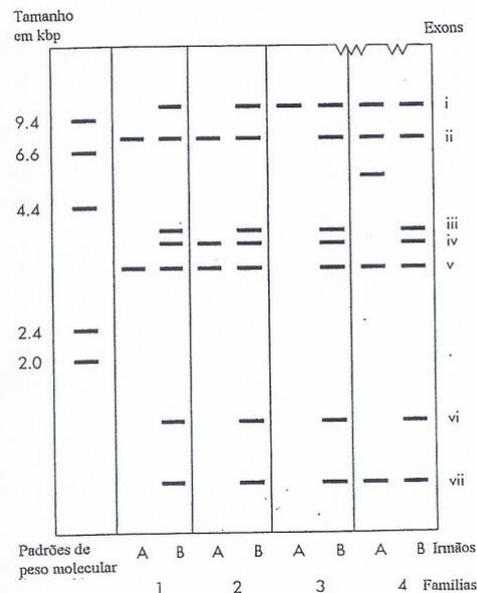
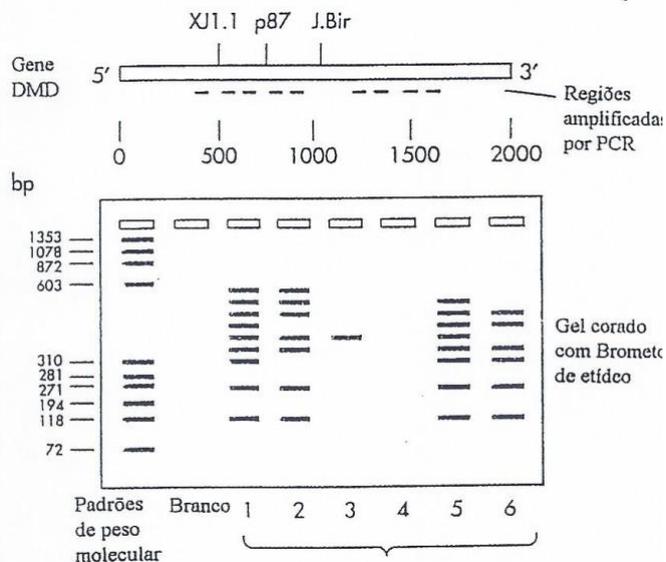


## LISTA DE EXERCÍCIOS: AULA SOBRE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GENÉTICAS

- 1) A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva causada por substituição de nucleotídeo acarretando a troca de ácido glutâmico (codificado por GAG) por valina (codificado por GTG) na posição 6 da cadeia beta da hemoglobina. A substituição de nucleotídeo elimina o sítio da enzima de restrição *Mst* II. Essa enzima corta o DNA de pessoas normais originando um fragmento de 1,1 kb; nas pessoas com a mutação a enzima gera um fragmento de 1,3 kb.
- Faça um esquema desta região do gene indicando sítios de restrição nas pessoas normais e nas com a mutação.
  - Faça um esquema do resultado de uma hibridação com uma sonda específica do gene na seguinte família: (1) pai heterozigótico; (2) mãe heterozigótica; (3) filho afetado; (4) filha afetada; (5) filha heterozigótica; (6) filho heterozigótico; (7) filho homozigótico normal.
- 2) A distrofia muscular de Duchenne é uma doença de herança ligada ao X recessiva. Quando era usada uma sonda de cDNA do gene da distrofina para hibridar com o DNA genômico de meninos afetados por distrofia muscular de Duchenne, digerido com uma enzima de restrição, várias bandas surgiam no resultado após a hibridação, como na figura abaixo. Sabendo-se que o gene da distrofina é um gene de cópia única, como explicar esse resultado?



- 3) A figura abaixo representa um teste que foi muito utilizado no diagnóstico de distrofia muscular Duchenne. Ele se baseia na técnica de PCR multiplex ou múltiplo. A barra representa os 2.000kb do gene da distrofina. Foram planejados e sintetizados pares de *primers* para amplificar as nove regiões do gene da distrofina mais frequentemente deletadas nos afetados, representadas por barras negras. Amostras de DNA de cada paciente são amplificadas na presença dos nove pares de *primers* simultaneamente e os produtos da PCR são analisados diretamente em gel de agarose corado com brometo de etídeo. O indivíduo 1 não tem deleção de nenhum fragmento, pois não tem a doença, e é utilizado como controle.

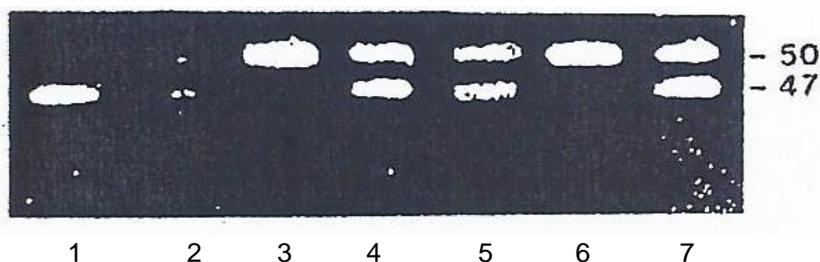


Pergunta-se:

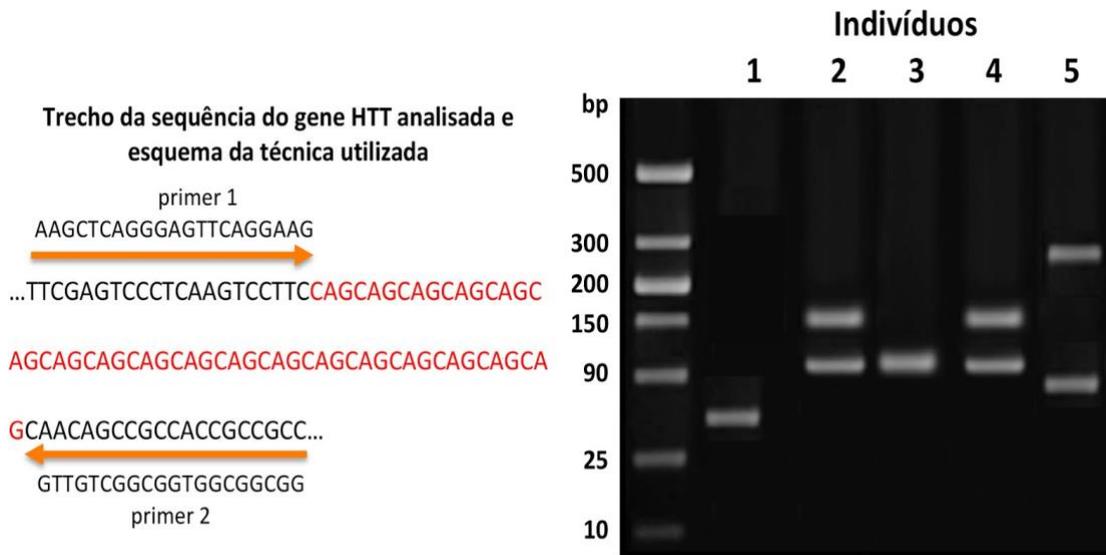
- Que tipos de alterações genéticas devem ter os indivíduos das amostras 2, 3, 5 e 6?
- Qual o papel do experimento chamado de "branco"?
- Quais são as possíveis explicações para os resultados apresentados na coluna 4?
- Esse teste genético serve para detectar mulheres heterozigóticas com deleções no gene *DMD*?

4) Um teste baseado na PCR foi desenvolvido para detectar a alteração mais frequente que causa a fibrose cística, doença de herança autossômica recessiva que resulta de mutações no gene *CFTR*. Essa alteração frequente é uma deleção de 3 pares de bases, que ficou conhecida como  $\Delta F508$ , porque o aminoácido deletado na proteína CFTR é o de número 508.

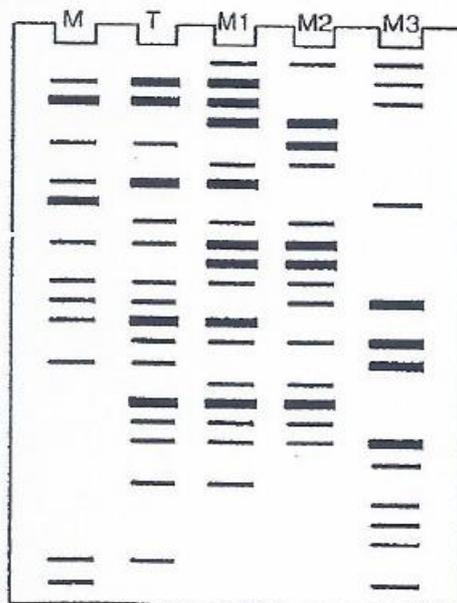
Observe o resultado do exame abaixo, realizado com o DNA de vários pacientes de uma família na qual ocorre a fibrose cística (o tamanho dos fragmentos amplificados está indicado em pb):



- Quem são os afetados, quem são os heterozigóticos e quem são as pessoas sem a alteração nessa família?
  - Suponha que um paciente afetado pela fibrose cística, oriundo de uma outra família, realizou o mesmo teste e apresentou um resultado igual ao do indivíduo 7 dessa família. Como podemos explicar o seu quadro clínico? O que pode ser feito para continuar o seu estudo genético?
- 5) Esquematize um teste baseado na PCR que permita estimar o número de cópias de uma sequência de trinucleotídeos em indivíduos portadores de alterações no gene de uma doença causada por uma expansão de trinucleotídeos.
- 6) Pacientes acometidos pela doença de Huntington apresentam movimentos involuntários que os incapacitam a realizarem tarefas motoras como alimentar-se e andar. A doença de Huntington tem herança autossômica dominante e é causada pelo aumento do número de repetições (acima de 40) de trinucleotídeos CAG no gene *HTT*, que codifica a proteína huntintina, em neurônios do núcleo estriado. A análise molecular, feita em pacientes suspeita da doença de Huntington, e o resultado da eletroforese de DNA em gel de agarose estão representado abaixo para 5 indivíduos. Indique quais desses indivíduos podem vir a ter a doença de Huntington.



7) Um zoológico adquiriu uma fêmea de tigre para seu programa de reprodução em cativeiro. Apesar da identidade da mãe dessa fêmea ser conhecida, havia dúvida sobre sua paternidade e alguns dos machos potenciais para serem usados no cruzamento poderiam ser muito aparentados a ela. Foi realizado, então, exame do DNA da fêmea de tigre, de sua mãe e de três machos, com o objetivo de se evitar excessiva consanguinidade no cruzamento. Os resultados da análise usando uma sonda de minissatélite estão mostrados na figura abaixo, onde M = mãe; T = tigresa; M1-3 = machos potenciais de serem usados no cruzamento. Qual dos três machos seria o mais adequado para ser cruzado com a fêmea de tigre? Justifique sua resposta.



8) Quatro pares de gêmeos, nascidos no espaço de uma hora, foram trocados em uma maternidade. Você foi chamado para resolver o problema. Como um primeiro passo você deseja identificar os pares de gêmeos. Para isso analisou o sangue de cada criança usando uma sonda que identifica polimorfismos de VNTR. Com base nos resultados mostrados na figura abaixo, responda quais crianças são irmãs e como você irá identificar os pais corretos.

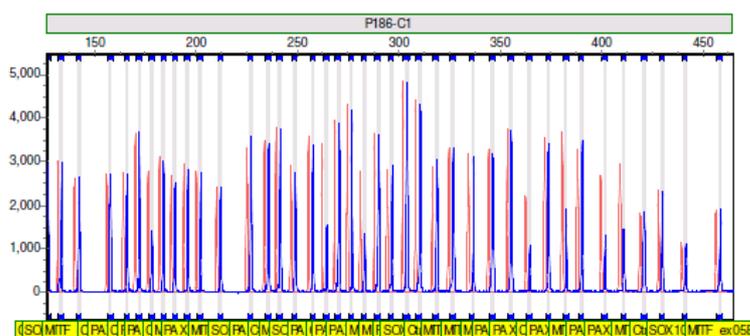


9) Observe a figura abaixo, que corresponde a um resultado de experimento de MLPA (*multiplex ligation probe amplification*). As sondas desse experimento foram planejadas para hibridar com regiões dos genes *MITF* e *PAX3*, ambos relacionados à uma síndrome chamada de síndrome de Waardenburg, de herança autossômica dominante. O resultado da hibridação dos indivíduos controle está indicado nos picos vermelhos e o resultado da hibridação do DNA de um paciente com a síndrome está indicado nos picos azuis.

MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.95	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 08/13/2013 - 08:49:17	Quantification By: Peak Height
Pane I: P186-C1	Classification: Loss < 0.75 <- Equivalent <- 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Copy Number
Synthetic Used: P186_12799.fsa // P186_12895.fsa // P186_14650.fsa // P186_controle_1.fsa // P186_controle_2.fsa // P186_controle_3.fsa // P186_controle_4.fsa	

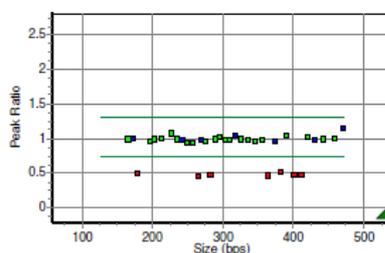
Probe Name	Bin Size	P186_11105
1 Ctrl_04q31	241.0	2
2 Ctrl_05q31	126.7	2
3 Ctrl_06q15	270.0	2
4 Ctrl_06q22	171.7	2
5 Ctrl_07q22	470.8	2
6 Ctrl_08q22	318.2	2
7 Ctrl_09q21	373.8	2
8 Ctrl_12q23	157.6	2
9 Ctrl_15q21	189.3	2
10 Ctrl_16p13	429.9	2
11 MITF_ex01A	142.0	2
12 MITF_ex01B	195.5	2
13 MITF_ex05A	248.6	2
14 MITF_ex05B	458.4	2
15 MITF_ex07	336.2	2
16 MITF_ex09	390.1	2
17 MITF_ex10	296.2	2
18 MITF_ex11	346.0	2
19 MITF_ex12	211.8	2
20 MITF_ex13	289.6	2
21 MITF_ex14	326.3	2
22 MITF_ex15	420.7	2
23 PAX3_ex01	303.7	2
24 PAX3_ex03A	165.8	2
25 PAX3_ex03B	276.5	2
26 PAX3_ex04A	355.2	2
27 PAX3_ex04B	202.0	2
28 PAX3_ex05A	183.6	2
29 PAX3_ex05B	235.3	2
30 PAX3_ex06A	382.4	1
31 PAX3_ex06B	410.9	1
32 PAX3_ex07A	401.6	1
33 PAX3_ex07B	282.8	1
34 PAX3_ex08A	364.5	1
35 PAX3_ex08B	264.0	1
36 PAX3_ex09	177.9	1
37 SOX10_ex01	441.4	2
38 SOX10_ex02	310.0	2
39 SOX10_ex03	133.4	2
40 SOX10_ex04A	257.2	2
41 SOX10_ex04B	226.6	2

P186\_11105.fsa -- Dye: Blue



Sample Name: P186\_11105  
 Machine: SeqAB3/30-20143-013  
 Run Time: 08/09/2013 - 17:14:51 -> 08/09/2013 - 17:47:23  
 Statistics # Probes Mean StdDev  
 Control Sample 10/31 1.01/0.88 0.06/0.22

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



Pergunta-se:

- Qual a importância dos indivíduos controle na análise dos resultados do MLPA?
- Quantas sondas mostraram menor intensidade de hibridação em relação aos controles?
- Como interpretar esses resultados?

10) Na família representada a seguir segrega uma mutação que acarreta uma forma de deficiência intelectual com herança recessiva ligada ao cromossomo X. O gene que causa a doença ainda não foi identificado, mas já são conhecidos marcadores moleculares polimórficos, do tipo RFLPs, com localização muito próxima a ele. Um desses locos polimórficos revela, após hibridação com uma sonda, dois fragmentos, um de 1,8 kb e um de 1,3 kb. Observe os resultados encontrados na genealogia mostrada a seguir e responda as questões de **a-c**.

- Qual é o fragmento que está associado ao gene da doença nesta família?
- Que orientação genética você daria às duas mulheres, irmãs dos afetados?
- O aconselhamento genético com base em marcadores moleculares, como os RFLPs, é um método infalível? Explique.

