Desenho das condições para realização de PCR dos Genes: *SCL12A1, KCNJ1, BSND, CLCNKA, CLCNKB* e *LMX1B.*

Fernanda Negrini Delgado, Emílio Martíns Curcelli, Tiago Vitor Ramalho, Elisa Sorensen Mascarin, Meire Savino da Costa Bettoni Moreira, Caio Julio Prado Liguori, Amélia Teixeira Trindade

INTRODUÇÃO

A maioria das **doenças renais raras** é grave, podendo levar a morte ou insuficiência renal crônica (IRC). Podem acometer morfologia e/ou função de glomérulos (Glomerulopatias) ou sistema tubular (Tubulopatias). Algumas se destacam pela prevalência ou gravidade de apresentação, como é o caso da Síndrome de Bartter e da Síndrome unha-patela.

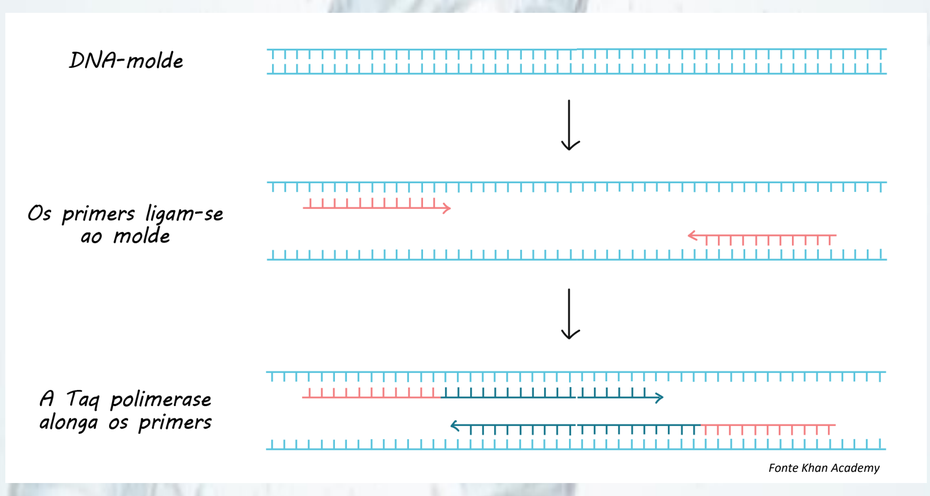
A **Síndrome de Bartter** é uma tubulopatia, complexa e heterogênia, que acomete a porção ascendente da alça de Henle, caracterizada por: alcalose metabólica com hipocalemia, hipocloremia, hiperreninemia, hiperaldosteronemia, levando a desidratação, desnutrição, associado à poliúria com ou sem surdez neurossensorial. Pode ser classificada em: cinco tipos autossômica recessiva (Bartter tipo I: gene *SCL12A1*; Bartter tipo II: gene *KCNJ1*; Bartter tipo III: gene *CLCNKB*; Bartter tipo IVa: gene *BSND*; Bartter tipo IVb: defeito simultâneo nos genes *CLCNKA e CLCNKB*) e um tipo dominante (Bartter tipo V: gene *CaSR)*.

A **Síndrome Unha-patela** é uma glomerulopatia autossômica dominante, que leva a proteinúria assintomática associada ou não a hematúria. A princípio foi descrita como patologia exclusivamente ortopédica. Mutações ou polimorfismo no gene *LMX1B* (um dos noves gene LIM- homeodominante que regulam a transcrição genética de vários outros genes).

Os diagnósticos destas patologias são realizados pelas identificações de mutações através do estudo genético.

A **reação em cadeia da polimerase** (**PCR**) é uma técnica que permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado em milhares de cópias.

A PCR acontece em 3 etapas: **desnaturação -** O DNA (dupla fita) contendo a sequência a ser amplificada é desnaturado por aquecimento, separando-se duas fitas simples; **anelamento -** ocorre resfriamento que habilita os primers a anelar cada fita simples desnaturada; **extensão -** ocorre aquecimento para que a taq-polimerase possa estender o molde, sintetizando novas fitas de DNA.



OBJETIVO

Tendo em vista que as situações ambientais interferem nas condições necessárias para que os *primers* possam atuar na amplificação de DNA, o objetivo desse estudo foi o de realizar o desenho das condições ideais para realização de PCR de alguns exons dos genes: *SLC12A1, KCNJ1, BSND, CLCNKA, CLCNKB* e *LMX1B.*

METODOLOGIA

Amplificação dos fragmentos por PCR – TESTE DOS *PRIMERS*

Foram adquiridos primers específicos de cada gene para definição das condições para a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR). As sequências dos primers foram obtidas utilizando como base, as sequências dos genes depositados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Foram desenhadas as condições para amplificação de alguns exóns dos específicos genes: inicialmente as amostras com moléculas de DNA foram preparadas conforme especificação de cada primer utilizando a polimerase Taq Kapa e a mistura Master Mix como descrito a seguir:

MASTER MIX GREEN* 2X (Buffer + Taq + nucleotídeos)_ 7 uL
*PRIMER FOWARD(Pf)*_____ *1 uL*
*PRIMER REVERSE(Pr)*_____1 uL
H2O_____ 4 uL
DNA_____ 1uL

METODOLOGIA

Essas misturas foram colocadas em termociclador com temperaturas especificas constante na bula de cada *primer* Os produtos finais foram submetido a reação de eletroforese em gel de agarose para verificar se ocorreu a amplificação ideal de cada exon.

Quando não havia a amplificação do exon, esses procedimentos eram repetidos, alterando-se as temperaturas de termociclagem (especialmente da fase de anelamento) até obtenção de amplificação ótima de cada exon.

RESULTADOS

Foram realizadas várias PCR para cada exon com a finalidade de obter as condições ideais dos *primers.*

GENE	BSND				CLCNKB		KCNJ1		LMX1B		SLC12A1		
ÉXONS	1	2	3	4	5-7	13-14	1	2	1	2	6	7	11
5’	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
30”	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
30”	**58°C**	**58°C**	**58°C**	**58°C**	**51°C**	**51°C**	**55°C**	**55°C**	**54°C**	**54°C**	**50°C**	**50°C**	**50°C**
30”	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
5’	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
INFINITO	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
	35x	35x	35x	35x	40x	40x	40x	40x	45x	45x	40x	40x	40x

CONCLUSÃO

Conclui-se que as PCR com Master Mix Green obtiveram mais facilmente as amplificações dos exons e que foi efetivo na obtenção de condições ideais de amplificação dos genes estudados.
As condições definidas por este projeto passaram a fazer parte do protocolo de estudo genético de doenças renais raras da UFSCAR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Joosten H, Strunk AL, Meijer S, Boers JE at al. An aid to the diagnosis of genetic disorders underlying adult-onset renal failure: a literature review. Clin Nephorl, v. 73, n. 6, p. 454-72, 2010.
Soeiro, EMD, Helou CMB. Aspecto Clinico, fisiopatológico e genético das tubulopatias hereditárias na infância. J Bras de Nefrol, v. 37, n.3, p385-98, 2015.
Ariceta G, Aguirre M. Tubulopatias en la Infancia que progresan hacia la enfermedad renal crónica. NefroPlus, v. 4, n.1, p. 11-18, 2011.
Iraola, GA, Menica MA. Protocolo Diagnostico Terapeutico de la AEP (Asociación Española de Pediatría): Nefrología (Tubulopatias), p.13746, 2008.
García Nieto, V; Yanes, M.I.L; Martín, F.C. Síndrome de Bartter y enfermedades afines. Revista de Nefrología, v. 2(1), p 66-73, 2011.
Perez JJL, Martínez LFJ, Alvarado EFG. Síndrome de Bartter. Reporte de un caso y revisión de la literatura. Revista Med, v.19, n.2, p.185206, 2011.
García-Nieto V, Yanes, M.I. L, Martín, F. C et al. Mutation G47R in the BSND gene causes Bartter syndrome with deafness in two Spanish families. Pediatr Nephrol, v.21, p.643-8, 2006.
Pablos A L, Garcia-Nieto V, Lopéz-Menchero J C et al. Severe manifestation of Bartter syndrome Type IV caused by a novel insertion mutation in the BSND gene. Clinical Nephrology, p 1-6, 2012.
Janssen A G H, Scholl U, Domeyer C, Nothmann D, Leinenweber A, and Christoph F†. Disease-Causing Dysfunctions of Barttin in Bartter Syndrome Type IV. J Am Soc Nephrol, v. 20, p.145–53, 2009.
Brochard K, Boyer O, Blanchard A, Loirat C et al. Phenotype– genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. Nephrol Dial Transplant, v. 24, p.1455–64, 2009.
Ghoumid J, Petit F, Holder-Espinasse M, Jourdain AS et al. Nail-Patella Syndrome: clinical and molecular data in 55 families raising the hypothesis of a genetic heterogeneity. Eur Journal of Humana Genetics, v. 24, p.44-50, 2016.
Lemley K. Kidney disease in nail-patella syndrome. Pediatr Nephrol, v. 24, p.2345-54, 2009.
Edwards N, Rice S.J., Raman S, Hynes AM et al. A novel LMX1B mutation in a family with end-stage renal disease of “unknown cause”. Clin Kidney J, , v.8 p. 113-19, 2015.
Dreyer S, Morello R, German MS, Zabel B et al. LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. Oxford University Press, v. 9,s.7, p. 1067-74, 2000.
Mendonça M, Pinheiro A, Castro I. Síndrome de Bartter. Uma Nova abordagem Terapêutica. Acta Med Port, v. 24, s.3, p.671-674, 2011.
Mejía N, Santos F, Claverie-Martín F, García-Nieto V, Ariceta G, Castaño L, RenalTube group. RenalTube: a network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. Eur J Pediatr, v. 172, n.6, p.775-80, 2013.
Tyrrell, D. A. J. Polymerase chain Reaction. BMJ, v. 324, n. 4, p. 4–9, 1997.
Agne, M. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields : a review. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 1–11, 2009.

Este projeto foi contemplado com uma bolsa de iniciação tecnológica. Ocorreu sem financiamento público ou privado.