

Testes Moleculares para Diagnóstico

Aula 6 – Biologia Molecular para Licenciatura

Instituto de Biociências – USP

ATIVIDADE 1- A EVOLUÇÃO DOS TESTES GENÉTICOS: O CASO DA DISTROFIA MUSCULAR

Atividade desenvolvida baseada no capítulo 10 (Diagnóstico Molecular) do livro Genética Humana e Genômica de Bruce R. Korf, 3ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Em 1982 James e Brenda decidem ter um filho. Eles procuram uma clínica genética, pois Brenda tem um meio-irmão, Charles (da mesma mãe), que tem distrofia muscular de Duchene (DMD). O diagnóstico foi feito quando Charles tinha 4 anos, pois apresentava atraso no desenvolvimento da linguagem e tinha dificuldades de subir escadas.

A distrofia muscular de Duchene (DMD) é caracterizada pela perda progressiva de força muscular. Ao final, os afetados podem estar paráliticos, exceto pelo movimento dos dedos e artelhos. Os afetados possuem níveis aumentados de creatina fosfoquinase sérica (CPK). A CPK é uma enzima encontrada nos músculos esquelético e cardíaco e no cérebro. Quando as células musculares estão danificadas, a CPK vaza para o soro. Isso ocorre em afetados mesmo ao nascimento, antes que a fraqueza muscular seja aparente.

A distrofia de Becker é um distúrbio correlato, no qual são afetados os mesmos grupos de músculos que na DMD, mas a idade de início é mais tardia e a progressão é mais lenta.

Quando criança, um teste revelou que Charles possuía nível elevado de CPK. Ele tem agora 18 anos e está na cadeira de rodas desde os 11 anos e tem profunda fraqueza muscular. Ele teve vários episódios de infecção respiratória e seu QI é abaixo do normal. Brenda e James estão preocupados com o risco de terem um filho com a mesma doença.

Analise o heredograma da família de Brenda (**Fig. 1**) e responda:

- 1) qual o tipo de herança do alelo mutado da DMD? Nesse caso, há risco diferencial entre os sexos?
- 2) a mãe de Brenda é portadora do alelo mutado ligado ao DMD?
- 3) Brenda tem risco de ser portadora do alelo mutado da DMD? Qual a porcentagem de risco?
- 4) qual o risco de um filho homem de Brenda herdar a doença?

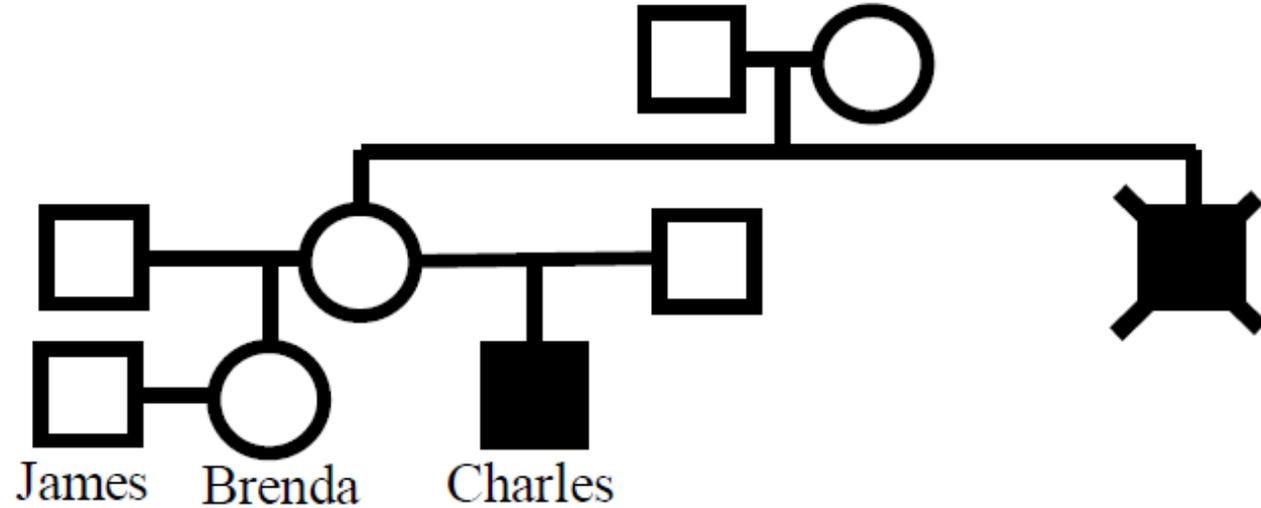


Figura 1. Heredograma da família de Brenda.

Análise o heredograma da família de Brenda (**Fig. 1**) e responda:

- 1) qual o tipo de herança do alelo mutado da DMD? Nesse caso, há risco diferencial entre os sexos?
- 2) a mãe de Brenda é portadora do alelo mutado ligado ao DMD? 2) Sim.
- 3) Brenda tem risco de ser portadora do alelo mutado da DMD? Qual a porcentagem de risco?
- 4) qual o risco de um filho homem de Brenda herdar a doença?

1) Herança ligada ao sexo, no caso cromossomo X. Risco maior entre homens.

3) Sim, risco de 50%.

4) Se ela for portadora, risco de 50%. Se não, risco é zero.

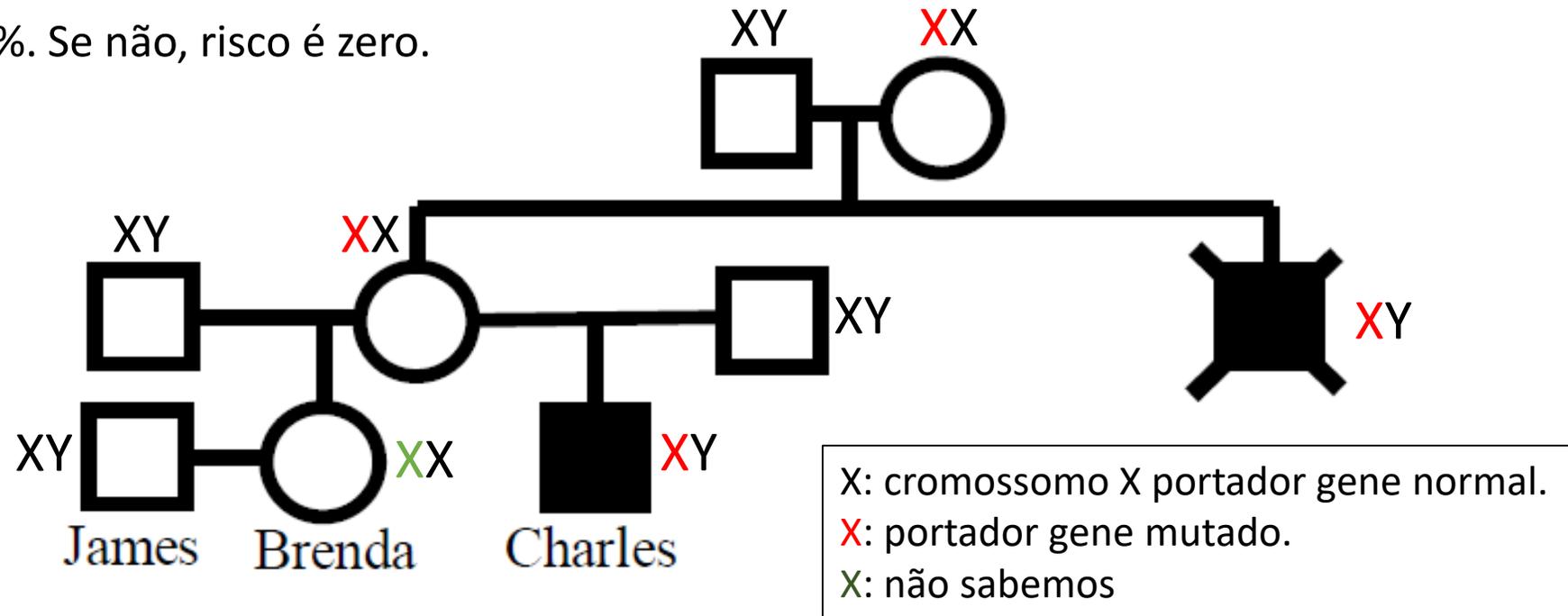


Figura 1. Heredograma da família de Brenda.

A análise de CPK no sangue da mãe de Brenda confirma que ela é portadora do gene. O resultado de Brenda indica que ela não é portadora, mas os médicos informam que esse resultado não exclui definitivamente a condição de portadora.

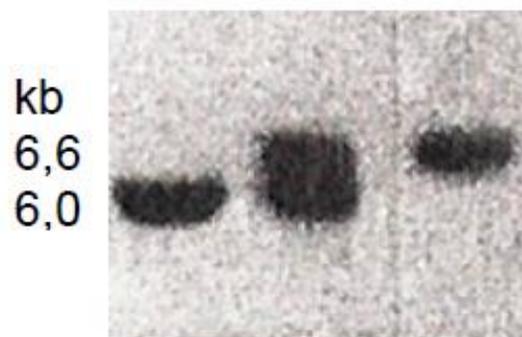
James e Brenda decidiram ter um filho em 1983. O consultor genético lhes informou que era possível realizar o diagnóstico pré-natal de DMD usando RFLP para locos vizinhos ao do gene da DMD (nessa época o gene da DMD ainda não havia sido isolado). Foi retirado sangue de Brenda, de sua mãe, de seu pai, de Charles (que tem DMD) e de ambos os pais de sua mãe.

O teste de RFLP realizado se baseia na existência de dois marcadores próximos ao gene da DMD: D2 e L128 (Fig. 2). Ou seja, essas sequências não causam a doença, mas estão fisicamente próximas ao gene da DMD. O marcador D2 pode detectar até duas bandas (6 kb e 6,6 kb) após a digestão do DNA de um indivíduo com a enzima de restrição *Pvu* II (Fig. 3). O L128 pode detectar até duas bandas (12 kb e 16 kb) após a digestão com *Taq* I (Fig. 3).



Figura 2. Localização dos marcadores L128 e D2 em relação ao gene que causa a DMD.

a.) D2



b.) L128

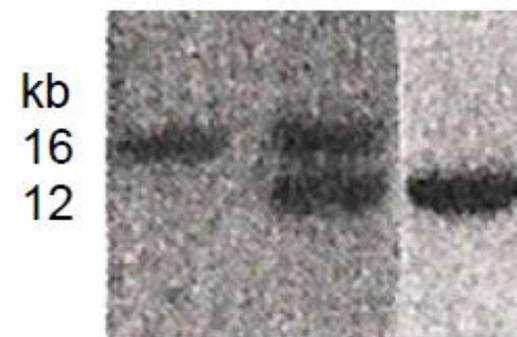
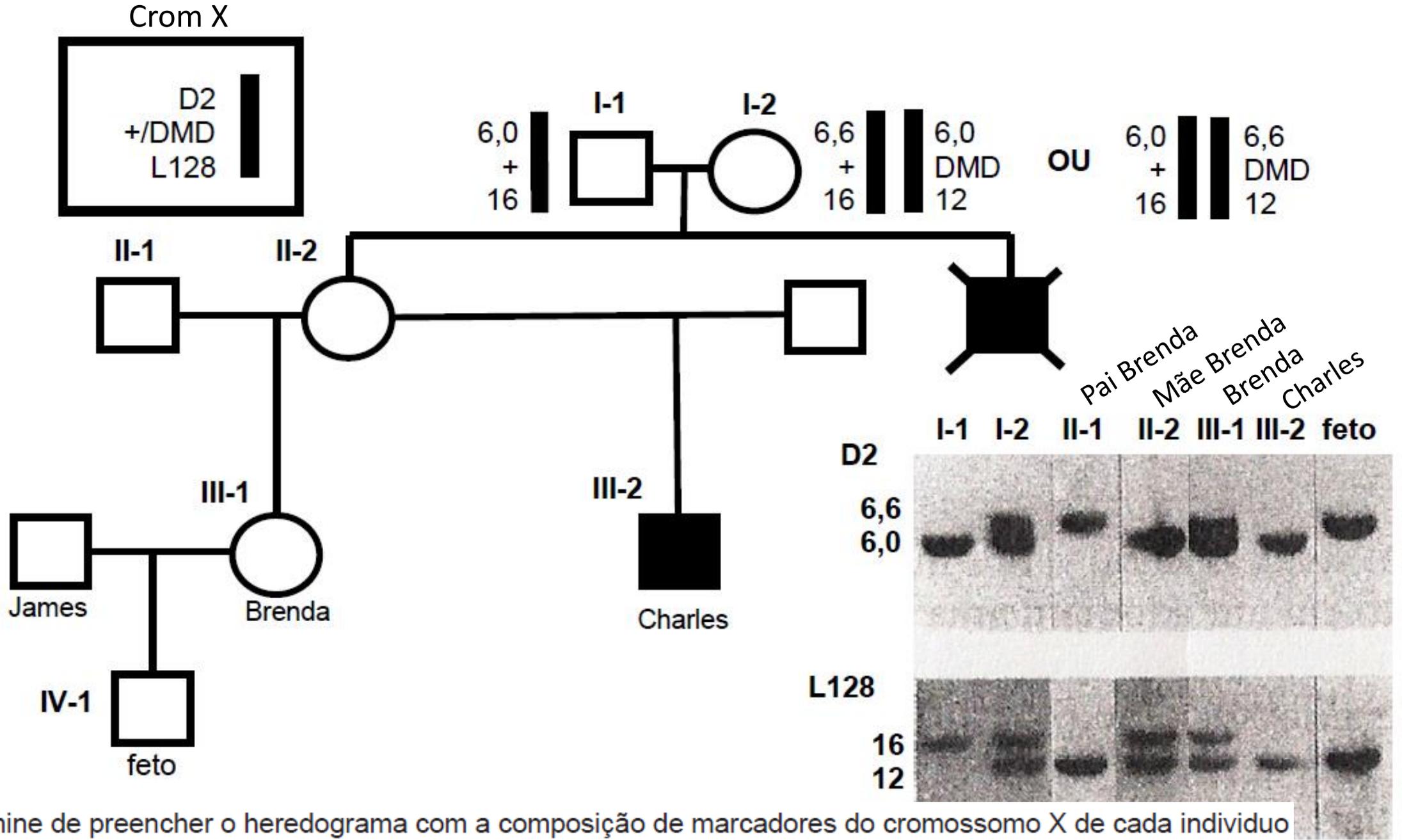


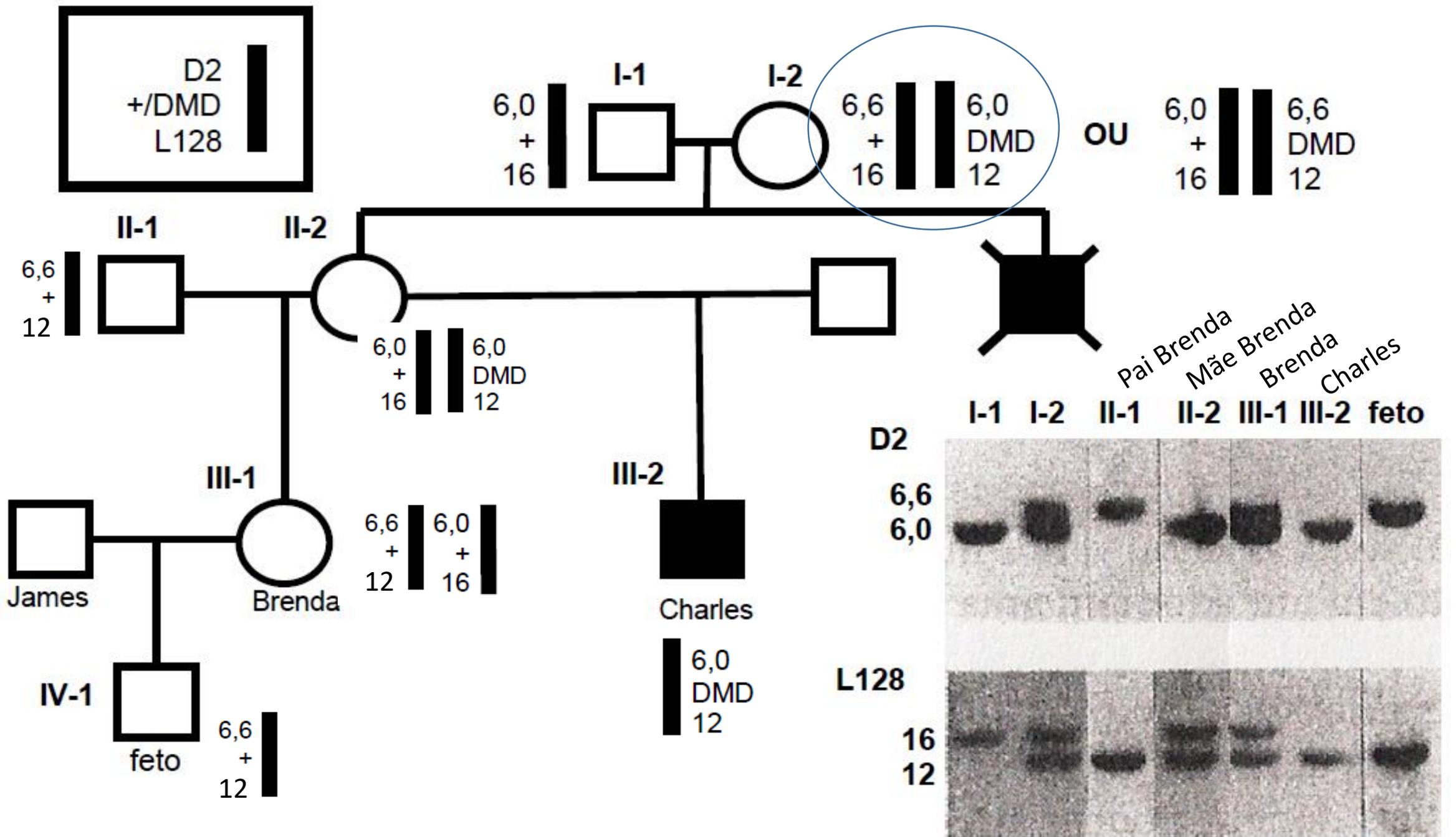
Figura 3. Padrões de bandas do *Southern blot*. a.) Membrana contendo DNA digerido com a enzima *Pvu*II e hibridada com DNA do marcador D2 (sonda), bandas obtidas de 6,6 e 6 kb. b.) Membrana contendo DNA digerido com a enzima *Taq*II e hibridada com DNA do marcador L128 (sonda), bandas obtidas de 16 e 12 kb.

Analise o padrão de bandas obtido nos *Southern blots* contendo DNA de Brenda e sua família (**Fig. 4**). O primeiro padrão de bandas contém DNAs digerido com *Pvu* II na membrana e o D2 utilizado como sonda. O segundo padrão de bandas contém DNAs digerido com *Taq* I na membrana e o L128 utilizado como sonda.

- 1) termine de preencher o heredograma com a composição de marcadores do cromossomo X de cada indivíduo (**Fig. 4**).
- 2) a mutação que leva ao DMD está ligada a quais tamanhos dos marcadores?
- 3) o feto é portador de DMD?



- 1) termine de preencher o heredograma com a composição de marcadores do cromossomo X de cada individuo
- 2) a mutação que leva ao DMD está ligada a quais tamanhos dos marcadores?
- 3) o feto é portador de DMD?



- 1) termine de preencher o heredograma com a composição de marcadores do cromossomo X de cada individuo
- 2) a mutação que leva ao DMD está ligada a quais tamanhos dos marcadores?
- 3) o feto é portador de DMD?

2) 6 Kb e 12 Kb.

3) Não é portador de MDM.

Em 1986 James e Brenda leram em um jornal que o gene da DMD fora clonado e entraram em contato com o consultor genético que lhes informou que, para algumas famílias, é possível encontrar deleções no gene. Isso oferece a chance de um diagnóstico pré-natal mais preciso. Pouco depois, Brenda engravidou pela segunda vez.

O gene que causa a DMD foi clonado em 1985. Seu produto é uma proteína de membrana com mais de 400 kDa que é expresso em células musculares. Essa proteína é denominada de distrofina. Estudos do DNA de homens com DMD e DMB revelaram uma alta frequência de deleções amplamente distribuídas ao longo do gene da distrofina.

Analise o padrão de bandas do *Southern blot* (**Fig. 5**). Ele contém DNA da mãe de Brenda (1), de Charles (2), do primeiro filho de Brenda (3) e do segundo feto de Brenda (4). Há diferença entre os padrões de bandas?

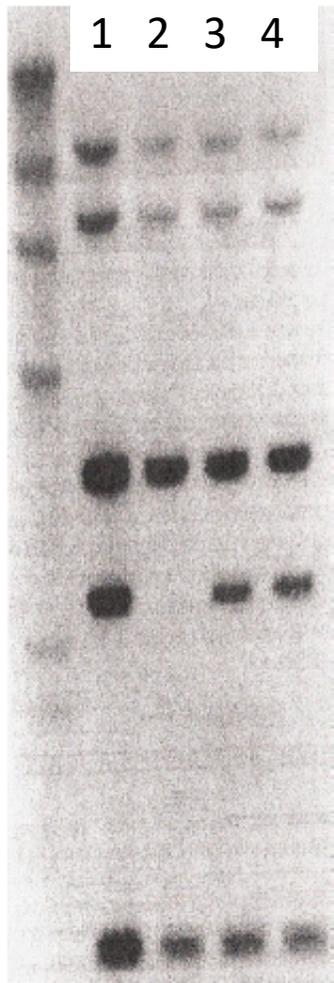


Figura 5. *Southern blot* obtido após a hibridação com o gene da distrofina (sonda). DNA da mãe de Brenda (1), DNA de Charles (2), DNA do 1º filho de Brenda (3) e DNA do 2º feto de Brenda (4).

Os tamanhos das deleções encontradas no gene da distrofina não possuem correlação com o efeito fenotípico (DMD ou DMB). No entanto, estudos com a proteína revelaram que em pessoas com DMD a distrofina está totalmente ausente nas biópsias musculares; enquanto afetados com DMB possuíam distrofina aberrante em quantidade e/ou qualidade. Essa informação melhorou a precisão do diagnóstico e a habilidade em prever a progressão da doença. Em geral, os afetados com DMD possuem mutações que alteram o quadro de leitura do código genético e os portadores de DMB possuem mutações *in frame*.

Com a clonagem do gene da distrofina, foi possível desenvolver testes baseados em PCR que amplificam os diferentes éxons que compõem o gene. Um conjunto de 18 pares de *primers* pode identificar 98% de todas as deleções conhecidas da distrofina. Analise a foto do gel com produtos da PCR de quatro dos 79 éxons da distrofina de quatro indivíduos diferentes (**Fig. 6**):

- 1) há algum padrão de bandas diferente?
- 2) o que a ausência de bandas indica?
- 3) os éxons que são adjacentes no gene obrigatoriamente vão aparecer na mesma ordem após a eletroforese?

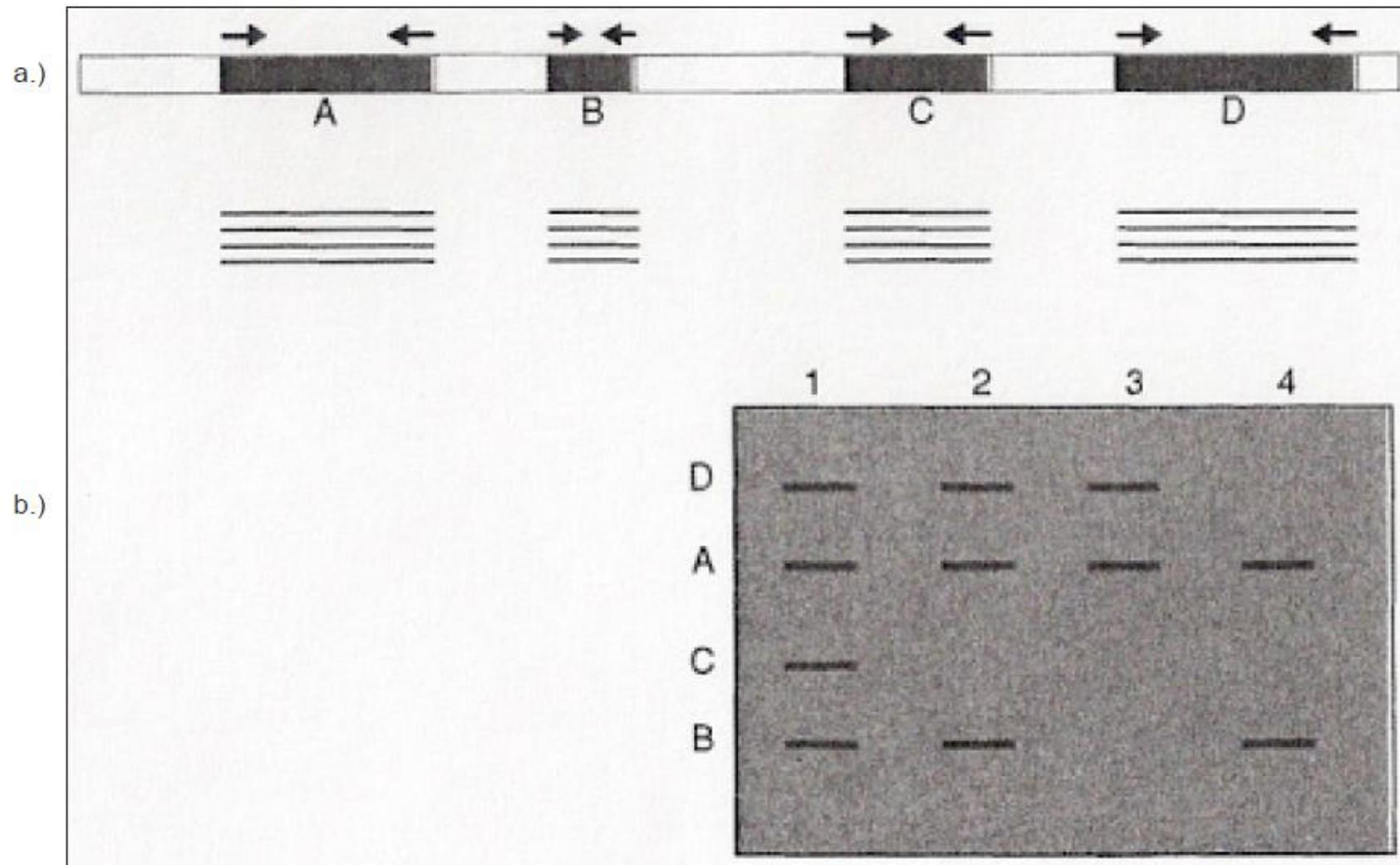


Figura 6. Esquema ilustrando a amplificação, por PCR, de quatro éxons (A a D) pertencentes ao gene da distrofina de quatro indivíduos (1 a 4). **a.)** As flechas mostram o sentido 5' - 3' dos *primers* em cada éxon. **b.)** Padrão de bandas obtido após o fracionamento dos produtos por eletroforese.

- 1) há algum padrão de bandas diferente? Sim.
- 2) o que a ausência de bandas indica? Que os determinados exons não estão presentes em alguns indivíduos.
- 3) os éxons que são adjacentes no gene obrigatoriamente vão aparecer na mesma ordem após a eletroforese?

Não, as bandas serão separadas por tamanho.

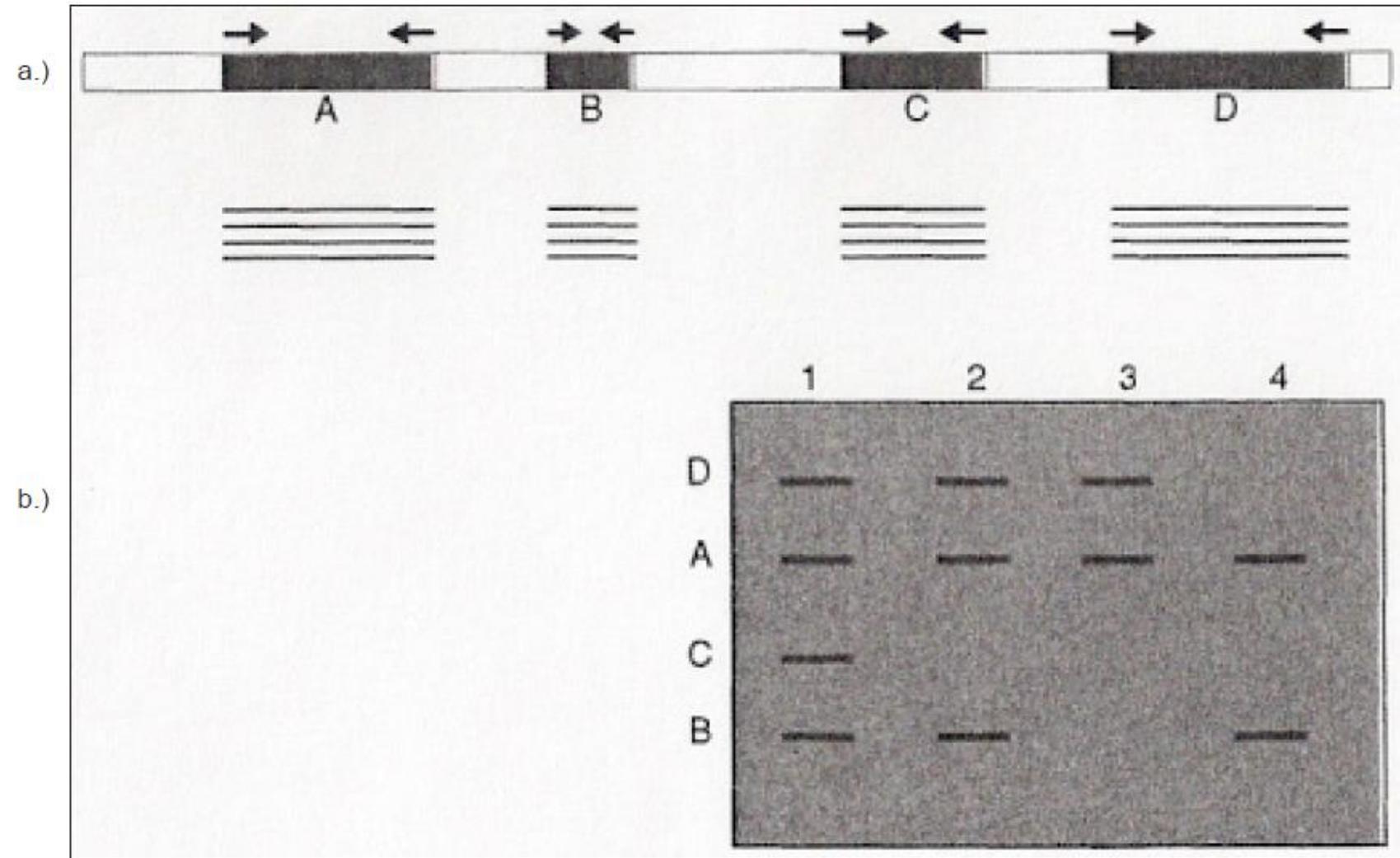
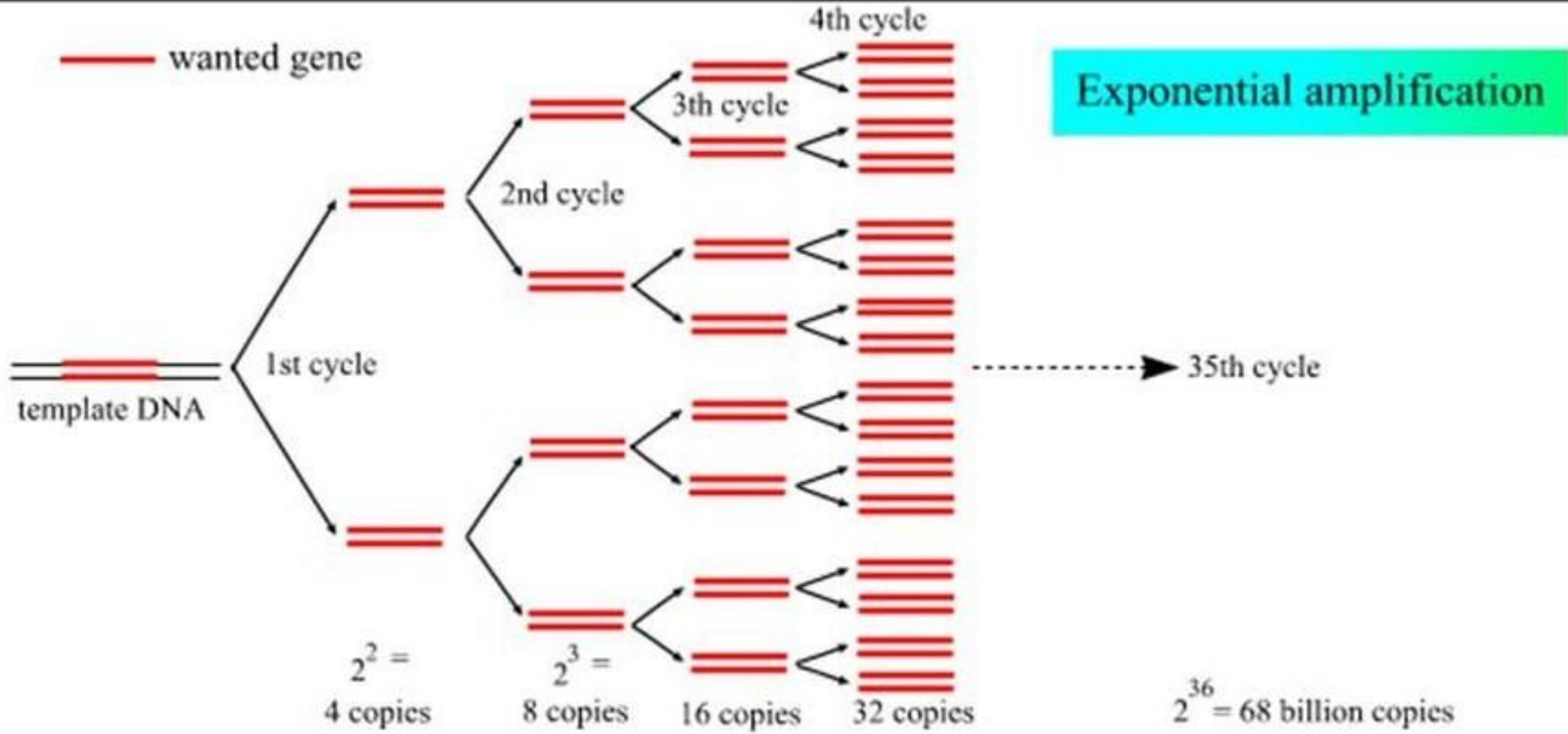
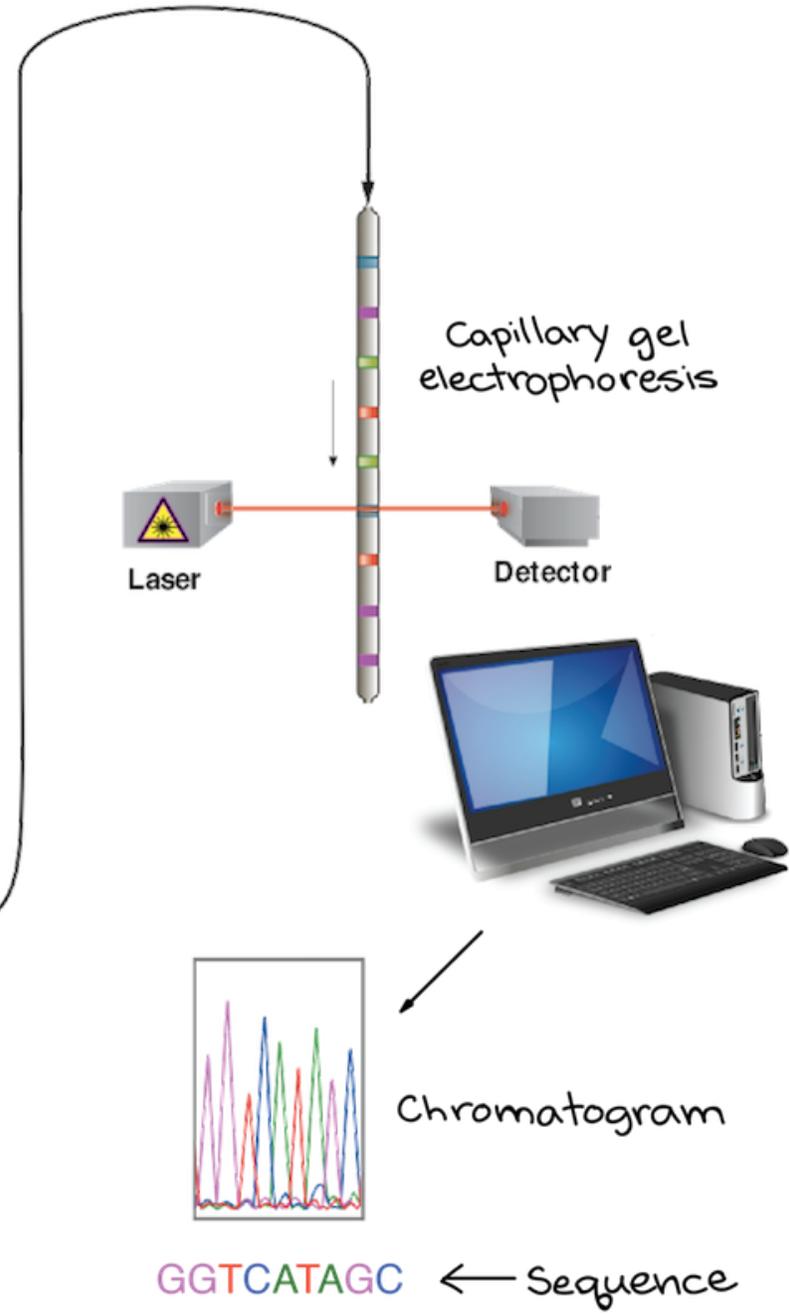
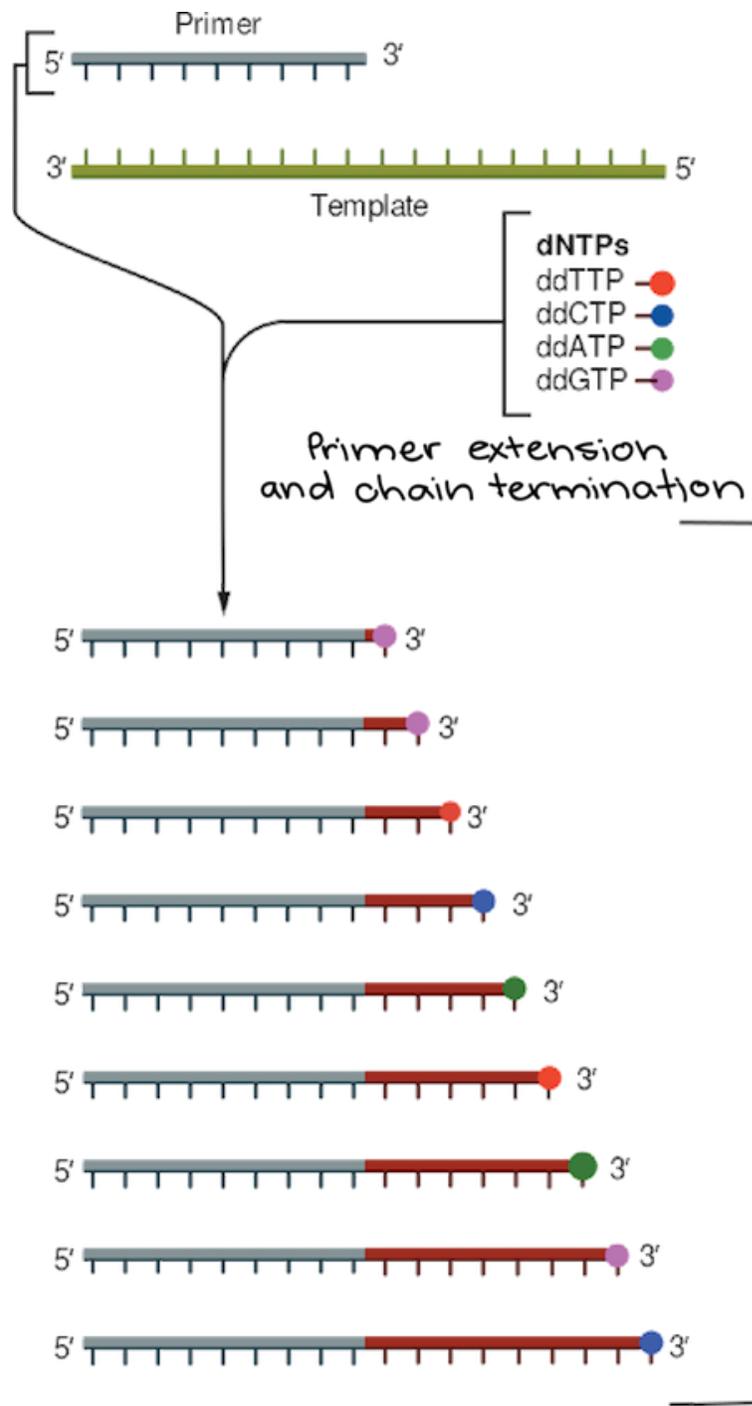


Figura 6. Esquema ilustrando a amplificação, por PCR, de quatro éxons (A a D) pertencentes ao gene da distrofina de quatro indivíduos (1 a 4). a.) As flechas mostram o sentido 5' - 3' dos primers em cada éxon. b.) Padrão de bandas obtido após o fracionamento dos produtos por eletroforese.

TESTES MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO

- PCR e Sequenciamento de Primeira Geração: detectar mutações em genes específicos;





TESTES MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO

- PCR e Sequenciamento de Primeira Geração: detectar mutações em genes específicos;
- CGH array: alterações na quantidade de cópias de segmentos de DNA;

1

DNA controle e DNA do paciente são marcados com corantes fluorescentes e aplicados ao microarray.

DNA CONTROLE

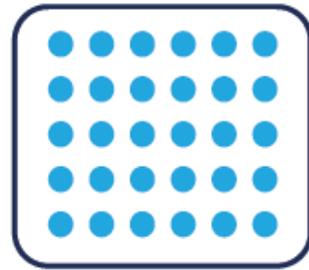


DNA DO PACIENTE

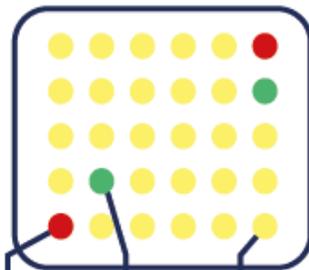


2

DNA controle e DNA do paciente são hibridizados com o microarray.



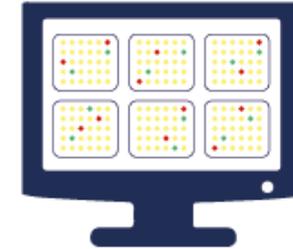
HIBRIDIZAÇÃO



Ganho de DNA Perda de DNA Não Alterado

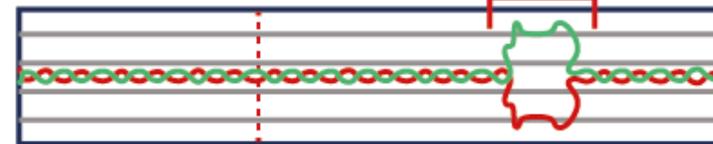
3

Os sinais fluorescentes são medidos pelo scanner microarray.



4

Os dados são analisados pelo software específico, gerando os resultados.



TESTES MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO

- PCR e Sequenciamento de Primeira Geração;
- CGH array: alterações na quantidade de cópias de segmentos de DNA;
- Genoma: sequenciamento do genoma completo;

- Projeto Sequenciamento do Genoma Humano

- Consórcio utilizando fragmentos de vários doadores;
- Celera baseado em 5 indivíduos;
- Ambos publicados em 2001.

- Projeto Sequenciamento do Genoma Humano

- Similaridade entre indivíduos: 99,9%;
- Similaridade com chipamzé: 98,8%;
- Apenas 2% do genoma codifica proteínas;
- Restante: regiões reguladoras, repetitivas, intrônicas e genes de RNAr e RNAt.

- Projeto Sequenciamento do Genoma Humano



TESTES MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO

- PCR e Sequenciamento de Primeira Geração;
- CGH array: alterações na quantidade de cópias de segmentos de DNA;
- Genoma: sequenciamento do genoma completo;
- Exoma: sequenciamento dos exons;

TESTES MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO

- PCR e Sequenciamento de Primeira Geração;
- CGH array: alterações na quantidade de cópias de segmentos de DNA;
- Genoma: sequenciamento do genoma completo;
- Exoma: sequenciamento dos exons;
- Painel de genes específico para uma doença ou quadro clínico.

Situações para discussão (pag. 112 apostila)

• **Situação 2. Diagnóstico pré-implantacional**

Família com criança anterior falecida com fibrose cística fez fertilização *in vitro*. Os embriões são geneticamente testados e somente os normais selecionados para implantação.

- Situação normal hoje;
- Geração dos embriões que serão descartados;
- Qual é o limite? Doenças sem tratamento? Miopia? Olho azul?

Situações para discussão (pag. 112 apostila)

- **Situação 7. Bancos de DNA das populações**

Um deputado apresenta projeto de lei obrigando presidiários a doarem amostras biológicas para construir um banco de dados de seus perfis genéticos, *DNA fringerpriting*, para desvendar crimes futuros.

- Nós sabemos lidar com essa informação de maneira correta? Não vamos criar preconceitos baseado em informações incertas?

Conceitos Levantados

- Testes genéticos
- Crispr
- Genoma
- Exoma
- Padrão de Herança/ Herança autossômica
- Sequenciamento
- Painel de genes
- Ética
- Deleção
- CGH Array
- Edição Gênica
- Publicação/Disseminação
- Revisão pelos pares
- Genoma
- Mutação
- Enzima de restrição
- Cas9
- RNA guia
- Terapia
- Nocaute
- Zinc finger
- PCR