

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA SÍNDROME DE X-FRÁGIL

Andressa Dalólio Valente¹; Ana Carolina Avelar²; Mariane Castardo Araujo³; Ana Maria Silveira Machado de Moraes⁴; Clarissa Torresan⁵; Marcela Funaki dos Reis⁶;

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/UniCesumar
andressa.dalolio98@gmail.com.

²Colaboradora Acadêmica do Curso de Medicina, Centro Universitário de Maringá- UNICESUMAR. ana_carolinavelar@hotmail.com.

³ Graduada em Ciências Biológicas, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. castardomari96@gmail.com

⁴ Colaboradora, Doutora, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. ana.machado@unicesumar.edu.br

⁵Coorientadora, Doutora, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. clarissa.torresan@unicesumar.edu.br

⁶Orientadora, Doutora, Departamento de Biomedicina, UNICESUMAR. marcela.reis@unicesumar.edu.br

RESUMO

A Síndrome do X- Frágil (SFX) é uma doença genética de herança recessiva ligada ao cromossomo X, sendo esta a principal causa de deficiência intelectual herdada de origem exclusivamente genética. A SXF é ocasionada por uma mutação do gene *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*), que leva a um distúrbio de neurodesenvolvimento no paciente, pois o gene *FMR1* deixa de expressar a proteína FMRP cuja insuficiência leva a deficiência intelectual e as formas representativas da doença. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi diagnosticar crianças menores de 18 anos com deficiência intelectual idiopática sugestiva para SXF por meio da Reação em Cadeia da Polimerase de Triagem (PCR-T). O estudo foi realizado em parceria com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Maringá, Liga Acadêmica de Genética Médica de Maringá-LAGeM, e o Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar. Foi realizada a padronização da extração de DNA da mucosa bucal, bem como uma coleta e extração do DNA da amostra positiva para SXF. O presente estudo está na fase final da padronização da PCR-T para então serem coletadas as amostras dos pacientes para diagnóstico SXF. As variáveis estudadas serão analisadas de forma descritiva com tabelas de contagem e frequência.

PALAVRAS-CHAVE: Aconselhamento genético; Distúrbio no neurodesenvolvimento; Gene *FMR1*; Mutação genética.

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome do X- Frágil (SXF), é uma das principais causas de deficiência intelectual, sendo essa exclusivamente de origem genética (GALVAN; GALVEZ, 2012). É uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, ocasionada por uma mutação no gene *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*). Essa mutação, promove a inativação do gene *FMR1*, que traz como consequência a inexpressividade proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), (AMANCIO, 2013).

De acordo com Amancio (2013), os indivíduos afetados pela SXF possuem mais de 200 repetições de uma sequência de nucleotídeos (CGG) no cromossomo X, e esses são conhecidos como portadores de mutação completa e por isso desenvolvem o fenótipo característico da síndrome.

Em um indivíduo o principal aspecto para suspeita de SXF, é o histórico de deficiência intelectual na família, além de distúrbios comportamentais (MARTINS, 2013). Outro aspecto analisado durante a anamnese são as características fenotípicas. Porém, a identificação dos indivíduos afetados pela SXF, menores de 18 anos, por meio dos sinais clínicos expressos pelo fenótipo é muito incerto, pois as principais características geralmente aparecem na adolescência, demandando muito tempo para serem observados (RUIZ et al., 2009). Sendo assim, o diagnóstico laboratorial é a melhor opção para a confirmação e/ou exclusão de suspeita para SXF (AMANCIO, 2013).

Para que problemas como esses sejam evitados, Chen et al., (2010), explicam que se faz necessário à utilização de técnicas eficientes para a confirmação de um diagnóstico preciso. Nesse sentido, hoje a técnica mais utilizada pelos laboratórios é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por ser uma técnica sensível, de rápida execução, específica e que demanda pouca quantidade de DNA para a sua realização. Por meio da PCR, o gene *FMR1* é analisado, e através da sua ampliação no gel de eletroforese é possível quantificar o número de repetições de bases CGG presentes no cromossomo X do paciente (CHEN et al., 2010).

Dessa forma, tendo em vista que Maringá não possui um centro de diagnóstico laboratorial especializado em PCR para SXF e conseqüentemente a maioria dos pacientes seguem com diagnóstico de deficiência intelectual idiopática, que gera muita angústia e sofrimento familiar. Esta pesquisa objetivou diagnosticar por meio de reação em cadeia da polimerase de triagem (PCR-T), crianças menores de 18 anos com deficiência intelectual idiopática para SXF.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa trata-se de um estudo transversal de caráter clínico e experimental realizado por meio de uma parceria com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Maringá, Liga Acadêmica de Genética Médica de Maringá-LAGeM, e o Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar. O presente estudo tem a liberação Comitê de Ética em Pesquisa do Unicesumar por meio do parecer número CAAE: 201839118.3.0000.5539 e foram inclusos indivíduos encaminhados pela APAE com deficiência intelectual idiopática sugestiva para SXF, menores de 18 anos e que os responsáveis e/ou familiares concordaram com a participação na pesquisa e assinaram os Termo de Assentimento e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A extração de DNA das células da mucosa bucal foi realizada a partir de coleta em swab seguindo o protocolo de ABRÃO et al. (2005), sendo este modificado e adaptado pelo Laboratório de Biologia Molecular. Após a extração de DNA, foi realizada a quantificação do DNA genômico, por meio da metodologia de Kanbe et al., (2002) com modificações. A estimativa da concentração de DNA em ng foi dada por comparação com *Ladder* de 1Kb (Invitrogen).

A reação de PCR-T foi realizada por adaptação do método descrito por Fu et al., (1991). A amplificação ocorreu em termociclador (Nova Instruments). O tamanho final esperado do produto de PCR é de aproximadamente 200pb para homens normais e de aproximadamente 200 e 225 para mulheres normais. Como medida de controle de qualidade da reação foi adotada um controle negativo constituído de amostra de DNA de indivíduo não afetado por SXF, controle positivo com amostra de um paciente confirmado com SXF e branco composto por água no lugar de amostra de DNA. Para a visualização dos resultados da PCR foi utilizada a metodologia de Kanbe et al., (2002) com modificações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos no presente estudo foram à padronização do protocolo da extração de DNA das células da mucosa bucal, onde se realizou a otimização do tempo para execução do procedimento de forma satisfatória, além de a utilização da mucosa bucal como amostra biológica se mostrou ideal para uma abordagem mais segura e

facilitadora, por ser um método menos invasivo e indolor ao paciente portador da SXF (Figura 1).

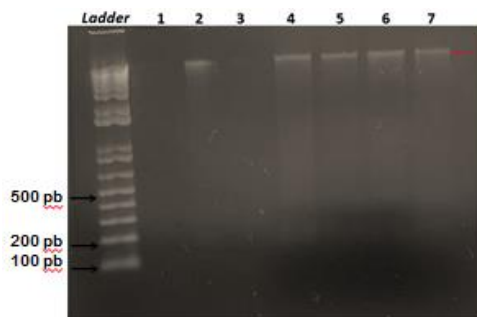


Figura 1: Extração de DNA de indivíduos sem SXF utilizando a técnica de swab bucal. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. *Ladder* de 1kb (Invitrogen).

Fonte: dados da pesquisa.

Com isso, foi realizada a seleção pela APAE de um paciente com laudo confirmatório para a SXF, sendo assim efetuada a coleta e extração do DNA da amostra positiva para SXF que foi utilizada como controle positivo (Figura 2).



Figura 2: Gel de agarose submetido a eletroforese, após a extração de DNA de indivíduo com presença de mutação para síndrome de X frágil.

Fonte: dados da pesquisa.

Até o presente momento foi concluído o treinamento de todos os membros da pesquisa, que foram capacitados para realizar as funções de acordo com técnicas laboratoriais e de biossegurança. A padronização da PCR-T está em andamento para que então sejam coletadas as amostras dos pacientes para diagnóstico de SXF e posterior emissão de laudos (Figura 4).

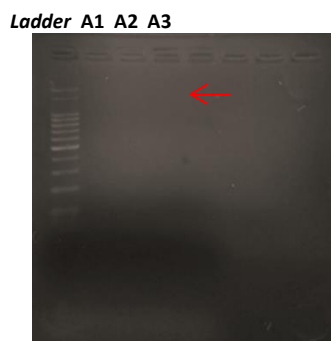


Figura 4: Gel de agarose a 2% para visualização dos resultados da PCR após aplicação de corrida eletroforética. É possível visualizar que não existiu amplificação da região desejada, sendo necessário refazer os testes. Foi utilizado *Ladder* 100 pb da Ludwig, A1: controle positivo para SXF, A2: controle negativo, A3: branco.

Fonte: dados da pesquisa.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho realizou a padronização efetiva do protocolo de extração de DNA das células da mucosa bucal, sendo de grande valia por ser um procedimento menos invasivo e mais seguro para se lidar com os portadores da SXF. Porém, a pesquisa segue na fase de testes para padronização do protocolo de realização da PCR para que seja possível então coletar as amostras dos pacientes para diagnóstico SXF, comprovando assim a eficiência da técnica de PCR para tal finalidade.

Ao finalizar da pesquisa espera-se fornecer aos familiares ou responsáveis um diagnóstico confirmatório ou de exclusão por meio da emissão de laudos que possibilitarão ao paciente melhores medidas terapêuticas e, sobretudo o direcionamento para estimulação do potencial intelectual e apoio emocional e aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, BILLERBECK, A.E.; NISHI, M.Y.; MARUI, S. MENDONÇA, B.B. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1, **Arq. Bras. Endocrinol Metab.** v.49, n. 6, p. 978-982, 2005

AMANCIO, A. P.; **Análise Molecular de Pacientes com Suspeita da Síndrome do X-Frágil.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2013.

CHEN, L.; HADD, A.; SAH, S.; FILIPOVIC-SADIC, S.; KROSTING, J.; SEKINGER, E.; PAN, R.; ... LATHAM, G. J. An Information-Rich CGG Repeat Primed PCR That Detects the Full Range of Fragile X Expanded Alleles and Minimizes the Need for Southern Blot Analysis. **Journal Molecular Diagnosis**, v. 12, p. 589-600, set. 2010.

FU, Y. H., D. P. KUHL, A. PIZZUTI, M. PIERETTI, J. S. SUTCLIFFE; RICHARDS, A. J. VERKERK, J. J. HOLDEN, R. G. FENWICK, JR., S. T. WARREN. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, 67, 1047-58. 1991.

KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 29, 973-989, 2002

GALVAN, A. M.; GALVEZ, R. Neocortical vasculature in the Fragile X mental retardation syndrome. **Brain Research**, v. 1471; p. 155-161, ago. 2012.

MARTINS, M. P.; Perturbações do Espectro X Frágil: Aspectos clínicos. In: FRANCO, V.; Síndrome de X Frágil pessoas, contextos & percursos. **Évora**, 2013. cap.1, p.21-40.