

Introdução

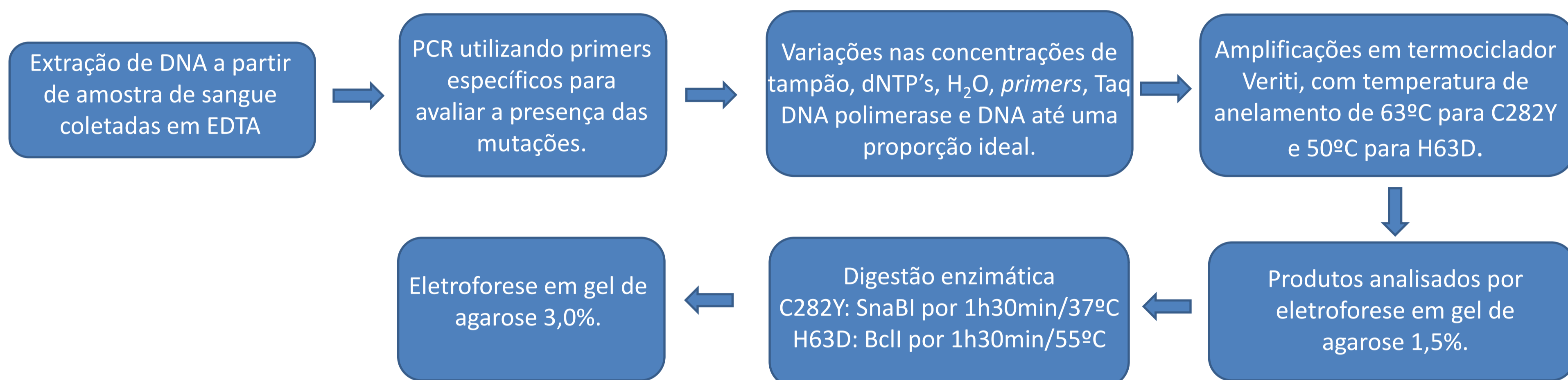
Hemocromatose é uma doença caracterizada pelo acúmulo de ferro que se deposita nos tecidos prejudicando seu funcionamento ou permanecendo na forma livre induzindo a formação de radicais livres. Isto pode levar a alterações crônicas como diabetes mellitus, pigmentação característica da pele e lesão hepática que variam de acordo com o tempo de evolução. Pode ser classificada como hereditária devido à mutação genética, ou secundária devido a outras condições que levem ao acúmulo. A Hemocromatose Hereditária (HH) é causada por diversas mutações, entre elas as que acontecem no gene HFE, codificador da proteína HFE, reguladora do metabolismo do ferro. As mutações mais frequentes são a C282Y e H63D. Já a Síndrome Metabólica (SM) é outra causa de acúmulo de ferro com causas distintas. Desta forma, torna-se importante investigar a frequência de HH em pacientes com SM na tentativa de excluir causas de acúmulo de ferro não relacionadas à HH.

Objetivo

Padronizar e validar a identificação das mutações C282Y e H63D do gene HFE em pacientes portadores de SM.

Metodologia

Foram avaliadas 55 amostras de pacientes com diagnóstico de SM, maiores de 18 anos que estão em acompanhamento no ambulatório de medicina interna do HCPA.



Como controles positivos utilizaram-se amostras heterozigotas para as mutações identificadas por sequenciamento direto de DNA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA sob os números 80094 e 182.301.

Resultados

Após a realização das reações foi possível verificar a formação de bandas alinhadas especificamente no tamanho dos fragmentos esperados em ambas as reações. Não foram visualizadas bandas nos controles negativos bem como a formação de dímeros de *primers*, sugerindo anelamentos específicos (figura 1).

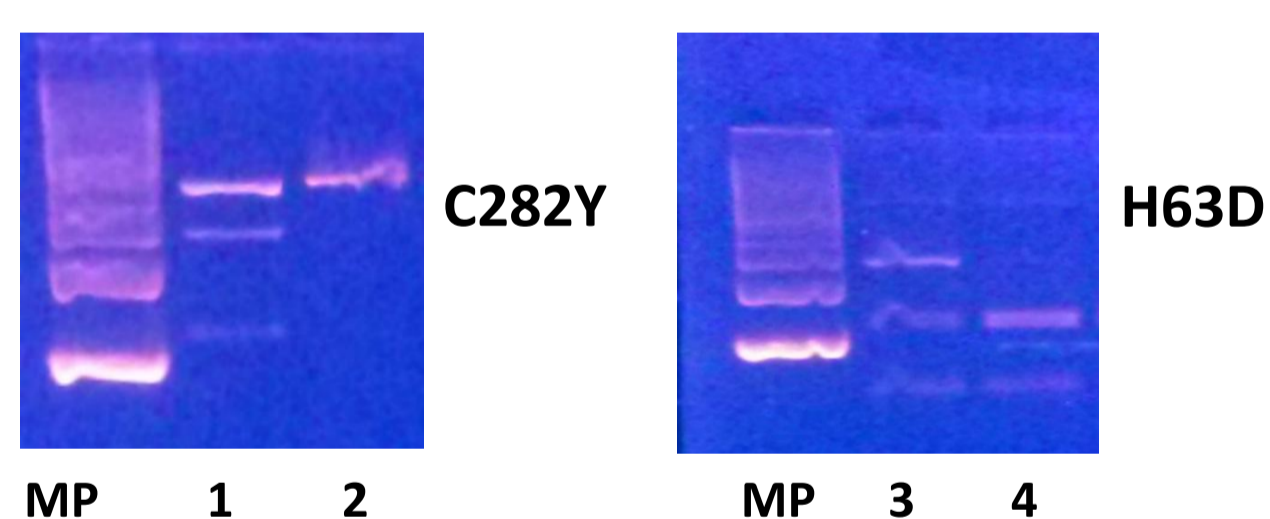


Fig1: Digestão com endonucleases de restrição para C282Y e H63D. Legenda: MP marcador 100pb, 1: Controle heterozigoto C282Y, 2: amostra ausente de mutação, 3: Controle heterozigoto H63D, 4: amostra ausente de mutação

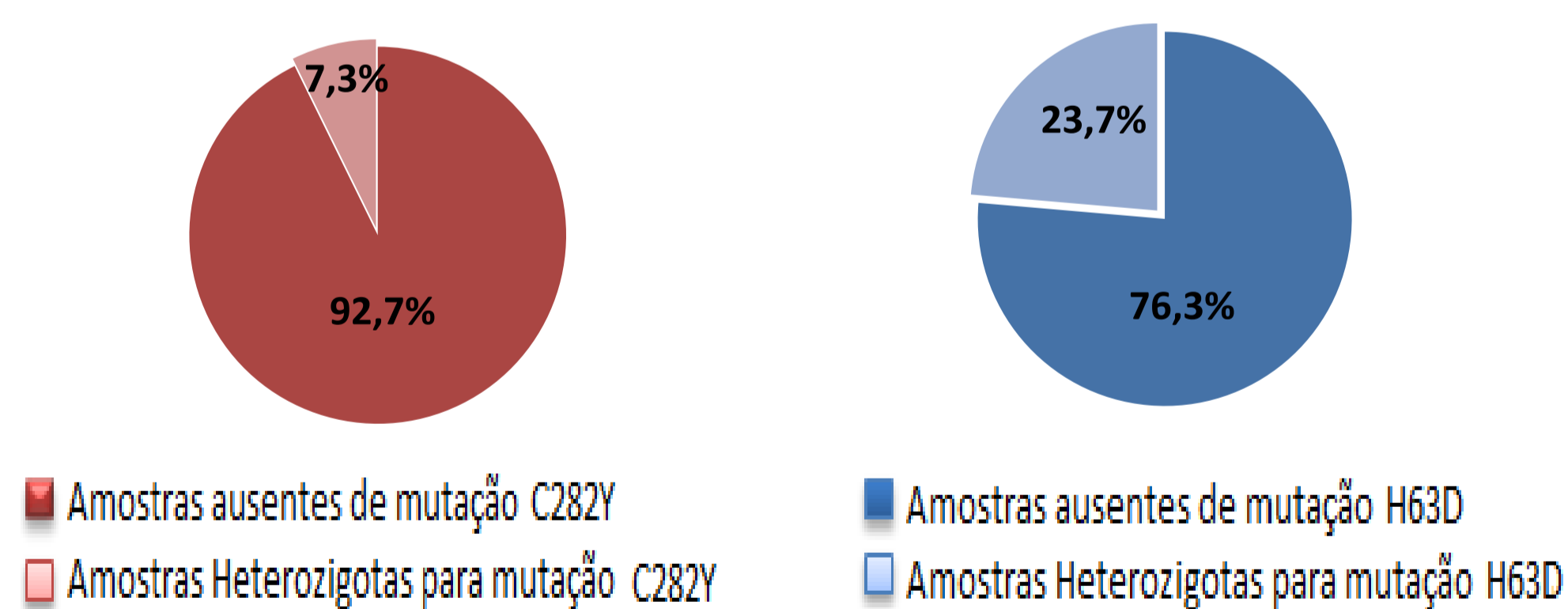


Fig2: Frequências encontradas para as mutações C282Y e H63D

Das 55 amostras analisadas pelas técnicas de PCR, 4 (7,3%) apresentaram padrão heterozigoto para a mutação C282Y, enquanto que o restante apresentou-se ausente da mutação. Já para a mutação H63D, 13 (23,7%) amostras apresentaram padrão heterozigoto e o restante também apresentou padrão ausente de mutação. Para ambas as mutações, não foram observados pacientes homozigotos (figura 2).

Conclusões

No estudo foi possível padronizar e validar a técnica de investigação molecular destas mutações através da técnica de PCR seguido de digestão enzimática. Foi observado que as frequências das mutações C282Y e H63D no gene HFE em pacientes com SM estão dentro do esperado para a população em geral, sugerindo que o maior acúmulo de ferro nestes pacientes seja resultado de outros mecanismos como, por exemplo, a regulação exercida pela hepcidina. Desta forma, foi constatado que a metodologia de PCR empregada é eficaz e sensível, sendo aplicável para análises desenvolvidas posteriormente na investigação destas mutações na Hemocromatose.

Financiamento