

Análise de DNA para reconstituição histórica: a identificação dos corpos dos Romanov e da variante que causou hemofilia em descendentes da Rainha Vitória

Variante - em genética, trata-se de uma diferença na sequência de DNA de um indivíduo em relação a uma sequência de referência. A maioria das variantes genéticas está fora de genes. Apenas parte das variantes, contidas nos genes, causam diferenças entre indivíduos e, dentre elas, uma pequena parcela pode prejudicar funções essenciais, resultando em doenças.



Laura Machado Lara Carvalho¹, Gustavo Dib Dangoni²,
Ana Cristina Victorino Krepschi³

¹Pós-doutoranda do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

²Doutorando do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

³Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

Autor para correspondência – lauralara@usp.br

Palavras-chave: genealogia, história, STRs, DNA mitocondrial, hemofilia, herança ligada ao X

A análise de material genético de personalidades da história pode responder a perguntas de interesse para a sociedade e tende a ganhar destaque na mídia em todo o mundo. Aqui, vamos tratar de como foi investigado um caso de grande repercussão: o da família de Nicolau II, o último Czar russo, que foi fuzilado, tendo seus restos mortais encontrados somente décadas depois do ocorrido. Explicaremos como a genética permitiu identificar os corpos dos Romanov e desvendou a causa da hemofilia dos descendentes da Rainha Vitória do Reino Unido. Isso foi possível porque, apesar de já não haver descendentes vivos da Rainha Vitória com hemofilia à época das investigações, alguns membros da família Romanov, aparentados da Rainha Vitória, cujos restos mortais puderam ser examinados, tinham a variante causal da doença, havendo material genético disponível para estudo. Investigações genéticas envolvendo grandes personalidades da história são ferramentas interessantes para popularização do conhecimento sobre as técnicas envolvidas e despertam interesse da comunidade não acadêmica em ciência, genética e história. Além disso, casos como os aqui descritos podem ajudar a motivar os estudantes em sala de aula.

Este artigo reúne os casos de grande repercussão envolvendo a identificação genética dos membros da família Romanov e a investigação da causa da hemofilia nos descendentes da Rainha Vitória do Reino Unido. Essas duas investigações estão conectadas pelo fato de que a Czarina Alexandra Romanov, uma descendente da Rainha Vitória, tinha um filho afetado por essa doença. Convidamos você, leitor, a explorar conosco essas investigações fascinantes, que utilizaram técnicas de genética molecular para buscar soluções para reconstituição histórica.

A morte dos Romanov

Os Romanov governaram a Rússia por mais de 300 anos. Após a Revolução Russa de 1917, evento que representou o início da construção de um estado socialista, o último Czar no poder, Nicolau II e sua família – sua esposa, a Czarina Alexandra, e seus cinco filhos Olga, Tatiana, Maria, Anastasia e o Czarevich (“príncipe herdeiro”) Alexei – foram mantidos no exílio em Yekaterinburg, na Rússia.

Também estavam com a família imperial quatro de seus funcionários: Dr. Eugene Bo-

tkin (médico da família), Alexei Trupp (criado do Czar), Anna Demidova (empregada doméstica da Czarina) e Ivan Kharitonov (cozinheiro da família).

Em 1918, a família do Czar Nicolau II, os três funcionários domésticos e o médico foram fuzilados (11 pessoas no total). Após as mortes, os corpos foram desfigurados, mutilados e enterrados. Em 1979, durante a construção de uma ferrovia, os restos mortais de nove corpos foram encontrados em uma vala comum, fato que ficou em segredo por alguns anos. Somente em 1991, com o fim da URSS (União das Repúblicas Socialistas Soviéticas), ocorreu a exumação dos restos mortais.

A sexagem genética dos corpos

Além das análises de morfologia óssea, foi utilizada também a análise genética para identificar o sexo biológico de cada uma das ossadas encontradas nessa vala comum: foi avaliado o gene da amelogenina (Figura 1). A amelogenina é uma proteína importante na formação do esmalte dentário,

sendo codificada pelos genes homólogos *AMELX* e *AMELY* que estão localizados nos cromossomos X e Y, respectivamente. O tamanho e a sequência do gene da amelogenina do cromossomo X (*AMELX*) difere um pouco do que fica no cromossomo Y (*AMELY*) e essa diferença pode ser explorada para sexagem genética, isto é, para identificar se o indivíduo é XX ou

XY. Como as pessoas do sexo biológico feminino têm dois cromossomos X, espera-se que elas tenham apenas o *AMELX*, em duas cópias, enquanto as do sexo masculino têm *AMELX* e *AMELY*. Dessa forma, foi possível verificar que, dos nove corpos identificados na vala comum, cinco eram de pessoas do sexo cromossômico masculino e quatro do feminino.

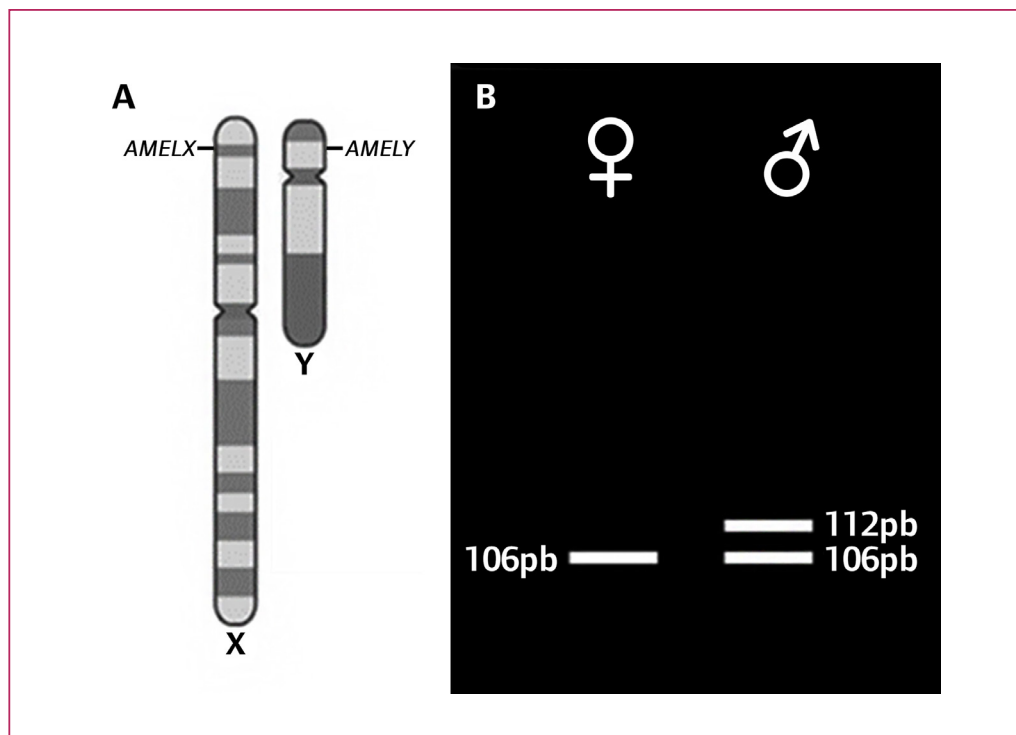


Figura 1. Gene da amelogenina e sua utilização para identificar o sexo cromossômico. (A) Localização dos genes da amelogenina nos cromossomos X e Y e (B) metodologia empregada para sexagem dos 11 corpos identificados em uma vala comum. Os investigadores amplificaram por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) uma região do gene da amelogenina que leva a um produto de 106 pares de bases (pb) a partir do alelo do cromossomo X e de 112 pb no do cromossomo Y. Como mulheres não têm o cromossomo Y, a apresentação é de apenas uma banda de 106 pb; para os homens são observadas as duas bandas (106 e 112pb). Para melhor compreensão sobre a técnica de PCR, consulte o artigo publicado nesta revista: Oliveira, E. H. D. de, & Pereira, T. C. (2019). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Genética Na Escola*, 14(2), 88–97. <https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2019.318>

O estabelecimento do grau de parentesco entre os corpos encontrados

Para identificar o grau de parentesco entre os corpos encontrados na vala, foram analisados cinco marcadores genéticos muito **polimórficos** do tipo **repetições em tandem** curtas (STRs – do inglês *Short Tandem Repeats*) de **cromossomos autosossomos**. Uma representação esquemática da

lógica de análise de perfil de STRs para estabelecer relações de parentesco entre pais e filhos é apresentada na Figura 2. Esse tipo de marcador é muito utilizado em ciências forenses para identificação humana e em investigação de paternidade. Destacadamente, as tecnologias de identificação humana têm uso relevante não apenas para desvendar questões referentes a grandes personagens da história, mas principalmente de “gente como a gente”, por questões de paternidade e porque podem ajudar a reduzir o sofrimento de famílias que vivem hoje com a dor e a incerteza que surgem quando um ente querido está desaparecido.

Polimórficos - lócus que têm variabilidade na sequência genética, considerando a população.

Repetições em tandem - são sequências de DNA em que um padrão específico de nucleotídeos se repete várias vezes consecutivamente (em série).

Cromossomos autosossomos - são os cromossomos que não fazem parte do par sexual. As células somáticas de seres humanos têm 22 pares de autosossomos e um par de cromossomos sexuais (X e Y).

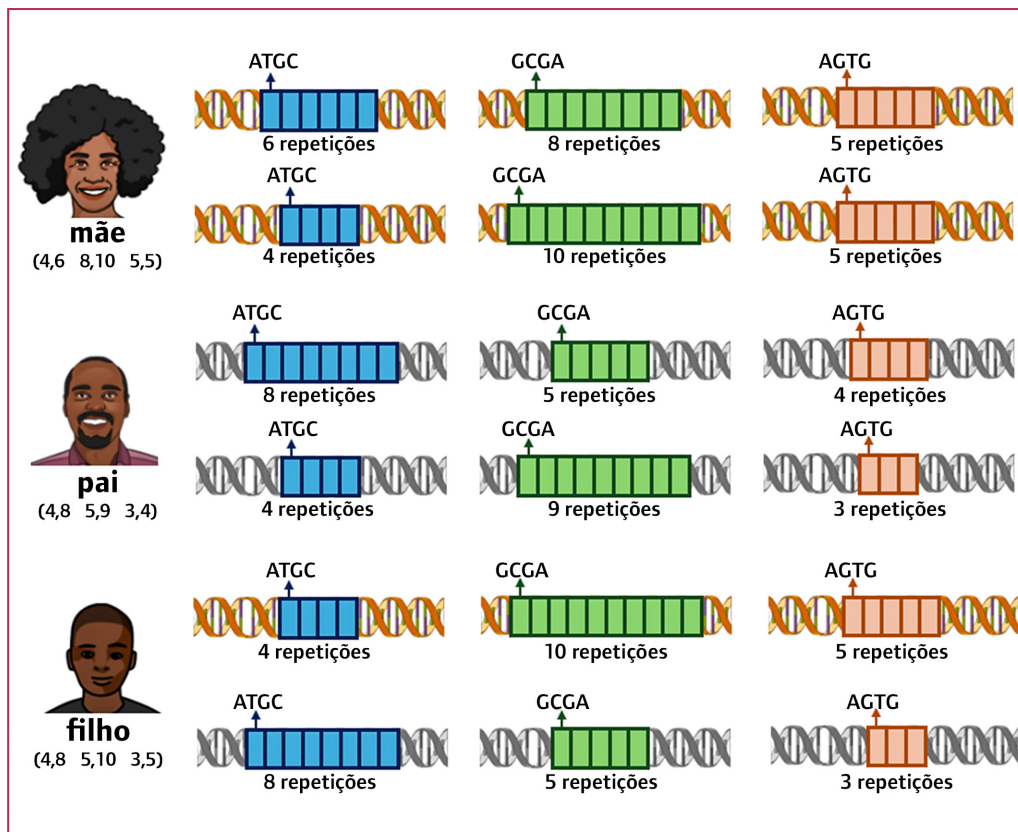


Figura 2. A segregação de alelos STRs autossômicos de três diferentes loci em uma família hipotética. Os STRs são sequências que se repetem em tandem. O número de repetições é variável. Cada indivíduo tem dois alelos de cada STR autossômico, sendo um herdado do genitor feminino (mãe) e outro do genitor masculino (pai). Neste esquema, os STRs de cada indivíduo são apresentados entre parênteses com números que indicam a quantidade de repetições. No filho, os STRs representados em loci de cor laranja foram herdados da mãe; e em loci de cor cinza foram herdados do pai.

O resultado da análise de um locus STR nos nove corpos identificados na vala é apresentado na Figura 3 e a Tabela 1 resume os resultados para os cinco loci STR analisados

nessa investigação. Perceba que os resultados apresentados na Tabela 1 são compatíveis com as relações de parentescos do heredograma da Figura 3.

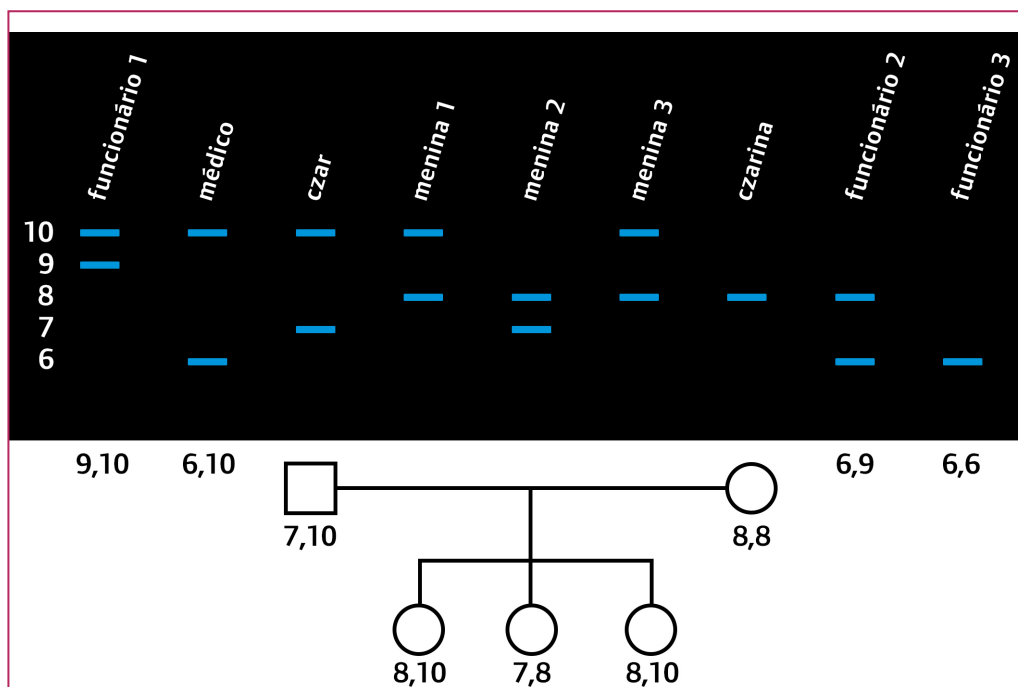


Figura 3. Análise do locus STR 1 (*HUMTH01*) nos nove esqueletos. As bandas azuis representam os produtos da amplificação do marcador STR 1 (*HUMTH01*). Os números de repetições de cada banda são apresentados à esquerda da imagem. Também estão indicados quais alelos desse locus foram identificados em cada um dos nove esqueletos. Imagem baseada nos resultados de pesquisa apresentados por Gill e colaboradores (*Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*. Nat Genet. 1994. <https://doi.org/10.1038/ng0294-130>).

esqueleto	STR 1 (TH01)	STR 2 (VWA/31)	STR 3 (13A1)	STR 4 (FES/FPS)	STR 5 (ACTBP2)
funcionário 1	9,10	14,20	6,16	10,11	-
médico	6,10	17,17	5,7	10,11	11,30
Czar	7,10	15,16	7,7	12,12	11,32
menina 1	8,10	15,16	5,7	12,13	11,32
menina 2	7,8	15,16	5,7	12,13	11,36
menina 3	8,10	15,16	3,7	12,13	32,36
Czarina	8,8	15,16	3,5	12,13	32,36
funcionário 2	6,9	15,17	5,7	8,10	-
funcionário 3	6,6	16,17	6,7	11,12	-

Tabela 1. Resultados obtidos a partir da análise de cinco locus STR dos nove esqueletos. Para cada locus STR analisado, é possível observar que para cada esqueleto atribuído às filhas dos Czares há um alelo herdado do pai e um da mãe. Para os funcionários não foi possível obter o genótipo para o locus ACTBP2 (STR 5) devido a uma limitação de qualidade das amostras, o que foi representado com hífen. Os dados da tabela foram obtidos na publicação de Gill e colaboradores (*Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*. Nat Genet. 1994. <https://doi.org/10.1038/ng0294-130>).

Investigação da matrilinearidade dos Czares: análise de DNA mitocondrial (DNAMt)

Para verificar se os restos mortais atribuídos aos Czares e suas filhas pertenciam às linhagens maternas esperadas, foram analisadas duas **regiões hipervariáveis** (HVR1 e HVR2) de DNAMt, em comparação com amostras de parentes. O DNAMt tem como particularidade a transmissão uniparental, pois herdamos as mitocôndrias apenas das nossas mães. Utilizou-se amostra do Príncipe Philip (Duque de Edimburgo; marido da Rainha Elisabete II do Reino Unido), por ser sobrinho-neto de Alexandra e pertencer à mesma matrilinearidade dela. Para verificar a identidade do Czar Nicolau II foi utilizada amostra de Xenia Sfiri, uma parente distante que tem a mesma matrilinearidade do Czar (Figura 4).

Na análise de DNAMt para confirmar a matrilinearidade da Czarina e seus filhos, houve uma sobreposição perfeita das re-

giões hipervariáveis desses indivíduos com as do Príncipe Philip (Tabela 2). Já na análise do DNAMt do Czar em comparação com o de Xenia Sfiri houve uma sobreposição perfeita para HVR2 (dado não mostrado), mas foi identificada uma **heteroplasmia** na HVR1 do Czar, ausente em sua parente matrilinear Xenia Sfiri. Uma amostra de James Carnegie (Duque de Fife; não representado na Figura 4), primo em terceiro grau de Nicolau II e de mesma matrilinearidade, também foi avaliada, com o mesmo resultado que na comparação com Xenia Sfiri. A identificação dessa heteroplasmia no Czar gerou dúvidas e, para esclarecimento, realizaram a exumação do corpo de um irmão dele, Jorge Alexandrovich, que estava enterrado em São Petesburgo (Rússia), cujo DNAMt tinha a mesma heteroplasmia (Figura 5). Isso indica que a mãe do Czar tinha essa heteroplasmia, mas as cópias de DNAMt contendo C (citosina) nessa posição se perderam ao longo das gerações; por isso Xenia e o Duque de Fife apresentavam apenas a cópia com T (timina). Alternativamente, a heteroplasmia em Xenia e no Duque de Fife pode ter uma frequência muito baixa da variante contendo C (citosina), não detectável pelo sequenciamento da época.

Matrilinearidade - filiação unilinear na qual se considera apenas a descendência pelo lado materno.

Heteroplasmia - fenômeno que se caracteriza pela coexistência de moléculas de DNA mitocondrial com sequências nucleotídicas diferentes, sendo decorrente de mutações no DNAMt.

Regiões hipervariáveis - são as porções mais polimórficas do DNA, em níveis populacionais.

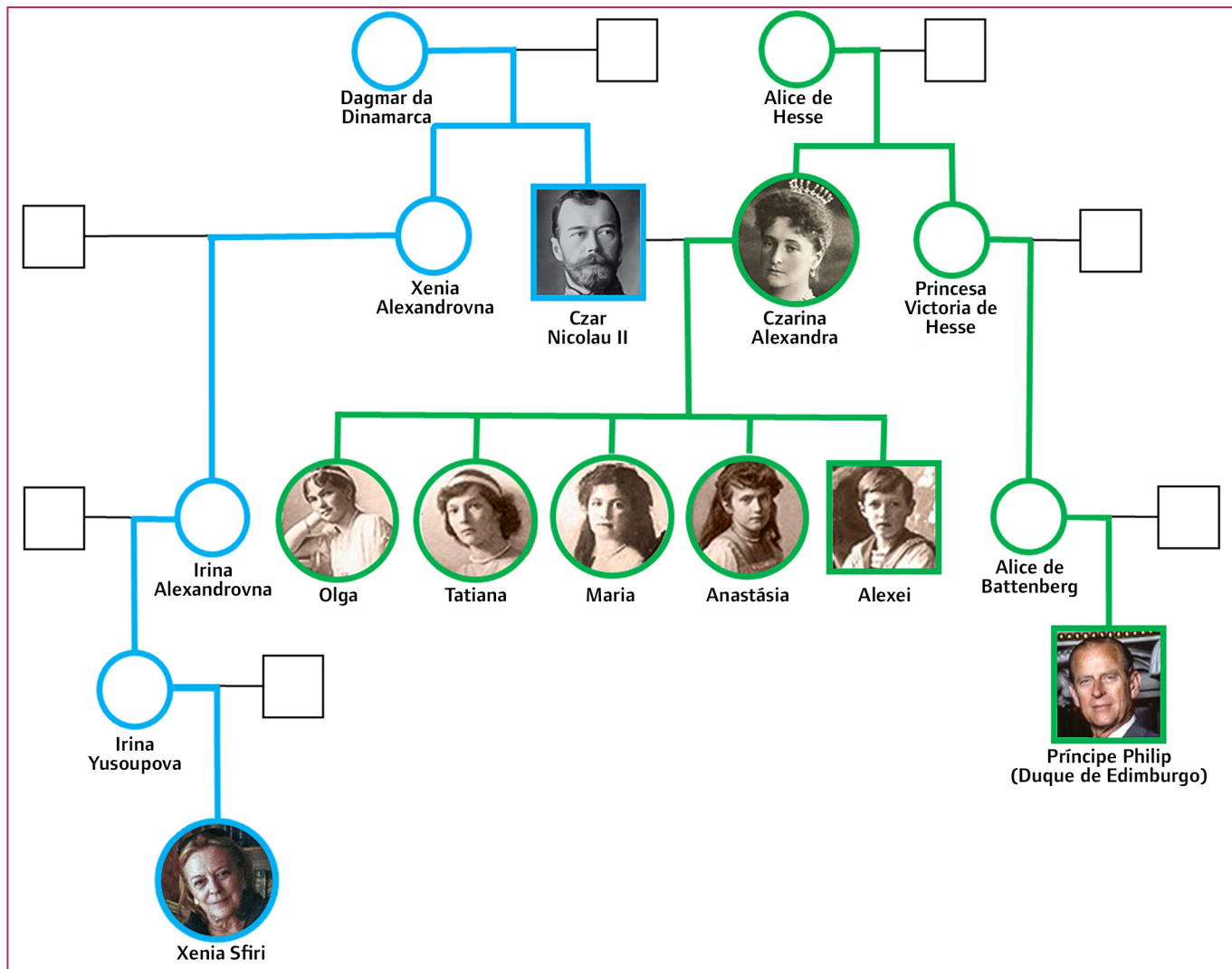


Tabela 2. Resultado da análise de DNAmT da Czarina e suas filhas, em comparação com a do Príncipe Philip. HVR1 - região hipervariável 1 do DNAmT humano; HVR2 - região hipervariável 2 do DNAmT humano. Os pontos representam nucleotídeos que são os mesmos presentes na sequência de referência previamente estabelecida (*Cambridge Reference Sequence* – CRS - Anderson et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981. doi:10.1038/290457a0). Os números correspondem às posições dos nucleotídeos na CRS, mas apenas os nucleotídeos que diferem da sequência de referência foram discriminados. O hífen representa um nucleotídeo para o qual não foi possível fazer a leitura por limitação técnica. A interpretação desses resultados é de que há uma correspondência entre o DNAmT do Príncipe Philippe, da Czarina e de suas filhas. Os dados da tabela foram obtidos na publicação de Gill e colaboradores (Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*. 1994. <https://doi.org/10.1038/ng0294-130>).

Figura 4. Segregação do DNAmT das genitoras dos Czares. A segregação do DNAmT da mãe do Czar Nicolau II (Dagmar da Dinamarca) é representada em azul. A segregação do DNAmT da mãe da Czarina Alexandra (Alice de Hesse) é representada em verde. Apenas as mulheres transmitem o DNAmT. Os indivíduos para os quais são apresentadas fotos tiveram seu DNAmT analisado.

origem da amostra	tipo de amostra	HVR1	HVR2
menina 1	fêmur	T C	. . . G . . C
menina 2	fêmur	T C	. . - G . . C
menina 3	fêmur	T C	. . . G . . C
Czarina	fêmur	T C	. . . G . . C
príncipe Philip	sangue	T C	. . . G . . C
		16111	263
		16357	315.1

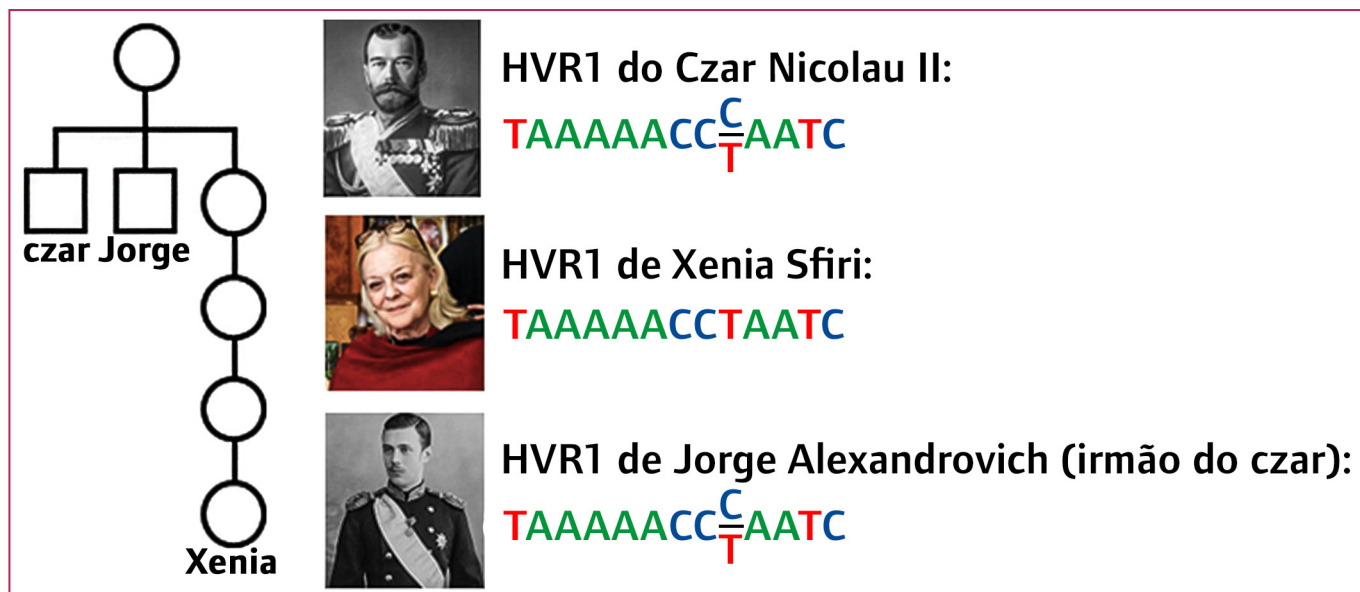


Figura 5.

A sequência da região HVR1 do Czar tem correspondência com a de Xenia Sfri, exceto por um nucleotídeo, no qual foi identificada heteroplasmia, também detectada em seu irmão Jorge Alexandrovich. HVR1 – região hipervariável 1 do DNAm. A HVR1 do Czar Nicolau II é compatível com a de Xenia Sfri – parente viva de mesma matrilinearidade –, exceto por um ponto, no qual foram identificados dois nucleotídeos (C e T), o que caracteriza heteroplasmia. Mais tarde, Jorge Alexandrovich, irmão do Czar que faleceu de tuberculose, teve seus restos mortais exumados para análise de DNAm, que revelou a mesma heteroplasmia. Os dados apresentados nesta figura foram obtidos na publicação de Ivanov e colaboradores (Mitochondrial DNA sequence heteroplasmly in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet.* 1996 <https://doi.org/10.1038/ng0496-417>).

Antropométricos - caracteres que correspondem às medidas das dimensões físicas de uma pessoa.

Bolchevique - grupo que defendia uma mudança política radical pelo povo russo, tendo chegado ao poder na Revolução de 1917.

Para saber mais sobre o DNAm, consulte o artigo publicado nesta revista sobre o tema: Mingroni-Netto, R. C. (2018). Por dentro do círculo: o DNA mitocondrial. *Genética Na Escola*, 13(1), 2–13. <https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2018.295>

A lenda da princesa perdida

A cova inicialmente identificada continha os restos mortais de 11 pessoas, atribuídos aos Czares, três de suas filhas, três funcionários domésticos e o médico da família. Estudos **antropométricos** indicaram que Olga e Tatiana estavam presentes, pela compatibilidade dos ossos com jovens naquelas idades. Porém, a identidade da terceira filha presente na cova não era consenso entre os pesquisadores, podendo ser Maria ou Anastásia (Figura 4).

Rumores que sugeriam que Anastásia poderia ter sobrevivido eram alimentados pela ausência de uma das meninas na cova. Várias mulheres afirmavam ser Anastásia, sendo Anna Anderson a mais conhecida, que dizia ter sido resgatada por um **Bolchevique** compassivo. Anna foi capa de jornais e revistas por décadas; ela teve muitos apoiadores e vivia luxuosamente. A lenda da princesa russa perdida também inspirou algumas produções cinematográficas. Em 1928, apenas

uma década após o fuzilamento dos Romanov, saíram os dois primeiros filmes baseados nisso. Em 1956 foi lançado outro filme e em 1986 uma série da NBC (rede de televisão dos EUA), mas a produção mais conhecida é a animação musical da Fox, de 1997.

Anna Anderson foi cremada, impossibilitando a obtenção de material genético de seu cadáver. No entanto, conseguiram uma amostra de intestino que tinha sido obtida durante uma cirurgia ocorrida em 1979. Essa amostra estava preservada em parafina, um procedimento que costuma ser realizado quando se vai analisar em microscópio (biópsia). Um estudo genético demonstrou então que Anna Anderson não poderia ser Anastásia Romanov. Quatro dos cinco lócus STRs de autossomos analisados eram incompatíveis com o resultado esperado para uma possível filha dos Czares.

Uma investigação financiada pelo irmão da Czarina, Ernest Louis, identificou Anna Anderson como Franziska Schanzkowska, uma operária polonesa com histórico de doenças mentais. O DNAm da amostra de intestino de Anna e de fios de cabelo atribuídos a ela foi comparado com o do Príncipe Philip (Figura 4) e de um sobrinho-neto de Franziska, Carl Maucher. Como resultado, o DNAm de Anna/Franziska era incompatível com o do Príncipe, mas compatível com o de Carl Maucher.

A identificação de uma segunda vala com os corpos que faltavam

A maior parte da família foi enterrada na cova que continha os restos mortais de 11 pessoas. Mas onde estariam os restos mortais de Alexei e da menina que faltava? Eles foram levados para outro lugar, provavelmente para confundir em exumações subsequentes. Em 2007, a descoberta de uma cova rasa próxima à primeira, contendo fragmentos do esqueleto de uma jovem de 18 a 25 anos e de um menino de 10 a 14 anos, levou a mais investigações.

O sexo genético dos restos mortais identificados na segunda vala foi confirmado por análise do gene da amelogenina. Foi realizada então uma investigação de locus STR do cromossomo Y a partir de DNA extraído dos esqueletos do menino e do Czar. Assim como o DNAMt, o cromossomo Y tem como particularidade ser de transmissão uniparental. O cromossomo Y é transmitido apenas pelo genitor masculino para os filhos homens. Os STR do cromossomo Y do Czar Nicolau II e do menino encontrado na segunda vala foram comparados com os de Andrew Andreevich, um parente distante, mas que pertence à mesma **patrilineagem** do Czar, conforme Figura 6. Concluiu-se que os restos mortais atribuídos ao Czar e a Alexei tinham o mesmo Y de Andrew.

Patrilineagem - filiação unilinear no qual se considera apenas a descendência pelo lado paterno.

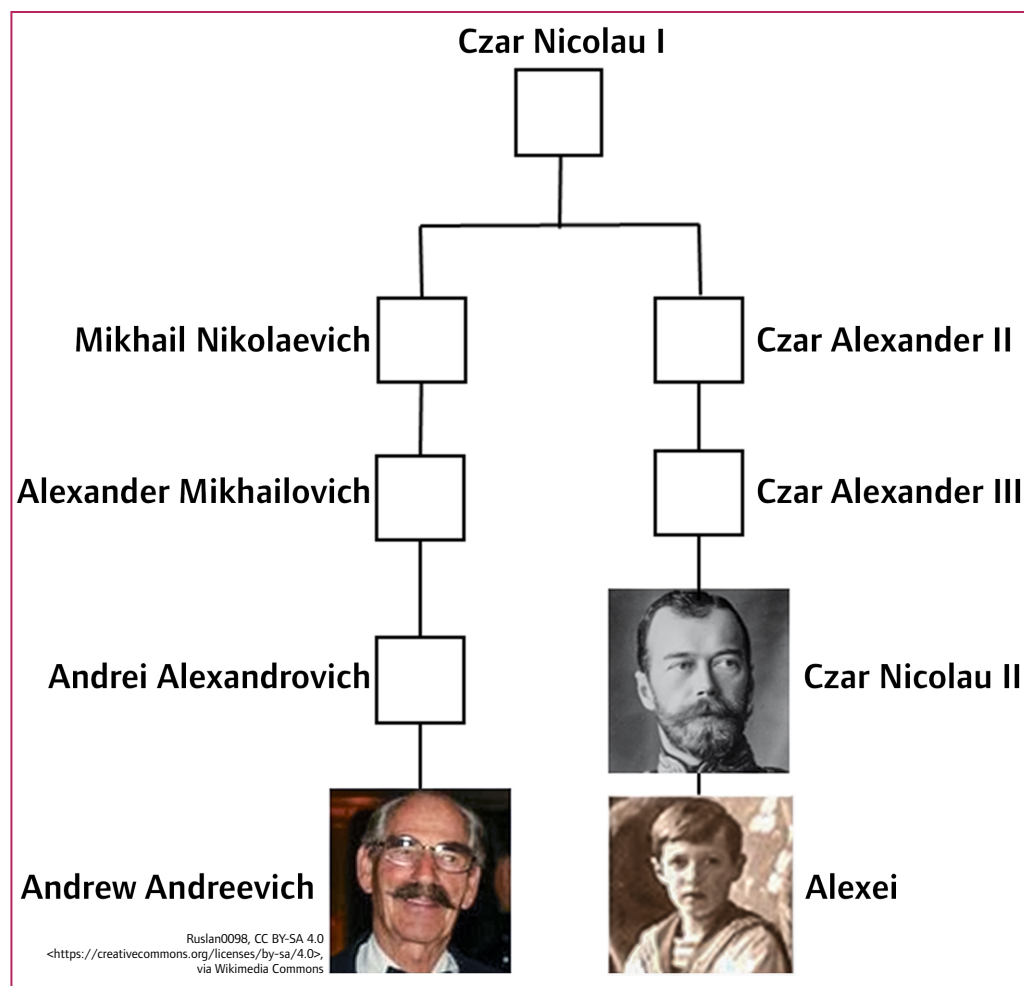


Figura 6. Patrilineagem do Czar Nicolau II. Os restos mortais atribuídos ao Czar Nicolau II e a Alexei tiveram locus STR do cromossomo Y avaliados em comparação com os de um parente vivo de mesma patrilineagem (Andrew Andreevich).

Para ambos os restos mortais identificados nessa segunda vala, foram realizadas também análises de DNAMt e de 15 STRs de autossomos, com dados confrontados com os da primeira vala e os de parentes vivos.

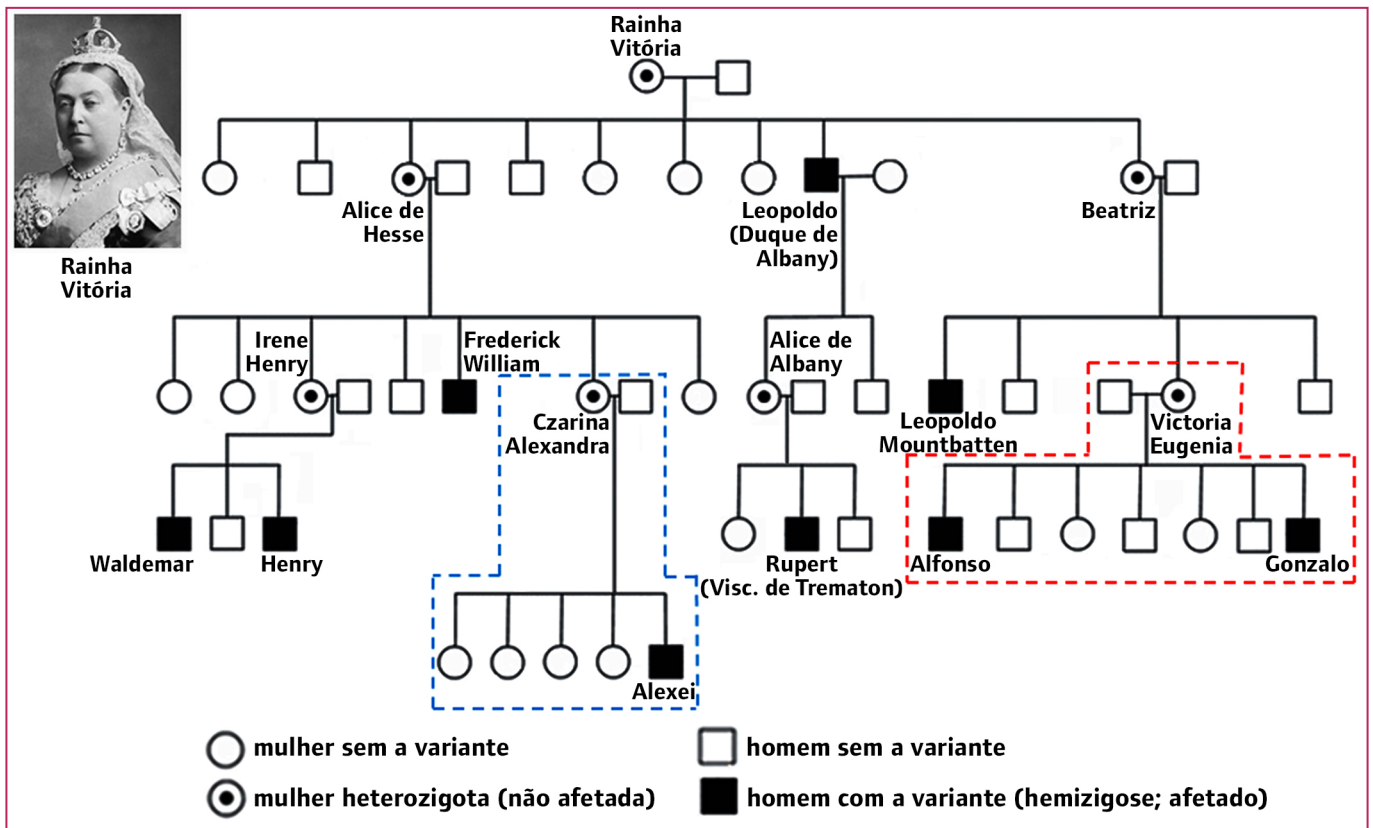
Em conclusão, os dois corpos da segunda vala eram de um casal de filhos dos Czares. Dessa forma, os restos mortais dos Czares e de seus cinco filhos tinham sido finalmente encontrados.

A “Doença Real”

A Rainha Vitória do Reino Unido (Figura 7), conhecida como “a avó da Europa”, teve nove filhos e 42 netos, sendo que vários deles se casaram com outros membros da realeza e de famílias nobres. Um de seus filhos, Leopoldo, tinha hemofilia, uma doença hereditária que tem como etiologia mutações em genes de fatores da coagulação e, conseqüente, apresentava sangramento prolongado em decorrência de traumas cotidianos e **equimoses** excessivas, entre outros sinais

clínicos. Também vários netos da Rainha Vitória manifestaram essa condição, sendo todos do sexo masculino. Os descendentes reais que manifestaram essa doença incluíam alguns bisnetos da Rainha Vitória, o Czarévich Alexei da Rússia (filho da Czarina Alexandra e do Czar Nicolau II) e os Príncipes da família real espanhola Alfonso e Gonzalo (Figura 7). Atualmente, não há descendentes vivos conhecidos da Rainha Vitória com essa doença, sendo impossível investigar a mutação causal da condição sem recorrer a restos mortais de membros afetados da família.

Equimoses - manchas na pele que são decorrentes do rompimento de pequenos vasos (capilares) sanguíneos.



O padrão de segregação da hemofilia na grande família da Rainha Vitória sugere um padrão de herança ligado ao X recessivo, pois as mulheres heterozigotas com a variante não manifestam o fenótipo, mas ao transmiti-la aos seus descendentes do sexo masculino eles são afetados (Figura 7). De fato, há dois tipos de hemofilia de herança ligada ao X recessiva: a hemofilia A e a hemofilia B (ou doença de Christmas). A hemofilia A é causada por uma deficiência do fator VIII da coagulação, em decorrência de mutações no gene que o produz (*F8*).

Já a hemofilia B é causada por mutações no gene *F9*, que gera deficiência do fator IX da coagulação. Ambos os genes (*F8* e *F9*) estão localizados no cromossomo X (Figura 8) e, dessa forma, as mulheres têm duas cópias deles, enquanto os homens têm apenas uma. Há uma terceira forma de hemofilia, a do tipo C, que é mais rara e tem outro padrão de herança (autossômico recessivo). A hemofilia C está relacionada com a deficiência do fator XI da coagulação e o gene que codifica essa proteína (*F11*) está localizado no cromossomo 4.

Figura 7. A Rainha Vitória do Reino Unido (1819-1901) e um heredograma que evidencia a segregação da hemofilia em sua descendência. A segregação da hemofilia na família imperial russa e na família real espanhola estão destacadas por linhas tracejadas em azul e vermelho. Nem todos os descendentes da Rainha Vitória do Reino Unido estão representados.

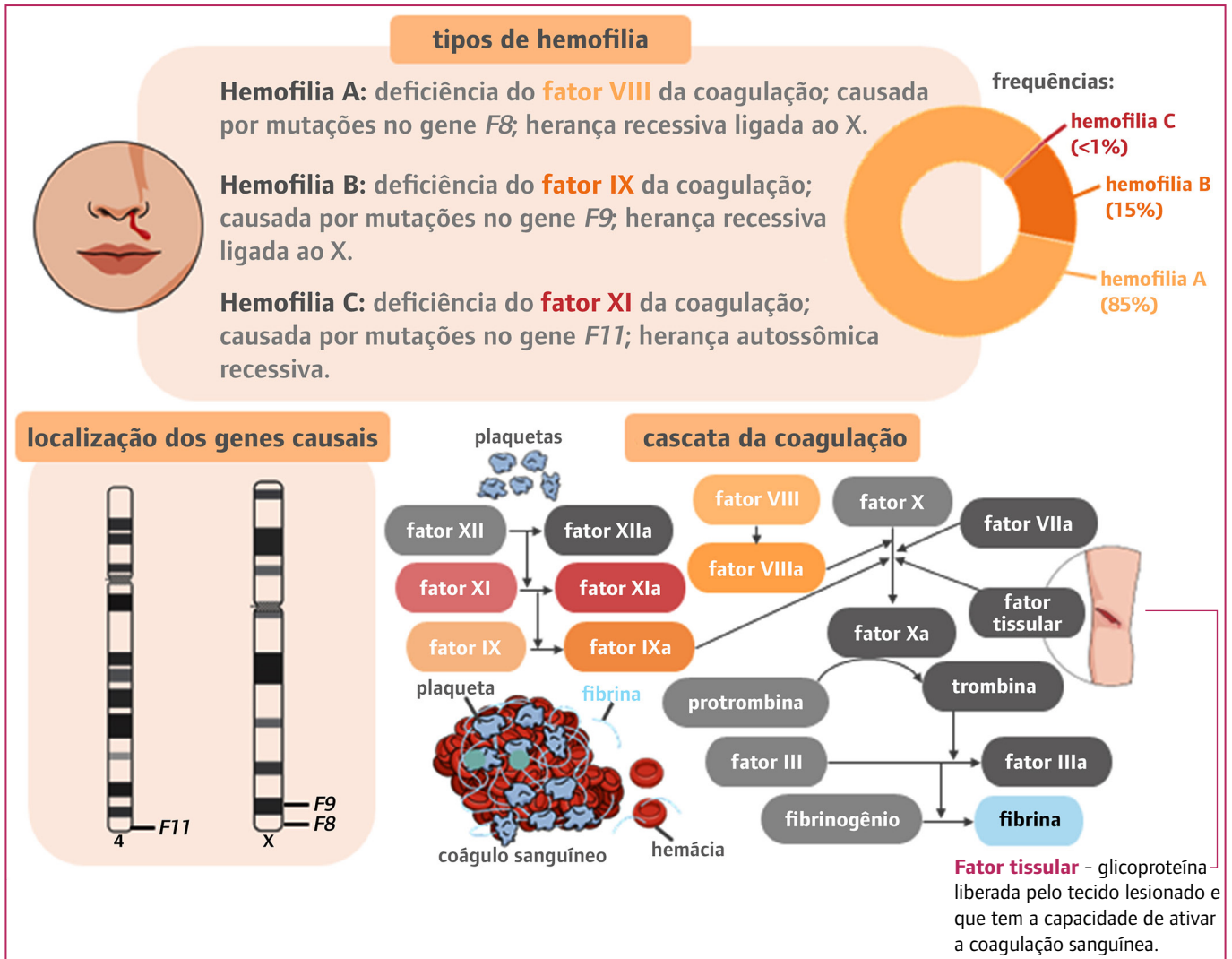


Figura 8. Tipos de hemofilia, localização dos genes causais nos cromossomos humanos e impacto na cascata da coagulação. A cascata da coagulação culmina na produção da fibrina, necessária para formação do coágulo sanguíneo que irá estancar o sangramento. A deficiência dos fatores VIII, IX ou XI impactam essa cascata, causando hemofilia. Na cascata, a ativação dos fatores da coagulação está representada com a letra a (ex.: IXa). O gráfico mostra a frequência desses diferentes tipos de hemofilia.

A Czarina Alexandra, neta da Rainha Vitória, era heterozigota para a variante causal da “doença real”. Isso impactou o império russo, pois Nicolau e Alexandra tinham apenas um filho homem (Alexei), que seria o futuro Czar, não fosse a Revolução. Alexei era hemofílico, sofreu graves sangramentos durante a infância, tendo a saúde frágil. A continuidade dos Romanov no poder estava ameaçada, portanto, por uma questão genética, mas também pela fome do povo e gastos exorbitantes da família imperial, além de conflitos políticos e até rumores de que a Czarina teria um relacionamento extraconjugal.

De posse de amostras de DNA advindas dos restos mortais da família da Czarina Alexandra, investigou-se a causa genética da hemofilia dos descendentes da Rainha Vitória. Considerando o padrão de herança, as hipóteses diagnósticas mais prováveis eram de hemofilia A ou hemofilia B e, assim sendo, foram investigados os genes *F8* e *F9*. Seguindo essa estratégia direcionada, foi encontrada uma variante genética em sítio de *splicing* do gene *F9* (Figura 9) no material genético da Czarina e de uma de suas filhas, em estado heterozigoto, bem como no de Alexei, em estado **hemizigoto**.

Hemizigoto - genótipo que ocorre tipicamente em indivíduos XY (do sexo biológico masculino), no qual há apenas um alelo em genes do cromossomo X, nas regiões sem correspondência no Y.

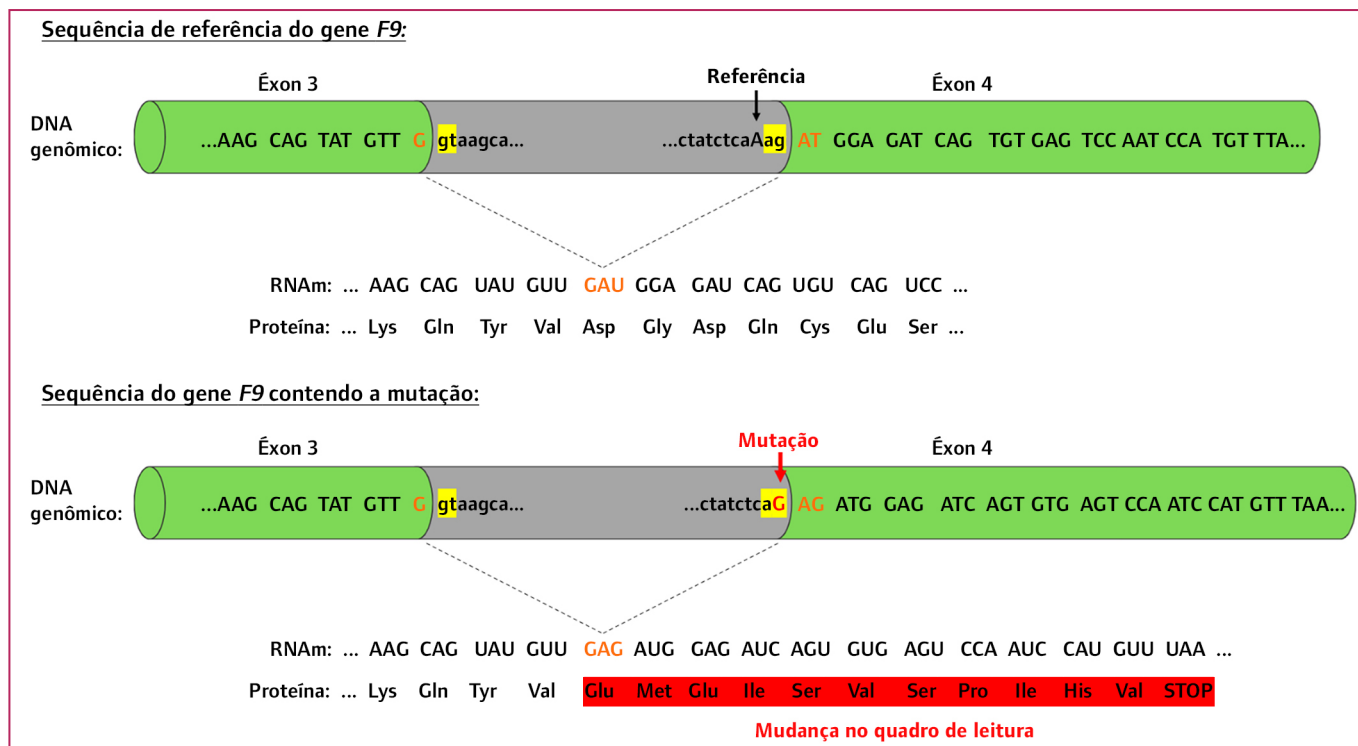


Figura 9. Variante identificada em sítio acceptor de *splicing* no gene **F9**. Um nucleotídeo adenina (A) foi substituído por uma guanina (G), alterando a posição do sítio acceptor de *splicing* e, conseqüentemente, também o quadro de leitura de tradução, o que gerou um códon de parada prematuro. Esta imagem está baseada nos resultados apresentados na publicação de Rogaev e colaboradores (*Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease"*. Science. 2009. doi: 10.1126/science.1180660).

Mas o que significa dizer que se trata de uma variante em sítio de *splicing*? O DNA é transcrito em pré-RNA (pré-RNA mensageiro) e, após esse processo, há a retirada de algumas porções desse RNA, chamadas de íntrons, e a união de partes que se mantêm, chamadas de éxons. Ao processo de retirada de íntrons e união dos éxons, que converte o pré-RNA em RNA maduro, dá-se o nome *splicing* (Figura 10). Para saber mais sobre os processos de transcrição, *splicing* e tradução, recomendamos a leitura do artigo “Revisitando o Dogma Central: a relação entre genes e proteínas”, publicado nesta revista: Vasconcelos e colaboradores (2021), *Genética Na Escola*, 16(2), 196–207. <https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2021.380>

É o RNA maduro que tem a receita para produção da proteína, por meio de um processo chamado de tradução. Uma particularidade das sequências intrônicas é que elas começam sempre com GT (guanina e timina), o que chamamos de sítio doador de *splicing*, e terminam com AG (adenina e guanina), chamado de sítio acceptor de *splicing* (Figura 10). Variantes nos sítios de *splicing* alteram o entendimento da maquinaria celular do que é éxon e o que é íntron e podem modificar o conteúdo do RNA maduro.

A variante causal da “doença real” foi identificada no gene *F9* e está localizada em seu íntron 3 (Figura 9). Nessa variante, com a substituição no íntron do nucleotídeo adenina (A) por uma guanina (G), cria-se um sítio acceptor de *splicing* novo, o que altera o quadro de leitura da tradução. Dessa forma, a partir da variante, os aminoácidos adicionados na tradução são diferentes do esperado e alguns códons depois surge um códon de parada (UAA), que leva ao término prematuro da tradução.

Até então, o efeito da variante no processo de *splicing* era apenas uma predição. Verificar o real efeito no RNA maduro exigiria o estudo dessa biomolécula, o que não seria possível com os restos mortais dos Romanov, pois os RNAs se degradam facilmente. Anos mais tarde, um paciente hemofílico não aparentado, mas com a mesma variante, foi identificado. Pesquisadores analisaram o RNA de células dele e de sua mãe (heterozigota não afetada), confirmando o *splicing* aberrante e confirmando a predição inicial. Além disso, os níveis de RNA de *F9* nas células desse paciente eram significativamente reduzidos em comparação com os de sua mãe. Em conclusão, esse estudo confirmou a **patogenicidade** da variante ante-

Patogenicidade - referente a “patogênico”, que significa “que causa doença”.

riormente identificada no gene F9 (Figura 9) e, assim, o diagnóstico de hemofilia B em descendentes da Rainha Vitória. Atual-

mente também são conhecidos outros casos de hemofilia B em que os pacientes têm essa mesma variante.

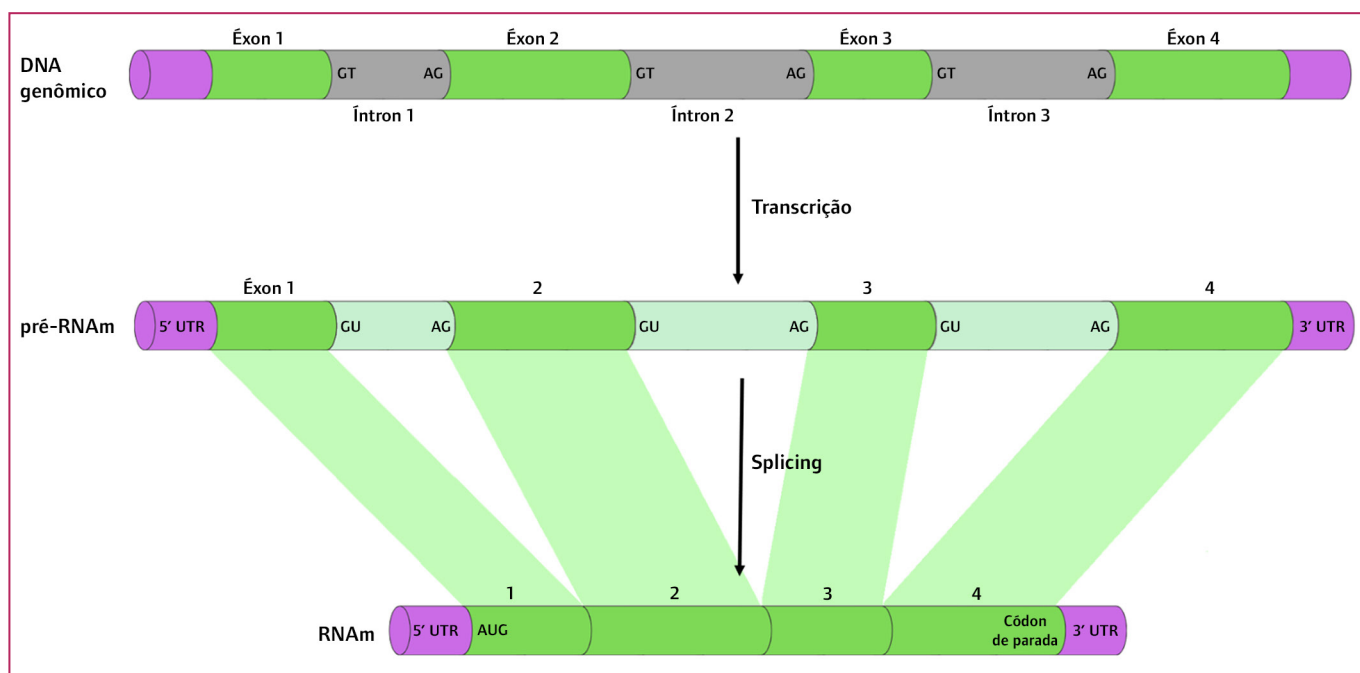


Figura 10. Compreendendo o *splicing* de RNA mensageiro (RNAm).

Na transcrição, informações contidas no DNA genômico são utilizadas para a produção do RNA mensageiro (RNAm). Em seguida, ocorre o processo de *splicing*, em que há a retirada dos íntrons e a junção dos éxons para a formação do RNAm maduro. As extremidades do RNAm (denominadas UTR, do inglês *untranslated regions*) não são codificadoras de proteína, pois o início da tradução se dá pela trinca de nucleotídeos com sequência AUG (que codifica o aminoácido metionina), enquanto o final da tradução se dá por uma trinca de nucleotídeos que corresponde a um códon de parada, que pode ser UAA, UAG ou UGA.

Considerações finais

Neste artigo, apresentamos investigações genéticas instigantes. A partir delas, foi possível abordar conceitos relevantes como teoria cromossômica da herança, marcadores para identificação humana, transmissão uniparental (mitocondrial e do Y), herança ligada ao X recessiva e *splicing* de RNAm.

Técnicas de genética molecular podem ser úteis para desvendar vários mistérios, inclusive os que envolvem grandes personalidades da história. Além do caso dos Romanov e da hemofilia dos descendentes da Rainha Vitória, há também outras investigações famosas que podem ser ferramentas interessantes em sala de aula e para popularização da ciência e de conceitos de genética.

Agradecimento

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos financiamentos (2013/08028-1; 2022/03980-5; 2023/17465-8; 88887.903185/2023-00).

Para saber mais sobre análises de DNA para reconstituição histórica

FOSTER, E., JOBLING, M., TAYLOR, P. et al. Jefferson fathered slave's last child. *Nature* 396, 27–28 (1998). <https://doi.org/10.1038/23835>

KING, T., FORTES, G., BALARESQUE, P. et al. Identification of the remains of King Richard III. *Nat Commun* 5, 5631 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms6631>

BEGG, T. J. A. et al. Genomic analyses of hair from Ludwig van Beethoven. *Current biology*. 33(8), 1431–1447 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.02.041>