



REVISTA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE E
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

REVISTA HCPA 2004; 24

24^a SEMANA CIENTÍFICA do HCPA

De 13 a 17 de Setembro de 2004

11º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul

Anais

Giugliani R , Matte U . Centro de Terapia Gênica . HCPA.

Introdução: A Gangliosidose GM1 é uma doença lisossômica de depósito causada pela deficiência -galactosidase. A forma infantil (GM1 I) é predominantemente da enzima neurológica, com retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. O gene para esta enzima está localizado no cromossomo 3 e possui 16 exons. Estudos anteriores demonstraram que duas mutações (R59H e 1622-1627insG) correspondem a cerca de 60% dos alelos em pacientes Brasileiros com GM1 I. A técnica de PCR ARMS consiste de duas reações complementares e utiliza três primers. Um dos primers é constante e complementar à fita molde em ambas as reações, os outros diferem na última base na posição 3' terminal e são específicos ou à seqüência normal ou à seqüência mutada de DNA, sendo que apenas um destes primers é usado por tubo. A padronização das condições de reação é importante para realização desta técnica. Objetivo: Padronizar uma técnica de PCR ARMS-Multiplex que possa auxiliar no diagnóstico molecular de pacientes Brasileiros com Gangliosidose GM1 apresentando as mutações R59H e 1622-1627insG. Materiais e métodos: Amostras de DNA de pacientes já genotipados para ambas as mutações foram utilizadas para a padronização da técnica. Foram desenhados primers contendo a última base complementar à seqüência normal ou à seqüência mutada, sendo estes desenhados de forma a ter a mesma temperatura de anelamento, permitindo a realização da PCR em dois tubos por paciente. Os resultados foram visualizados em gel de agarose. Resultados: Diferentes fatores que influenciam na geração de produtos de PCR foram testados para padronização desta técnica, entre eles: temperatura de anelamento (Ta), concentração de MgCl₂ e de Dimetilsulfóxido (DMSO) e quantidade de primers e de DNA. A Ta demonstrou-se o fator mais crucial para o estabelecimento da técnica em questão, pois pequenas variações na mesma alteraram significativamente os resultados. Em apenas dois experimentos os pacientes que não apresentavam as mutações tiveram amplificação com os primers correspondentes à seqüência normal e os pacientes com as mutações amplificaram de acordo com o padrão esperado, tanto para homocigotos quanto heterocigotos. Conclusões: Apesar do objetivo inicial não ter sido completado, todos os fatores indicam que a técnica pode funcionar, sendo realmente rápida e simples, podendo ser aplicada para o diagnóstico de mutações, desde que respeitados todos os critérios a serem padronizados. Foram obtidos bons resultados nos experimentos preliminares, porém há dificuldades na reprodutibilidade da técnica. Se esta for estabelecida poderá substituir a análise por SSCP ou com enzimas de restrição realizadas até o momento.