

**P 2011****Utilização de PCR em tempo real quantitativo como método de detecção de portadoras de Mucopolissacaridose tipo II**

Ana Carolina Brusius-Facchin; Bruna Serrão de Oliveira; Jéssica Dick; Roberto Giugliani; Sandra Leistner-Segal - HCPA

A Mucopolissacaridose tipo II ou síndrome de Hunter é uma doença lisossômica de herança recessiva ligada ao X, causada por mutações ao longo do gene que causa a deficiência da enzima lisossômica L-iduronato-2-sulfato sulfatase e consequente armazenamento intralisossomal dos glicosaminoglicanos heparan e dermatan sulfato. O gene que codifica a IDS está localizado no cromossomo Xq28.1, é composto por 9 exons e 8 introns e tem um tamanho aproximado de 24 kb. Deleções de um ou mais exons já foram descritas como causa da doença em cerca de 12% dos casos, os demais casos foram descritos como portadores de mutações de ponto. A técnica de PCR, através da amplificação de todos os exons do gene IDS e análise dos fragmentos amplificados através de eletroforese em gel de agarose são utilizadas na detecção de pacientes com deleções. Contudo, a análise de portadoras através desse método se torna difícil, devido à presença de uma cópia normal do gene em um dos cromossomos X. Análise bioquímica, através da medida da atividade da IDS, para identificação de heterozigotas, nem sempre é efetiva, mesmo que teoricamente a atividade seja 50% inferior à média da atividade encontrada em indivíduos normais. Como método de análise molecular o MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) tem sido utilizado para determinação do status de portadoras, porém este é um método demorado de alto custo. Com o objetivo de desenvolver uma metodologia alternativa para a análise de portadoras, utilizamos o PCR em tempo real, através da quantificação com SYBR Green. Mães de três pacientes portadores de deleções total, e previamente analisadas por MLPA, foram incluídas na análise. Para determinar a eficiência da reação, foi utilizado o gene de referência GAPDH. A análise quantitativa foi realizada através da medida do valor dos Cts durante a fase exponencial de amplificação. Utilizando essa metodologia, o status de portadora de uma das mães e o status normal das outras duas, corroborando a análise por MLPA, pode ser confirmado. Com isso, podemos concluir que o PCR quantitativo em tempo real poder ser um potencial método a ser utilizado na detecção de portadoras de familiares de pacientes com deleção do gene IDS, o que é fundamental para o aconselhamento genético das famílias. Unitermos: PCR em tempo real; Análise de deleções; Doença ligada ao X