



## Padronização de uma reação em cadeia da polimerase para a pesquisa do polimorfismo 677C>T do gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase

Ana Paula da Silva<sup>1</sup>, Fabrício Edler Macagnan<sup>2</sup>, Ana Maria Pandolfo Feoli<sup>2</sup>, Virginia Minghelli Schmitt<sup>1</sup> (orientador)

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia - FFARM, <sup>2</sup>Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia – FAENFI, PUCRS

### Resumo

O objetivo deste trabalho é padronizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa do polimorfismo 677C>T do gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), para utilização na análise de indivíduos com Síndrome Metabólica (SM).

A SM é uma entidade complexa que associa fatores de risco cardiovasculares bem estabelecidos, como hipertensão arterial, hipercolesterolemia e diabetes, usualmente relacionados à deposição central de gordura e resistência à insulina, estando associada a um aumento estimado da mortalidade cardiovascular em 2,5 vezes.

A enzima MTHFR é regulatória no metabolismo do carbono 1 do folato, catalisando a redução irreversível do 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que é substrato de uma reação equimolar com a homocisteína, gerando metionina e tetraidrofolato. O polimorfismo 677C>T do gene *MTHFR* resulta em uma variante termolábil da enzima, com redução da atividade e conseqüente aumento dos níveis de homocisteína. Indivíduos heterozigotos (CT), quando comparados aos indivíduos CC, apresentam cerca de 60% da atividade da enzima e os indivíduos TT têm apenas 30%. O polimorfismo 677C>T do *MTHFR* é considerado a causa mais comum de hiperhomocisteinemia, relatada como um fator de risco independente e um marcador para doenças cardiovasculares.

A padronização da PCR compreende a testagem das melhores condições dos reagentes. Para padronizar a reação para pesquisa do polimorfismo 677C>T do *MTHFR*, serão testadas diferentes quantidades de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e DNA extraído das amostras.

Até o momento, foi realizada a pesquisa com diferentes quantidades de *primer*. A primeira condição testada foi 50pmol de cada *primer* na reação, porém foi verificada a formação de grande quantidade de dímeros, sugerindo o uso de uma quantidade excessiva na reação. Então, foi testada a quantidade de 25pmol, o que resultou na diminuição dos dímeros de *primer*, porém também uma redução na intensidade da banda referente ao amplicon desejado (198pb). Em seguimento, foi testada a quantidade de 37,5pmol, que resultou em pequena quantidade de dímeros e uma intensidade adequada da banda referente ao amplicon.

Baseado nos testes realizados, a condição de *primers* a ser utilizada na reação será de 37,5pmol cada. As condições ideais dos demais reagentes serão testadas individualmente para garantir o seu uso racional e a melhor sensibilidade da reação.