

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO BIOMÉDICO

CURSO DE BIOMEDICINA

LUDIANA BARBOSA LOPES

RECUPERAÇÃO GÊNICA COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM
TRABALHO DE CAMPO: RELATO DE UM CASO FAMILIAR

Niterói, RJ

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO BIOMÉDICO

CURSO DE BIOMEDICINA

LUDIANA BARBOSA LOPES

RECUPERAÇÃO GÊNICA COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM
TRABALHO DE CAMPO: RELATO DE UM CASO FAMILIAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Biomedicina, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial do título de Bacharel em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Reis Almeida

Niterói, RJ

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por cuidar de cada detalhe da minha vida.

A esta Universidade, à coordenação do curso sempre tão atenciosa e a todos os professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Profº Jorge Reis, pela atenção e apoio que recebi e o incentivo que me dá para continuar a crescer cada vez mais em conhecimento e maturidade.

Aos outros mestres que também contribuíram para esse trabalho, tanto na parte laboratorial quanto na parte escrita: membros do Laboratório de Virologia (HCCF/UFRJ), Laboratório Universitário Rodolpho Albino (LURA) e todos do Laboratório Multiusuário de Apoio a Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas (LAMAP).

À minha família, ao meu namorado Allan e aos amigos que sempre me apoiaram, torceram e comemoram junto comigo a cada conquista, pois mesmo distantes sempre se fizeram presentes. E aos amigos que ganhei nesses quatro anos de curso, agradeço por todo carinho e amizade recebidos.

Resumo

Os procedimentos que envolvem a realização de testes genéticos para diagnóstico de doenças hereditárias devem ser cuidadosamente executados, evitando assim resultados insatisfatórios. Uma dessas etapas envolve a procedência do material colhido, seja sangue, saliva, pele ou outros. É indiscutível que quanto mais fresco (recente) for a amostra, ou o quão corretamente ela tenha sido armazenada, preferencialmente a -20°C , mais conservado e viável estará o material genético. Contudo, existem situações em que não é possível seguir a risca o protocolo de boas práticas laboratoriais devido às limitações encontradas na vida real e no meio clínico. Afinal, por serem as técnicas moleculares relativamente novas e dispendiosas, poucos são os hospitais públicos que as oferecem, e mesmo quando as realizam, abrangem-se poucas doenças. O trabalho aqui apresentado faz um relato de um caso real onde a análise pré-analítica de um material biológico foi o grande objetivo. Nesse contexto, ao se depararem com uma suspeita clínica de doença genética rara, denominada na literatura como Doença Renal Intersticial Autossômica Dominante (DRIAD), acometendo membros de várias gerações de uma família, cujo caso principal era tratado no Hospital Universitário Antônio Pedro/UFF, o sangue dos mesmos foi colhido em lugares e situações diferentes, incluindo a casa dos indivíduos, no intuito da realização de testes diagnósticos. Como esta unidade de saúde não realiza tais procedimentos de pesquisa genética, o material ficou guardado durante meses em condições inadequadas. Quando a oportunidade surgiu, viu-se a necessidade de constatar a integridade do material, antes de se executar o procedimento. O presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade do DNA, através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase utilizando a marcação de um gene constitutivo, bem como quantificar e analisar a pureza do mesmo. Constatou-se que, embora as condições de tempo, temperatura e armazenamento não tenham sido de acordo com o protocolo, as amostras se encontravam viáveis para exames moleculares. Esta etapa de recuperação e análise da viabilidade gênica torna possível, posteriormente, a obtenção do diagnóstico genético final, assim como o tratamento adequado para os membros da família que possuem a doença.

Palavras chaves: recuperação gênica, testes genéticos, PCR e DRIAD.

Abstract

The procedures involving genetic testing for the diagnosis of hereditary diseases should be carefully performed, thereby preventing unsatisfactory results. One of those steps involves the origin of harvested material, as blood, saliva, skin or other. It is unquestionable that the fresher sample, or how it has been properly stored, preferably at -20°C , the most preserved and viable the genetic material will be. However, there are situations where you can not follow correctly the protocol of the laboratory practices because of the limitations found in real life and in our clinical setting. After all, being a relatively new and expensive technique, there are few public hospitals that offer, and even when they do, cover up few diseases. The work presented here is an account of a real case, where the pre-analytical analysis of a material was the ultimate goal. In this context, when faced with a clinical suspicion of rare genetic disease called in the literature as renal disease Interstitial Autosomal Dominant (DRIAD), involving members of several generations of a family whose index case was treated at the University Antônio Pedro Hospital- UFF, the blood was collected in different places and situations, including the home of individuals, with the aim of carrying out diagnostic tests. As the unit does not perform such genetic research procedures, the material has been stored for months in inadequate conditions. When the opportunity came, the need to verify the integrity of the material, before performing the procedure was seen. This study aimed to evaluate the viability of the DNA through the Polymerase Chain Reaction technique using the marking of a constitutive gene, as well as quantify and analyze the gene's purity. It was found that, although the conditions of time and storage temperature have not been according to the protocol, samples were viable for molecular testing. Concluding, subsequently is possible to obtain the specific monitoring and diagnosis, and appropriate treatment for family members.

Key words: gene recovery, genetic testing, PCR and DRIAD.

Lista de Abreviaturas

ddNTP - Didesoxirribonucleotídeo Trifosfato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleótido trifosfato

DP - Diálise Peritoneal

DRAU - Doença Renal associada a Uromodulina

DRC - Doença Renal Crônica

DRIAD - Doença Renal Intersticial Autossômica Dominante

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

HD - Hemodiálise

HUAP - Hospital Universitário Antônio Pedro

LAMAP - Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Sumário

1. Introdução.....	7
1.1 Diagnóstico de doenças hereditárias.....	8
1.2 A pesquisa de um gene constitutivo - β -actina.....	11
1.3 Descrição clínica e a hipótese diagnóstica.....	12
1.4 A doença - Doença Renal Intersticial Autossômica Dominante.....	14
1.5 Genética e Fisiopatologia da DRIAD.....	15
2. Objetivos.....	16
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1. Dos Pacientes.....	16
3.1.1 Heredograma.....	17
3.2 Das amostras.....	18
3.2.1 Processamento das amostras biológicas.....	18
3.2.2 Processamento Químico Convencional.....	19
3.2.3 Extração de DNA.....	19
3.2.4 Reação da Polimerase em Cadeia.....	20
3.2.5 Quantificação de DNA por espectrofotometria.....	22
4. Resultados.....	22
5. Discussão.....	23
6. Perspectivas e envolvimento futuros do material.....	28
7. Conclusão.....	28
8. Bibliografia.....	29
ANEXOS	
ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.....	32
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	33

1. Introdução

Quando certa quantidade de sangue venoso é colhida para análises de rotina, mesmo tendo o cuidado na coleta e na escolha do tubo, este pode ficar exposto a diversos fatores externos que alteraram sua composição levando a uma diminuição da qualidade para testes laboratoriais (GUIMARÃES *et al*, 2011). Até mesmo o material genético que se encontra envolto pelo núcleo, aparentemente seguro, pode sofrer alterações. Ainda que a dupla fita seja considerada estável e resistente, fatores como temperatura e agitação podem danificá-la diminuindo sua integridade.

Para a realização de testes diagnósticos ou mesmo para fins de estudo e pesquisa é necessário que o DNA se encontre em boas condições. Os testes moleculares também estão sujeitos a erros, principalmente na fase pré-analítica (MELO *et al.*, 2010). Etapa que envolve desde a preparação do paciente, coleta, identificação e armazenamento até o momento em que será manuseada. Como meio de evitar perdas foram estipuladas condições de coleta e armazenamento que promovam uma proteção e uma durabilidade ao material, evitando que erros possam afetar a confiabilidade do resultado (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Determinar a fonte da coleta é o primeiro passo. Uma revisão de práticas atuais de banco de DNA para estudos epidemiológicos testou a qualidade e a quantidade de DNA obtido de quatro fontes (manchas de sangue seco, sangue total, linfócitos e *swab* de epitélio bucal) mostrou que o melhor resultado é obtido de sangue total, tanto para extração imediata quanto para estocagem (STEINBERG *et al.*, 2004)

A escolha do tubo é essencial. Estudos demonstraram que a heparina é inibidora da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo assim os tubos contendo anticoagulante como etilenodiaminotetracético (EDTA) e citrato são os recomendados (KOTIKALAPUDI *et al.*, 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 2014) recomenda-se que o sangue total usado para análise de DNA seja armazenado por no máximo 24h em temperatura ambiente ou de 2 a 8°C por até 72h antes da extração. Para armazenamentos em longos períodos, o soro ou plasma devem ser estocados a -20°C ou em temperatura inferior, -80°C, para uma melhor conservação.

Os Kits comerciais utilizados para a extração costumam garantir melhores resultados quando são usados sangues recém-colhidos ou descongelados de -20 a -70°C.

Porém, nem sempre é possível seguir esses critérios. Muitos profissionais que fazem trabalho de campo, por exemplo, vão até locais distantes realizar as coletas. Não armazenam como o recomendado e às vezes demoram dias até que a amostra esteja em um laboratório para ser processada. Ou, como é o caso relatado nesse trabalho, amostras que foram colhidas, porém não puderam ser analisadas por ausência de laboratório público que as faça e que ainda foram armazenadas de forma inadequada, segundo os critérios estabelecidos. Sendo esse material nobre extraído das pessoas acometidas pela doença, inclusive que podem ser difíceis de serem reencontradas, será que essa demora em condições não apropriadas torna o sangue uma fonte inviável para análise do material genético?

1.1 Diagnóstico de doenças hereditárias

“O DNA, ácido desoxirribonucleico, é uma molécula de cadeia dupla em formato de espiral. E cada cadeia é composta por bases purinas e pirimidinas unidas por ligações de hidrogênio. Essas bases são: adenina, timina, guanina e citosina” (WATSON; CRICK, 1953). A combinação dessas estruturas gera um código genético capaz de comandar o funcionamento de um organismo vivo. Cada porção do DNA é chamada de gene, composto por uma sequência específica e tendo uma função determinada. Estes são quem determinam as características que passarão para as futuras gerações e também são neles onde ocorrem as mutações, em uma ou mais bases, que podem desencadear alterações funcionais ou até deletérias. E são essas mutações as responsáveis por muitas das doenças genéticas que se conhecem hoje. (KLUG et al., 2009)

Cerca de 3% a 10% da população possui alguma doença hereditária segundo a Organização Mundial da Saúde. Tais pessoas com essa suspeita costumam encontrar dificuldade para ter um diagnóstico preciso, pois exige técnicas e equipamentos específicos muita das vezes não disponíveis gratuitamente, como é o caso do Brasil. O SUS oferece testes para algumas doenças raras, porém a maioria fica sem sua exata origem. Existem clínicas e laboratórios particulares aptos a essa prática, contudo, a limitação financeira é um impeditivo para o prosseguimento do estudo. Estima-se que o mercado de testes moleculares para fins diagnósticos tenha tido um crescimento de 11,49% anualmente entre 2009 e 2014 (MELO *et al.*, 2010).

A maneira encontrada por muitos médicos de hospitais públicos é recorrer a instituições de estudo e pesquisa que desenvolvam projetos naquela determinada área do

conhecimento. Essa parceria não só permite a continuidade do tratamento e orientação médica como também auxilia a expandir o conhecimento sobre tais alterações gênicas.

Para a realização do exame é preciso colher uma amostra biológica como sangue, saliva, tecido, entre outros, e realizar a extração do DNA que pode ser feita utilizando sistema automatizado, kits comerciais manuais ou ensaios padronizados em laboratório (*in house*). A escolha do método de extração também irá influenciar na qualidade do produto final (RIEMANN *et al.*, 2007).

A partir do material extraído se inicia a amplificação do material genético utilizando um termociclador para a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) e os primers (iniciadores compostos de ácidos nucleicos que complementam uma sequência do DNA) da região que se deseja amplificar. O produto formado é submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose onde os fragmentos são separados pela diferença de tamanho (PERMENTER *et al.*, 2015). Vide Figura 1.

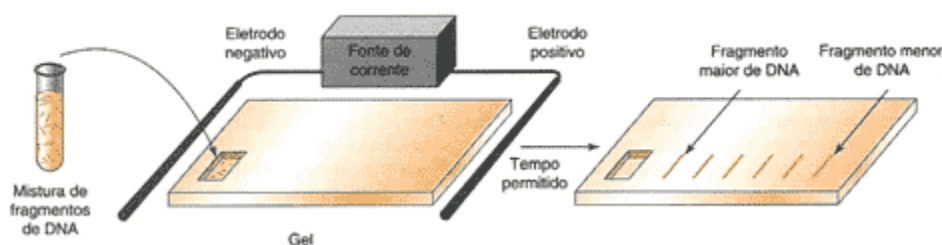


Figura 1. Modelo esquemático de uma eletroforese. Fonte:

<http://www.sobiologia.com.br/figuras/Genetica/eletroforese.gif> Acesso 22/01/2016

Esse é um meio qualitativo de se avaliar a presença de um gene determinado. Já que como resultado aparecerá no gel uma banda iluminada com tamanho específico ao do fragmento estudado.

Para fazer uma análise mais detalhada, ou seja, identificar as bases nitrogenadas de uma região específica e assim poder identificar sequências de nucleotídeos de DNA pode-se fazer o sequenciamento genético a partir de uma reação de sequenciamento.

Diferentemente da reação de PCR utiliza-se nucleotídeos marcados com fluorocromos, os ddNTPs. No final os fragmentos gerados de tamanhos diferentes apresentam sempre como último nucleotídeo um ddNTP (NIKIFOROV, 2014). Ao ser colocado em um equipamento, sequenciador de DNA, também é submetido a uma corrida eletroforética similar, onde cada fragmento tem seu fluorocromo excitado por um laser emitindo assim um comprimento de onda correspondente a uma cor que por sua vez é traduzido pelo equipamento em sua base nitrogenada respectiva. Esses dados são organizados pelo programa gerando então a sequência daquele trecho estudado na forma de um eletroferograma, como é ilustrado na Figura 2. abaixo.

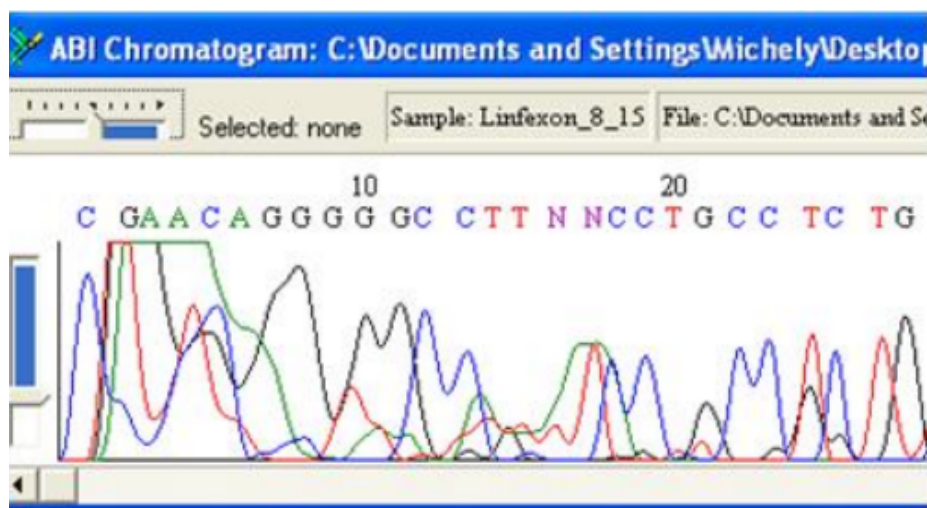


Figura 2. Eletroferograma visualizado pelo aplicativo Chromas (da Applied Biosystems) em uma interface gráfica. Fonte: (VIANA, 2007)

Um aparelho muito utilizado também após a extração é o NanoDrop, um espectrofotômetro capaz de quantificar DNA de cadeia dupla de acordo com a Lei de Lambert-Beer, resumida na fórmula a seguir.

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

Onde C é a concentração de DNA em $ng/\mu L$, Abs a absorvância, em 260nm que corresponde ao pico de absorção de UVs do DNA, e que corresponde ao coeficiente de extinção, que para o DNA é igual a $50ng.cm/\mu L$, e b a altura da coluna criada no espectrofotômetro, correspondendo a 1cm. Desse modo, quando o aparelho mede a absorvância a 260nm, tem-se um valor, que multiplicado por 50 (constante e) indica a concentração de DNA na amostra, em $ng/\mu L$. Outro dado importante de medir é a absorvância em 280nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de proteínas. Com isso, mede-se a razão 260/280 para verificar a pureza da amostra. Quanto maior a razão, mais pura será a amostra. O valor utilizado como referência de pureza do DNA é de 1,8 (SILVA, 2014). O modelo de curva obtida está ilustrado na Figura 3 abaixo.

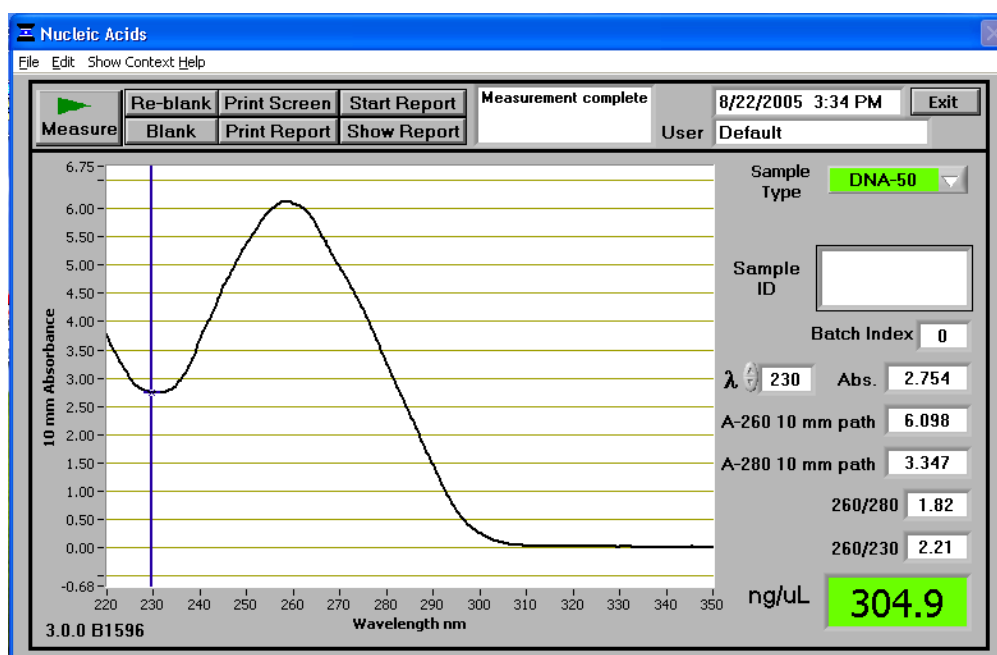


Figura 3: Exemplo de comprimento de onda vs a curva de absorvância de uma amostra no NanoDrop.

Fonte: <http://openwetware.org/wiki/Image:DNANanodropExample1.PNG>. Acesso 22/01/2016

1.2 A pesquisa de um gene constitutivo - β -actina

Alguns testes se baseiam na pesquisa de um gene constitutivo muito utilizado na literatura para fins de controle interno, o gene da β -actina (SELVEY *et al.*, 2001). As actinas são proteínas altamente conservadas envolvidas na motilidade, estrutura e integridade celular. A β -actina faz parte de uma família formada por seis isoformas, quatro musculares e duas citoplasmáticas, esta última subdividida em γ e β . Sendo a principal isoforma encontrada, é expressa na maioria das células eucariotes não musculares bem como em mioblastos indiferenciados, participando, portanto de inúmeras funções. Seu gene (ACTB) se encontra no cromossomo 7p22. (BLANCO *et al.*, 2002).

Seu fragmento possui aproximadamente 177 pares de base e este é o tamanho da banda iluminada que se espera encontrar na eletroforese em gel de agarose como resultado.

1.3 Descrição clínica e a hipótese diagnóstica

Um heredograma representativo de uma doença autossômica dominante possui alguns itens que o caracterizam como: indivíduos afetados precisam estar presentes em gerações sucessivas; é preciso que haja números iguais de afetados entre os sexos; cada

indivíduo doente tem que ter pelo menos um de seus pais apresentando a doença, casais afetados podem gerar descendentes normais; casais normais dificilmente apresentarão indivíduos afetados (PASTERNAK, 2002). A partir do caso índice e do heredograma montado baseado na sua história familiar constatou-se ser uma doença autossômica dominante.

Com os exames laboratoriais em mãos avaliou-se a proteinúria de alguns dos pacientes. Uma doença glomerular tem como característica geral um dano renal parenquimatoso, sendo a albumina o principal marcador desse dano. O paciente normalmente apresenta proteinúria > 300mg/dia (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011). Porém, nenhum deles apresentou proteína na urina, descartando a possibilidade de ser uma doença glomerular. Não apresentavam edemas e relataram urinar excessivamente. Lesões intersticiais são caracterizadas por gerar pouca proteinúria e diurese.

Os exames de imagem de alguns membros revelaram a presença de múltiplos cistos renais.

Com esse conjunto de informações chegou-se à conclusão de um possível caso de uma doença renal localizada no interstício e de caráter autossômico dominante.

Ao procurar na literatura se haviam informações a respeito, encontrou-se um artigo, que será discutido neste trabalho, sobre um estudo realizado na Áustria descrevendo uma doença que afetava cinco famílias no país todo, a qual essa família brasileira se encaixava. Ainda não foram relatados na literatura casos semelhantes a esse no Brasil. Porém estima-se que 200 famílias americanas sofrem da mesma doença (BLEYER, 2015).

Baseado na literatura sabe-se que a Doença Renal Intersticial Autossômica Dominante (DRIAD) é um distúrbio raro. A partir desses estudos, o que se tem comprovado é que essa alteração genética pode ser de três tipos: Mutação no gene da UMOD que codifica a uromodulina, mutação no gene REN, que codifica a renina, mutação no gene MUC1, que codifica a mucina-1, podendo haver mutação em outros genes ainda não identificados. A alteração no gene da UMOD é a mais frequente. Por isso a testagem para a mutação nesse gene é priorizada (BLEYER, 2015).

A Uromodulina, também chamada de Tamm-Hosffal, é uma proteína expressa na alça ascendente de Henle que, em condições normais, se encontra em grande quantidade na urina. Sua função ainda não é totalmente conhecida, porém, uromodulinas mutadas podem ocasionar um déficit na reabsorção tubular, causando assim quadros de poliúria e hiperuricemia (AYASREH-FIERRO N1, 2013). Entretanto, os membros da família brasileira estudada não apresentaram níveis elevados de ácido úrico no sangue. Uma

alteração que pode interferir nesses níveis e que poderia explicar tal fato seria o aumento da fração de excreção desses pacientes.

O ácido úrico, derivado da degradação de purinas, normalmente tem de dois terços a três quartos excretados pelos rins e o restante pelo intestino. A uricemia média atinge valores de 3,0 a 4,0 mg/dl em crianças, já quando adultos, entre 6,0 e 6,5 mg/dl em homens e aproximadamente 5,0 mg/dl em mulheres. Praticamente todo ácido úrico é filtrado e 90% é reabsorvido, resultando em fração excretora de 10%. Seu transporte acontece principalmente na porção tubular, tendo diversos transportadores responsáveis por essa função. A uricosúria é representada principalmente pelo urato filtrado que escapa à reabsorção. Diversos fatores como polimorfismos genéticos nesses transportadores, diabetes, medicamentos, nefrite intersticial aguda, entre outros, podem causar a hipouricemia (RIELLA, 1996).

Em alguns casos, o aparecimento de cistos medulares pode acontecer, contudo não se sabe ao certo se esses são parte da síndrome. Quando a mutação é no gene da MUC-1 existe uma prevalência de cistos significativa (ONOE *et al.*, 2016), já quando são outros genes, REN e UMOD, quase não há. Para diagnosticá-los fazem-se necessários exames de imagens.

Os exames de imagem realizados em alguns desses pacientes constataram a presença de múltiplos cistos. Em um dos pacientes com o resultado da biópsia renal confirmou-se a presença de cistos tubulares com fibrose tubulointersticial.

Uma característica peculiar quando há mutação no gene da REN é a presença de anemia, principalmente na infância, quando os sintomas da disfunção renal ainda não apareceram. Esse baixo nível de eritropoietina pode ser explicada devido ao baixo nível de angiotensina. Com o decorrer da idade esse quadro declina, pois os hormônios sexuais compensam a angiotensina na produção de eritrócitos (BLEYER, 2015). No decorrer das consultas médicas, curiosamente, a paciente relatou que ela e algumas de suas irmãs trataram de anemias quando jovens.

Diante dos motivos clínicos e dos exames feitos confirmou-se ainda mais as suspeitas de ser uma DRIAD, entretanto surgiu-se uma nova questão: trata-se de qual tipo de DRIAD?

1.4 A doença - Doença Renal Intersticial Autossômica Dominante

Pacientes diagnosticados com Doença Renal Crônica tem como principais causas da doença a glomerulonefrite crônica, hipertensão e diabetes mellitus. Outras causas seriam por doenças específicas como Lúpus ou Doença Renal Policística, por

exemplo. Mas ainda resta uma grande parcela composta por diagnósticos incertos ou de etiologia desconhecida. (GRICO; KUSOMOTA; CÂNDIDO, 2009; RIBEIRO et al., 2008)

As doenças familiares são muito pouco estudadas e, por conseguinte, muito pouco conhecidas no meio clínico. As mais conhecidas em nefrologia, sejam dominantes ou recessivas, autossômicas ou ligadas ao sexo, são as doenças de Alport, Fabry, Doença Renal Policística, Glomeruloesclerose Segmentar e Focal e IgA familiar, entre outras. Por serem mais habituais, logo fazem parte das hipóteses médicas. Em contra partida aquelas consideradas raras ou que ainda estão em processo de descobrimento e por isso são pouco conhecidas, tornam-se mais difíceis de serem diagnosticadas, tornando seu tratamento mais demorado e muitas vezes ineficaz.

O distúrbio classificado como D RIAD é raro e heterogêneo. Caracteriza-se por ter uma progressão lenta que leva a uma diminuição da função renal. Seus sintomas podem aparecer já na adolescência e quando mais velhos se agravam para uma doença renal terminal. Em alguns casos pode surgir antes dos 10 anos de idade. Os acometidos costumam apresentar sedimento urinário pouco expressivo, gota, creatinina elevada, doença renal crônica, proteinúria mínima ou ausente e dependendo da alteração podem aparecer cistos medulares. O diagnóstico clínico presuntivo se baseia na apresentação de manifestações clínicas acima descritas além de um histórico familiar de doença renal de padrão sugestivo de herança autossômica dominante. Entretanto este só poderá ser confirmado mediante testes genéticos. O tratamento se concentra em controlar a hiperuricemia e gota quando presente e a DRC progressiva (BLEYER; KMOCH, 2014).

Neste trabalho, baseado na história familiar juntamente com o diagnóstico clínico e na busca de informações na literatura médica, surgiu a hipótese de ser DRIAD a doença que estaria afetando a família aqui relatada. Para ratificar a suspeita clínica dos membros dessa família brasileira, baseando-se em testes moleculares seria necessária a coleta de sangue como fonte de material genético. As amostras foram colhidas e por motivos diversos não foram armazenadas corretamente. Para poder constatar se essas amostras ainda são viáveis e dar continuidade ao diagnóstico e tratamento, a análise da sua integridade gênica se torna indispensável.

1.5 Genética e Fisiopatologia da DRIAD

O gene UMOD localiza-se no cromossoma 16q12. É responsável por codificar uma proteína, uromodulina, também conhecida como Tamm-Hosfall, produzida exclusivamente na parte ascendente espessa da alça de Henle. Tem características

insolúveis e propriedades aderentes e pegajosas que são importantes para manter a impermeabilidade desse segmento da alça (TURNER *et al.*, 2003). Por ser altamente glicosilada, depois de ser secretada para a urina se liga a constituintes como bactérias, proteínas e cristais (LHOTTA *et al.*, 2012). Também tem a função de facilitar o transporte intracelular do transportador Na-K-2Cl e do canal ROMK de potássio na superfície apical das células tubulares. Mutações nesse gene podem estar localizados nos exons 4 ou 5, ou de forma mais rara nos exons 6 ou 8. A maioria deles são mutações missenses, resultando na deleção ou adição de um resíduo de cisteína. Sendo assim, as proteínas geradas não se unem de forma adequada e são incapazes de saírem do retículo endoplasmático, ficando acumuladas dentro das células da alça podendo levar à atrofia dessas células e até à sua morte. Ainda podem comprometer a síntese e a secreção de uromodulinas normais, reduzindo sua excreção urinária. Alterações no gene UMOD podem gerar quadros de hiperuricemia e doença renal crônica progressiva (BLEYER, 2015).

O gene REN localizado no cromossoma 1q32 é responsável por expressar a renina em vários segmentos do túbulo renal. A sinalização desse gene faz com que ocorra a translocação da pró-pré-renina até o retículo endoplasmático onde será convertida a pró-renina. Esta por sua vez será clivada por lisozimas e transformada em renina, que no complexo renina-angiotensina regula a pressão sanguínea e o equilíbrio de fluidos e sais do corpo. Mutações que alterem esse sinal interrompem esse deslocamento da pré-pró-renina fazendo com que esta se acumule no citoplasma das células produtoras de renina podendo levar a um dano estrutural e até à apoptose da célula. Além de diminuir os níveis de renina e conseqüentemente de angiotensina (ŽIVNÁ *et al.*, 2009).

O gene MUC1 está localizado no cromossoma 1q21. É o gene responsável por induzir a formação de mucina-1, uma proteína específica dentro de várias outras proteínas de mucinas que compõem o muco, substância encontrada na mucosa das vias respiratórias, digestivas, reprodutivas e em outros locais do corpo. Esta proteína em específico também tem um papel no desenvolvimento renal. Indivíduos afetados apresentam a inserção de uma citocina em uma sequência de repetição na sua região codificante, produzindo então uma mucina-1 anormal na região intracelular da alça de Henle, no túbulo distal, no ducto coletor e em sua membrana apical. Sua patofisiologia nos rins ainda não é bem compreendida. Contudo, estudos em camundongo mostram que esta não é uma proteína essencial, indicando que em pacientes afetados ela possa ter

um efeito dominante negativo ou de ganho de função (JAIN *et al.*, 2105). Sabe-se, porém que essa alteração leva a uma insuficiência renal lentamente progressiva e na maioria das vezes, à necessidade de diálise ou transplante renais futuros (ARCINIEGAS *et al.*, 2015)

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a integridade do material genético oriundo de amostras de sangue armazenadas em condições não recomendadas de um caso familiar.

2.2 Objetivo Específico

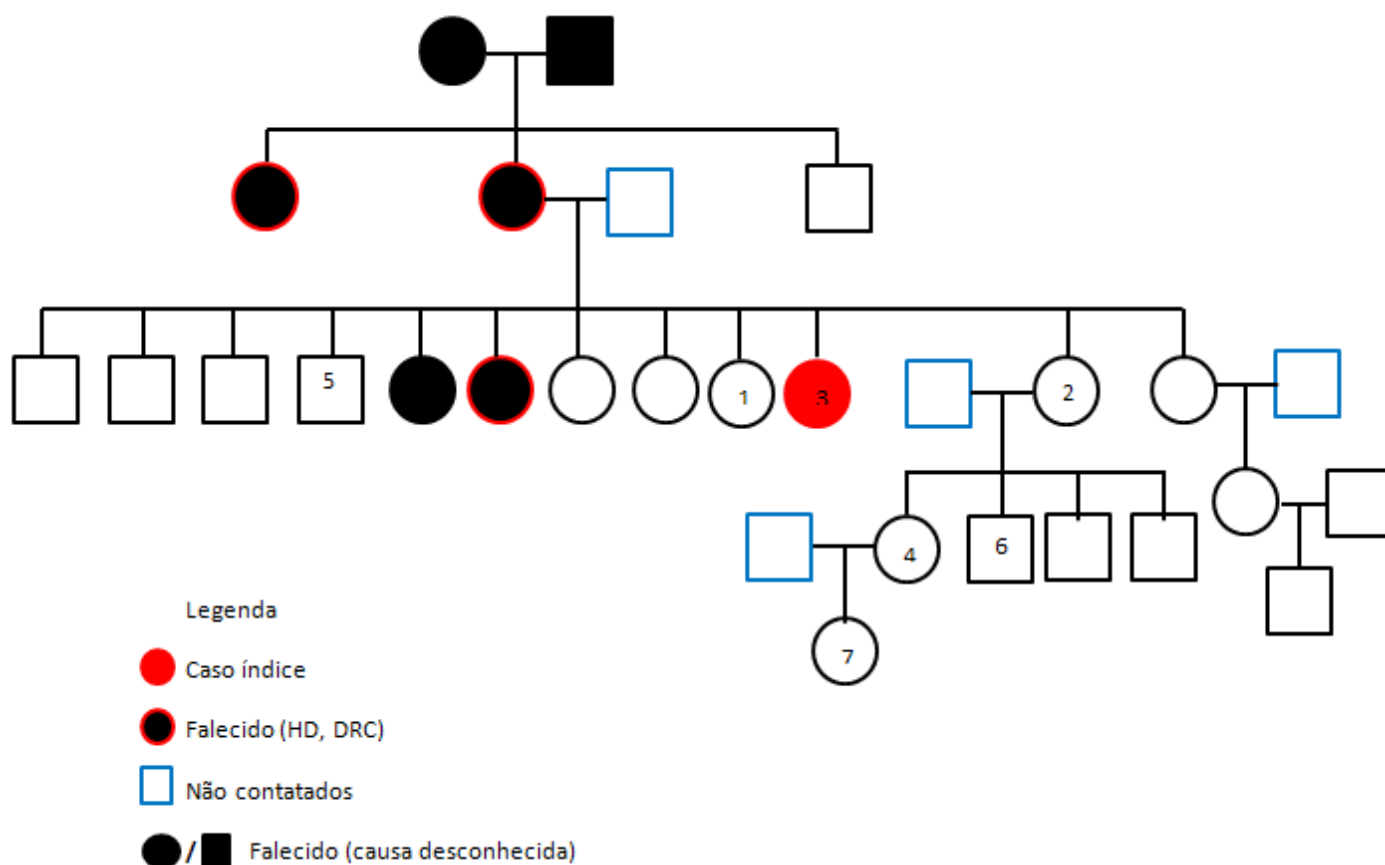
Avaliar a concentração e a pureza do DNA obtido.

3. Materiais e Métodos

3.1 Dos pacientes

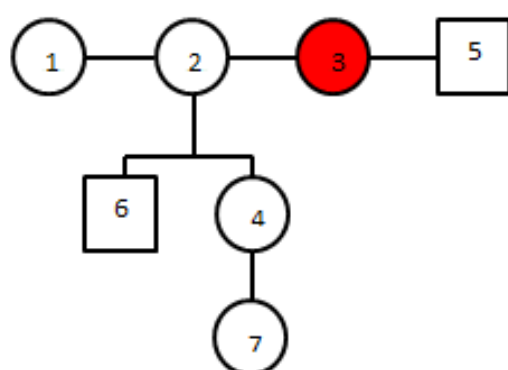
O caso índice (uma senhora de 57 anos de idade, parda, natural do Rio de Janeiro) procurou o médico relatando uma dificuldade em tratar sua doença, uma alteração renal até então sem um diagnóstico preciso, que não se enquadrava em nenhum padrão conhecido pela comunidade médica. A partir da anamnese e de um relato feito pela paciente, descobriu-se que as irmãs também sofriam de problemas parecidos. Uma delas, recebeu o rim de um irmão. Outra irmã, falecida, passou por hemodiálise durante sete anos. Uma terceira, com DRC, se recusou a fazer hemodiálise e veio a falecer alguns anos mais tarde. Descobriu-se que a mãe e uma tia também passaram por hemodiálise e que um casal de sobrinhos do caso índice apresentou os mesmos sintomas. Ou seja, três gerações apresentaram aspectos clínicos aparentemente parecidos, afetando ambos os sexos. Perante o caso descrito, surgiu à hipótese de analisar também toda sua família, suspeitando ser uma doença genética. Um heredograma da família, a seguir, foi montado para ilustrar melhor o caso:

3.1.1 Heredograma



Para tal, foram contabilizados vinte e cinco membros conhecidos da família, sendo sete deles com valor para estudo.

Explicado o motivo e a intenção da pesquisa, os familiares autorizaram por escrito participar e realizar os exames necessários.



Legenda

- 1- Em HD há 7 anos
- 2- Transplantada renal
- 3- Caso índice-múltiplos cistos medulares
- 4- HAS
- 5- Doador renal
- 6- Há 3 anos em DP
- 7- Não apresenta sintomas

3.2 Das amostras

As amostras avaliadas neste trabalho pertencem a membros dessa família atendidos no ambulatório de nefrologia do Hospital Universitário Antônio Pedro. Baseado na anamnese dos pacientes e de seus relatos clínicos a suspeita é de se tratar de

uma DRIAD. Na literatura há, provenientes de outros países, relatos de casos semelhantes aos encontrados aqui no Brasil. Essa patologia recebeu o nome de DRIAD.

As amostras foram coletadas, ficaram armazenadas em um recipiente de plástico em temperatura ambiente por alguns meses até serem estocadas em geladeira a -4°C . Passado quase um ano após a coleta, em parceria com laboratórios de pesquisa da Universidade Federal Fluminense, foi possível que a extração fosse feita.

Entretanto, baseando-se nas condições de armazenamento recomendadas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial e por vários artigos na literatura eram poucas as chances de o material se encontrar viável para estudos genéticos, que requerem a máxima integridade do DNA. Diante disso havia uma necessidade de recuperação gênica, ou seja, uma avaliação da integridade do material antes de submetê-lo à pesquisa dos genes em questão.

3.2.1 Processamento das amostras biológicas

O sangue foi colhido tanto no HUAP/UFF como nas casas de alguns membros da família. Um técnico especializado realizou a coleta através da veia mediana cubital, por meio do sistema de coleta de sangue a vácuo e em tubos com anticoagulante (EDTA). Não foram centrifugados e os tubos a princípio ficaram em temperatura ambiente por alguns meses e depois foram armazenados em geladeira (4°C).

3.2.2 Processamento Químico Convencional

A análise da creatinina sérica foi realizada em alguns dos membros da família, os quais tinham prontuário no HUAP.

Juntamente com a ureia, a creatinina, produto do metabolismo da creatina e fosfocreatina muscular, é comumente utilizada como marcador de função renal. Por ser exclusivamente excretada pelos rins, sua concentração plasmática é inversamente proporcional à filtração glomerular. É através do “*clearance*” dessas substâncias e sua concentração no sangue que se avalia o funcionamento renal. Os níveis séricos normais variam no homem de 0,8 a 1,3mg/100ml e na mulher de 0,6 a 1,0 mg/100ml(RIELLA, 2003). Os valores estão na tabela abaixo. A partir deles é possível confirmar a alteração na função renal desses pacientes.

TABELA 1. Quadro clínico e níveis de Creatinina sérica dos pacientes.

Paciente	Clinica	Data da medição	Creatinina sérica (mg/dL)
1	DRC	-	-
2	DRC	-	-
3	Cisto medular renal/anemia	Ago/2015	2,69
4	Nefrite Intersticial Familiar com biópsia do rim/	Ago/2015	1,58

	anemia na infância		
5	Saudável – Doador renal	Ago/2015	1,20
6	DRC/ Alto nível de ácido úrico/ anemia na infância	-	-
7	Infecção frequente no trato urinário	Ago/2015	0,89

3.2.3 Extração de DNA

As amostras estavam guardadas por muito tempo, aproximadamente um ano, em geladeira convencional no LAMAP. Foram transportadas em um suporte de isopor com gelo reciclável até o Laboratório de Virologia, localizado no Hospital Clementino Fraga Filho (HCFE/UFRJ) onde foi realizada a extração de DNA.

A extração foi feita utilizando um kit, DNeasy Blood & Tissue Kit, QUIAGEN, seguindo as instruções do fabricante.

Procedimento

O Tissue lysis buffer “Buffer ATL” foi aquecido a 56°C antes de iniciar o processo. A cada tubo de 0.5mL devidamente identificado adicionou-se 200µL de Buffer ATL, 25 µL de Proteinase K e 200 µL da amostra de sangue total conservado em EDTA, as quais foram homogeneizadas em um agitador de tubos (AT 56, PHOENIX, Brasil) e incubadas a 56°C por 20 minutos em um termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer, Estados Unidos). Em seguida foi adicionado 200 µL de Etanol Absoluto P.A. Transferiu-se essa mistura para a coluna Quiagen DNeasy fixada ao tubo coletor e em seguida foi submetida a uma centrifugação de 8.000rpm por 2 minutos em uma microcentrífuga (NT 800, Novatecnica, Brasil). Foi desprezado o fluido formado e a coluna foi recolocada em um novo tubo coletor. Após a adição de 500 µL da solução “Washer buffer” AW1 as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 12.000 rpm por 1 minuto. O fluido formado foi novamente desprezado e recolocou-se a coluna em um novo tubo coletor. Em seguida foi adicionado 500 µL da solução “Washer buffer” AW2 seguida por outra centrifugação de 12.000 rpm por 1 minuto. Desprezou-se o fluido formado e a coluna foi recolocada em um microtubo (Eppendorf de 1,5 mL) e centrifugada a seco a 8.000 rpm por 1 minuto a fim de eliminar todo resíduo de etanol. A coluna então foi colocada em um tubo cônico estéril de poliestireno de 1,5mL previamente identificado com o número da amostra respectiva. Foi adicionado 100 µL do tampão “Elution buffer” AE e as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente a coluna foi descartada e o tubo cônico estéril contendo o DNA foi estocado a -20°C até o momento de sua utilização na amplificação.

3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Para detecção qualitativa do DNA nas amostras de sangue utilizou-se a PCR com iniciadores para a região da β -actina.

Os iniciadores utilizados na PCR qualitativa estão descritos na tabela 1.

TABELA 2. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR qualitativa

Oligonucleotídeos	Orientação	Sequência
Primer 2470	Senso	5' TCATCACCATTGGCAATGAG 3'
Primer 2719	Antisenso	5' CAGTGTGTTGGCGTACAGGT 3'

Materiais:

- Água Milli-Q
- 10 x tampão de PCR
- dNTP's
- $MgCl_2$ 50Mm
- Enzima Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*®)

Aos tubos de poliestireno de 0,5 mL foram acrescentados 17,9 μ L de água Milli-Q; Tampão 10x; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTP 200 μ M; Taq Polimerase 1,5 U; primer 0,08 μ M e 100ng de DNA. Dando um volume final de 25 μ L em cada tubo.

Em um termociclador (GenAmp PCR System 2400, Roche Diagnostic System, Estados Unidos) as amostras foram submetidas às seguintes condições de reação: um ciclo de desnaturação a 94°C por 5 minutos, depois à fase de hibridização em 40 ciclos de 94°C por 55 segundos, 55°C por 55 segundos e 72°C por 55 segundos, à extensão em 72°C por 6 minutos e depois refrigeradas a 4°C até serem retiradas e armazenadas no freezer.

3.2.5 Gel de Eletroforese

Materias:

- Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE 0,5x)
- Brometo de etídeo
- Agarose 2%
- Padrão de peso molecular

Método

Foram submetidos à eletroforese 7 μ L do produto da PCR em gel de agarose a 2% em tampão TBE a 0,5x a 120 volts/20 minutos em uma cuba eletroforética (PS 250-1, Sigma)

Após a corrida, o gel foi examinado em um transiluminador (Mod M-26E, UVP, Estados Unidos) com luz ultravioleta a 254 nm, para a visualização das bandas de DNA

de 177 pares de bases. O brometo de etídio, usado como revelador, se intercala entre as fitas da dupla hélice de DNA.

Foram usados água estéril como controle negativo e uma amostra de sangue do laboratório como controle positivo.

3.2.5 Quantificação de DNA por espectrofotometria

O DNA foi quantificado pelo método de espectrofotometria utilizando o aparelho nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000c, Estados Unidos) onde foram medidos a concentração de material genético na amostra bem como a sua pureza, baseado na razão da absorvância de DNA sobre absorvância de proteína.

4. Resultados

As figuras 1 e 2 mostram o resultado da PCR para a amostra de DNA, utilizando iniciadores específicos para a região do gene da β -actina. Observam-se bandas com tamanho molecular de aproximadamente 177pb as quais foram visualizadas no gel de agarose conforme o esperado.

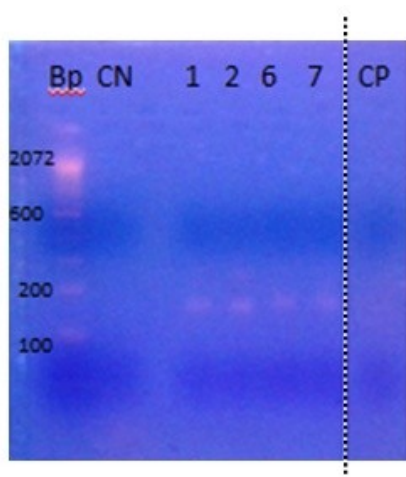


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR. Bb: Marcador de peso molecular. CN: controle negativo. 1 a 7: amostras. CP: controle positivo. Após a linha tracejada tem-se o CP: controle positivo, assim editado para melhor visualização do gel.

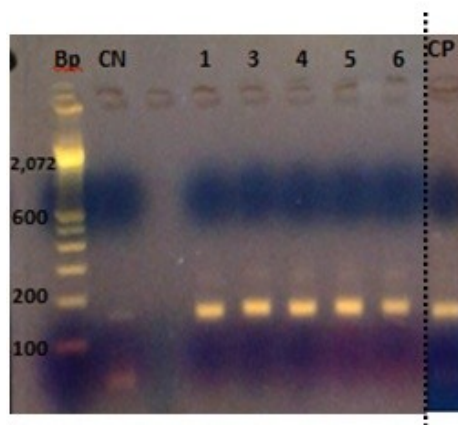


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR. Bb: Marcador de peso molecular. CN: controle negativo. 1 a 6 amostras. Após a linha tracejada tem-se o CP: controle positivo, assim editado para melhor visualização do gel.

sados

para fins de testes do material. Já no segundo foram utilizadas as amostras que faltavam além das amostras 1 e 6.

Para determinar o rendimento de DNA isolado e analisar sua pureza em relação às proteínas contidas no produto final utilizou-se de um método de espectrofotometria usando o aparelho NanoDrop. Na tabela 3 são apresentados os valores das concentrações e da razão 260/280.

TABELA 3. Concentração e razão de pureza das amostras

a	(ng/ μ L)	0
1	0,7	0,43
2	5,6	1,49
3	2,1	0,66
4	2,1	0,69
5	3,0	0,67
6	12,1	0,77
7	28,3	0,91

As concentrações do extraído da maioria das amostras são consideradas baixas, portanto insatisfatórias para testes segundo recomendações da literatura. Entretanto, como mostra a banda iluminada de 177 pares de base de β -actina no gel de agarose, existe sim DNA ali presente, o que possibilita seu uso para análises futuras. A média encontrada foi de 7,7ng/ μ L (variando de 0,7 a 28,3ng/ μ L). A pureza baseada na razão 260/280 obteve uma média de 0,80 (variando de 0,43 a 1,49).

5. Discussão

Os meios mais simples utilizados para avaliação da integridade de um material genético são: análise de um gene constitutivo por meio de uma corrida eletroforética e sua quantificação através da espectrofotometria (PALTIEL et al., 2012). A primeira tem uma avaliação mais qualitativa, pois indica apenas a presença ou não daquele gene e, portanto, do material genético como um todo. A segunda já agrega valores numéricos em seus resultados, gerando dados mais precisos. Contudo, ambos são dependentes, pois a quantidade de DNA encontrado não significa exatamente que ele está íntegro, ou seja, podem-se ter valores altos e ele estar fragmentado, dificultando a marcação de um gene, principalmente se for de tamanho grande. Em contrapartida, a concentração de material na amostra pode ser baixa, (menor que o valor mínimo para que uma reação de

PCR ocorra em equilíbrio), mas o material existente se encontra inteiro, em boas condições. Já quando a concentração for baixa e a qualidade deste também, a marcação do gene no gel de eletroforese dificilmente aparecerá, indicando insuficiência de DNA.

Os valores baixos de concentração encontrados podem ser explicados pelos seguintes argumentos: de acordo com protocolo do kit utilizado para a extração, QIAGEN DNeasy Blood & Tissue, o uso de material de má qualidade pode levar a um rendimento e comprimento de DNA purificado reduzido. As amostras utilizadas realmente não estavam em perfeitas qualidades já que ficaram por alguns meses sem refrigeração, podendo ocasionar uma diminuição da qualidade do material genético. O melhor resultado é obtido usando amostras frescas ou imediatamente armazenadas e congeladas de -20 a -70 °C. Os tubos, quando realocados, foram para uma geladeira a 4°C, o que pode ter minimizado os danos, porém parte pode ter se degradado no período em que ficou no ambiente.

Os valores obtidos estavam aquém do que é esperado em uma extração de excelência, que pode chegar a 3µg de DNA, equivalente a 3000ng, segundo as instruções do fabricante do kit. Porém, valores menores não indicam necessariamente inviabilidade.

Na prática, o rendimento encontrado aqui se assemelha a outros estudos no que se refere a valores abaixo da expectativa dos kits. Riemann e colaboradores (2007) realizaram um estudo comparando técnicas manuais e automatizadas para extração de DNA de sangue total, utilizando inclusive um kit da mesma marca usada nesse estudo. Obtiveram como resultado em relação à concentração final uma média de $23,95 \pm 0,65 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (variando de 4,00 a $127,00 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e $15,25 \pm 0,35 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (variando de 1,20 a $56,30 \text{ ng}/\mu\text{L}$) respectivamente. Com relação à razão 260/280, obtiveram melhores resultados, em torno de $1,90 \pm 0,02$ (variando de 1,32 a 4,33) o manual e $1,98 \pm 0,02$ (variando de 1,15 a 4,98) o automatizado. Diante disso, concluíram que o modo manual obteve ligeira vantagem sobre o robótico, contudo ambos com valores abaixo do estipulado pelos fornecedores. Aqui a técnica utilizada foi a manual e os valores obtidos são consideráveis quando comparados a este estudo. Confirmando que os valores dos testes realizados nesse trabalho estão dentro da realidade encontrada na prática por outros profissionais.

A temperatura em que as amostras permaneceram desde a coleta até a extração influencia diretamente a qualidade final. AlRokayan (2000) fez o seguinte teste para

avaliar os efeitos da temperatura de estocagem na qualidade e quantidade de DNA extraído. Ele realizou uma coleta e separou em três alíquotas. A primeira foi imediatamente submetida à extração e quantificada, a segunda foi armazenada a 4°C e a terceira a -20°C, ambas por 95 dias. A amostra fresca foi a que mais obteve rendimento, ($26,55 \pm 6,44 \mu\text{g/mL}$), seguida de 4°C ($18,84 \pm 3,50 \mu\text{g/mL}$) e por último a de -20°C ($16,81 \pm 3,18 \mu\text{g/mL}$). A qualidade foi satisfatória para todas as amostras, obtendo uma média da razão 260/280 de $1,87 \pm 1,01$. Mostrando que a quantidade extraída tem um decréscimo, porém a qualidade permanece inalterada. Concluiu-se também que se a extração for realizada dentro de sete a oito semanas após a coleta, o ideal é que seja armazenado a 4°C, pois este obteve melhor resultado quando comparado ao sangue armazenado a -20°C, mostrando que nem sempre a menor temperatura é a mais adequada. (ALROKAYAN, 2000)

As amostras do presente estudo permaneceram a maior parte do tempo em temperatura ambiente, podendo ter sido fator fundamental para o baixo rendimento após a extração, mas não afetou sua qualidade, visto que a marcação do gene constitutivo foi positiva na corrida eletroforética. Depois foram armazenadas a 4°C, o que pode ter preservado o material que ainda existia.

Permenter e colaboradores (2015), analisaram quantitativamente a degradação de DNA de amostras de sangue total armazenadas em temperatura ambiente e em 4°C realizando 3 extrações em um período de 130 dias (dia 1, dia 15 e dia 130) utilizando um software de análise TapeStation 2200. Compararam os rendimentos além de dividi-los em tubos com EDTA e tubos com heparina para verificar os efeitos na integridade do DNA quanto aos anticoagulantes usados. Como resultados encontraram uma pequena variação quanto à concentração média ($254,51 \pm 167 \text{ ng/ml}$) nos diferentes períodos e temperaturas. Todos apresentaram uma razão 260/280 de $1,85 \pm 0,03$, indicando pureza do material. Já a medida de degradação, dada em porcentagem, obteve diferenças relevantes. Das amostras armazenadas em temperatura ambiente, inicialmente apresentaram baixa degradação, porém no final, 130 dias depois, as amostras armazenadas em heparina obtiveram quase 100% de degradação. Já as com EDTA mantiveram um platô da primeira extração em diante de aproximadamente 45% de degradação. Das amostras armazenadas a 4°C o aumento da degradação nas amostras heparinizadas foi mais lento, enquanto que as amostras com EDTA quase não sofreram alteração.

O tempo de estocagem tem importante relevância quando associado à outra variante, como a temperatura, por exemplo. Como se pode observar, as amostras armazenadas a 4°C em EDTA quase não sofreram com o passar dos meses. Porém, o mesmo não pode ser dito às amostras sem refrigeração. Houve uma tendência maior de degradação nesse caso. O que contribui para reforçar o presente estudo, indicando que tempo versus temperatura influencia diretamente no rendimento final.

Incluindo a variante anticoagulante usado, percebe-se também uma diferença entre os mesmos usados. Uma vez que o anticoagulante que manteve a melhor preservação foi o mesmo utilizado nas amostras aqui testadas, EDTA, esse pode ter sido um fator importante que contribuiu positivamente para manter o DNA presente mesmo depois de passados meses da coleta do sangue e mesmo estando fora de refrigeração.

O estudo realizado na Áustria, intitulado: “Epidemiology of Uromodulin-Associated Kidney Disease.” – Results from a Nation-Wide Survey (Austria) levou à publicação de um artigo na revista *Nephron Extra* no ano de 2012. A pesquisa teve como objetivo examinar a epidemiologia da Doença Renal Associada à Uromodulina (DRAU) naquele país.

O conjunto amostral era composto por pacientes diagnosticados com DRAU de forma independente e pacientes do Registro de Diálise e Transplante Austríaco. Desse registro foram selecionados aqueles que apresentavam doenças renais e também os que iniciaram terapia de substituição renal entre 20 e 50 anos de idade. Para eles foi enviado um questionário composto de duas perguntas: 1ª se eles tinham um histórico familiar de doença renal e 2ª se sofriam de gota. Os que responderam positivamente às questões foram selecionados e desses foram analisados o histórico médico detalhado. Caso houvesse um histórico familiar compatível a uma doença renal autossômica dominante, estes eram procurados e convidados, após dado o consentimento, a fazer testes genéticos para mutações no gene *UMOD*, que codifica a uromodulina e no *HNF-1β*, gene de fator nuclear de hepatócitos. Ao início obtiveram um total de 6.210 pacientes. Desses, muitos foram excluídos durante o estudo ou por terem sido associados a outras doenças ou por responderem negativamente a uma ou ambas as questões.

Ao final, sete indivíduos foram genotipados e um deles foi positivo, sendo esta uma nova mutação do gene *UMOD*. A pesquisa epidemiológica foi discutida em um encontro nacional de nefrologia conduzindo a um diagnóstico de outro caso suspeito e

confirmado posteriormente também com uma nova mutação. Outras três famílias foram identificadas em consultório médico e genotipadas.

No total foram encontradas cinco famílias em toda Áustria, compreendendo quatorze pacientes apresentando mutações no gene UMOD. Foram descobertos diferentes aminoácidos gerando as mutações: Família 1 (Cys77Tyr), Família 2 (Cys126Arg), Família 3 (Asp196Tyr), todas diagnosticadas em consultório médico, Família 4, pertencente ao caso encontrado na pesquisa epidemiológica, (Cys217Trp) e Família 5 (Cys223Arg), pertencente ao caso descoberto no encontro de nefrologia.

Todas as cinco mutações estão localizadas no éxon 4 do gene UMOD. Porém cada uma delas induz a um quadro clínico diferente, seja na idade em que os sintomas aparecem ou na intensidade desses, sendo mais brandos ou mais severos. Nenhum deles apresentou mutação no gene HNF -1 β .

As características mais comuns nesses portadores são a hiperuricemia associada a uma fração de excreção de ácido úrico menor que 5%, falha renal crônica e gota. Ocorre tanto em homens quanto em mulheres e tem caráter autossômico dominante (BLEYER *et al.*, 2003). Os casos aqui apresentados são a maioria mulheres, contudo todos apresentam caráter autossômico dominante. Três dos sete pacientes já tem DRC e apresentam valores de creatinina sérica elevada. Tais padrões levam a suspeita de poder haver uma mutação no gene UMOD.

Por isso, faz se necessário o sequenciamento do material genético dos pacientes aqui estudados. Para assim descobrir se a mutação está nesse gene, sendo este o mais frequente, além de ter a possibilidade de ser uma das alterações de aminoácidos descritas no artigo acima ou uma nova mutação a ser encontrada.

As manifestações clínicas apresentadas pelos membros afetados podem gerar dúvidas a respeito do diagnóstico correto. A anemia relatada pelo caso índice gera fortes indícios de ser uma alteração no gene REN. Porém os cistos medulares constatados na biópsia são característicos de mutação no gene MUC-1. Contudo, a hipótese de ser ocasionada por defeitos no gene UMOD não pode ser descartada visto que esse é o mais comum dentre os possíveis genes estudados e por isso o primeiro a ser testado.

A primeira vista, de acordo com as normas recomendadas, esse material seria imediatamente descartado. Porém, se trata de um caso especial, onde além de ser uma doença rara, há uma dificuldade em contatar os membros da família

para uma recoleta. A extração era necessária mesmo que parecesse inviável. E o material mostrou-se de qualidade, apto a ser utilizado para os testes moleculares.

6. Perspectivas e envolvimento futuros do material

Diante dos resultados positivos, indicando que as amostras estão aptas e viáveis mesmo nas circunstâncias em que se encontravam, o objetivo principal agora é iniciar os testes de sequenciamento utilizando marcadores para os genes específicos alterados na DRIAD. Verificando assim se a suspeita se confirma e a partir dos resultados poder fornecer o diagnóstico a essa família, iniciando o acompanhamento e tratamento adequados.

7. Conclusão

- Embora a literatura e os manuais de práticas laboratoriais indiquem as condições ideais de meios e tempo de armazenamento, não significa necessariamente que condições diferentes levem à inviabilidade do material.
- As amostras testadas obtiveram resultados satisfatórios mesmo estando em temperatura ambiente por alguns meses.
- É indiscutível o fato de que quanto mais recente ou armazenada adequadamente, melhor e mais confiáveis serão os resultados dos testes genéticos.
- Os métodos de avaliação usados, espectrofotômetro e corrida eletroforética, são suficientes para garantir um material de qualidade, validando-o para ser utilizado em testes futuros.
- As variantes: temperatura, tempo e anticoagulante devem ser levadas em consideração quando se trata de amostras para extrair DNA. Quanto maior o tempo, menor o rendimento final. Quanto menor a temperatura maior a preservação. Quando armazenado em tubos com EDTA, a dupla fita se encontra melhor conservada.
- A recuperação gênica se faz essencial em amostras duvidosas quanto à sua qualidade. Visto que testes genéticos são caros e muitos deles, raros, quanto menos vieses, maior a credibilidade e a certeza de bons resultados.

8. Bibliografia

ALROKAYANALROKAYAN, S. A. Effect of storage temperature on the quality and quantity of DNA extracted from blood. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 392–394, 2000.

ARCINIEGAS, E. et al. Presence of MUC1 in the epidermal thickening of psoriatic plaques. **HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY**, 2015.

AYASREH-FIERRO N1, T.-B. R. Familial chronic interstitial nephropathy with hyperuricaemia caused by the UMOD gene. **Nefrologia**, v. 33, n. 4, 2013.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, mar. 2011.

BLANCO, O. G. et al. El citoesqueleto de actina: Una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas**, v. 21, n. 2, p. 115–122, 2002.

BLEYER, A. **Autosomal dominant interstitial kidney disease**. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/autosomal-dominant-interstitial-kidney-disease-medullary-cystic-kidney-disease#H997405>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

BLEYER, A. J. et al. Renal manifestations of a mutation in the uromodulin (Tamm Horsfall protein) gene. **American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 42, n. 2, p. E20–E26, 2003.

BLEYER, A. J.; KMOCH, S. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: of names and genes. **Kidney International**, v. 86, n. 3, p. 459–461, 2014.

GRICO, T. C.; KUSOMOTA, L.; CÂNDIDO, M. DE LI. Percepções e conhecimentos de pacientes com Dença Renal Crônica em tratamento conservador. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 11, n. 4, p. 884–893, 2009.

GUIMARÃES, A. C.; WOLFART, M.; DANI, C. Artigo de revisão o laboratório clínico e os erros pré-analíticos clinical laboratory and pre-analytical errors. n. 14, 2011.

JAIN, S. et al. Mucin 1 is a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, p. 354–362, 2105.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 9. ed. [s.l: s.n.].

KOTIKALAPUDI, R. et al. Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. v. 17, n. 1, p. 181–186, 2015.

LHOTTA, K. et al. Epidemiology of uromodulin-associated kidney disease - results from a nation-wide survey. **Nephron extra**, v. 2, p. 147-58, 2012.

MELO, M. R. et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 375-381, 2010.

NIKIFOROV, T. T. Oligonucleotides labeled with single fluorophores as sensors for deoxynucleotide triphosphate binding by DNA polymerases. **Analytical Biochemistry**, v. 444, p. 60-6, 2014.

OLIVEIRA, G. DE S. et al. Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo : iluminando uma fase escura de erros. n. 34, p. 441-447, 2009.

ONOE, T. et al. Hints to the diagnosis of uromodulin kidney disease. v. 9, n. 1, p. 69-75, 2016.

PALTIEL, L. et al. Biospecimen quality program in the biobank of the Norwegian Institute of Public Health. v. 21, n. 2, p. 225-229, 2012.

PASTERNAK, J. J. **Genética Molecular Humana: mecanismos das doenças hereditárias**. 1ª. ed. Barueri: Manole Ltda, 2002.

PERMENTER, J. et al. Quantitative analysis of genomic DNA degradation in whole blood under various storage conditions for molecular diagnostic testing. **Molecular and Cellular Probes**, p. 5-9, 2015.

RIBEIRO, R. D. C. H. M. et al. **Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo** ACTA Paulista de Enfermagem. **Anais...2008**

RIELLA, M. . **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

RIELLA, M. C. **Princípios em Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RIEMANN, K. et al. Comparison of Manual and Automated Nucleic Acid Extraction From Whole-Blood Samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 21, n. 2, p. 244-248, 2007.

SELVEY, S. et al. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 15, n. 5, p. 307-11, out. 2001.

SILVA, V. G. Implementação de um método de validação do controle de qualidade em amostras de DNA armazenadas no. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica**. [s.l: s.n.].

STEINBERG, K. et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. **Epidemiology**, v. 14, p. 246-254, 2004.

TURNER, J. J. O. et al. UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1398-1401, 2003.

VIANA, D. A. . **Polimorfismos do gene TP53 no linfoma de Hodgkin**Fortaleza-Ce, 2007.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Genetical implications of the structure of deoxiribonucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 964-967, 1953.

ŽIVNÁ, M. et al. Dominant Renin Gene Mutations Associated with Early-Onset Hyperuricemia, Anemia, and Chronic Kidney Failure. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 2, p. 204-213, 2009.

RAVE, C. F. **Sequenciamento de DNA**. Disponível em: <<http://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=1966>>. Acesso em 12 set. 2015.

Sequenciamento de DNA. Disponível em:< <https://www.ufpe.br/biolmol/aula8-sequenciamento.htm> >. Acesso em: 12 set. 2015

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Aspectos clínicos e diagnósticos genéticos de uma série de casos familiares com doença renal não esclarecida, oriundos do ambulatório de nefrologia do Hospital Universitário Antônio Pedro: um estudo descritivo.

Pesquisador: Jorge Reis Almeida

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 47569515.9.0000.5243

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

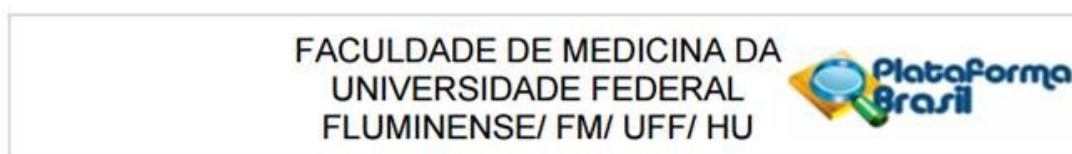
Outros	TALE_Aspectos clínicos e diagnósticos familiares com doença renal.pdf	14/08/2015 15:44:36		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_PROF_FABIO_LURA.pdf	14/08/2015 15:44:54		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_DIRETOR_HUAP_GENE_RENAL.pdf	14/08/2015 15:45:07		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_LAMAP.pdf	14/08/2015 15:45:29		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_540058.pdf	14/08/2015 15:46:39		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não



Continuação do Parecer: 1.201.044

NITEROI, 26 de Agosto de 2015

Assinado por:
ROSANGELA ARRABAL THOMAZ
 (Coordenador)

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

TÍTULO DA PESQUISA: “Aspectos clínicos e diagnósticos genéticos de uma série de casos familiares com doença renal não esclarecida, oriundos do ambulatório de nefrologia do Hospital Universitário Antônio Pedro: um estudo descritivo”.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Jorge Reis Almeida

Laboratório Multidisciplinar de Apoio à Pesquisa, Faculdade de Medicina, Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense. Telefone para contato: (21) 3674-7290.

Nome _____ do _____ voluntário: _____, Idade: _____ anos,

RG: _____

Responsável Legal: _____, R.G. _____

Responsável

Legal: _____

O (A) Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Aspectos clínicos e diagnósticos genéticos de uma série de casos familiares com doença renal não esclarecida, oriundos do ambulatório de nefrologia do Hospital Universitário Antônio Pedro: um estudo descritivo”, de responsabilidade do pesquisador Jorge Reis Almeida que tem o objetivo de avaliar geneticamente o material biológico (sangue ou urina) doado voluntariamente a fim de procurar genes responsáveis por ocasionar uma doença renal ainda não diagnosticada, não esclarecida ou não descrita. O estudo tem como justificativa ajudar no diagnóstico e orientação médica a respeito da continuidade do tratamento do paciente. O procedimento a ser

realizado consta de uma simples coleta para a retirada de uma pequena quantidade de sangue do voluntário, numa seringa de 20 mL, de uma veia do braço, como de costume para qualquer exame de sangue. É possível que aconteça algum desconforto no local da coleta provocando dor e hematomas. Para minimizar esses riscos, as amostras serão colhidas por profissionais treinados. Sobre a urina trata-se de uma amostra simples de urina da manhã. Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato com o pesquisador responsável pelo telefone descrito acima. Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação pela sua decisão. Os pesquisadores se comprometem a manter segredo das informações geradas, tanto as obtidas de prontuários como as obtidas pelo médico atendente, (idade, medicamento, cidade de origem, sexo, entre outras) sobre sua pessoa. Caso os resultados gerem algum dado para publicação científica, seus dados pessoais não serão mostrados.

Os participantes de pesquisa, e comunidade em geral, poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Hospital Universitário Antônio Pedro, para obter informações específicas sobre a aprovação deste projeto ou demais informações:

e-mail: etica@vm.uff.br Tel/fax: (21) 26299189

Eu _____ RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar como voluntário do projeto acima descrito.

Ou, eu _____ RG nº _____, responsável legal

por _____, RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Niterói, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento