



Evento	Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2014
Local	Porto Alegre
Título	Padronização e validação da técnica de PCR para a detecção das mutações C282Y e H63D em pacientes com síndrome metabólica
Autor	DAIANE KELLER CECCONELLO
Orientador	DIOGO ANDRE PILGER

Introdução: Hemocromatose é uma doença caracterizada pelo acúmulo de ferro, o qual se deposita nos tecidos e órgãos prejudicando seu funcionamento ou mesmo permanece 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. A doença pode ser classificada como hereditária, devido a uma mutação genética, ou secundária, devido a outras condições que levem ao acúmulo de ferro. A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva causada por diversas mutações, entre elas as que acontecem no gene HFE, codificador da proteína HFE, importante reguladora do metabolismo do ferro. Dentre as mutações já descritas, as mais expressivas são a C282Y e a H63D. Já a Síndrome Metabólica (SM) é outra causa importante de acúmulo de ferro com causas distintas. Desta forma, é importante investigar a frequência de HH em pacientes com SM, na tentativa de excluir outras causas de acúmulo de ferro não relacionadas à HH, sobretudo doença hepática e alcoolismo, que são muito mais frequentes que a própria HH. **Objetivos:** padronizar e validar a identificação molecular das mutações C282Y e H63D 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. Inicialmente, foi realizada a extração do DNA a partir de amostras de sangue coletadas em EDTA utilizando o método baseado na adsorção dos ácidos nucleicos em coluna de sílica para posterior eluição do DNA, conforme orientações do fabricante (Purelink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). Para avaliação da presença das mutações, o material foi submetido à amplificação gênica através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos distintos para as regiões que contemplam os sítios de mutação. Foram realizadas variações nas concentrações de tampão, dNTPs, H₂O, *primers*, Taq DNA polimerase e DNA até uma proporção considerada ideal. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) em condições previamente estabelecidas, com temperatura de anelamento de 63°C para a mutação C282Y e 50°C para a H63D. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% impregnado com GelRed®. Em seguida, foi realizada digestão dos fragmentos amplificados com endonucleases. Para cada mutação foram utilizadas enzimas de restrição específica, SnaB I, por 1h30min em 37°C para região C282Y, e BclI por 1h30min em 55°C para a região H63D. Logo após, a análise dos fragmentos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 3,0%. Como controles positivos foram utilizadas amostras heterozigotas para as mutações C282Y e H63D 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. 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. **Discussão:** 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. Como o estudo está em andamento, os resultados são parciais e o número de amostras deve ser ampliado, sendo que a correlação entre as mutações e a SM poderá ser estabelecida no decorrer do estudo.