

P 1858**Padronização de sequenciamento de Sanger do gene VHL para pacientes da assistência via pesquisa**

Gustavo Stumpf da Silva; Patrícia Ashton-Prolla - HCPA

A síndrome de Von Hippel-Lindau (sVHL) é uma doença genética rara com 100% de penetrância, relacionada com o desenvolvimento de hemangioblastomas e carcinomas em tecidos e órgãos altamente irrigados. A identificação de mutações patogênicas no gene VHL caracteriza e confirma a sVHL, permitindo ao paciente acompanhamento preventivo com o intuito de rastrear a formação dos tumores e tratar os sintomas já em estágio inicial. O gene VHL é um supressor tumoral de 12kb localizado no braço curto do cromossomo 3, constituído de três éxons que codificam um mRNA de 4560 pares de base (pb). Apesar do pequeno tamanho, conjuntos de primers da maioria dos estudos na literatura amplificam apenas as regiões codificantes do gene, sem analisar as regiões 5'UTR e junções éxon-ínton, onde já foram identificadas alterações patogênicas. Para oferecer aos pacientes uma informação mais completa sobre a integridade da sequência do seu gene, foi desenhado um conjunto de primers com cobertura para toda a região 5'UTR, região codificante, e junções éxon-ínton e que mantenha uma distância mínima (40pb) entre essas regiões e o sítio de ligação do primer. Como a sequência de nucleotídeos do VHL é formada em grande parte por regiões repetitivas e ricas em G e C, o éxon 1 foi dividido em dois amplicons, um iniciando 400pb antes do início do éxon, o final do segundo após 100pb do início do ínton 1 e uma região de sobreposição entre os amplicons. Os primers do éxon 2 também foram criados ligando-se mais internamente no ínton, mas o sequenciamento apresentou uma deleção polimórfica perto do início do éxon, o que impossibilitava a análise da região codificante. Com um primer de apenas 15 bases, foi padronizado um Nested PCR em conjunto com o primer reverso inicial, que se liga após esse polimorfismo sem a formação de amplicons inespecíficos, permitindo o sequenciamento da região desejada. O desenho dos primers referentes ao éxon 3 foi realizado sem complicações. Foram testados quatro pacientes com forte suspeita clínica da sVHL sendo identificadas mutações patogênicas em um deles : LRG_322 c.194C>G (p.Ser65Trp). Assim, foi possível realizar o sequenciamento de todas as regiões do gene VHL relacionadas a alterações patogênicas conhecidas nas bases de dados, permitindo a identificação destas tanto nos pacientes quanto nos seus familiares e oferecendo o conjunto de medidas assistenciais para prevenir e tratar precocemente os sintomas da síndrome. Unitermos: VHL; Diagnóstico molecular; Câncer hereditário