

## IDENTIFICAÇÃO SEMI-AUTOMATIZADA DE MUTAÇÕES FREQUENTES NO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE

TAMARA DA SILVA VACCARO; FERNANDA MARQUES DE SOUZA GODINHO; HUGO BOCK; LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA; ROBERTO GIUGLIANI; MARIA LUIZA SARAIVA-PEREIRA

Fenilcetonúria (PKU) se caracteriza pela deficiência total ou parcial da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), a qual converte o aminoácido fenilalanina em tirosina, sendo codificada pelo gene fenilalanina hidroxilase (*PAH*). A PKU é causada por mutações no gene *PAH* e muitas alterações diferentes nesse gene já foram descritas. O espectro de mutações em pacientes com PKU do sul do Brasil já foi estabelecido e as seis mutações mais frequentes estão presentes em 63.6% dos alelos analisados. Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um protocolo baseado em PCR em tempo real para a identificação das mutações IVS2nt5G>C, I65T, R261X, R261Q, R408W e IVS12nt1G>A. O grupo de estudo foi composto por amostras de 39 pacientes com PKU, as quais foram previamente testadas para essas mutações pela metodologia de RFLP e/ou sequenciamento direto. O DNA foi isolado a partir de amostras de sangue pelo método de precipitação de sais e proteinase K e quantificado pelo método fluorimétrico e as amostras diluídas a 2ng/ul. Os *primers* e as sondas foram desenhados no programa *Primer Express v. 2.0 (Applied Biosystems)*. As mutações foram analisadas pelo sistema *TaqMan®* no equipamento *ABI 7500 PCR System*. As reações foram padronizadas para as seis mutações e todas as amostras foram testadas. Os resultados obtidos nesse estudo concordaram com os resultados obtidos anteriormente. A metodologia padronizada demonstrou ser mais rápida que as metodologias empregadas anteriormente, além de necessitar de uma menor quantidade de material para a sua realização. Portanto, o novo protocolo já está incorporado na análise molecular de novos casos de PKU. Além disso, essa metodologia pode ser adaptada para a análise molecular de amostras proveniente de outras fontes de DNA, como sangue em papel-filtro (Apoio Financeiro: FIPE-HCPA, FAPERGS e CNPq).