



# ANÁLISE MOLECULAR DE AMOSTRAS DE DNA DE PACIENTES COM HIPERCALCEMIA HIPOCALCIÚRICA FAMILIAR UTILIZANDO POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADEIA SIMPLES



Marcus Vinícius Costa Pedroni<sup>1</sup>, Dra. Lilia Freire R. de Souza Li

<sup>1</sup>mmvcpedroni@yahoo.com.br

Centro de investigação em pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

**Palavras-chave:** Proteína – Mutação – Hipercalcemia – Receptor de Cálcio

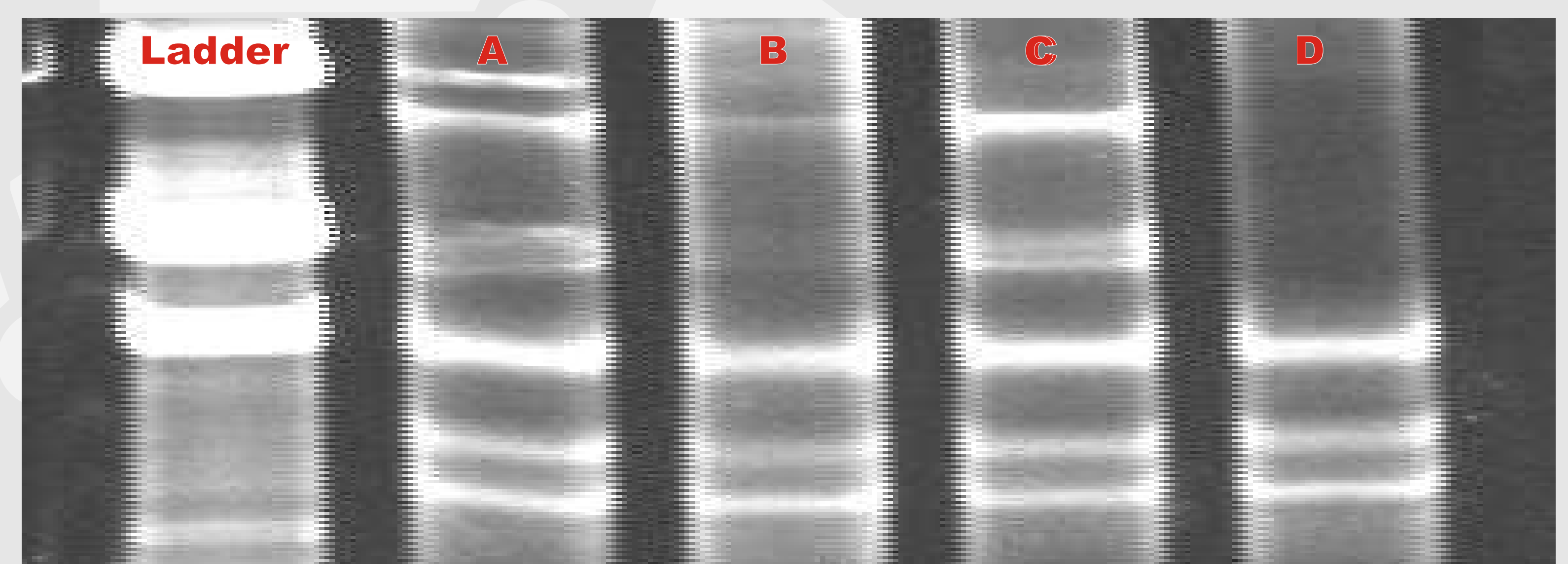
## INTRODUÇÃO

O receptor sensor do cálcio (CASR) é essencial na regulação do cálcio extracelular no organismo, e está presente em todos os tecidos relacionados à homeostase do  $Ca^{2+}$ , como por exemplo, paratireóides, tireóides e rins. Mutações com perda de função do CASR levam a desregulação das concentrações de  $Ca^{2+}$  extracelular, causando a doença Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar, manifestada em indivíduos heterozigotos, isto é, com apenas um alelo mutado. Devido à perda de função do CASR a concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular se eleva e inibe a secreção do paratormônio pelas paratireóides e aumenta a reabsorção renal de  $Ca^{2+}$ . Amostras de DNA de dois pacientes foram analisadas para identificar mutação. Este método provou ser eficiente em pré-selecionar potenciais sítios de mutação.

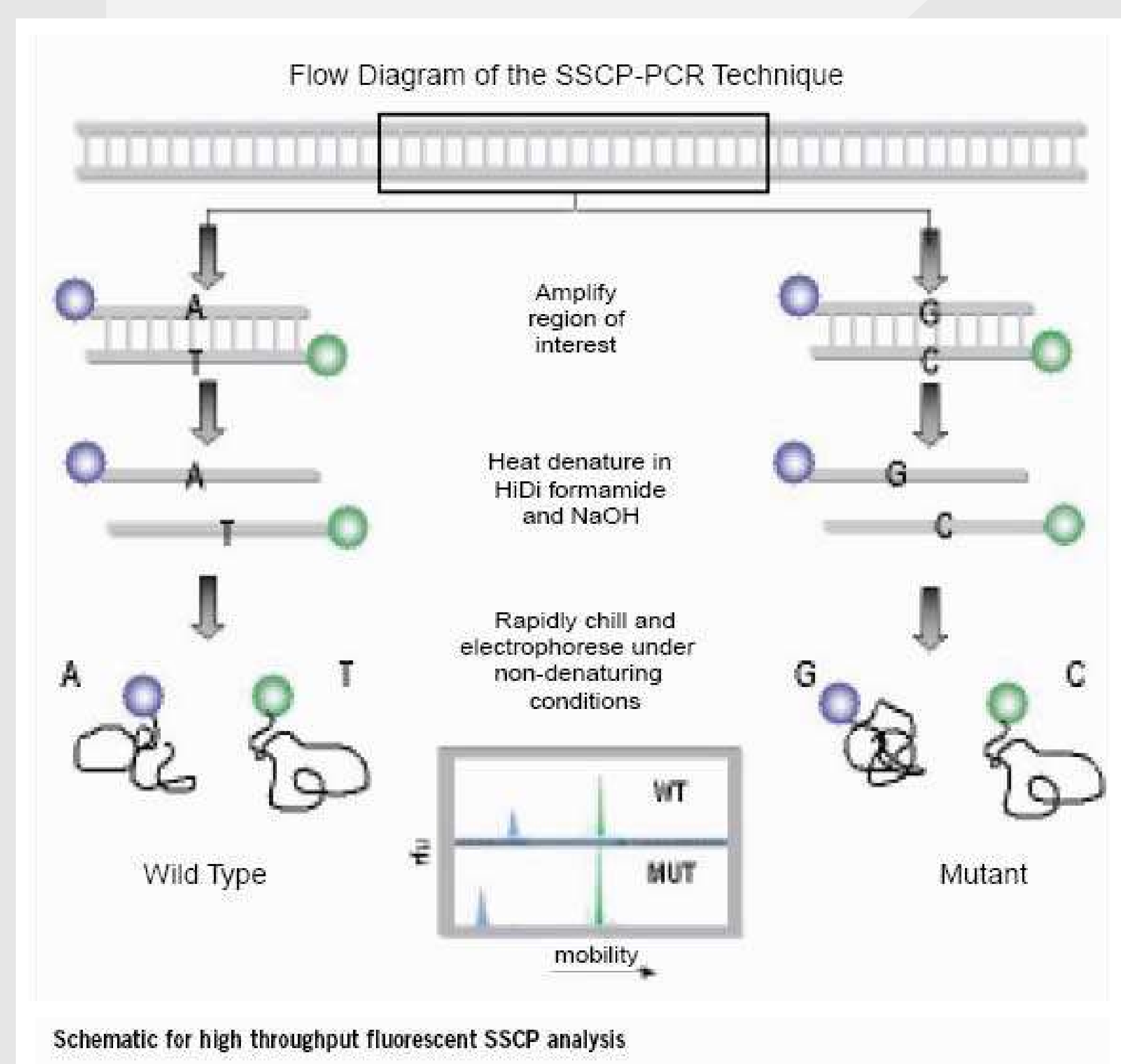
## MATERIAIS E MÉTODOS

- **Extração de DNA:** o DNA genômico foi extraído do sangue periférico utilizando o Kit Mo Bio.
- **PCR (Reação de Polimerase em Cadeia):** os exons da região codificadora do CASR foram amplificadas usando pares de primers específicos. Os produtos da amplificação foram observados em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo. Foram utilizados 250 ng de DNA genômico como molde, 200 ng de cada par de primers, 100  $\mu$ M de dNTPs, 5  $\mu$ L de Buffer 3 10x, para um volume final de 50  $\mu$ L. Após um hot start a 98°C por 3 minutos, 1  $\mu$ L de Taq polimerase foi adicionada seguido de 30 ciclos de amplificação.
- **SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples):** os PCRs desnaturados dos pacientes foram comparados com o controle sadio, baseando-se na corrida eletroforética em gel de poliácridamida 10% corado com SYBRGold e observado no transiluminador. O perfil de migração de bandas dos pacientes em estudo foram compara-dos com os controles para a determinação de uma alteração na migração.

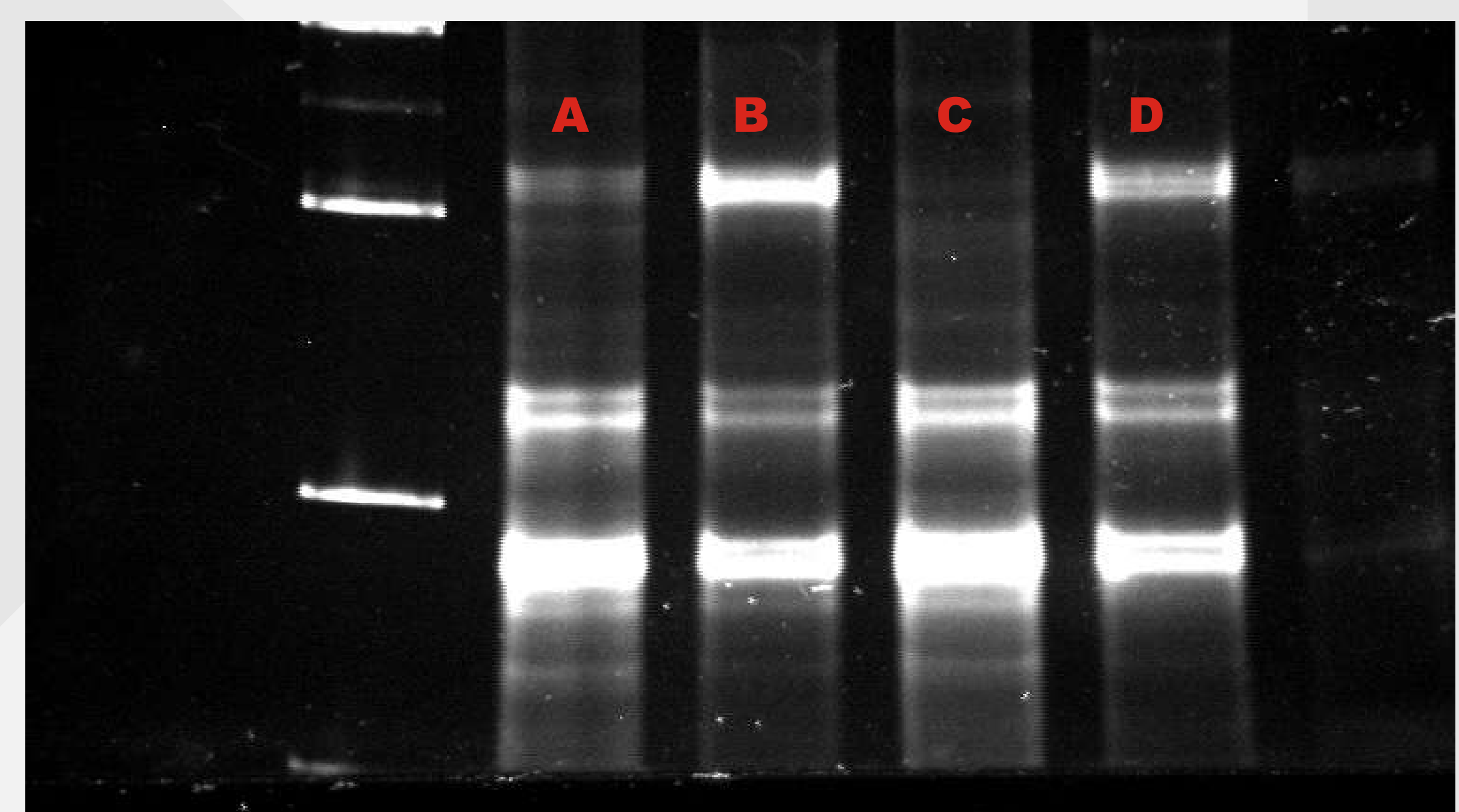
## RESULTADOS



**Figura 2:** eletroforese em gel de poliácridamida (exon 2), A e B, controles normais; C, paciente normal, D, paciente alterado.



**Figura 1:** Esquema da técnica de SSCP, que identifica mutações com precisão de uma base mutada



**Figura 3:** eletroforese em gel de poliácridamida (exon 7), A e B, controles normais; C, paciente com padrão alterado, D, paciente normal

## CONCLUSÃO

- Foi realizado análise de exon 2 de seis pacientes demonstrando padrões normais em cinco e sugestivo de mutação em um paciente (D).
- A análise do exon 5 por SSCP demonstrou padrões normais para os pacientes.

