descartado das análises) e uma sequência consenso foi gerada a partir de dois *contigs* utilizando o *software DNADynamo* (<https://www.bluetractorsoftware.com/>). Posteriormente, a sequência consenso foi alinhada à sequência ZRS WT de gato doméstico (*Felis catus*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX010805.1/>) utilizando o *software Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 PCR e eletroforese

Os resultados da primeira série de PCR realizada, partindo de amostras de gatos WT, podem ser verificados a seguir (Figura 7):

Figura 7 – Quatro fragmentos da sequência ZRS amplificados por PCR usando cinco amostras de DNA de gatos WT



M: Marcador de peso molecular. As letras de A a E correspondem às amostras de gatos WT utilizadas. C-: controle negativo (todos os reagentes da PCR presentes, com água ultrapura no lugar de DNA genômico).

Ao observar a figura 7, é possível verificar que todos os fragmentos de ZRS esperados foram amplificados com sucesso a partir das amostras A, B e E de gatos WT, as quais tinham as seguintes concentrações de DNA: desconhecida, 500 ng/ $\mu$ l e 100 ng/ $\mu$ l, respectivamente. Em contrapartida, nenhum fragmento de ZRS foi amplificado a partir das amostras C e D, que apresentavam concentrações de DNA de 2 ng/ $\mu$ l e 20 ng/ $\mu$ l, respectivamente. Observa-se também que todas as bandas produzidas apresentam posições compatíveis com os tamanhos esperados (916 pb, 403 pb, 354 pb e 407 pb).

A segunda série de PCR realizada, partindo da amostra de DNA da gata Isabella, amplificou com sucesso todos os fragmentos de ZRS e as bandas produzidas apresentaram posições compatíveis com os tamanhos esperados. Estes resultados podem ser verificados a seguir (Figura 8):

Figura 8 – Quatro fragmentos da sequência ZRS amplificados por PCR usando a amostra de DNA da gata Isabella



M: marcador de peso molecular. Isa: fragmento de ZRS da gata Isabella; C+: controle positivo, utilizando amostra A de gato WT; C-: controle negativo.

### 3.2.2 Quantificação dos fragmentos de ZRS da gata Isabella

A quantificação dos fragmentos de ZRS obtidos por PCR a partir da amostra de DNA da gata Isabella resultou em concentrações de DNA apropriadas (entre 20-40 ng/ $\mu$ l) para o posterior envio à empresa responsável pelo sequenciamento. O fragmento ZRS apresentou concentração de DNA de 35,71 ng/ $\mu$ l; o fragmento ZRSpart1, 30,79 ng/ $\mu$ l; ZRSpart2, 46,54 ng/ $\mu$ l; ZRSpart3, 27,41 ng/ $\mu$ l.

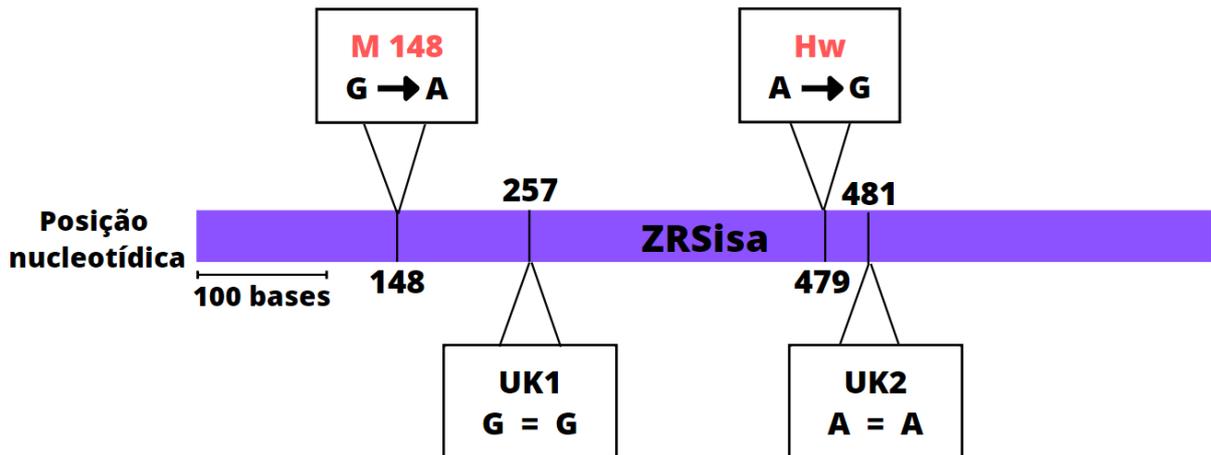
### 3.2.3 Sequenciamento dos fragmentos de ZRS da gata Isabella

O sequenciamento foi realizado para determinar a sequência ZRS da gata Isabella e identificar assim a(s) mutação(ões) possivelmente responsáveis pela sua condição de polidactilia. A sequência consenso completa foi comparada com as mutações descritas por Lettice e colaboradores (2008), sendo elas: UK1, na posição 257; Hw, na posição 479; e UK2, na posição 481.

Após analisar as posições nucleotídicas pertinentes (Figura 9), observou-se que a gata Isabella possui G na posição 257 e A na posição 481, sendo idêntica aos genótipos de referência WT (ver Figura 4) e não possuindo, portanto, as mutações UK1 e UK2, respectivamente. Porém, a gata apresentou G ao invés de A na posição 479, o que é característico da mutação Hw (Figuras 9 e 10, B). Além disso, observou-se uma nova mutação ou polimorfismo de

nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) na posição 148, onde há G no lugar de A, diferindo assim da sequência de referência WT (Figura 9 e 10, A). A sequência completa do alinhamento entre ZRS WT e ZRS da gata Isabella pode ser encontrada no Apêndice.

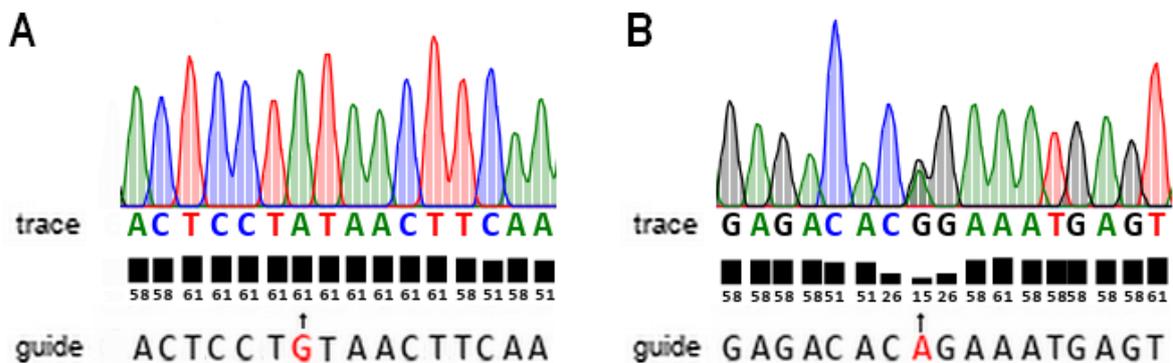
Figura 9 – Mutações presentes na sequência ZRS da gata Isabella



Resultados encontrados para a sequência ZRS da gata Isabella, denominada de ZRSisa, representada em roxo. Sequências com nomes em vermelho correspondem a mutações encontradas na gata Isabella, enquanto aquelas em preto apresentaram bases idênticas às da sequência WT. As quatro caixas representam quatro posições de interesse, três referentes a mutações descritas na literatura e uma referente a um novo polimorfismo. Este, na posição 148, corresponde a uma mutação ainda não descrita (indicada por M 148), onde encontrou-se adenina no lugar de guanina. Nas posições 257 e 481, UK1 e UK2 respectivamente, a gata Isabella não apresentou variações em relação à ZRS WT. Na posição 479 (Hw), a gata Isabella apresentou guanina no lugar da adenina da sequência WT.

Ao observar o eletroferograma da sequência ZRS da gata Isabella, também podemos identificar dois picos na posição 479 (G e A). O *software* aqui usado definiu a guanina para esta posição, já que esta apresentou um pico levemente superior ao da adenina (Figura 10, B). Este resultado sugere que a gata Isabella é heterozigota, contendo um alelo do tipo Hw (com G) e um alelo do tipo selvagem (com A).

Figura 10 – Eletroferogramas da sequência ZRS da gata Isabella nas regiões das mutações identificadas



Regiões da sequência ZRS WT (denominada “*guide*”) e da sequência na gata Isabella (“*trace*”) adjacentes às mutações identificadas. Em A, o novo SNP identificado na posição 148, marcada em vermelho. Em B, a mutação Hw na posição 479, marcada em vermelho. Nesta posição, observa-se dois picos: um correspondente à guanina, em preto, e um correspondente à adenina, em verde. As barras indicam os valores de qualidade para a determinação de cada base da sequência. Adaptada do *software DNADynamo*.

### 3.3 DISCUSSÃO

Os resultados da primeira série de PCR demonstraram que os *primers* utilizados (HAMELIN *et al.*, 2020), sob as condições experimentais do laboratório canadense, foram adequados para a amplificação da sequência ZRS partindo daquelas amostras de gatos WT que apresentavam as maiores concentrações de DNA (B e E), além da amostra com concentração de DNA não especificada (A). As amostras que apresentam menores concentrações de DNA (C e D) foram negativas para todos os fragmentos, sugerindo que a baixa concentração de DNA foi insuficiente para a amplificação (Figura 7). Conforme previsto, os fragmentos amplificados corresponderam aos tamanhos descritos por Hamelin e colaboradores (2020). Vale lembrar que o fragmento ZRS, de 916 pb, engloba a sequência ZRS, que contém 779 pb em gatos domésticos (LETTICE *et al.*, 2003; LETTICE *et al.*, 2008). Como mencionado anteriormente, a sequência reguladora ZRS é altamente conservada entre espécies, contendo 772 pb em humanos e 770 pb em camundongos (LETTICE *et al.*, 2003; LETTICE *et al.*, 2008; WIECZOREK *et al.*, 2010). A segunda série de PCR também alcançou êxito ao amplificar todos os fragmentos de ZRS partindo da amostra da gata Isabella (Figura 8). Semelhante ao observado com as amostras dos gatos WT, os tamanhos dos fragmentos também corresponderam aos tamanhos descritos por Hamelin e colaboradores (2020).

A polidactilia pré-axial (PPD) está entre as mais comuns malformações congênicas dos membros de tetrápodes e é comumente classificada em quatro subtipos: tipo I, caracterizado por polidactilia do polegar/hálux; tipo II, polegares com três falanges; tipo III, polidactilia do dedo indicador; e tipo IV, polissindactilia dos polegares (dígito extras fusionados)

(TEMTAMY & MCKUSICK, 1978; AL-QATTAN, 2018). A PPD em camundongos é um fenômeno bem conhecido, e diversos mutantes já foram descritos, entre eles Hx, do inglês *Hemimelic extra toes* (KNUDSEN & KOCHHAR, 1981; MASUYA *et al.*, 1995; SHARPE *et al.*, 1999). A mutação Hx (Figura 4) está localizada na região proximal do cromossomo 5 do camundongo, próximo ao gene *Shh* (CHANG *et al.*, 1994; MASUYA *et al.*, 1995). Essa região é homóloga à região do braço longo do cromossomo 7 em humanos (mais especificamente, 7q36), na qual foram mapeados genes relacionados ao fenótipo de PPD e próximo de onde também se localiza o gene *Shh* nesta espécie (HING *et al.*, 1995; MASUYA *et al.*, 1995; LETTICE *et al.*, 2002). Estudos realizados em outro mutante de camundongo polidáctilo denominado *Sasquatch* (Ssq), gerado através de um evento de inserção transgênica, demonstrou que SHH era expresso de maneira ectópica na região anterior dos membros que apresentavam dedos extras. Os camundongos heterozigotos para o alelo Ssq apresentavam PPD apenas nos membros posteriores, e os homozigotos apresentavam PPD em todos os membros (SHARPE *et al.*, 1999). Estudos posteriores revelaram que a inserção transgênica em Ssq ocorreu na região do íntron 5 do gene *Lmbr1*, que está 1 Mb à montante (ou *upstream*) do gene *Shh*. Apesar disso, os níveis dos transcritos de *Lmbr1* não foram alterados pela interrupção, o que sugere que os éxons se mantêm intactos e a transcrição do gene não é afetada (LETTICE *et al.*, 2002).

Lettice e colaboradores (2002) também analisaram um humano com PPD (caracterizada neste caso em específico por duplicação do polegar nas mãos, sendo que estes apresentavam três falanges, totalizando seis dedos no membro superior e triplicação do hálux nos pés, totalizando sete dedos no membro inferior) causada por uma translocação t(5 7)(q11,q36), sendo que o ponto de interrupção corresponde à localização do íntron 5 do gene *Lmbr1*. Essas descobertas levaram à hipótese de que a PPD, nestes casos, seria o resultado da interrupção de um regulador cis-atuante presente nesta região gênica (LETTICE *et al.*, 2002). A função regulatória desta sequência foi posteriormente descrita, sendo então sequenciada para diferentes espécies e denominada *zone of polarizing activity regulatory sequence*, ou ZRS (LETTICE *et al.*, 2003). Estes autores também descreveram quatro mutações na sequência ZRS associadas à PPD em humanos pertencentes a famílias não-relacionadas e de diferentes origens (a saber: Dutch, Belgian1, Belgian2 e Cuban), além de identificarem a posição da mutação Hx, que leva à PPD em camundongos (Figura 4) (LETTICE *et al.*, 2003).

A sequência ZRS tem função de regulação cis-atuante do gene *Shh* (LETTICE *et al.*, 2003). Assim, podemos supor que alterações de uma única base nesta sequência, dependendo de sua posição, são suficientes para alterar a afinidade de fatores de regulação, alterando a expressão de *Shh*. Lettice e colaboradores (2012) demonstraram que membros de dois grupos

da família de fatores de transcrição ETS (do inglês *E26 Erythroblast transformation-specific*) (SHARROCKS, 2001) agem diretamente em ZRS, modulando seu efeito sobre *Shh* e definindo o padrão temporal e espacial de expressão deste gene. A ligação normal dos fatores de transcrição ETS1/GABP $\alpha$  (do inglês *GA-binding protein alpha chain*) em cinco diferentes locais da sequência ZRS regula a fronteira da ZPA, enquanto a ligação normal dos fatores de transcrição ETV4/5 (do inglês *ETS translocation variant 4/5*) em dois locais de ZRS restringe a expressão de *Shh* para além da ZPA (LETTICE *et al.*, 2012). Além disso, duas mutações pontuais de substituição de base nestes *motifs* alteraram o padrão de ligação dos fatores ETS e levaram à expressão ectópica de SHH na região anterior do membro, típica da PPD (LETTICE *et al.*, 2012). Outro estudo recente apontou que a proteína HnRNP K (do inglês *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) se liga preferencialmente a sequência ZRS quando esta apresenta uma mutação pontual (posição 446 da sequência ZRS de humanos, T > A), além de também se ligar ao promotor de *Shh* (XU *et al.*, 2020). A proteína HnRNP K possui um papel importante na organização da cromatina e na transcrição, e interage tanto com DNA de fita simples quanto DNA de fita dupla, sendo uma boa candidata para atuar como fator de transcrição de longa distância (XU *et al.*, 2020).

As mutações na sequência ZRS em gatos domésticos anteriormente descritas por Lettice e colaboradores (2008), ocorrem nas posições 257 (UK1), 479 (Hw) e 481 (UK2). Duas delas (UK1 e UK2) foram identificadas em gatos polidáctilos provenientes de diferentes regiões da Grã-Bretanha (n = 8). Já a mutação Hw foi identificada em uma amostra da população dos gatos de Hemingway (n = 8) e de gatos provenientes de outras regiões dos EUA (n = 2). A análise resultante do sequenciamento permitiu concluir que a gata Isabella não apresenta as mutações UK1 e UK2, já que ela possui uma guanina na posição 257 e uma adenina na posição 481 em sua sequência ZRS, sendo estas bases idênticas às da sequência ZRS WT (Figura 9). Em contrapartida, quando se analisa a posição 479, Isabella possui uma guanina em sua sequência ZRS, em contraste com a adenina da sequência WT (Figuras 9 e 10). Assim, constata-se que ela apresenta a mutação Hw, e que esta é, provavelmente, a modificação responsável pela condição polidáctila da gata (LETTICE *et al.*, 2008). A mutação Hw está próxima de uma das regiões de ligação do fator de transcrição ETS que, como mencionado anteriormente, se ligam à sequência ZRS, regulando a expressão de *Shh* (LETTICE *et al.*, 2012). A região de ligação ETS está localizada em uma sequência altamente conservada, começando na posição 484. Portanto, sugere-se que a mutação Hw na posição 479 pode alterar essa região crítica, interrompendo a ligação de ETS à ZRS, expandindo a fronteira da ZPA e levando à expressão

ectópica de *Shh* na região anterior do membro em desenvolvimento, resultando em PPD (LETTICE *et al.*, 2012).

Os gatos polidáctilos eram tidos como amuletos por capitães de navios; por isso, populações destes animais são encontradas principalmente em regiões costeiras que possuem grandes portos (LETTICE *et al.*, 2008). Duas raças de gatos estão historicamente relacionadas à polidactilia: a raça Pixie Bob e a raça Maine Coon (HAMELIN *et al.*, 2017). Esta última é originária do estado do Maine, no nordeste dos EUA, conhecido por suas cidades portuárias, como Portland e Bar Harbor. O estado também faz divisa com o Canadá, ficando a apenas 3,5 horas de balsa da província de Nova Scotia (NOVA SCOTIA CANADA, 2023). A gata Isabella (SRD) é proveniente da cidade portuária de Halifax, capital de Nova Scotia. Portanto, sugere-se que sua linhagem pode ter surgido a partir de populações de gatos polidáctilos trazidos por navios por volta da década de 1930, mesma época que a gata polidáctila *Snow White* foi presenteada a Hemingway por um capitão de navio na ilha portuária de Key West, na Flórida, EUA. Ou seja, os ascendentes de Isabella e de *Snow White* podem ter feito parte da mesma população de gatos fundadora, originando duas linhagens diferentes: uma canadense em Halifax e outra norte-americana, que deu origem aos gatos de Hemingway e, desse modo, compartilhando a mesma mutação (Hw) responsável pelo fenótipo da polidactilia. Outra possibilidade é de que a mutação Hw ter surgido independentemente na linhagem canadense, ou esta linhagem ter se originado de outra população já portadora deste alelo.

O eletroferograma do sequenciamento de ZRS de Isabella mostra dois picos na posição 479 (Figura 10), sugerindo que a gata é heterozigota para a mutação Hw, apresentando um alelo selvagem e um alelo mutante. Um estudo envolvendo gatos polidáctilos da raça Maine Coon (n = 48) apresentou 18 gatos heterozigotos para o alelo Hw, além de identificar dois gatos não-polidáctilos também heterozigotos para Hw, o que sugere penetrância incompleta para a característica em gatos (HAMELIN *et al.*, 2020).

Aproximadamente 60% de uma população de gatos Hw (n = 485) apresentam dígitos a mais apenas nas patas anteriores (LANGE *et al.*, 2013), fazendo de Isabella um caso incomum. Isabella apresenta um dígito a mais em todas as patas, e gatos Hw com este fenótipo representavam 24% da população estudada (LANGE *et al.*, 2013). Apesar disso, um estudo envolvendo gatos da raça Maine Coon de uma linhagem canadense, duas linhagens estadunidenses e uma linhagem alemã mostrou que todos os gatos polidáctilos da linhagem canadense (n = 29) apresentavam dedos extras em todas as patas, assim como Isabella (HAMELIN *et al.*, 2017). Os gatos polidáctilos pertencentes à linhagem canadense estudada não apresentavam as mutações já descritas (Hw, UK1 e UK2), o que sugere que outra mutação

está envolvida no fenótipo de polidactilia destes animais (HAMELIN *et al.*, 2020). O sequenciamento de Isabella define, além da mutação Hw, uma nova mutação na posição 148, onde ela apresenta adenina no lugar da guanina da sequência ZRS WT (Figuras 9 e 10). Portanto, a partir desses resultados, surge uma nova hipótese de que o SNP descrito neste trabalho possa influenciar este fenótipo em conjunto com a mutação Hw. Novos estudos envolvendo gatos apresentando dígitos extras em todas as patas se fazem necessários, focando na investigação desta mutação na posição 148 para avaliar a frequência deste alelo e determinar sua influência sobre a polidactilia. Outras posições de ZRS podem estar envolvidas nesta sinalização, além de outras sequências regulatórias de *Shh*, como pZRS (pré-ZRS), que também está localizada no íntron 5 do gene *LMBRI* (POTUIJT *et al.*, 2018).

#### **4 A GATA ISABELLA ENSINANDO GENÉTICA: TRÊS ATIVIDADES DIDÁTICAS**

O estudo de caso realizado neste trabalho foi originalmente idealizado para basear uma atividade didática a ser aplicada nas aulas teórico-práticas da disciplina CMMB 403 (*Developmental Biology of Animals* – Biologia do Desenvolvimento Animal) para alunos de graduação de cursos das áreas biológicas na Universidade de Calgary, no Canadá. A ideia era utilizar o caso da gata Isabella para contextualização, despertando o interesse para o aprendizado da regulação gênica envolvida no desenvolvimento de membros.

É possível também aplicar este caso para o ensino de Biologia Molecular, utilizando a amostra de tecido da gata polidáctila Isabella para realizar aulas práticas de extração de DNA, preparo de gel de agarose, PCR e eletroforese. Aulas práticas dessa natureza já são realizadas na disciplina BEG7013 (Biologia Molecular I) do curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da UFSC, partindo de amostras da mucosa oral dos próprios estudantes, também com fins de genotipagem, apesar de utilizar marcadores moleculares diferentes. Nestas aulas, os alunos adquirem experiência em técnicas essenciais na pesquisa em Genética, e há um grande engajamento discente por se tratar de casos reais, o que torna o processo muito mais instigante e interessante.

Com o intuito de facilitar o aprendizado dos conceitos complexos da Genética e superar alguns dos desafios apresentados, desenvolveu-se três atividades que têm como público-alvo principal alunos de graduação em cursos das áreas biológicas e da saúde, utilizando o caso da gata Isabella como ponto de partida. Apesar disso, a atividade 1 também pode ser aplicada no Ensino Médio, já que envolve conceitos abordados nas aulas de Biologia neste nível de ensino (BRASIL, 2018). Esta atividade lida com a subárea da Genética denominada Genética Clássica,

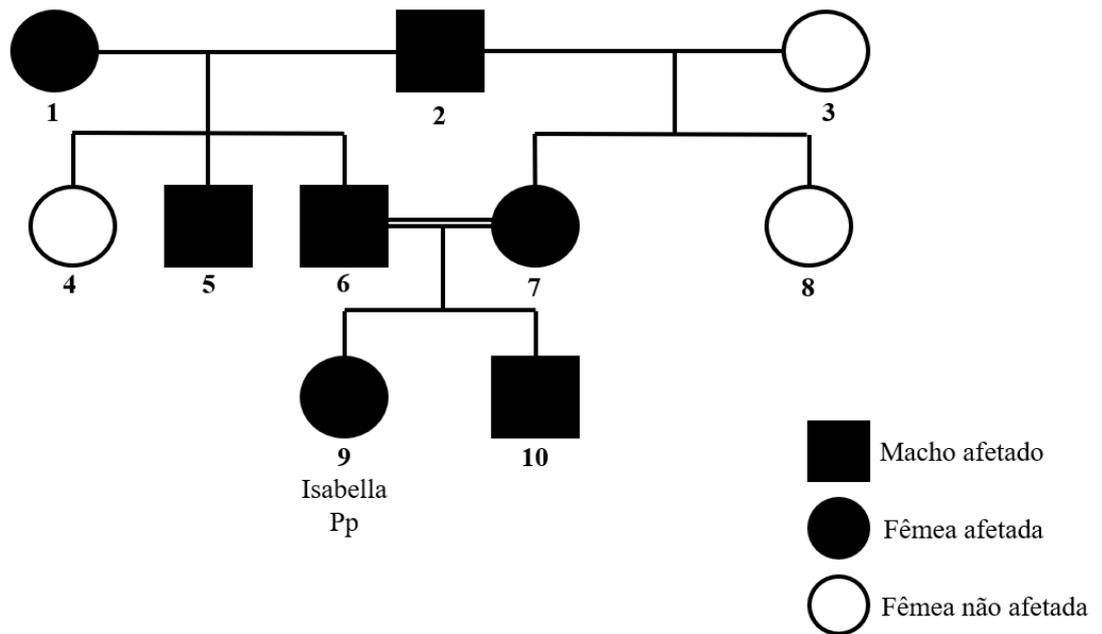
a qual aborda os mecanismos da hereditariedade explicitados pelos famosos experimentos com ervilhas de Gregor Mendel (1822 - 1884), e por isso é também chamada de Genética Mendeliana (VENTURIERI & ROSA, 2010). A atividade 2 aborda a subárea da Biologia Molecular ou Genética Molecular, que estuda a estrutura e função do material genético a nível molecular (RIBEIRO, 2014). Finalmente, a atividade 3 está relacionada com a subárea da Genética Populacional, que investiga a variação genética em nível de populações (SOUZA *et al.*, 2011) e serve de base para o ensino de Evolução.

Os gabaritos apresentados seguem as três atividades para auxiliar os professores na correção das mesmas e dar sugestões de possíveis linhas de debate em sala de aula. As atividades serão publicadas como REAs e estarão disponíveis no *website* do Projeto Imagine (<https://projetoimagine.ufsc.br/>) a fim de serem aplicadas por professores de todo o Brasil e de outros países lusófonos, podendo também ser traduzidas para outros idiomas no futuro, o que aumentaria em muito seu potencial de disseminação e utilização. Além disso, há a perspectiva de disponibilizarmos um questionário a fim de avaliar quão efetivas foram as ferramentas didáticas desenvolvidas em aumentar o engajamento dos alunos e facilitar a assimilação dos conceitos relacionados à genética. Este questionário poderá ser utilizado tanto junto a escolas envolvidas em futuros projetos quanto pelos usuários *online* do Projeto Imagine que aplicarem estes recursos didáticos. As atividades 1, 2 e 3 são descritas a seguir.

### **Atividade 1 – Genética Clássica**

A polidactilia em mamíferos é uma condição caracterizada por dedos extras nos membros anteriores e/ou posteriores. Há vários genes envolvidos em sua herança, sendo que um deles é autossômico e apresenta dominância completa<sup>1</sup>. O alelo dominante deste gene confere o fenótipo da polidactilia. Um estudo com uma gata (*Felis catus*) chamada Isabella\*, que tem polidactilia, revelou que ela é heterozigota para este gene (um de seus alelos é dominante e outro é recessivo). Utilizou-se a letra “P” para o alelo dominante, e “p” para o alelo recessivo. Considerando o heredograma da família de Isabella (identificada pelo número 9), responda as seguintes perguntas:

Figura 11 – Heredograma da família da gata Isabella (Atividade 1)



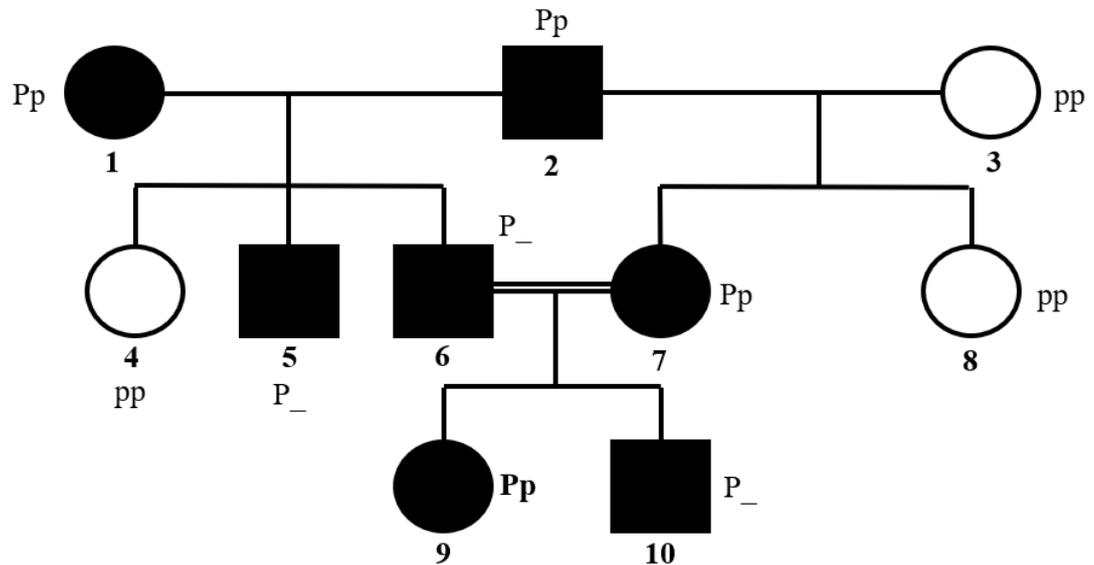
<sup>1</sup> É importante salientar que a polidactilia é um exemplo clássico de penetrância incompleta; ou seja, nem todos os indivíduos com o genótipo para certa característica apresentam o fenótipo esperado. Para fins didáticos, neste exercício consideramos que todos os indivíduos portadores do alelo dominante apresentarão polidactilia.

\*Isabella é uma gata canadense que apresenta polidactilia. Ela vive em Calgary, Alberta, e o heredograma da sua “família” contém dados reais e também fictícios, visando o enriquecimento do exercício.

1. Qual é o genótipo da mãe de Isabella (indivíduo 7)?
2. Qual é o genótipo do pai de Isabella (indivíduo 6)?
3. Considere agora que o pai de Isabella (6) é heterozigoto. Qual é a probabilidade, expressa em fração, do irmão de Isabella (indivíduo 10) ser também heterozigoto para este gene?

## Gabarito da Atividade 1

Figura 12 – Gabarito do heredograma da família da gata Isabella (Atividade 1)



1. Pp. (Partindo do genótipo da gata 8, infere-se que o indivíduo 2 só pode ser heterozigoto. Logo, o indivíduo 7, que é a mãe de Isabella, também só pode ser heterozigoto).
2. Já para o pai de Isabella (indivíduo 6), não podemos ter certeza de seu genótipo baseando-se nas informações que temos no heredograma, podendo ele ser PP ou Pp (representado assim por P\_).
3. Se o pai de Isabella for Pp, podemos então fazer o cruzamento Pp x Pp, e chegamos nas probabilidades de 1/4 de o irmão de Isabella ser PP, 2/4 de ser Pp e 1/4 de ser pp. Porém, já sabemos que ele apresenta polidactilia e, por isso, devemos excluir a probabilidade de pp acontecer. Logo, as novas probabilidades são de 1/3 para PP e 2/3 para Pp. Conclui-se, então, que a probabilidade de o irmão de Isabella ser heterozigoto, nesta situação, é de 2/3.

Figura 13 – Gabarito da questão 3 (Atividade 1)



## Atividade 2 – Genética Molecular

Figura 14 – Sequências ZRS WT e ZRS da gata Isabella (Atividade 2)



Observe as duas sequências de DNA acima representadas. ZRSwt e ZRSisa correspondem a duas sequências nucleotídicas possíveis de um trecho da sequência ZRS do genoma do gato doméstico (*Felis catus*). Esta sigla vem do nome em inglês *ZPA regulatory sequence*. O trecho em questão se situa entre as posições nucleotídicas 451 e 500 (contando a partir do início da transcrição do gene respectivo que, por convenção, denominamos de posição 1). A sequência ZRS atua na regulação de um gene chamado de *Sonic hedgehog* (*Shh*), cuja expressão é responsável pela padronização e desenvolvimento dos dedos nos membros de mamíferos.

1. Nota-se que há uma diferença entre as duas sequências na posição 479 (indicada pela seta vermelha). Qual o nome dado a este tipo de mutação, no qual uma base é trocada por outra?
2. No caso desta mutação específica, observa-se que há um troca de uma adenina (na sequência “selvagem” ou “*wild type*”, aqui denominada de “ZRSwt”) por uma guanina (na sequência mutante “ZRSisa”). Em relação à classificação química das bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), qual é outra denominação dada a essa mutação?
3. A sequência denominada “ZRSisa” pertence a uma gata canadense chamada Isabella, que apresenta um dedo a mais em todas as patas – condição conhecida como polidactilia. Considerando a atuação de ZRS sobre *Shh*, que hipótese(s) podemos levantar sobre o efeito molecular da mutação em questão?

### Gabarito da Atividade 2

1. **Mutação de ponto do tipo substituição de base.**
2. **Transição, pois adenina e guanina são ambas bases púricas (na transição, há uma troca de bases nitrogenadas de mesma natureza química – purina por purina ou pirimidina por pirimidina).**

3. Partindo-se do princípio que: 1) ZRS regula *Shh*, 2) a expressão de *Shh* é responsável pela formação dos dedos e 3) a gata que tem a mutação apresenta dedos a mais, podemos sugerir que a mutação cause alguma alteração na regulação do gene *Shh* (por exemplo, que aumente sua expressão), fazendo com que dedos extras apareçam. *Observação: outras hipóteses são possíveis e bem-vindas para gerar discussão e debate sobre determinismo genético e herança multifatorial em sala de aula – analisar todas as respostas individualmente.*

### Atividade 3 – Genética Populacional

O autor Ernest Hemingway (1899 – 1961) era um apaixonado por gatos domésticos (*Felis catus*). Ele ganhou uma gatinha branca de seis dedos – condição conhecida como polidactilia, que consiste em dedos extras nas patas – de um capitão de navio chamado Stanley Dexter. Os marinheiros eram fãs de gatos polidáctilos, pois acreditavam que eles traziam sorte às viagens, além de controlarem pragas a bordo. Essa linda felina de 6 dedos foi chamada de *Snow White* (Branca de Neve em inglês). Hoje, a casa de Hemingway, em Key West (Flórida, EUA), tornou-se um museu, e tem uma população de 60 gatos\*, todos descendentes da *Snow White*. Considerando que metade deles são polidáctilos; que a população, para fins didáticos, está em equilíbrio de Hardy-Weinberg; e que esta é uma característica autossômica dominante; calcule, para esta população, utilizando duas casas após a vírgula:

1. As frequências fenotípicas;
2. As frequências alélicas;
3. A frequência estimada de indivíduos heterozigotos;
4. O número estimado de indivíduos heterozigotos.

\*Ficou curiosa(o) para saber mais sobre esses gatinhos? Visite <https://www.hemingwayhome.com/our-cats!>

### Gabarito da Atividade 3

1. Frequências fenotípicas:

$$\text{Polidáctilos} = 30/60 = 0,50$$

$$\text{Sem polidactilia} = 30/60 = 0,50$$

2. Frequências alélicas:

$$\text{PP e Pp} = 30 \text{ indivíduos}$$

$$\text{pp} = 30/60 = 0,50$$

$$q^2 = 0,50 \quad p = 1 - q$$

$$q = \sqrt{0,50} \quad p = 1 - 0,71$$

$$q = 0,71 \quad p = 0,29$$

$$p + q = 1$$

**3. Frequência esperada de heterozigotos:**

$$2pq = 2 \times 0,29 \times 0,71 = 0,41$$

**4. Número esperado de indivíduos heterozigotos:**

$$0,41 \times 60 \text{ indivíduos} = 25$$

**Dos 60 gatos, aproximadamente 25 devem ser heterozigotos e 5 homozigotos dominantes (PP).**

**5 CONCLUSÃO**

A gata Isabella é heterozigota, apresentando a mutação Hw em um dos alelos de sua sequência ZRS, sendo esta mutação a provável responsável pelo fenótipo de polidactilia do animal. Ela também apresentou uma nova mutação não descrita na literatura na posição 148, possuindo uma adenina no lugar da guanina, característica da sequência WT. Esta mutação pode influenciar o fenótipo de Isabella, sendo que estudos posteriores são necessários para confirmar esta influência. O estudo de caso da gata Isabella também baseou o desenvolvimento de três atividades didáticas para o ensino de Genética, a fim de despertar o interesse dos alunos, facilitando o entendimento de conceitos complexos e incitando o debate em sala de aula.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Pooja *et al.* *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. **Development**, v. 130, n. 3, p. 623-233, 2003.
- AHN, Kyung *et al.* BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. **Development**, v. 128, n. 22, p. 4449-4461, 2001.
- AHN, Sohyun; JOYNER, Alexandra L. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. **Cell**, v. 118, n. 4, p. 505-516, 2004.
- AL-QATTAN, Mohammad M. Zone of polarizing activity regulatory sequence mutations/duplications with preaxial polydactyly and longitudinal preaxial ray deficiency in the phenotype: a review of human cases, animal models, and insights regarding the pathogenesis. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 2018, Article ID 1573871, 9 p., 2018.
- ARAÚJO, Maurício S. *et al.* A genética no contexto de sala de aula: dificuldades e desafios em uma escola pública de Floriano-PI. **Revista de Ensino de Ciências e Matemática**, v. 9, n. 1, p. 19-30, 2018.
- ARSENIC, Ruza *et al.* Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. **BMC Clinical Pathology**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.
- BRASIL. [Constituição (1988)]. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília, DF: Presidência da República, [2016]. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicao.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm)>. Acesso em: 28 de maio de 2023.
- BRASIL. Ministério da Educação. Base Nacional Comum Curricular. Brasília, 2018. Disponível em: <[http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC\\_EI\\_EF\\_110518\\_-versaofinal\\_site.pdf](http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC_EI_EF_110518_-versaofinal_site.pdf)>. Acesso em: 25 de maio de 2023.
- BURKE, Ann C. *et al.* Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. **Development**, v. 121, n. 2, p. 333-346, 1995.
- BUTTERFIELD, Natalie C.; MCGLINN, Edwina; WICKING, Carol. The molecular regulation of vertebrate limb patterning. **Current topics in developmental biology**, v. 90, p. 319-341, 2010.
- CARDOSO, Livia R.; OLIVEIRA, Veridiana S. O Uso das Tecnologias da Comunicação Digital: desafios no ensino de genética mendeliana no ensino médio. **Informática na Educação: teoria & prática**, v. 13, n. 1, p. 101-114, 2010.
- CHANG, David T. *et al.* Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. **Development**, v. 120, n. 11, p. 3339-3359, 1994.

CHEN, Haixu; JOHNSON, Randy L. Interactions between dorsal-ventral patterning genes *lmx1b*, *engrailed-1* and *wnt-7a* in the vertebrate limb. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 46, n. 7, p. 937-941, 2002.

CHEN, Sisi. The developing limb bud. **Wikipedia commons**, the free media repository. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Limb\\_bud\\_diagram.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Limb_bud_diagram.jpg)>. Acesso em: 11 de maio de 2023.

COHN, Martin J.; TICKLE, Cheryll. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. **Nature**, v. 399, n. 6735, p. 474-479, 1999.

DANFORTH, C. H. Heredity of polydactyly in the cat. **The Journal of Heredity**, v. 38, n. 4, p. 10-112, 1947.

DAVIS, Allan P. *et al.* Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. **Nature**, v. 375, n. 6534, p. 791-795, 1995.

DEALY, Caroline N. *et al.* *Wnt-5a* and *Wnt-7a* are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. **Mechanisms of Development**, v. 43, n.2-3, p. 175-186, 1993.

DELGADO, Irene; TORRES, Miguel. Gradients, waves and timers, an overview of limb patterning models. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 49, p. 109-115, 2015.

DENG, Yi-Mo *et al.* A simplified Sanger sequencing method for full genome sequencing of multiple subtypes of human influenza A viruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 68, p. 43-48, 2015.

GILBERT, Scott F.; BARRESI, Michael J. F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. xxiv, 911 p.

GOLDBACH, Tânia *et al.* Problemas e desafios para o ensino de genética e temas afins no ensino médio: dos levantamentos aos resultados de um grupo focal. **Anais do VII Encontro Nacional de Pesquisa em Educação e Ciência**, v. 7. Florianópolis, 2009. Disponível em: <<http://fep.if.usp.br/~profis/arquivos/viienpec/VII%20ENPEC%20%202009/www.foco.fae.ufmg.br/cd/pdfs/1570.pdf>>. Acesso em: 25 de maio de 2023.

HAMELIN, Alexia *et al.* Clinical characterisation of polydactyly in Maine Coon cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 4, p. 382-293, 2017.

HAMELIN, Alexia *et al.* Genetic heterogeneity of polydactyly in Maine Coon cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 12, p. 1103-1113, 2020.

HARFE, Brian D. *et al.* Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. **Cell**, v. 118, n. 4, p. 517-528, 2004.

HEMINGWAY HOME. The Hemingway Home and Museum, 2021. Página Inicial. Disponível em: <<https://www.hemingwayhome.com/>>. Acesso em: 29 de maio de 2023.

HING, Anne V. *et al.* Linkage of preaxial polydactyly type 2 to 7q36. **American Journal of Medical Genetics**, v. 58, n. 2, p. 128-135, 1995.

KNUDSEN, T. B.; KOCHHAR, D. M. The role of morphogenetic cell death during abnormal limb-bud outgrowth in mice heterozygous for the dominant mutation Hemimelia-extra toe (Hm<sup>x</sup>). **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 65 (Supplement), p. 289-307, 1981.

LANGE, Axel; NEMESCHKAL, Hans L.; MÜLLER, Gerd B. Biased polyphenism in polydactylous cats carrying a single point mutation: the Hemingway model for digit novelty. **Evolutionary Biology**, v. 41, p. 262-275, 2014.

LANGE, Axel; MÜLLER, Gerd B. Polydactyly in development, inheritance, and evolution. **The quarterly review of Biology**, v. 92, n. 1, p. 1-38, 2017.

LETTICE, Laura A. *et al.* Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 99, n. 11, p. 7548-7553, 2002.

LETTICE, Laura A. *et al.* A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 14, p. 1725-1735, 2003.

LETTICE, Laura A. *et al.* Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 7, p. 978-985, 2008.

LETTICE, Laura A. *et al.* Opposing functions of the ETS factor family define *Shh* spatial expression in limb buds and underlie polydactyly. **Developmental Cell**, v. 22, n. 2, p. 459-467, 2012.

LEWANDOSKI, Mark; SUN, Xin; MARTIN, Gail R. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. **Nature Genetics**, v. 26, p. 460-463, 2000.

MACHADO, Maria H. **Genética e questões bioéticas: possibilidades e desafios para o ensino médio**. 2021. 216 f. Tese (Doutorado em Ensino em Biociências e Saúde) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

MASUYA, Hiroshi *et al.* A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. **Genes & Development**, v. 9, n. 13, p. 1645-1653, 1995.

MATOS, Emanuel V. *et al.* Genética prática e aplicada no ensino de biologia e medicina. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 59703-59713, 2020.

NOVA SCOTIA CANADA. Tourism Nova Scotia, 2023. Arrive by sea in Nova Scotia. Disponível em: <<https://www.novascotia.com/travel-info/getting-here/sea>>. Acesso em: 09 de junho de 2023.

PALMEIRA, R. L.; SILVA, A. A. R. da; RIBEIRO, W. L. As metodologias ativas de ensino e aprendizagem em tempos de pandemia: a utilização dos recursos tecnológicos na Educação Superior. **Holos**, v. 36, n. 5, p. 1-12, 2020.

PARR, Brian A.; MCMAHON, Andrew P. Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. **Nature**, v. 374, n. 6520, p. 350-353, 1995.

PENCHASZADEH, Victor B. Problemas éticos do determinismo genético. **Revista Bioética**, v. 12, n. 1, p. 61-68, 2004.

POTUIJT, Jacob W. P. *et al.* A point mutation in the pre-ZRS disrupts sonic hedgehog expression in the limb bud and results in triphalangeal thumb-polydactyly syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1405-1413, 2018.

PROJETO IMAGINE. Projeto Imagine, 2020. Série de vídeos “A Ciência na Pandemia”. Disponível em: <<https://projetoimagine.ufsc.br/a-ciencia-na-pandemia/>>. Acesso em: 28 de maio de 2023.

PROJETO IMAGINE. Projeto Imagine, 2023. Página Inicial. Disponível em: <<https://projetoimagine.ufsc.br/>>. Acesso em: 28 de maio de 2023.

RIBEIRO, Maria C. M. **Genética Molecular**. 1. ed. e 2. reimp. Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2014.

RIDDLE, Robert D. *et al.* Induction of the LIM Homeobox Gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. **Cell**, v. 83, n. 4, p. 631-640, 1995.

SCHERZ, Paul J. *et al.* Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. **Developmental Biology**, v. 308, n. 2, p. 343-354, 2007.

SHARPE, James *et al.* Identification of *Sonic hedgehog* as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant *Sasquatch*. **Current Biology**, v. 9, n. 2, p. 97-100, 1999.

SHARROCKS, Andrew D. The ETS-domain transcription factor family. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 11, p. 827-837, 2001.

SOUZA, Ilíada R. de; TONI, Daniela C. de; CORDEIRO, Juliana. **Genética evolutiva**. 1. ed. Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2011. 231 p.

TEMTAMY, S. A.; MCKUSICK, V. A. The genetics of hand malformations. **Birth Defects Original Article Series**, v. 14, n. 1, p. 1-28, 1978.

TICKLE, C. Patterning systems—from one end of the limb to the other. **Developmental cell**, v. 4, n. 4, p. 449-458, 2003.

TODD, Neil B.; TODD, Lydia M. Mutant alleles frequencies among domestic cats in some eastern areas of Canada: regional homogeneity of factors in Canadian Atlantic Provinces and the French colony of Saint Pierre. **The Journal of Heredity**, v. 67, n. 6, p. 368-372, 1976.

VENTURIERI, Giorgini A.; ROSA, Vivian L. da. **Genética clássica**. 1. ed. Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2010. 116 p.

XU, Caixia *et al.* A novel ZRS variant causes preaxial polydactyly type I by increased sonic hedgehog expression in the developing limb bud. **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 189-198, 2020.

WELLIK, Deneen M.; CAPECCHI, Mario R. *Hox10* and *Hox11* genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 363-367, 2003.

WIECZOREK, Dagmar *et al.* A specific mutation in the distant sonic hedgehog (SHH) cis-regulator (ZRS) causes Werner mesomelic syndrome (WMS) while complete ZRS duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (PPD) with or without triphalangeal thumb. **Human Mutation**, v. 31, n. 1, p. 81-89, 2010.

## APÊNDICE A – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA ZRS DA GATA POLIDÁCTILA ISABELLA (ZRSISA) E DA SEQUÊNCIA ZRS WT (*WILD-TYPE*)

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ZRS <sub>Isa</sub>	ACCTTAATGCCTATCTTTGATTTGGAGTCTTGGCATAAAATTTAACATAAGCGACAGCAA	60
ZRS <sub>Wt</sub>	ACCTTAATGCCTATCTTTGATTTGGAGTCTTGGCATAAAATTTAACATAAGCGACAGCAA *****	60
ZRS <sub>Isa</sub>	CATCCTGACCAATTACCCAAGCTATCCAGACATCCCGAAATGTCCAGAGCATAGCACACG	120
ZRS <sub>Wt</sub>	CATCCTGACCAATTACCCAAGCTATCCAGACATCCCGAAATGTCCAGAGCATAGCACACG *****	120
ZRS <sub>Isa</sub>	GTCTGTAGGATTAAGAGGTTGACTCCTATAACTCAAACGGAGTGCTTGATAATCAAAGC	180
ZRS <sub>Wt</sub>	GTCTGTAGGATTAAGAGGTTGACTCCTGTAACTCAAACGGAGTGCTTGATAATCAAAGC *****	180
ZRS <sub>Isa</sub>	AAAAAGTACAAAATTTGAGGTAACCTCTTTCTTAGCTAATTAGACTGACCAGGTGGCAG	240
ZRS <sub>Wt</sub>	AAAAAGTACAAAATTTGAGGTAACCTCTTTCTTAGCTAATTAGACTGACCAGGTGGCAG *****	240
ZRS <sub>Isa</sub>	CAAAGAGCCGGGTGCCGGTGTGGGAAGCCATAAAGCTGAGCGCTGTGACAGCACAGT	300
ZRS <sub>Wt</sub>	CAAAGAGCCGGGTGCCGGTGTGGGAAGCCATAAAGCTGAGCGCTGTGACAGCACAGT *****	300
ZRS <sub>Isa</sub>	GCAGGAGGGCCGAGGTCGTTCCATGTGTTTCTATCCTGTGTCACAGTGTGAAATTGTCC	360
ZRS <sub>Wt</sub>	GCAGGAGGGCCGAGGTCGTTCCATGTGTTTCTATCCTGTGTCACAGTGTGAAATTGTCC *****	360
ZRS <sub>Isa</sub>	TGGTTTATGTCCCTTTTGGCAAACCTACATAAAAGTGACCTTGTACTGTATTTTATGACC	420
ZRS <sub>Wt</sub>	TGGTTTATGTCCCTTTTGGCAAACCTACATAAAAGTGACCTTGTACTGTATTTTATGACC *****	420
ZRS <sub>Isa</sub>	AGATGACTTTTTCCCCCAGTGGCTAATTTGTCTCAGGCCTCCGTCTTAAAGAGACACGG	480
ZRS <sub>Wt</sub>	AGATGACTTTTTCCCCCAGTGGCTAATTTGTCTCAGGCCTCCGTCTTAAAGAGACACAG ***** *	480
ZRS <sub>Isa</sub>	AAATGAGTAGGAAGTCCAGCGTGGTCTCAGAGAGCTTTCATTGCGTTCTTTCATTATTTT	540
ZRS <sub>Wt</sub>	AAATGAGTAGGAAGTCCAGCGTGGTCTCAGAGAGCTTTCATTGCGTTCTTTCATTATTTT *****	540
ZRS <sub>Isa</sub>	TGCTCGTTTTTGGCACTGATCATCCATAAATTGTTGGACATGAGTGAATAAGGAAGTGCT	600
ZRS <sub>Wt</sub>	TGCTCGTTTTTGGCACTGATCATCCATAAATTGTTGGACATGAGTGAATAAGGAAGTGCT *****	600
ZRS <sub>Isa</sub>	GCTTAGTGTTAGCGGCACATGCGCGTCTTTGGCCTGGTTTTTGTGGGTGAGAGGAAATCA	660
ZRS <sub>Wt</sub>	GCTTAGTGTTAGCGGCACATGCGCGTCTTTGGCCTGGTTTTTGTGGGTGAGAGGAAATCA *****	660
ZRS <sub>Isa</sub>	CATACAAAAGGAAGACTCCTGCTGGGAAACCTTGCAAGGAAATTTACCTGGGTGCGTT	720
ZRS <sub>Wt</sub>	CATACAAAAGGAAGACTCCTGCTGGGAAACCTTGCAAGGAAATTTACCTGGGTGCGTT *****	720
ZRS <sub>Isa</sub>	TTGATCTTGGTGTTTATTACAGAAAATGGACTCATATCTCACTAACTATTGTTATGTGT 779	
ZRS <sub>Wt</sub>	TTGATCTTGGTGTTTATTACAGAAAATGGACTCATATCTCACTAACTATTGTTATGTGT 779 *****	

Alinhamento realizado no *software Clustal Omega*. Os asteriscos indicam identidade entre as sequências. Na posição 148, a sequência ZRS da gata Isabella (ZRS<sub>Isa</sub>) apresenta uma adenina em vez de uma guanina (ZRS<sub>Wt</sub>); já na posição 479, a sequência ZRS de Isabella apresenta uma guanina em vez de uma adenina característica da sequência ZRS<sub>Wt</sub>.