

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

FREDERICO SCOTT VARELLA MALTA

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO
SIMULTÂNEA DAS MUTAÇÕES H63D E S65C NO GENE HFE DA
HEMOCROMATOSE**

Belo Horizonte
2012

FREDERICO SCOTT VARELLA MALTA

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO
SIMULTÂNEA DAS MUTAÇÕES H63D E S65C NO GENE HFE DA
HEMOCROMATOSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof Antônio Carlos Vieira
Cabral

Belo Horizonte
2012

Malta, Frederico Scott Varella.
M261p Padronização de técnica de PCR em tempo real para detecção simultânea das mutações H63D e S65C no gene HFE da hemocromatose [recursos eletrônicos]. / Frederico Scott Varella Malta. - - Belo Horizonte: 2012.
90 f.: il
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Antônio Carlos Vieira Cabral.
Área de concentração: Perinatologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hemocromatose. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 3. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 4. Mutação. 5. Dissertação Acadêmica. I. Cabral, Antônio Carlos Vieira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 260.5.17



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **FREDERICO SCOTT VARELLA MALTA**, nº de registro 2007670512. No dia **dezessete de dezembro de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“Padronização de técnica de PCR em tempo real para detecção simultânea das mutações H63D e S65C no gene HFE da hemocromatose”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Perinatologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Antonio Carlos Vieira Cabral/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Apto</u>
Profa. Ana Paula Brum Miranda Lopes	Instituição:	Indicação: <u>Apto</u>
Profa. Zilma Silveira Nogueira Reis	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Profa. Marina Lobato Martins	Instituição: HEMOMINAS	Indicação: <u>Apto</u>
Profa. Fabíola de Andrade Caxito	Instituição: Hermes Pardini	Indicação: <u>Apto</u>

Pelas indicações o candidato foi considerado APROVAÇÃO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2012.

Prof. Antonio Carlos Vieira Cabral/ Orientador _____
Profa. Ana Paula Brum Miranda Lopes _____
Profa. Zilma Silveira Nogueira Reis _____
Profa. Marina Lobato Martins _____
Profa. Fabíola de Andrade Caxito _____
Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG

Dedico este trabalho a minha família e amigos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, agradeço por tudo que eu aprendi nesta etapa da vida e espero um dia poder retribuir o que aqui recebi pelo dom da graça;

À Maria Clara e Clarissa pelo amor e incentivo e por entenderem os dias e noites na frente do computador;

Aos meus pais, Frederico e Edna, e irmãos, Guilherme e Ricardo, que sempre me apoiaram inclusive naqueles momentos em que pensei em desistir. Também agradeço à Andréia, Xandão e Valéria que fazem parte desta família que amo tanto;

Ao Prof. Cabral, grande pesquisador, pelos ensinamentos que transcenderam a ciência e que com sua paciência soube me ajudar a driblar os obstáculos;

À equipe do hospital das clínicas que me recebeu muito bem e que contribuíram muito no trabalho e principalmente me mostraram a olhar a ciência com uma visão mais humana;

A todas as pessoas que participaram do projeto anterior pela dedicação, pelo tempo despendido e pela colaboração, em especial a Alessandro Ferreira, Patrícia Ângelo, Karina Braga, Dr^a Ana Paula e as grávidas participantes. Acredito que nada na vida é desperdiçado e que tudo pode e vai ser aproveitado algum dia;

Aos amigos do laboratório Hermes Pardini, pela amizade, a ajuda, as sugestões, e pela compreensão das horas gastas com este trabalho;

À Vanessa de Oliveira e Nancy Fonseca que sempre foram compreensíveis comigo na ausência e que me apoiaram com sua amizade;

À Fabíola pela amizade e confiança e por ter acreditado neste trabalho;

Ao Dr. Victor Pardini pelo incentivo à pesquisa;

Ao Laboratório Hermes Pardini pelo apoio financeiro desta pesquisa;

E finalmente a todas as pessoas que não tiveram seus nomes citados aqui, pois não haveria espaço para declarar o apoio de tantas pessoas que ajudaram no projeto antigo e neste.

“O Senhor é meu Pastor nada me faltará.” Salmo 23,1

RESUMO

A hemocromatose é a desordem genética mais comum em europeus. Está distribuída em todo o mundo sendo que nas populações mais afetadas a prevalência pode chegar a 1: 220-250 indivíduos. Ainda é uma desordem subdiagnosticada, tanto por ser considerada rara quanto pelo fato de que é descoberta quando as manifestações da doença estão totalmente estabelecidas como a cirrose, diabetes e pigmentação da pele. A confirmação do diagnóstico de hemocromatose antes do desenvolvimento de cirrose ou outras manifestações avançadas dessa desordem pode garantir que providências sejam tomadas para a manutenção da qualidade de vida do paciente. Atualmente, os guias especializados no diagnóstico e tratamento da hemocromatose recomendam a utilização de testes genéticos para o gene *HFE* para o auxílio na tomada de decisão nos cuidados médicos com o paciente. Portanto o desenvolvimento de novas metodologias para a identificação de mutações é um importante passo para o fornecimento de ferramentas que auxiliem os médicos. Nosso trabalho teve o objetivo de desenvolver um ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real simultâneo para as mutações H63D e S65C. A utilização de sondas capazes de identificar dois polimorfismos simultaneamente em um ensaio de PCR 5' Nuclease jamais foi relatado antes na literatura. O ensaio foi planejado com a ajuda de ferramentas de bioinformática, em seguida padronizado e validado seguindo recomendações de guias especializados na área de genética molecular. O ensaio validado também está adequado às recomendações de dois guias de boas práticas para o diagnóstico de hemocromatose. Todas as características de desempenho testadas do ensaio de PCR 5'Nuclease para detecção simultânea das mutações H63D e S65C foram validadas com sucesso e o ensaio foi considerado apto a ser utilizado na prática clínica.

Palavras-Chave: hemocromatose; PCR em tempo real; técnicas de laboratório clínico; teste de diagnóstico molecular; mutação.

ABSTRACT

Hemochromatosis is the most common genetic disorder in Caucasians. Its geographic distribution is worldwide, but it is seen most commonly in some populations in which it occurs with a prevalence of approximately 1 per 220-250 individuals. It is still underdiagnosed, because it is often considered a rare disorder that is manifested by the clinical findings seen in fully established disease consisting of cirrhosis, diabetes, and skin pigmentation. The diagnosis of hemochromatosis before the development of advanced cirrhosis or other manifestations of this disorder can ensure that steps are taken to maintain the quality of life of the patient. Currently, the guide specialized in the diagnosis and treatment of hemochromatosis recommend the use of genetic testing for HFE gene to aid in decision making in health care of patient. Therefore the development of new methodologies for the identification of mutations is an important step towards providing tools that aid physicians. Our study had the objective to develop a PCR 5'Nuclease assay to detection in real time simultaneously H63D and S65C mutations. The use of probes in PCR 5'Nuclease assay able to identify two polymorphisms simultaneously was never been seen before in the literature. The test was planned with the help of bioinformatics tools and then standardized and validated following recommendations of expert guides in the area of molecular genetics. The assay is also suitable validated following recommendations of two guides to good practice for the diagnosis of hemochromatosis. All performance characteristics tested for PCR 5'Nuclease assay for simultaneous detection of the mutations H63D and S65C have been successfully validated and the test can be used in clinical practice.

Key words: hemochromatosis; real time pcr; clinical laboratory techniques; molecular diagnostic techniques; mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histórico das desordens de acúmulo de ferro	18
Figura 2: Representação esquemática do ensaio PCR 5'Nuclease para a detecção simultaneamente das mutações H63D e S65C.....	34
Figura 3: Representação esquemática da genotipagem de um paciente heterozigoto para a mutação H63D e homozigoto selvagem para a mutação S65C.....	35
Figura 4: Partes que se dividem um sinal de amplificação. Linha de base, Ct, elevação na escala logaritmo e platô.	35
Figura 5: Tela de resultados da busca realizada no banco de dados OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man®.....	40
Figura 6: Tela de resultado da busca realizada no banco de dados do dbSNP-Short Genetic Variations.	41
Figura 7: Tela de resultado da busca realizada pela ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool utilizando o programa “nucleotide blast”.....	42
Figura 8: Tela do resultado de busca realizada pela ferramenta BLAT – BLAST Like Alignment Tool.	43
Figura 9: Tela de resultado da busca realizada pela ferramenta MFEprimer – 2.0. Foi observado anelamento em duas sequências genômicas: NC_000006.11 e NC_000001.10.	49
Figura 10: Tela de resultados da busca realizada pela ferramenta LNA™ Oligo Optimizer. Do lado esquerdo as hibridizações observadas e a esquerda as estruturas secundárias e seus respectivas pontuações (scores)	51
Figura 11: Mapa do plasmídio pIDTSMART-AMP: 63mut65mut. Em azul a sequência do gene sintético, em laranja sítios de anelamento para os iniciadores de amplificação do bacteriófago M13 e em verde o vetor contendo o gene de resistência a ampicilina e uma porção do plasmídio de origem pUC.	52
Figura 12: Detalhes da sequência obtida através do sequenciamento do plasmídio pIDTSMART-AMP:63mut65mut. Em azul a sequência do gene sintético, em laranja sítios de anelamento para os iniciadores de amplificação do bacteriófago M13 e em	

verde o vetor contendo o gene de resistência a ampicilina e uma porção do plasmídeo de origem pUC.....	53
Figura 13: Resultado dos sinais 63M65M, 63N65M, 63M65N e 63N65N para os haplótipos 6365 DC/DC, 6365 HC/HC, 6365 DS/DS e 6365 HS/HS respectivamente.	55
Figura 14: Comparação da intensidade de fluorescência dos cinco fluoróforos. FAM fluoróforo do sinal 63M65M, CY5 fluoróforo do sinal 63N65M, JOE fluoróforo do sinal 63M65N, CY3 fluoróforo do sinal 63N65N e ROX fluoróforo do sinal passivo.	56
Figura 15: Diferenciação de um sinal 63N65N positivo e negativo. A e C amostra de paciente com sinal positivo evidenciado apenas no gráfico através do gráfico $\Delta R_n \times$ Ciclos pelo crescimento exponencial indicado pela seta. B e D amostra de paciente com sinal negativo evidenciado pela ausência de crescimento exponencial. Em A e B pode-se observar que a interpretação da formação de platô dos sinais pode ser confundida quando o sinal é visualizado apenas através do gráfico $R_n \times$ Ciclos.	57
Figura 16: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados do teste de seletividade dos iniciadores em diversas temperaturas de anelamento (58 – 62°C). Primeira e última canaletas – padrão de peso molecular 10pb (Life Technologies™). Canaleta 1 e 2 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 58°C . Canaleta 3 e 4 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 59°C. Canaleta 5 e 6 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 60°C. Canaleta 7 e 8 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 61°C de anelamento. Canaleta 9 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 62°C e canaleta 10 – branco de reação.	58
Figura 17: O índice Kappa de concordância entre observadores calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa. .	61
Figura 18: O índice Kappa de concordância intra observador calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa. .	62
Figura 19: O índice Kappa de concordância entre as técnicas RFLP <i>versus</i> 5'Nuclease calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa de 76 amostras de pacientes.	63
Figura 20: O índice Kappa de concordância entre as técnicas RFLP <i>versus</i> 5'Nuclease calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de	

confiança de 95% do Kappa de 153 amostras de pacientes mais amostras sintéticas.

.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sondas LNA® selecionadas.....	47
Tabela 2: Iniciadores selecionados.	48
Tabela 3: Iniciadores selecionados para amplificar a região externa da sequência contendo a região do ensaio PCR 5' Nuclease.	54
Tabela 4: Resultado de 12 réplicas de indivíduos com os haplótipos mais frequentes, 6365 HS/HS, 6365 HS/DS, 6365 DS/DS, 6365 HS/HC, 6365 HS/DC, 6365 HC/HC e o controle sintético 6365 DC/DC.	60
Tabela 5: Relação de concordância de haplótipos entre observadores.	61
Tabela 6: Tabela de contingência RFLP <i>versus</i> 5'Nuclease de 76 amostras de pacientes.	62
Tabela 7: Tabela de contingência RFLP <i>versus</i> 5'Nuclease de 153 amostras de pacientes mais amostras sintéticas.	63

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
SUMÁRIO	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 História das desordens de acúmulo de ferro	18
2.2 Possíveis causas de acúmulo de ferro	19
2.3 Bases genéticas para as síndromes de sobrecarga de ferro	19
2.4 O metabolismo do ferro	20
2.5 O gene <i>HFE</i> da hemocromatose	21
2.5.1 Mutação C282Y	22
2.5.2 Mutação H63D	23
2.5.3 Mutação S65C	23
2.6 Pesquisa molecular das mutações do gene <i>HFE</i>	23
2.7 Diagnóstico e tratamento de Hemocromatose	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MÉTODOS	28
4.1 Obtenção da sequência genética do gene <i>HFE</i> (região flanqueadora das mutações H63D e S65C)	28
4.2 Pesquisa por outros polimorfismos no banco de dados Ensembl do EMBL que podem estar presentes na região de interesse.	28
4.3 Análise dos polimorfismos no banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations e a base de dados do HGMD.	29
4.4 Construção das sondas e iniciadores do ensaio 5'Nuclease	29
4.4.1 Sondas LNA®	29
4.4.2 Iniciadores	30
4.4.3 Verificação de formação de dímeros e estruturas secundárias nos oligonucleotídeos	30

4.5	Construção de controle positivo sintético H63D mutante e S65C mutante.	30
4.5.1	Síntese do gene sintético.	30
4.5.2	Desenho dos iniciadores para amplificar o gene sintético.	31
4.6	Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real para as mutações H63D e S65C do gene da Hemocromatose.	31
4.6.1	Purificação de DNA das amostras de sangue total.	31
4.6.2	Quantificação de DNA.	32
4.6.3	Reação em cadeia da polimerase 5' Nuclease.	33
4.6.4	Programa de PCR.	34
4.6.5	Metodologia de análise dos resultados.	34
4.6.6	Crítérios de determinação de resultados.	35
4.7	Avaliação do desempenho analítico.	36
4.7.1	Avaliação da seletividade dos iniciadores.	36
4.7.2	Avaliação de interferentes no resultado.	36
4.7.3	Determinação do limite de detecção utilizando amostras clínicas portando os principais genótipos.	37
4.7.4	Reprodutibilidade.	37
4.7.5	Precisão.	38
4.7.6	Acurácia do ensaio genético e taxa de falsos resultados.	38
5.	RESULTADOS.	40
5.1	Obtenção da sequência genética do gene <i>HFE</i> (região flanqueadora das mutações H63D e S65C).	40
5.2	Pesquisa por outros polimorfismos no banco de dados Ensembl do EMBL que podem estar presentes na região de interesse.	42
5.3	Análise dos polimorfismos no banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations e a base de dados do HGMD.	44
5.4	Construção das sondas e iniciadores do ensaio 5' Nuclease.	47
5.4.1	Sondas LNA.	47
5.4.2	Iniciadores.	48
5.4.3	Verificação de formação de dímeros e estruturas secundárias nos oligonucleotídeos:	50
5.5	Construção de controle positivo sintético H63D mutante e S65C mutante.	52
5.5.1	Síntese do gene sintético.	52
5.5.2	Desenho do gene sintético.	53
5.6	Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real para as mutações H63D e S65C do gene da Hemocromatose.	54
5.6.1	Crítérios de determinação de resultados.	55
5.7	Avaliação do desempenho analítico.	57

5.7.1	Avaliação da seletividade dos iniciadores.	57
5.7.2	Avaliação de interferentes no resultado	58
5.7.3	Limite de detecção utilizando amostras clínicas portando os principais genótipos	59
5.7.4	Reprodutibilidade	60
5.7.5	Precisão.....	61
5.7.6	Acurácia do ensaio genético e taxa de falsos resultados.....	62
6.	DISCUSSÃO	65
6.1	Obtenção da sequência genética do gene <i>HFE</i> (região flanqueadora das mutações H63D e S65C).....	65
6.2	Pesquisa por outros polimorfismos no banco de dados Ensembl do EMBL que podem estar presentes na região de interesse.	66
6.3	Análise dos polimorfismos no banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations e a base de dados do HGMD.	66
6.4	Construção das sondas e iniciadores do ensaio 5'Nuclease.....	67
6.4.1	Sondas LNA.....	67
6.4.2	Iniciadores.....	70
6.4.3	Verificação de formação de dímeros e estruturas secundárias nos oligonucleotídeos.....	71
6.5	Construção de controle positivo sintético H63D mutante e S65C mutante.	71
6.5.1	Desenho do gene sintético.....	72
6.5.2	Síntese do gene sintético.	73
6.6	Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real para as mutações H63D e S65C do gene da Hemocromatose.	74
6.7	Avaliação do desempenho analítico.	76
6.7.1	Avaliação da seletividade dos iniciadores.	76
6.7.2	Avaliação de interferentes no resultado	76
6.7.3	Limite de detecção utilizando amostras clínicas entre os principais genótipos	77
6.7.4	Reprodutibilidade e Precisão	78
6.7.5	Acurácia do ensaio genético e taxa de falsos resultados.....	79
7.	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

A Hemocromatose é a desordem genética mais comum em europeus. No Brasil, não existem registros de sua incidência. Está distribuída em todo o mundo sendo que nas populações mais afetadas sua prevalência pode chegar a 1: 220-250 indivíduos. A doença afeta igualmente homens e mulheres, mas os sintomas nos homens aparecem mais cedo, por volta dos 40 anos, enquanto nas mulheres, devido a perda de sangue mensalmente, o depósito de ferro no corpo é menor e os sintomas surgem após os 50 anos.

A Hemocromatose ainda é uma desordem subdiagnosticada, tanto por ser considerada rara quanto pelo fato de que é descoberta quando as manifestações da doença estão totalmente estabelecidas como a cirrose, diabetes e pigmentação da pele. Após os danos ocorridos nos órgãos que acumulam o ferro, pouco se pode fazer para tratar os sintomas.

Um dado levantado pela Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado revelou que a observação de manifestações clínicas em pacientes com sintomas clássicos da hemocromatose e sua descoberta em fase avançada foi bastante comum entre as décadas de 1950 a 1980. A partir de 1990, a Hemocromatose hereditária passou a ser detectada em pacientes com níveis de ferro anormais ou por pesquisa na família. Quando estes pacientes foram identificados dessa forma, 75% deles não tiveram sintomas e não exibiram os estágios finais das manifestações da doença. Portanto a identificação de pacientes com predisposição ao acúmulo desordenado de ferro anteriormente às manifestações da doença conseguiu aumentar a qualidade de vida e prevenir as complicações severas da doença.

Em um estudo de coorte prospectivo realizado na Cidade do México foi avaliada a influência das variantes C282Y e H63D, do gene *HFE*, no peso de recém-nascidos. Este estudo demonstrou que o genótipo mutante de H63D da criança prediz a redução de seu peso ao nascimento. Em modelos de regressão linear o alelo mutante H63D predisse a diminuição de 129,5 gramas do peso de recém-

nascidos. O efeito combinado do genótipo mutante H63D da mãe e criança predisse uma diminuição ainda maior, de 176,9 gramas no peso da criança ao nascer. Os autores ainda observaram que o alelo mutante H63D da mãe está relacionado com o aumento das consequências negativas do fenômeno do efeito tóxico do chumbo, que ocorre durante a gravidez, devido à mobilização desse metal dos ossos da mãe^{59, 60}.

Desta forma, o desenvolvimento de novas metodologias para a identificação de mutações associadas a esses efeitos é um importante passo para o fornecimento de ferramentas que auxiliem os médicos nas tomadas de decisão em relação ao paciente. A biologia molecular tem se mostrado uma importante ferramenta nas áreas da medicina personalizada como, por exemplo, na avaliação das mutações genéticas que influenciam no metabolismo de drogas, também nos estudos de síndromes e doenças genéticas causadas por mutações. Apesar desses avanços, existe carência em métodos que possuem sua eficiência comprovada de acordo com critérios de avaliação metodológica.

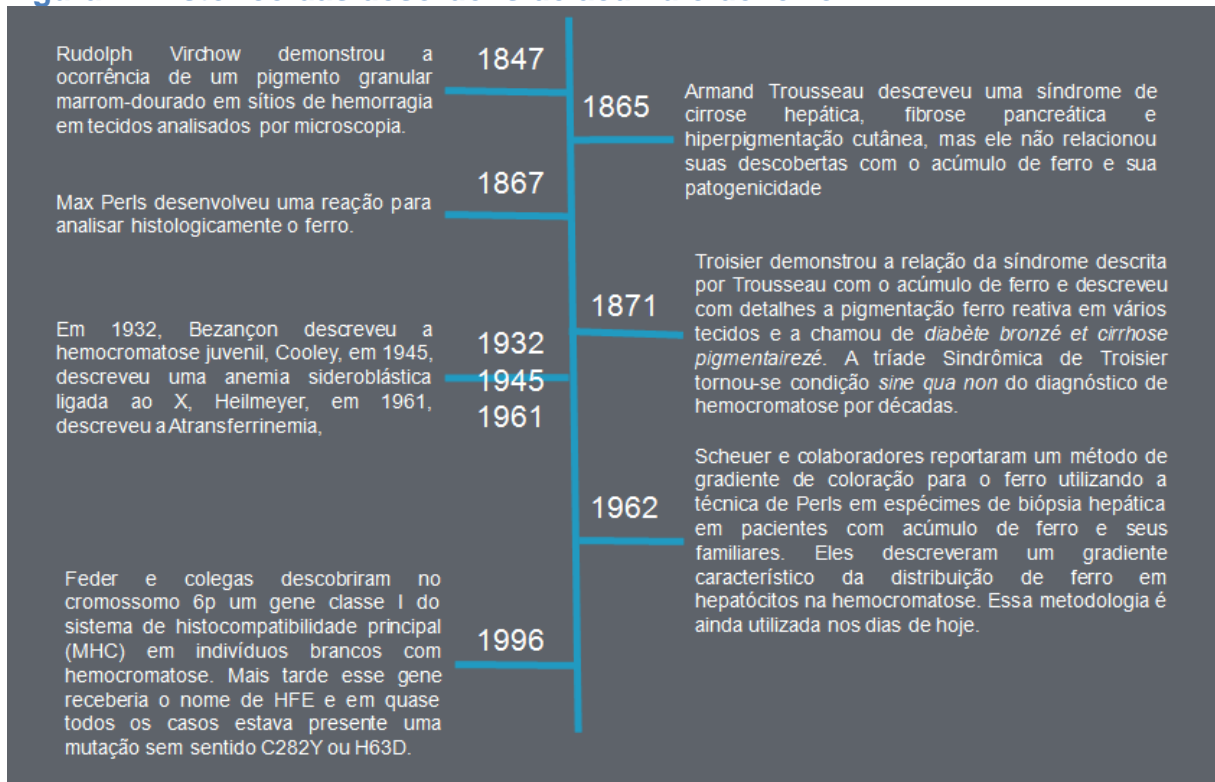
Este trabalho tem como objetivo padronizar uma nova metodologia baseada em PCR em tempo real para identificação das variantes C282Y e H63D, do gene HFE seguindo os critérios de avaliação de guias para validação de testes para diagnóstico molecular na prática clínica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História das desordens de acúmulo de ferro

Em 1704 em Berlin, Heinrich Diesbach e Johann Konrand Dippel acidentalmente produziram uma coloração azul a partir da mistura de potássio, óleo animal derivado de sangue e sulfato ferroso. Quase 150 anos depois, médicos e cientistas perceberam que poderiam visualizar o ferro contido em tecidos utilizando uma reação semelhante. E depois de mais de 250 anos, esta prática se tornou comum para quantificar o ferro em sangue e tecidos permitindo a identificação da hemocromatose e outras síndromes de sobrecarga de ferro. Na Figura 1 podemos observar vários pontos importantes da história e do avanço do conhecimento acerca das desordens de acúmulo de ferro.

Figura 1: Histórico das desordens de acúmulo de ferro



2.2 Possíveis causas de acúmulo de ferro

Em 1929, A. S. Strachan estudou 876 necropsias de indivíduos da África central e do sul que morreram entre 1925 e 1928. Em seu estudo ele concluiu que a dieta poderia ser a responsável pela coloração comumente encontrada na “diabetes bronzeada”². Em 1935, J.H. Sheldon, fez um levantamento cuidadoso na literatura de 311 casos de “hemocromatose” que o levaram a concluir que a absorção de ferro estava aumentada nestas pessoas e que, provavelmente, esta condição estaria ligada a um erro inato do metabolismo. Ele rejeitou outros fatores como alcoolismo, intoxicação, infecções e diabetes como sendo a causa de hemocromatose e viu o trabalho de A. S. Strachan com ceticismo. Em 1960, R. A. Macdonald publicou que a sobrecarga de ferro e danos causados em tecidos e órgãos era resultado do consumo de álcool e outros fatores nutricionais e não de um erro inato que aumentava a absorção do ferro. Subsequentemente, muitos pesquisadores publicaram evidências de um fator hereditário que aumentava a absorção de ferro em indivíduos com hemocromatose e verificaram a influência do sexo e idade com o fenótipo clínico de hemocromatose.

2.3 Bases genéticas para as síndromes de sobrecarga de ferro

A natureza hereditária de várias síndromes relacionadas à sobrecarga de ferro foi descrita entre 1945 e 1995. Entre elas a anemia sideroblástica ligada ao X, aceruloplasminemia, síndrome hereditária catarata-hiperferritinemia e a hemocromatose ferroportina.

Em 1996, Feder e colegas descobriram, no cromossomo 6p, um gene classe I do sistema de histocompatibilidade principal (MHC) em indivíduos brancos com hemocromatose. Mais tarde esse gene receberia o nome de *HFE* e, em quase todos os casos da doença, estava presente pelo menos uma das duas mutações, C282Y ou H63D. A proteína HFE está fortemente relacionada à regulação da absorção intestinal do ferro.

A mutação C282Y causa uma alteração na estrutura terciária da proteína HFE , e conseqüentemente, ocorre a perda de sua função. A homozigotidade de C282Y no gene *HFE* está presente em aproximadamente 90% das pessoas com fenótipo de hemocromatose e esse genótipo define a hemocromatose “clássica”. A mutação C282Y é mais presente em descendentes de europeus; no entanto, a mutação H63D ocorre em quase todas as populações do mundo.

Em 1997, Douabin e colegas reportaram uma nova mutação de sentido trocado (S65C) no gene *HFE*⁵. Mais tarde, Mura e colaboradores mostraram que a prevalência da mutação S65C estava aumentada em indivíduos com hemocromatose que não apresentavam as mutações C282Y ou H63D em um dos cromossomos ⁸.

2.4 O metabolismo do ferro

O ferro é um importante mineral empregado no transporte de oxigênio, síntese de DNA e metabolismo energético. Nos mamíferos está presente no grupo heme das hemoglobinas, mioglobinas e dos citocromos ^{1,10}.

A deficiência do ferro pode levar a sérios problemas de saúde sendo a anemia a manifestação mais relevante. Por outro lado, o acúmulo de ferro também é prejudicial para as células e tecidos, já que o ferro livre promove a síntese de espécies de oxigênio reativas que lesam proteínas, lipídios e DNA. Portanto o equilíbrio deste mineral é importante para homeostase celular^{1,10}.

No equilíbrio do ferro estão envolvidas diversas células, hormônios e proteínas transportadoras que são responsáveis por sua absorção, distribuição e eliminação. A eliminação do ferro é um processo menos eficiente que sua absorção e distribuição ^{1,10}.

A absorção ocorre principalmente nos enterócitos localizados na parede intestinal do duodeno. Em torno de 1mg a 2mg de ferro são absorvidas diariamente no intestino. O processo inicia através da conversão do Fe³⁺, presente na dieta, na forma Fe²⁺ pelo citocromo redutase b duodenal (Dcytb) que então é transportada ao interior do

enterócito pela proteína transmembrana de metal divalente (DMT-1). A forma heme do ferro é transportada ao interior do enterócito pela proteína transportadora do heme-1 (HCP1).

O mecanismo regulatório de HCP1 se faz através de alterações dos níveis de ferro intracelular. Quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos, ocorre uma redistribuição de HCP1 do citoplasma para a membrana, o oposto ocorrendo quando os níveis estão altos. Este mecanismo ajuda a controlar a absorção de ferro na forma heme de acordo com sua abundância ^{1,10}.

Intracelularmente o ferro é armazenado na forma de ferritina e é exportado para o plasma pela Ferroportina (FPT). A Ferroportina é uma proteína com 10 a 12 segmentos transmembrana, localizada na região basolateral de vários tipos celulares, que tem alta afinidade pelo Fe²⁺. O Fe²⁺ externalizado por ela deve ser oxidado na forma Fe³⁺, o que é feito pela hefaestina ^{1,10}.

O ferro na forma Fe³⁺ é então transportado pela Transferrina (Tf) até os locais onde ele será utilizado. A Transferrina é uma glicoproteína de 80KDa que solubiliza o ferro e o torna menos reativo e portanto menos agressivo à célula. Quando a Transferrina encontra-se saturada de ferro, ela se liga ao Receptor de Transferrina (TfR) e internaliza o ferro novamente e portanto sinaliza ao organismo o excesso de ferro através do mecanismo regulatório de HCP1 ¹.

A afinidade da Tf pelo TfR é em parte controlado pela proteína HFE. Um complexo HFE-TfR se forma no citosol da célula reduzindo o número desses receptores na membrana celular quando o grau de saturação de ferro esta alto. Este complexo é responsável por sinalizar tanto o nível alto quanto o baixo de ferro na célula ^{1,10}.

2.5 O gene *HFE* da hemocromatose

O gene *HFE* está localizado no cromossomo 6, no braço curto e na posição 22.2 (6p22.2). Ele possui 7 exons que compreendem 12Kb, é expresso em todos os tecidos exceto no cérebro e é responsável pela transcrição de uma proteína que possui uma estrutura similar às proteínas de classe I do MHC, a qual interage com a

β 2-microglobulina. Drakesmith, em 2002, utilizou o sistema de numeração iniciando pelo primeiro aminoácido da proteína madura. No entanto posteriormente foi incluído um trecho codificado por uma sequência de sinalização de 22pb, contido na proteína imatura, que alterou a forma de numeração dos aminoácidos ⁶. Por esse motivo, as mutações C260Y e H41D passaram a ser chamadas de C282Y e H63D respectivamente.

Segundo a Associação Americana para Estudos de Doenças do Fígado (AASLD), os pacientes portadores de síndromes de sobrecarga de ferro podem ser classificados em três categorias: ¹ Aqueles com causas hereditárias de acúmulo de ferro, ² aqueles com causas secundárias variadas de acúmulo de ferro, e ³ um grupo pequeno de miscelâneas.

Aproximadamente 85 a 90% dos pacientes com causas hereditárias de acúmulo de ferro apresentam a mutação C282Y no gene *HFE* em homozigose, embora existam alguns heterozigotos compostos, que são aqueles que apresentam um alelo mutado C282Y e o outro alelo mutado H63D ou S65C ¹². Os outros 15 a 10% dos pacientes com causas hereditárias de acúmulo de ferro estão relacionados com mutações em outros genes envolvidos na homeostase do ferro.

2.5.1 Mutação C282Y

A mutação C282Y foi descrita em 1996 por Feder e colaboradores. Estes pesquisadores viram, através de ensaios de transfecção de células, que a transição G > A na posição 845, que leva à substituição de uma cisteína por uma tirosina, modifica um domínio conservado de cisteína na proteína HFE. Esta alteração prejudica sua interação com a β 2-microglobulina e, conseqüente, sua localização na superfície da célula. Desta forma, esta mutação impede a interação de HFE- β 2-microglobulina com TfR causando o acúmulo de ferro no interior da célula ⁷. Esta mutação é a mais comum em indivíduos com hemocromatose hereditária (HH), com frequência entre 80 a 90%.

2.5.2 Mutação H63D

A mutação H63D ocorre através de uma transversão de citosina em guanina na posição 187 do gene *HFE* que leva a substituição do aminoácido histidina por um aspartato no resíduo 63 (H63D). Esta mutação provavelmente altera uma ponte salina intramolecular dependente de pH que interfere na ligação de HFE ao receptor de Transferrina TfR^{9,10}. No entanto, os detalhes da interferência que a mutação causa no processo de acúmulo de ferro permanecem incompreendidos. A frequência desta mutação está enriquecida em portadores de hemocromatose com heterozigose para C282Y.

2.5.3 Mutação S65C

A mutação S65C está relacionada a uma transversão A > T na posição 193 do gene *HFE*, que leva a substituição de uma serina por uma cisteína na posição 65 da proteína imatura. Em algumas populações, a frequência dessa mutação pode variar de 1,6 a 5,5%^{2, 3, 4}. Não foram observadas modificações severas na estrutura da proteína portadora desta alteração. No entanto, vários pesquisadores demonstraram que esta mutação estava “enriquecida” em indivíduos portadores de hemocromatose e que apresentavam a mutação C282Y em heterozigose.

2.6 Pesquisa molecular das mutações do gene *HFE*

A Sociedade Clínica de Genética Molecular (CMGS) adotou em 2006 um guia de boas práticas para o diagnóstico molecular de hemocromatose tipo 1. A CMGS faz parte da Sociedade Britânica de Genética Humana, que promove a qualidade nos testes genéticos (DNA) através de treinamento, educação e pesquisa. Este guia estabelece o uso de metodologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de análise de polimorfismo de tamanho de fragmento por restrição (RFLP), PCR alelo-específico, PCR em tempo real e outros^{7,11}.

Entretanto, alguns órgãos como o Serviço de Avaliação Externa da Qualidade do Reino Unido (UK NEQAS) ou a Rede Europeia de Qualidade de Testes de Genética

Molecular (EMQA) relataram alguns erros observados utilizando métodos que foram previamente publicados mas que não seguiram critérios rígidos para a avaliação de sua eficiência¹¹.

As causas para estes erros podem ser atribuídos aos problemas específicos na sequência genética do gene *HFE*, assim como aos erros gerais cometidos na validação dos testes moleculares.

A região do gene *HFE*, que abriga as mutações associadas a Hemocromatose alvos desse estudo, é bastante peculiar em se tratando de testes moleculares. As mutações H63D e S65C estão localizadas a apenas seis bases de distância uma da outra e algumas técnicas de análise da mutação H63D podem sofrer interferência na presença da mutação S65C, ou vice-versa. De fato, de acordo com alguns serviços de avaliação externa da qualidade já foram relatados casos em que o heterozigoto composto H63D/S65C foi detectado como um H63D homozigoto mutante¹¹.

Esta interferência também poderia ocorrer em diversas técnicas como: PCR alelo específico ou ARMS-PCR (do inglês, amplification refractory mutation system). Como no desenho dos iniciadores destas técnicas, geralmente é inserido um mal-pareamento de bases para aumentar a instabilidade dos iniciadores e possibilitar a discriminação dos alelos normais e mutados¹⁴, uma segunda mutação, não esperada, na região de anelamento dos iniciadores poderia resultar em falso-negativos ou falso-positivos.

Também em técnicas como no ensaio de PCR 5' Nuclease (PCR em tempo real Tipo-TaqMan®) as menores sondas possuem em torno de 13 pares de bases (pb) e, conforme forem desenhadas, podem conter simultaneamente os dois sítios das mutações H63D e S65C. Estes ensaios são desenvolvidos para discriminar apenas uma mutação ou SNP (do inglês, single nucleotide polymorphism) por vez. Sendo assim, uma segunda mutação "não prevista" poderia da mesma forma, alterar a temperatura de anelamento da sonda e conseqüentemente resultar em falso-negativos ou falso-positivos. Em estudos de validação interna no Laboratório Hermes Pardini um ensaio TaqMan® Nº C_1085600_10 (LifeTechnologies, Carlsbad, California) para identificação da mutação H63D apresentou um erro a cada 150 genotipagens (dados não publicados).

Em relação à validação de métodos diagnósticos, os problemas reportados são diversos como: metodologias inadequadas, descuido nos apontamentos pertinentes, falha na escolha das amostras e outros. Estes estudos mal elaborados podem fazer com que metodologias sejam prematuramente empregadas e levem os médicos a tomarem decisões erradas sobre os cuidados com determinado paciente.

Um levantamento realizado entre 1978 a 1993 em quatro jornais relevantes na área médica revelou que a maioria dos testes diagnósticos era avaliada inadequadamente ¹⁵ e, portanto, a partir desses estudos foram criadas iniciativas para tentar padronizar a avaliação dos testes diagnósticos com critérios mínimos que assegurassem a qualidade dos testes.

2.7 Diagnóstico e tratamento de Hemocromatose

O guia prático de 2011 para o diagnóstico e tratamento de hemocromatose pela Associação Americana para o estudo de doenças do fígado indica que indivíduos com parentesco de 1º grau de pacientes com hemocromatose devem ser investigados quanto ao nível de saturação da transferrina e ferritina no soro e, concomitantemente, ser avaliados quanto as mutações no gene *HFE*. Em indivíduos suspeitos assintomáticos e sintomáticos, os níveis de saturação da transferrina e ferritina no soro devem ser primeiramente investigados. Caso os níveis de saturação da transferrina apresentem um aumento inferior a 45% e os níveis de ferritina estejam normais, nenhuma avaliação adicional é necessária. Caso o aumento no nível de saturação da Transferrina seja superior a 45% e o nível de ferritina esteja elevado, deve-se testar as mutações no gene *HFE*, relacionadas à hemocromatose. Primeiramente testa-se a mutação C282Y, caso o genótipo seja homozigoto mutante, o nível de ferritina no soro pode ser pesquisado novamente como indicador de cirrose, isto é, nível de ferritina no soro inferior a 1000µg/L é indicativo de ausência de cirrose sendo indicada a flebotomia terapêutica. Caso o nível de ferritina no soro seja superior a 1000µg/L ou os níveis de enzimas do fígado estejam elevados podem indicar a cirrose em 80% de indivíduos homozigotos para C282Y. Neste caso a biópsia do fígado é indicada para avaliar a concentração de ferro hepático e o tratamento é a flebotomia terapêutica¹².

Nos casos em que o genótipo de C282Y for heterozigoto, é aconselhada a pesquisa de outras mutações no gene *HFE*, como H63D e S65C^{11,12}. Outras doenças do fígado também devem ser descartadas antes de se realizar a biopsia de fígado para avaliar a concentração de ferro hepático e o tratamento é a flebotomia terapêutica¹².

A confirmação do diagnóstico de hemocromatose antes do desenvolvimento de cirrose ou outras manifestações avançadas dessa desordem pode garantir que providências sejam tomadas para a manutenção da qualidade de vida do paciente

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo consiste na padronização e validação de uma nova metodologia para detectar a presença das mutações H63D e S65C simultaneamente através do ensaio PCR 5'Nuclease e detecção em tempo real para auxiliar a detecção precoce da hemocromatose. Além disso, como o método prevê a identificação das duas mutações simultaneamente poderá ocorrer menos erros na genotipagem caso o paciente testado possuam as duas variantes.

3.2 Objetivos Específicos

Desenho experimental do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real simultâneo para as mutações H63D e S65C;

Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease para a detecção simultânea das mutações H63D e S65C do gene *HFE* para identificar a condição ótima da reação;

Validação do ensaio de PCR 5' Nuclease mediante a comparação com o método referência de genotipagem para as mutações H63D e S65C para verificar a eficiência do método testado.

4. MÉTODOS

Como se trata de uma metodologia nova no sentido de que a sonda fará a identificação simultânea de duas mutações, haverá uma fase de idealização do ensaio de PCR 5' Nuclease. Foram utilizados os conceitos básicos de construção de ensaio “tradicional” de PCR 5' Nuclease e conceitos novos especulativos acerca da possibilidade do uso do ensaio em um formato novo capaz de discriminar dois sítios de mutação simultaneamente. Vários passos da idealização do ensaio de PCR 5' Nuclease foram realizados com a ajuda de ferramentas de bioinformática.

4.1 Obtenção da sequência genética do gene *HFE* (região flanqueadora das mutações H63D e S65C)

Primeiramente foi realizada uma pesquisa na base de dados do OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man® (<http://www.omim.org/>) para obter informações sobre os polimorfismos H63D e S65C. A busca foi realizada utilizando a palavra chave HFE. Em seguida o banco de dados dbSNP-Short Genetic Variations (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) foi utilizado para obter a sequência flanqueadora de um dos polimorfismos. Por último esta sequência foi utilizada para obter a sequência referência do gene *HFE* através da ferramenta BLAST - [Basic Local Alignment Search Tool](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A pesquisa foi realizada no programa “Nucleotide blast” utilizando os parâmetros padrões com a alteração do genoma pesquisado para “Reference genomic sequences”.

4.2 Pesquisa por outros polimorfismos no banco de dados Ensembl do EMBL que podem estar presentes na região de interesse.

Para encontrar esta anotação genômica no banco de dados do projeto Ensembl do EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (<http://www.ensembl.org/index.html>), foi utilizada a ferramenta BLAT – BLAST “Like Alignment Tool”

(<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>). Todos os parâmetros padrões da ferramenta foram utilizados com exceção da espécie selecionada e a sensibilidade da pesquisa, respectivamente *Homo sapiens* e alinhamento exato (Exact matches). Em seguida a ferramenta “Region Report” (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/UserData/SelectReportOptions) do EMBL foi utilizada para encontrar variações do tipo polimorfismo de base única (SNP) ou deleções e inserções (InDels) na sequência alvo.

4.3 Análise dos polimorfismos no banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations e a base de dados do HGMD.

A partir dos números de identificação dos SNPs foram usados os bancos de dados dbSNP-Short Genetic Variations (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) e a base de dados do HGMD – Human Genetic Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>) para obter as seguintes informações de cada polimorfismo: posição na sequência referência NG_008720.1, variação alélica, alelo selvagem, frequência dos alelos, população onde o polimorfismo foi encontrado, importância clínica e contexto na sequência.

4.4 Construção das sondas e iniciadores do ensaio 5’Nuclease.

4.4.1 Sondas LNA®.

Para prever a Temperatura de melting (T_m) das sondas LNA foi utilizado a ferramenta LNA™ Oligo T_m Prediction (<http://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx>). As sondas LNA (Locked Nucleic Acid) são constituídas de nucleotídeos modificados que aumentam a afinidade da sonda pelo DNA.

4.4.2 Iniciadores.

As recomendações de Xiaowei Wang e Brian Seed, 2007 foram utilizadas para escolher o par de iniciadores a serem usados na reação em cadeia da polimerase. Para prever a Temperatura de melting (T_m) dos iniciadores foi utilizado a ferramenta LNA™ Oligo T_m Prediction. Em seguida, para avaliar a especificidade do par de iniciadores no genoma humano e prever a força de interação da ligação 3' dos iniciadores foi utilizada a ferramenta MFEprimer-2.0 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/>). Todos os parâmetros padrões foram utilizados.

4.4.3 Verificação de formação de dímeros e estruturas secundárias nos oligonucleotídeos

Para verificar a formação de dímeros e estruturas secundárias foi utilizada a ferramenta LNA™ Oligo Optimizer (<http://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonOligoOptimizerTool.aspx>) sem alteração dos parâmetros padrões.

4.5 Construção de controle positivo sintético H63D mutante e S65C mutante.

4.5.1 Síntese do gene sintético.

Como não haviam amostras de todos os genótipos necessários para serem utilizadas como controle positivo, optamos por utilizar genes sintéticos. Para a construção do controle sintético foi escolhida a síntese gênica da empresa IDT® - Integrated DNA Technologies. A ferramenta para realizar o pedido de síntese está disponível no link <http://www.idtdna.com/order/OldOrder.aspx?type=genes>. A opção "Gene" foi selecionada por se tratar de uma sequência superior a 400pb. Em seguida os dados referentes à construção do gene foram inseridos: O nome da sequência e a sequência gênica escolhidas foram respectivamente, 63mut65mut e sequência da anotação genômica >gj|224514668:26030968-26031467. As bases

selvagens foram substituídas pelas bases mutantes relativas às mutações H63D e S65C. Segue abaixo a sequência utilizada na construção com detalhe para os sítios das mutações sublinhadas.

```
CCAGACACAGCTGATGGTATGAGTTGATGCAGGTGTGTGGAGCCTCAACATCCTGCTCCCCTCCTACT
ACACATGGTTAAGGCCCTGTTGCTCTGTCTCCAGGTTACACTCTCTGCACTACCTCTTCATGGGTGCC
TCAGAGCAGGACCTTGGTCTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGTTTCGTGTT
CTATGATGATGAGTGTGTCGCCGTGTGGAGCCCCGAACTCCATGGGTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCAGA
TGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGTCTGAAAGGGTGGGATCACATGTTCACTGTTGACTTCTGGACTATT
ATGGAAAATCACAACCACAGCAAGGGTATGTGGAGAGGGGGCCTCACCTTCCTGAGGTTGTCAGAGCT
TTTCATCTTTTCATGCATCTTGAAGGAAACAGCTGGAAGTCTGAGGTCTTGTGGGAGCAGGGAAGAGG
GAAGGAATTTGCTTCCTGAGATCA
```

O vetor escolhido para a clonagem gênica foi o plasmídeo pIDTSMART-AMP.

A construção do plasmídeo foi confirmada através de sequenciamento e foi realizado pela empresa IDT® como controle de qualidade de produção do gene sintético.

4.5.2 Desenho dos iniciadores para amplificar o gene sintético.

As recomendações gerais para o desenho de iniciadores de Shen Z et al, 2010 foram utilizadas para escolher o par de iniciadores responsáveis por amplificar, por meio de uma reação de PCR convencional, a sequência flanqueadora contendo a região de interesse no gene sintético. Isto foi feito para termos uma fonte inesgotável do controle positivo. Para predizer a Temperatura de melting (T_m) dos iniciadores foi utilizada a ferramenta LNA™ Oligo T_m Prediction. Em seguida, para avaliar a força de interação da porção 3' dos iniciadores foi utilizada a ferramenta MFEprimer-2.0 e para verificar a formação de dímeros e estruturas secundárias foi utilizada a ferramenta LNA™ Oligo Optimizer.

4.6 Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real para as mutações H63D e S65C do gene da Hemocromatose.

4.6.1 Purificação de DNA das amostras de sangue total.

As amostras de DNA de 230 pacientes foram preparadas utilizando o kit comercial Gentra Puregene Blood (QIAGEN®) modificado. Para isto, foram adicionados 400µl

de halo de leucócitos em um tubo de 1,5ml contendo 900µl de solução de lise de células vermelhas “RBC Lysis Solution”. A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a lise de hemácias, a mistura foi centrifugada por 1 minuto a aproximadamente 17.000 g em centrífuga A-14 (*Jouan*). O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado de células foi lavado e homogeneizado com 100µl de solução de eluição TE, utilizando a pipeta. Foram adicionados 350µl de solução de lise celular “Cell Lysis Solution” no tubo e a mistura foi novamente homogeneizada. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente até que a solução se tornasse homogênea. Foi adicionado ao tubo, contendo o lisado celular, 1,5µl de solução de RNase “RNase A Solution” e a mistura foi homogeneizada, por inversão, 25 vezes. Os tubos foram incubados por 15 minutos à 37°C em termobloco *Timer IT-2002 (BioPLUS)*. Em seguida, foram adicionados 120µl de solução de precipitação de proteínas “Protein Precipitation Solution”, a mistura foi homogeneizada no agitador de tubos *MS1 Minishaker (IKA®)* em alta velocidade por 30 segundos. O tubo foi centrifugado por 3 minutos a aproximadamente 17.000 g na centrífuga A-14 (*Jouan*). A seguir, o sobrenadante, contendo o DNA foi transferido para outro tubo de 1,5ml contendo 600µl de isopropanol para análise (Merck KGaA) e a mistura foi novamente homogeneizada. O tubo foi centrifugado por 3 minutos a aproximadamente 17.000 g na centrífuga A-14 (*Jouan*). Em seguida o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 300µl de solução de etanol 70% sobre o precipitado. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a aproximadamente 17.000 g na centrífuga A-14 (*Jouan*) e o sobrenadante retirado com o auxílio de uma pipeta. O tubo foi deixado aberto por 15 minutos para o álcool evaporar e em seguida foram adicionados ao tubo 20µl de solução de hidratação “DNA Hydratation solution”. O tubo foi incubado à 65°C por 2 horas para sua completa hidratação. As amostras foram então conservadas em freezer à -20°C até o momento de sua utilização.

4.6.2 Quantificação de DNA

As amostras de DNA purificado foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro *NanoVue™ (GE Healthcare)* seguindo as recomendações do fabricante. As medidas foram realizadas nos seguintes comprimentos de onda: A260nm, A280nm, A230nm.

As relações A260/A280nm e A260/A230nm e a concentração de DNA foram determinadas para todas as amostras.

4.6.3 Reação em cadeia da polimerase 5' Nuclease

O ensaio PCR 5'Nuclease foi desenhado para detectar simultaneamente as mutações H63D e S65C. Conforme a Figura 2, por exemplo, na presença do haplótipo HS/HS, apenas a sonda 63N65N emitirá o sinal devido a sua total complementaridade com o DNA genômico, o que permite sua quebra pela atividade exonuclease 5'-3'da DNA polimerase.

As sondas e haplótipos foram nomeados conforme a seguir para facilitar sua referência no texto. Para se referir aos haplótipos utilizamos o código IUPAC para aminoácidos. Por exemplo, um indivíduo homocigoto normal para H63D e homocigoto mutante para S65C receberia a nomenclatura de 6365 HC/HC, ou seja, os dois cromossomos são compostos por um alelo selvagem ou normal que no código IUPAC para aminoácidos está representado pela letra H, para a mutação H63D, e um alelo mutante que no código IUPAC para aminoácidos está representado pela letra C, para a mutação S65C. Quando nos referimos às sondas ou aos sinais que elas emitem utilizamos a nomenclatura N para selvagem ou normal e M para mutante e, portanto a sonda 63N65M teria a complementaridade total nos dois cromossomos de um indivíduo com haplótipo 6365 HC/HC.

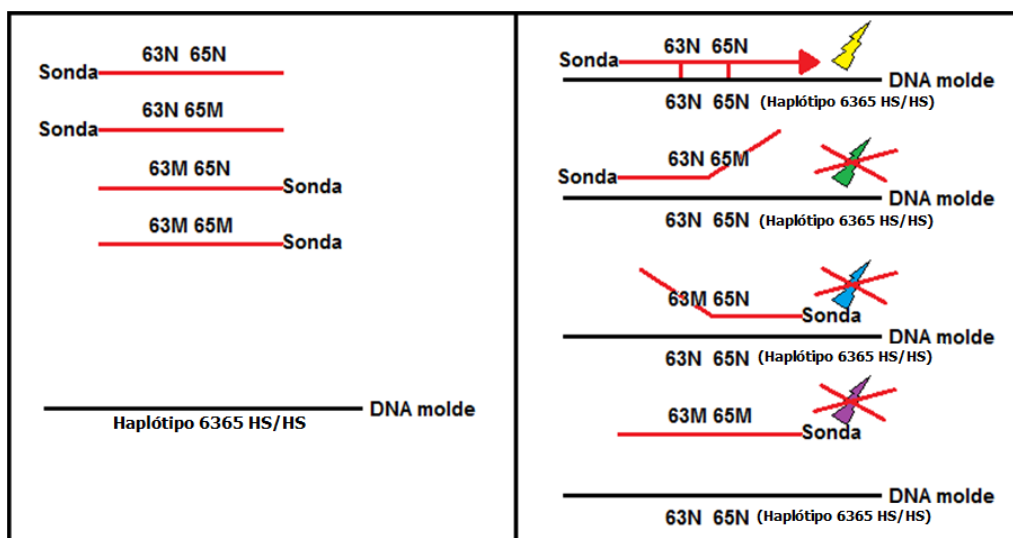


Figura 2: Representação esquemática do ensaio PCR 5'Nuclease para a detecção simultaneamente das mutações H63D e S65C.

Os iniciadores HEMO_F e HEMO_R e as quatro sondas 63N65N, 63N65M, 63M65N e 63M65M foram adicionadas ao tampão 2x *TaqMan*® *genotyping PCR Master Mix* (LifeTechnologies™) nas concentrações finais de 0,9mM para os iniciadores e 0,35mM para as sondas. A concentração final de DNA variou entre 0,5ng e 50ng conforme o experimento e o volume final da reação foi 25µl.

4.6.4 Programa de PCR

A etapa de amplificação foi realizada no termociclador 7500 Fast Real time (Life Technologies™), selecionando o tipo de experimento de quantificação com curva padrão “*Quantification Standard curve*”, reagentes *TaqMan*® “*TaqMan*® *Reagents*” e velocidade de aquecimento padrão “*Standard ~ 2 hours to complete a run*”. As condições de temperatura foram as seguintes: 60°C por 1 minuto, desnaturação a 95°C por 10 minutos, 50 ciclos em dois passos a 95°C por 15 segundos e 58 a 64°C por 2 minutos e extensão final a 60°C por 1 minuto. Foram selecionados quatro alvos com os respectivos fluoróforos e cor representativa: Sinal 63N65N, fluoróforo Cy3 com cor representativa rosa. Sinal 63N65M, fluoróforo Cy5 com cor representativa marrom. Sinal 63M65N, fluoróforo JOE com cor representativa azul. Sinal 63M65M, fluoróforo 6FAM com cor representativa verde. Além disso, foi selecionada a fluorescência passiva ROX para a normalização dos sinais de fluorescência na cor representativa vermelha.

4.6.5 Metodologia de análise dos resultados

A detecção do haplótipo foi avaliada através do sinal gerado pelo fluoróforo (Figura 3). Para a determinação dos resultados foram levados em consideração o Ct determinado manualmente, a formação de platô e a elevação do sinal na escala logarítmica. Os gráficos foram apresentados nos formatos $R_n \times \text{Ciclos}$ e $\Delta R_n \times \text{Ciclos}$. Sendo R_n a fluorescência do repórter normalizado pela fluorescência da referência passiva em função no número de ciclos e ΔR_n a diferença entre o sinal

pré-PCR e o pós-PCR em função do número de ciclos. O Ct foi determinado como o ciclo quando a fluorescência excedeu a linha de base (Figura 4).

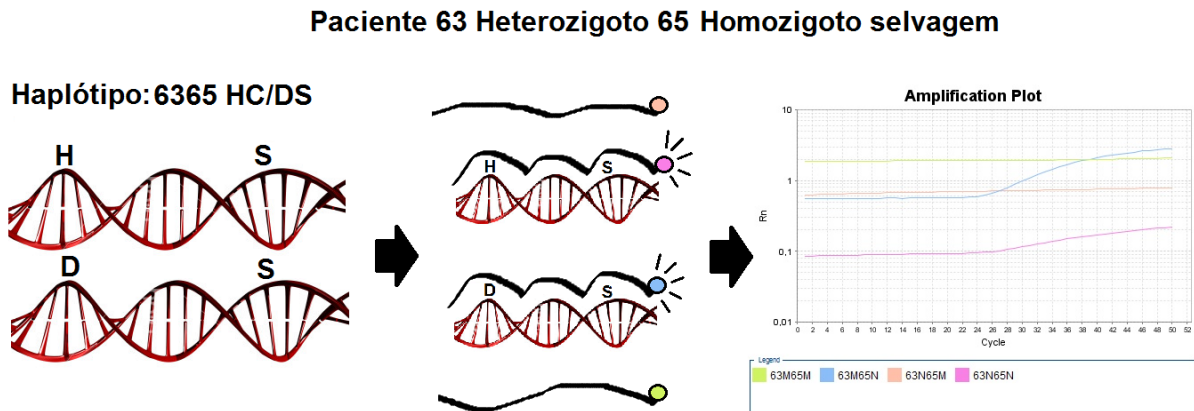


Figura 3: Representação esquemática da genotipagem de um paciente heterozigoto para a mutação H63D e homozigoto selvagem para a mutação S65C

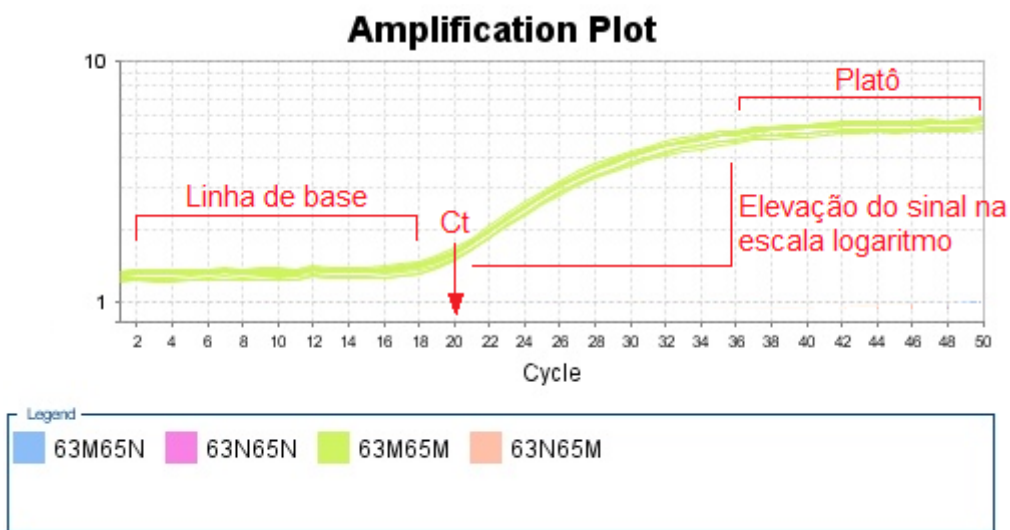


Figura 4: Partes que se dividem um sinal de amplificação. Linha de base, Ct, elevação na escala logarítmica e platô.

4.6.6 Critérios de determinação de resultados

Os critérios de determinação dos resultados foram elaborados a partir de amostras com os genótipos conhecidos. Através desses resultados foram avaliados o Ct determinado manualmente, formação de platô e elevação do sinal na escala logarítmica individualmente para cada sinal. Foram feitas tentativas de encontrar

padrões que se repetiam em amostras positivas que por sua vez não se demonstravam em amostras negativas.

4.7 Avaliação do desempenho analítico.

4.7.1 Avaliação da seletividade dos iniciadores.

A seletividade dos iniciadores foi avaliada *in silico* conforme explicado no item 4.4.2 e também através da verificação da amplificação de fragmentos inespecíficos em gel de agarose 2%. A reação de PCR continha 0,9mM dos iniciadores HEMO_F e HEMO_R, tampão 2x *TaqMan® genotyping PCR Master Mix* (LifeTechnologies™) e o volume final da reação foi de 25µl. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Life Technologies™). As condições de temperatura testadas foram as seguintes: desnaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos em três passos a 95°C por 30 segundos, 58 a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.7.2 Avaliação de interferentes no resultado

As interferências avaliadas neste trabalho foram aquelas provenientes do método de purificação de DNA utilizado, ou seja, resíduos da extração do ácido nucleico pelo método Gentra Puregene Blood (QIAGEN®). Para isto, foram selecionadas amostras a partir da leitura no espectrofotômetro *NanoVue™* (GE Healthcare) e de sua relação de absorbância nos comprimentos de onda A260/A280 e A260/A230 respectivamente. Foram selecionadas amostras com leitura de absorbância superior a 1,9 na relação de comprimento de onda A260/A280, possivelmente contaminadas com RNA e proteínas, e amostras com leitura de absorbância inferior a 2,0 na relação de comprimento de onda A260/A230, possivelmente contaminadas com sal e solventes orgânicos^{46, 47}.

4.7.3 Determinação do limite de detecção utilizando amostras clínicas portando os principais genótipos

O limite de detecção do teste foi testado em indivíduos com os haplótipos mais frequentes, 6365 HS/HS, 6365 HS/DS, 6365 DS/DS, 6365 HS/HC, 6365 HS/DC, 6365 HC/HC, e o controle sintético 6365 DC/DC. As concentrações de DNA testadas foram 0,5 η g, 1 η g, 5 η g, 10 η g e 50 η g. Foram avaliados para cada sinal emitido pelas sondas, o Ct e a formação de platô, apresentados nos gráficos Rn x Ciclos e Δ Rn x Ciclos, e elevação do sinal na escala logarítmica, conforme os critérios de determinação de resultado para cada sinal. Esses testes foram realizados em doze repetições para a avaliação da variação através do cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação do Ct observado. O limite de detecção foi determinado quando todos os sinais 63N63N, 63N65M, 63M65N e 63M65M atenderam todos os critérios de determinação de resultados em todos os genótipos testados.

4.7.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio, que neste estudo significa a habilidade do teste em produzir resultados repetidos e consistentes por diferentes operadores, foi avaliada testando um painel de 30 amostras clínicas apresentando os seguintes haplótipos: 6365 HS/HS (16 amostras), 6365 DS/DS (1 amostra), 6365 HS/DS (9 amostras), 6365 HC/DS (1 amostra), 6365 HS/HC (1 amostra), o gene sintético 6365 HS/DC (1 amostra) e um branco de reação. O painel foi avaliado por três operadores de níveis diferentes quanto à experiência em análise de resultados de PCR em tempo real. A concordância entre os três observadores foi avaliada pelo índice Kappa utilizando 7 categorias que representam os seis haplótipos mais o branco da reação. O índice Kappa foi calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa. Além disso, foi calculado o índice Kappa geral, valor-p e intervalo de confiança de 95% do Kappa geral.

4.7.5 Precisão

A precisão avaliada neste estudo. Para tanto, um painel de 30 amostras clínicas apresentando os seguintes haplótipos: 6365 HS/HS (16 amostras), 6365 DS/DS (1 amostra), 6365 HS/DS (9 amostras), 6365 HC/DS(1 amostra), 6365 HS/HC (1 amostra), o gene sintético 6365 HS/DC (1 amostra) e um branco de reação foram avaliados pelo mesmo operador em três dias diferentes. A concordância entre as três observações foi avaliada pelo índice Kappa utilizando 7 categorias que representam os seis haplótipos mais o branco da reação. O índice Kappa foi calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa. Além disso, foi calculado o índice Kappa geral, valor-p e intervalo de confiança de 95% do Kappa geral.

4.7.6 Acurácia do ensaio genético e taxa de falsos resultados

A validade do ensaio foi avaliada através da acurácia do ensaio e da taxa de resultados falsos.

A acurácia pode ser descrita como a capacidade de um método para fornecer o resultado verdadeiro. Neste estudo, avaliamos a acurácia do ensaio testando a concordância de acertos na genotipagem das mutações H63D e S65C pelas técnicas de RFLP (Teste referência) e o novo ensaio 5'Nuclease de PCR em tempo real, através do índice Kappa. Os resultados dos haplótipos foram agrupados em 9 categorias e o índice kappa, valor-p e intervalo de confiança de 95% do kappa foram calculados para cada categoria. Além disso, o índice kappa geral, valor-p geral e intervalo de confiança de 95% do Kappa geral foram calculados para o ensaio. Para os testes foram feitas duas amostragens, uma primeira contendo 76 amostras de pacientes. Nesta amostragem foram representados 5 haplótipos com as seguintes frequências: 6365 HS/HS (60,52%), 6365 HS/DS(32,89%), 6365 DS/DS (2,64%), 6365 HC/DS(2,64%) e 6365 HS/HC (1,31%). A segunda conteve 153 amostras sendo que foram adicionados novos pacientes escolhidos para representarem os haplótipos raros 6365 HC/HC e dentre essas, 6 amostras sintéticas (genes sintetizados) representando os haplótipos raríssimos 6365 DS/DC, 6365 HC/DC e 6365 DC/DC.

A taxa de falsos resultados foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de resultados falsos} = 100 \times \frac{\text{número de amostras classificadas erroneamente}}{\text{Número total de amostras testadas}}$$

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção da sequência genética do gene *HFE* (região flanqueadora das mutações H63D e S65C).

A busca na base de dados do OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man® (<http://www.omim.org/>) utilizando a palavra chave HFE encontrou 38 resultados (Figura 5).

The screenshot shows the OMIM search results for the query 'hfe'. The search bar at the top indicates 'OMIM for hfe' with 38 results found. The results are listed in a table with checkboxes and links to GeneTests and Locus Maps. The first result is selected and highlighted in blue.

Item	Gene/Condition	GeneTests	Links
<input checked="" type="checkbox"/> 1	*613609. HFE GENE; HFE Gene map locus 6p21.3	GeneTests	Links
<input type="checkbox"/> 2	#235200. HEMOCHROMATOSIS; HFE Gene map locus 6p21.3. 20p12	GeneTests	Links
<input type="checkbox"/> 3	#612635. MICROVASCULAR COMPLICATIONS OF DIABETES, SUSCEPTIBILITY TO, 7; MVCD7 Gene map locus 6p21.3		Links
<input type="checkbox"/> 4	#176100. PORPHYRIA CUTANEA TARDA PORPHYRIA, HEPATOERYTHROPOIETIC, INCLUDED; HEP, INCLUDED Gene map locus 6p21.3. 1p34	GeneTests	Links

Recent activity: hfe (38) OMIM. See more...

Figura 5: Tela de resultados da busca realizada no banco de dados OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man®.

A opção referente ao gene *HFE*, [*613609. HFE GENE; HFE](#), foi selecionada e as duas mutações de interesse foram localizadas com seus respectivos números de identificação do banco de dados dbSNP-Short Genetic Variations (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>): H63D [dbSNP:rs1799945] e S65C [dbSNP:rs1800730]. Utilizando o número de identificação do SNP rs1799945 para

fazer a pesquisa no banco de dados do dbSNP-Short Genetic Variations obteve-se a sequência flanqueadora deste polimorfismo presente no gene *HFE*: ATGACCAGCTGTTTCGTGTTCTATGAT (Figura 6).

The screenshot shows the dbSNP search results for rs1799945. The search bar contains 'rs1799945' and the search button is labeled 'Search'. Below the search bar, there are links for 'Save search', 'Limits', 'Advanced', and 'Help'. The main content area displays the following information:

- Display Settings:** A dropdown menu is set to 'rs1799945 [Homo sapiens]'. Below it, a checkbox is checked for '1.'.
- Sequence:** ATGACCAGCTGTTTCGTGTTCTATGAT [C/G] ATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCG
- Annotations:** A row of colored buttons for 'MapView', 'VarView', 'PubMed', 'GeneView', 'SeqView', 'Protein 3D', and 'OMIM'.
- Allele Origin:** C-Germline G-Germline
- MAF/MinorAlleleCount:** G=0.085/186
- Clinical Significance:** probable-pathogenic
- HGVS Names:** [NC_000006.11:g.26091179C>G] [NG_001335.1:g.74893C>G] [NG_008720.1:g.8671C>G] [NM_000410.3:c.187C>G] [NM_139003.2:c.187C>G] [NM_139004.2:c.187C>G] [NM_139006.2:c.187C>G] [NM_139007.2:c.77-363C>G] [NM_139008.2:c.77-363C>G] [NM_139009.2:c.118C>G] [NM_139010.2:c.77-1734C>G] [NM_139011.2:c.77-2168C>G] [NP_000401.1:p.His63Asp] [NP_620572.1:p.His63Asp] [NP_620573.1:p.His63Asp] [NP_620575.1:p.His63Asp] [NP_620578.1:p.His40Asp]
- ID:** 1799945

On the right side, there is a 'Send to:' section with a 'Search details' box containing 'rs1799945[All Fields]' and a 'Search' button. Below that is a 'Recent activity' section with 'Turn Off' and 'Clear' buttons, and a message stating 'Your browsing activity is empty.'

Figura 6: Tela de resultado da busca realizada no banco de dados do dbSNP-Short Genetic Variations.

Na pesquisa realizada no programa “nucleotide blast” utilizando a sequência ATGACCAGCTGTTTCGTGTTCTATGAT como consulta foram localizados 129 resultados, sendo 5 sequências humanas e o restante de outros organismos. A sequência escolhida foi a de nº de acesso: NG_008720.1 conforme a Figura 7.

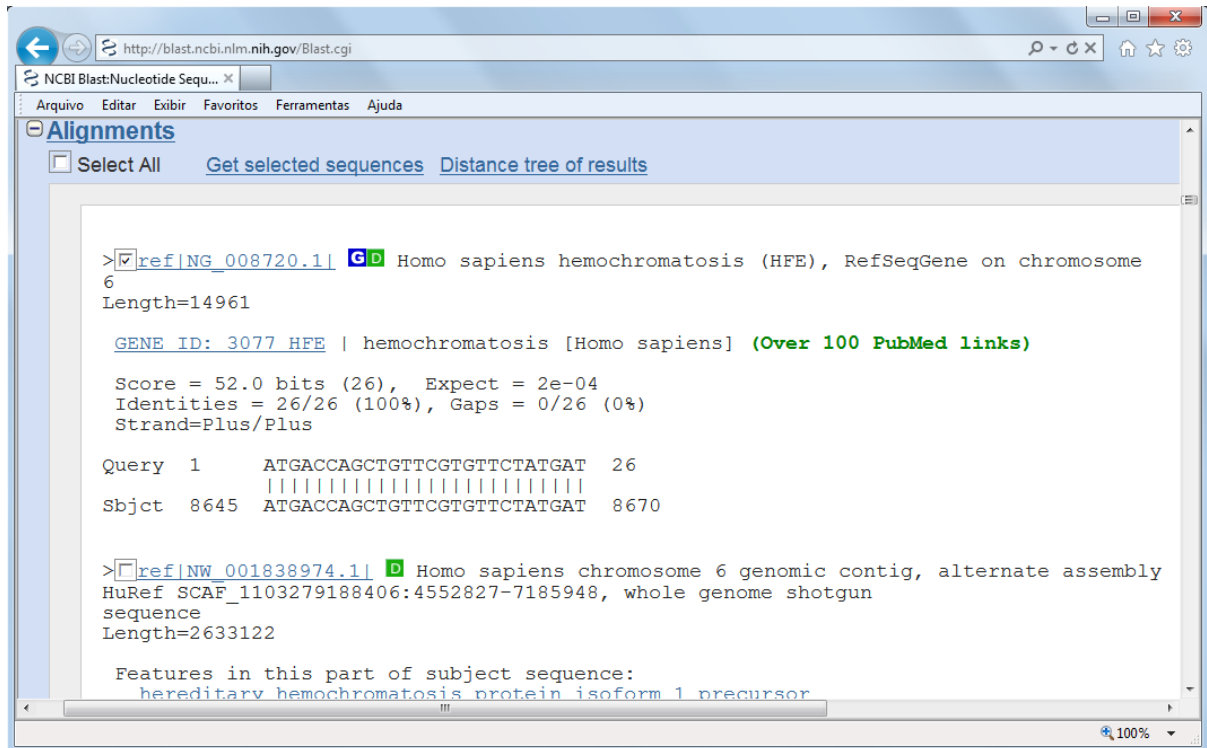


Figura 7: Tela de resultado da busca realizada pela ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool utilizando o programa “nucleotide blast”.

A partir desta sequência obtida foi selecionado um trecho de 500pb em torno das mutações para prosseguir com o desenho experimental do ensaio de PCR 5' Nuclease.

```
CCAGACACAGCTGATGGTATGAGTTGATGCAGGTGTGTGGAGCCTCAACATCCTGCTCCCTCCTACTACACATG
GTTAAGGCCTGTTGCTCTGTCTCCAGGTTACACTCTCTGCACTACCTCTTCATGGGTGCCCTCAGAGCAGGACCT
TGGTCTTTCCCTTGTGTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGTTTCGTGTTCTATGATCATGAGAGTCGCCG
TGTGGAGCCCGAACTCCATGGGTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCAGATGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGTCTGAA
AGGGTGGGATCACATGTTCACTGTTGACTTCTGGACTATTATGGAAAATCACAACCACAGCAAGGGTATGTGGAG
AGGGGGCCTCACCTTCCTGAGGTTGTCAGAGCTTTTTTCATCTTTTCATGCATCTTGAAGGAAACAGCTGGAAGTCT
GAGGTCTTGTGGGAGCAGGGAAGAGGGAAGGAATTTGCTTCTGAGATCA
```

5.2 Pesquisa por outros polimorfismos no banco de dados Ensembl do EMBL que podem estar presentes na região de interesse.

A ferramenta BLAT foi utilizada para localizar a coordenada da sequência de 500pb no genoma humano de referência. O resultado da busca mostrou 100% de identidade entre as sequências de consulta e a sequência encontrada e a coordenada apresentada foi 6:26090968:26091467 (Figura 8).

Figura 8: Tela do resultado de busca realizada pela ferramenta BLAT – BLAST Like Alignment Tool.

Em seguida, a coordenada da sequência de interesse, 6:26090968:26091467, foi inserida na ferramenta de busca “Region Report”. O resultado apresentou 26 variações presentes na sequência consultada. Após a exclusão de entradas ambíguas ainda restaram 18 variações.

Abaixo segue a lista de todas as variações descritas nesta sequência com seus respectivos números identificadores de SNP seguido de sua localização genômica.

Na base de dados do dbSNP, HGVBase e TSC este número identificador do SNP é precedido de 'rs' e na base do HGMD - Human Genomic Mutation Database o número é precedido de "CM" ou "CD".

a) ID: rs2227837	Posição: 26091003-26091003
b) ID: rs142921463	Posição: 26091047-26091047
c) ID: rs2242956	Posição: 26091096-26091096
d) ID: rs28934889	Posição: 26091149-26091149
e) ID: rs147297176	Posição: 26091166-26091166
f) ID: rs111033557	Posição: 26091167-26091167
g) ID: rs1799945	Posição: 26091179-26091179
h) ID: rs147426902	Posição: 26091181-26091181
i) ID: rs1800730	Posição: 26091185-26091185
j) ID: CM033969	Posição: 26091188-26091188
k) ID: rs139523708	Posição: 26091192-26091192
l) ID: CD024541	Posição: 26091195-26091195
m) ID: CM020721	Posição: 26091203-26091203
n) ID: rs62625342	Posição: 26091220-26091220
o) ID: rs28934597	Posição: 26091269-26091269
p) ID: CD042592	Posição: 26091271-26091271
q) ID: rs28934596	Posição: 26091306-26091306
r) ID: rs2071303	Posição: 26091336-26091336

Para visualizar a posição das mutações na anotação genômica do banco de dados Ensembl todos os sítios das variações foram realçadas em verde e as mutações de interesse H63D e S65C foram sublinhadas. As variações alélicas estão representadas de acordo com o código IUPAC para nucleotídeos.

>gj|224514668:26030968-26031467

```
CCAGACACAGCTGATGGTATGAGTTGATGCAGGTG GTGGAGCCTCAACATCCTGCTCCCCTCCTACT
ACACATGGTTARGGCCTGTTGCTCTGTCTCCAGGTTACACTCTCTGCACTACCTCTTCA YGGGTGCC
TCAGAGCAGGACCTTGGTCTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACR TGGATGACCAGCTGTTYR TGT
CTATGAT S Y GAG WGT Y GCC R TG TGGAGCCC Y GAACTCCATGGGTTTC Y AGTAGAATTTCAAGCCAGA
TGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGTCTGAAAS GGTGGGATCACATGTTCACTGTTGACTTCTGGACTAY T
ATGGAAAATCACAACCACAGCAAGGGTAY GTGGAGAGGGGGCCTCACCTTCCTGAGGTTGTCAGAGCT
TTTCATCTTTTCATGCATCTTGAAGGAAACAGCTGGAAGTCTGAGGTCTTGTGGGAGCAGGGAAGAGG
GAAGGAATTTGCTTCCTGAGATCA
```

5.3 Análise dos polimorfismos no banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations e a base de dados do HGMD.

O SNP rs2227837 identifica uma transição T>C na posição 8495, sendo o alelo T selvagem, com frequência 0,636 na população germânica e 0,593 na população

chinesa e o alelo C, mutante, com frequência de 0,364 na população Germânica e 0,407 na população chinesa. A importância clínica deste polimorfismo é desconhecida e ele está localizado na região intrônica do gene *HFE*.

O SNP rs142921463 identifica uma transição A>G na posição 8539, sendo o alelo A selvagem. Não existem estudos de frequência populacional desse polimorfismo. Sua importância clínica é desconhecida e ele está localizado na região intrônica do gene *HFE*.

O SNP rs2242956 identifica uma transição T>C na posição 8588, sendo o alelo T selvagem. Em todas as populações estudadas: hispânicas, asiáticas, europeias, africanas e outras a frequência do alelo T foi 1,0. Sua importância clínica é desconhecida, no entanto esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 35 da proteína HFE com substituição de uma metionina por uma treonina.

O SNP rs28934889 identifica uma transição G>A na posição 8641, sendo o alelo G selvagem, com frequência 1,0 nas populações europeia, africana e asiática e com frequência 0,977 e 0,023, respectivamente para os alelos G e A, na população hispânica. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 53 da proteína HFE com substituição de uma valina por metionina e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP rs147297176 identifica uma transição C>T na posição 8658, sendo o alelo G selvagem, com frequência de 1,0 na população mista estudada. Sua importância clínica é desconhecida e esta alteração causa uma mutação silenciosa no códon para a fenilalanina na posição 58 da proteína HFE.

O SNP rs111033557 identifica uma transição G>A na posição 8659, sendo o alelo G selvagem. Não há estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 59 da proteína HFE com substituição de uma valina por uma metionina e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP rs1799945 identifica uma transição C>G na posição 8671, sendo o alelo C selvagem. A frequência desse polimorfismo varia muito de uma população para outra. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 63 da

proteína HFE com substituição de uma histidina por uma asparagina e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP rs147426902 identifica uma transição T>C na posição 8673, sendo o alelo T selvagem com frequência 0,995 e alelo C frequência 0,005 em uma população mista. Sua importância clínica é desconhecida e esta alteração causa uma mutação silenciosa na histidina na posição 63 da proteína HFE.

O SNP rs1800730 identifica uma transição A>T na posição 8677, sendo o alelo A selvagem. A frequência desse polimorfismo varia muito de uma população para outra. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 65 da proteína HFE com substituição de uma serina por uma cisteína e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP CM033969 identifica uma transição C>T na posição 8680, sendo o alelo C selvagem. Não há estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 66 da proteína HFE com substituição de uma arginina por uma cisteína e está relacionada com a hemocromatose.

O SNP rs139523708 identifica uma transição G>A na posição 8684, sendo o alelo G selvagem, com frequência de 1,0 na população mista estudada. Sua importância clínica é desconhecida, mas esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 67 da proteína HFE com substituição de uma arginina por histidina.

A indel CD024541 identifica uma deleção na posição 8687, sendo o alelo T selvagem. Não há estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação de alteração de fase de leitura e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP CM020721 identifica uma transição C>T na posição 8795, sendo o alelo C selvagem. Não há estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação sem sentido e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP rs62625342 identifica uma transição C>T na posição 8712, sendo o alelo C selvagem, com frequência 1,0 nas populações europeia, africana, americana e hispânicas e com frequência 0,979 e 0,021, respectivamente para os alelos C e T,

na população asiática. Sua importância clínica é desconhecida e esta alteração causa uma mutação silenciosa na serina na posição 76 da proteína HFE.

O SNP rs28934597 identifica uma transversão G>C na posição 8761, sendo o alelo G selvagem. Não existem estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 93 da proteína HFE com substituição de uma glicina por uma arginina e está relacionada com a hemocromatose.

O SNP CD042592 identifica uma deleção na posição 8763, sendo o alelo G selvagem. Não há estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação sem sentido e está relacionada com o fenótipo de hemocromatose.

O SNP rs28934596 identifica uma transição T>C na posição 8798, sendo o alelo T selvagem. Não existem estudos de frequência desse polimorfismo. Esta alteração causa uma mutação de sentido trocado na posição 105 da proteína HFE com substituição de uma arginina por uma histidina e está relacionada com a hemocromatose.

O SNP rs2071303 identifica uma transição A>G na posição 8828, sendo o alelo A selvagem. Diversos estudos de frequência desse polimorfismo foram feitos e a frequência dos alelos variou de 0,692 e 0,308 respectivamente para os alelos A e G na população africana até 0,188 e 0,812, respectivamente para A e G, na população asiática. Este polimorfismo está localizado na região intrônica do gene *HFE* e pode estar associado à hemocromatose.

5.4 Construção das sondas e iniciadores do ensaio 5'Nuclease.

5.4.1 Sondas LNA.

As sondas selecionadas estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Sondas LNA® selecionadas.

Nome	Marcação 5'	Oligonucleotídeos 5'-3'	Marcação 3'	TMDNA	%GC
63N65N	Cy3	TATGAT+ <u>C</u> ATGA+G+ <u>A</u> GTCGCC	BHQ2	67	47

63N65M	Cy5	TATGAT+ <u>C</u> ATGA+G+ <u>I</u> GTCCGCC	BHQ2	67	47
63M65N	JOE	TATGAT+ <u>G</u> ATGA+G+ <u>A</u> GTCCGCC	BHQ1	67	47
63M65M	6FAM	TATGAT+ <u>G</u> ATGA+G+ <u>I</u> GTCCGCC	BHQ1	67	47

De acordo com a ordem das colunas temos os campos: Nome das sondas, Marcação 5' que indica qual o fluoróforo selecionado, Oligonucleotídeo 5'-3' que indica a sequência da sonda, os sítios das mutações H63D e S65C estão sublinhado e a base precedida do sinal + indica a base LNA, Marcação 3' indica qual "quencher" foi selecionado, TMDNA indica a temperatura de melting da sonda quando anelando em sequências de DNA e %GC indica o conteúdo de bases GC em porcentagem.

5.4.2 Iniciadores.

Os iniciadores selecionados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores selecionados.

Nome	Oligonucleotídeos 5'-3'	TMDNA	%GC
HEMO_F	AGCTTTGGGCTACGTG	60	56
HEMO_R	AATTCTACTGGAAACCCATGG	60	43

Nome do iniciador, oligonucleotídeo 5'-3' que indica a sequência do iniciador, TMDNA indica a temperatura de melting do iniciador quando anelando em sequências de DNA e %GC indica o conteúdo de bases GC em porcentagem.

Em seguida, o par de iniciadores foi testado quanto a especificidade no genoma humano e sua força de interação da porção 3' dos iniciadores utilizando a ferramenta MFEprimer-2.0 (Figura 9). O resultado indicou dois sítios de anelamento dos iniciadores no DNA genômico humano.

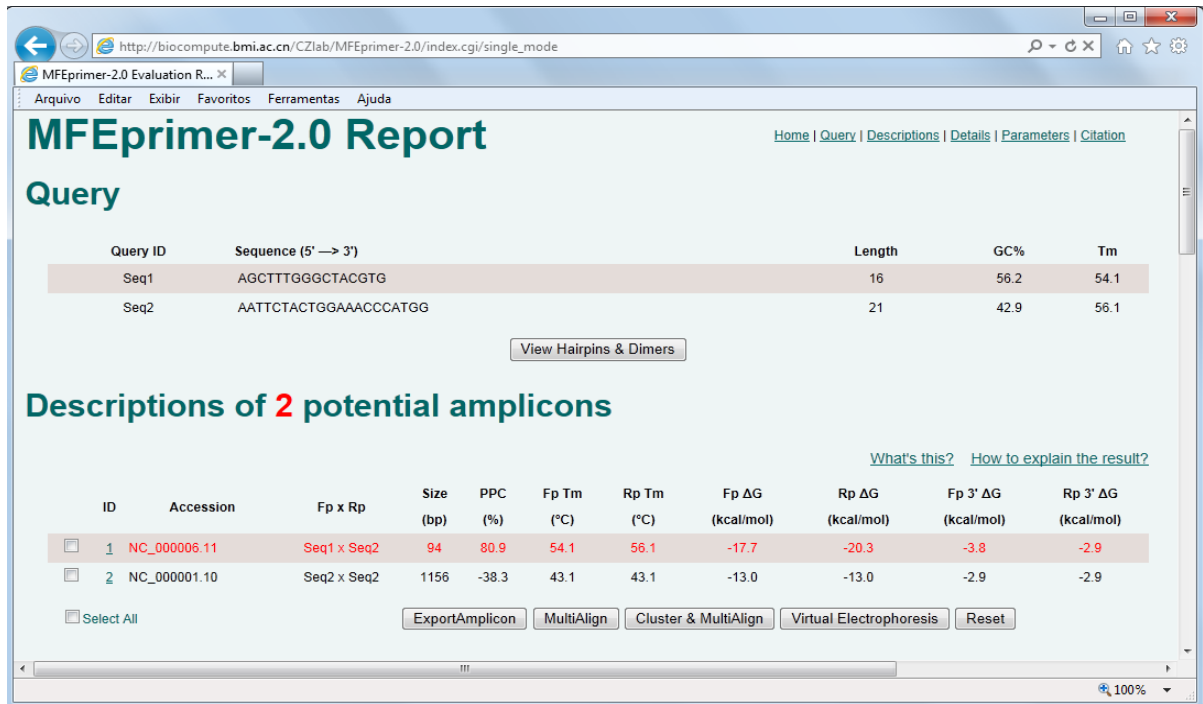


Figura 9: Tela de resultado da busca realizada pela ferramenta MFEprimer – 2.0. Foi observado anelamento em duas seqüências genômicas: NC_000006.11 e NC_000001.10.

O primeiro resultado apresentou um fragmento de 94pb situado no cromossomo 6, com PPC (Pair Primer Coverage – Cobertura do par de iniciadores) de 80,9% e força de interação na porção 3' do iniciador “forward” e “reverse” de -3,8Kcal/mol e -2,9Kcal/mol, respectivamente. A anotação genômica referente ao sítio de interação da seqüência do par de iniciadores segue abaixo:

>Amp_1 Seq1 + Seq2 ==> gi|224589818|ref|NC_000006.11| Homo sapiens chromosome 6, GRCh37.p2 primary reference assembly
 AGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGTTCTGTTCTATGATCATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCC
 GAACTCCATGGGTTTCCAGTAGAATT

O segundo resultado apresentou um fragmento de 1156pb situado no cromossomo 1, com PPC de -38,3% e força de interação na porção 3' do iniciador de -2,9Kcal/mol para ambos os iniciadores. A anotação genômica referente ao sítio de interação da seqüência do par de iniciadores segue abaixo:

>Amp_2 Seq2 + Seq2 ==> gi|224589800|ref|NC_000001.10| Homo sapiens chromosome 1, GRCh37.p2 primary reference assembly
 aattctacTGGAAACCCATGGcctgtaagaagagcctcacactccttctgttctaggttataataaaac
 gttcaaaattagaggagaacccttagctgcccagccacctgtgataacagtttctttgggtaaactgt
 atcatatataatataatatacatatatacatatataatagatatacatatataatatacatatata
 atgcacatacacacatactttaagatacaggcttgctttatggtatataataggttaattcagagtc
 aataaaatagaatattggtaaaaactcccattagagaaatggtgaacattccagactcctgggtggaa
 acctagttccctattaagacattgctcctactgaaaatttgaccgaactgagtttctatcattttctt

ctggaaagcatgcagcaagctcaaatacaaggaccacctgcgctaacagtgctgtactgccgatccac
catgatccccacgaaagggcagtcacagttacaatctgtggtgtcagccataaacaggccccctccc
catctaggaacactgatataaaaattctaattgtgcattttcttgtttcttctcctacaatcatcaactcat
ttatgaatctctgtaataagtgtcgggaagtcaagatgggttgaaagacaatacctttcctccaagtg
tttgcctctagtaagtcaaaatgggcacacacatagaaataactgtcataggcaataaatgacacat
attgtataaatggaataggcgaatgagtcaggaacttagagaagatatcacagggttgaggtaattgaa
gacgacatgataaagaagataggggtgtaggggcagggcatgaaggagttgcaggaattgaactatta
gggaaaaggagatattctcaatttgtccctctacccctctggccaaatatgtaacatataaatacacca
aacaccttcgagatcaggcaccatcccttggtgcccgtagtaacaacaagctgggtcaccttcagtg
acgtttcacccaaagaaactgttatcacaggtggctgggcagctaggggttctcctctaattttgaac
gttttattataacctagAACAGAGAGTGTGAGGCTCTTCTTACAGGCCATGGGTTTCCAGtagaatt

5.4.3 Verificação de formação de dímeros e estruturas secundárias nos oligonucleotídeos:

A ferramenta LNA™ Oligo Optimizer encontrou 21 hibridizações entre homodímeros e heterodímeros e 6 estruturas secundárias nos oligonucleotídeos testados. As interações com suas respectivas pontuações (scores) estão mostrados na Figura 10.

Hybridization			Secondary Structure	
Name	Score	Score	Score	Info
63N65M - 63N65M	30	T A T G A T C A T G .: : . : : . : : . G T A C T A G T A T	14	63N65M: T A T G A T C A T G A G T G T C G C C (((())))
63N65M - 63M65N	30	T A T G A T C A T G .: : . : : . : : . G T A C T A G T A T	0	
63M65N - 63M65N	30	T A T G A T C A T G .: : . : : . : : . G T A C T A G T A T	14	63M65N: T A T G A T C A T G A G A G T C G C C (((())))
63N65M - HEMO_R	27	T C A T G A G T G T C .: : . : : . : : . G G T A C C C A A A G	0	
HEMO_F - HEMO_F	27	A G C T T T G G G C T .: : : : : . T C G G G T T T C G A	14	HEMO_F: A G C T T T G G G C T A C G T G (((. .)))
HEMO_R - HEMO_R	27	T T C T A C T G G A A .: : . : : . : : : . A A G G T C A T C T T	14	HEMO_R: A A T T C T A C T G G A A A C C C A T G G (((())))
HEMO_F - HEMO_R	23	C T T T G G G C T A C .: : . : : . : : : . G G T A C C C A A A G	0	
63N65N - 63N65M	22	T A T G A T G A T G .: : . : : . : : . G T A C T A G T A T	0	
63N65N - 63M65N	22	T A T G A T G A T G .: : . : : . : : . G T A C T A G T A T	0	
63N65N - HEMO_F	22	G T G T C G C C .: : . : : . : : . T G C A T C G G	0	
63N65M - 63M65M	22	T A T G A T C A T G .: : . : : . : : . G T A G T A G T A T	0	
63N65M - HEMO_F	22	G T G T C G C C .: : . : : . : : . T G C A T C G G	0	
63M65N - 63M65M	22	T A T G A T C A T G .: : . : : . : : . G T A G T A G T A T	0	
63M65N - HEMO_R	22	T C A T G A G A G T C .: : . : : . : : : . G G T A C C C A A A G	0	
63N65N - 63N65N	21	G A T G A T G A G T G T C G C C .: : : : : . C C G C T G T G A G T A G T A G	12	63N65N: T A T G A T G A T G A G T G T C G C C (. (()) .)
63N65N - HEMO_R	21	A T G A G T G T C .: : . : : . : : . T A C C C A A A G	0	
63M65N - HEMO_F	20	G T C G C C .: : . : : . : : . C A T C G G	0	
63M65M - HEMO_F	20	G T C G C C .: : . : : . : : . C A T C G G	0	
63N65N - 63M65M	19	G A T G A G T G T C G C C .: : . : : . : : : . C C G C T G A G A G T A G	0	
63M65M - 63M65M	17	G A G A G T C G C .: : . : : . : : . C G C T G A G A G	12	63M65M: T A T G A T G A T G A G A G T C G C C (. (()) .)
63M65M - HEMO_R	16	A T G A G A G T C .: : . : : . : : . T A C C C A A A G	0	

Figura 10: Tela de resultados da busca realizada pela ferramenta LNA™ Oligo Optimizer. Do lado esquerdo as hibridizações observadas e a esquerda as estruturas secundárias e seus respectivas pontuações (scores)

5.5 Construção de controle positivo sintético H63D mutante e S65C mutante.

5.5.1 Síntese do gene sintético.

O mapa do plasmídio contendo o gene sintético com as duas mutações H63D e S65C é apresentado na Figura 11.

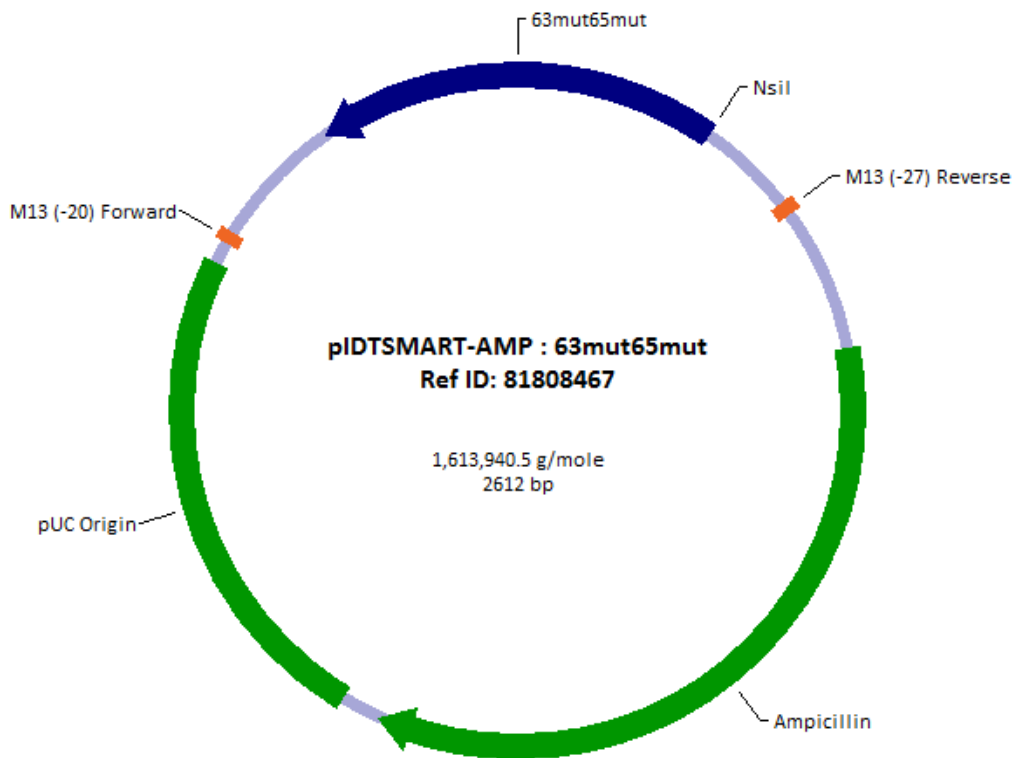


Figura 11: Mapa do plasmídio pIDTSMART-AMP: 63mut65mut. Em azul a sequência do gene sintético, em laranja sítios de anelamento para os iniciadores de amplificação do bacteriófago M13 e em verde o vetor contendo o gene de resistência a ampicilina e uma porção do plasmídio de origem pUC.

A sequência do gene sintético foi confirmada através do sequenciamento do plasmídio e é apresentada na cor azul na Figura 12.

Gene Synthesis Specification Sheet



Sales Nbr: 7308228

Ref ID: 81808467

Gene Name: pIDTSMART-AMP : 63mut65mut

Gene Size: 506 bp

Plasmid Weight: 1,613,940.5 g/mole

Sequence Detail

```

00001 CCGCTGTAAA ACGACGGCCA GTTTATCTAG TCAGCTTGAT TCTAGCTGAT CGTGGACCGG AAGGTGAGCC AGTGAGTTGA
00081 TTGCAGTCCA GTTACGCTGG AGTCTGAGGC TCGTCTGAA TGATATGCGA CCGCCGGAGG GTTGGGTTTG AGACGGGGCA
00161 CAGATCCAGT CGCGCTGCTC TCGTCTGATC TGATCTCAGG AAGCAAATTC CTTCCCTCTT CCTGCTCCCC ACBAGACCTC
00241 AGACTTCCAG CTGTTTCCTT CAAGATGCAT GAAAAGATGA AAAGCTCTGA CCACTCAGG AAGGTGAGCC CCGCTCTCCA
00321 CATACCCTTG CTGTGGTTGT GATTTTCCAT AATAGTCCAG AAGTCAACAG TGAACATGTG ATCCCACCTT TTCAGACTCT
00401 GACTCAGCTG CAGCCACATC TGGCTTGAAA TTCTACTGGA AACCCATGGA GTTCGGGGCT CCACACGGCG ACACCTCATCA
00481 TCATAGAACG CGAACAGCTG GTCATCCACG TAGCCCAAAG CTTCAAACAA GGAAAGACCA AGGTCTCTGT CTGAGGCACC
00561 CATGAAGAGG TAGTGCAGAG AGTGTGAACC TGGAGACAGA GCAACAGGCC TTAACCATGT GTAGTAGGAG GGGAGCAGGA
00641 TGTTGAGGCT CCACACACCT GCATCAACTC ATACCATCAG CTGTGTCTGG ATGCATGGTG CGAGCGGATC GAGCAGTGTC
00721 GATCAGTTCT GGACGAGCGA GCTGTCTGTC CTTACGGCAT TATACGTATG ATCCGTCCAC GATCAGCTAG
00801 ATTATCTAGT CAGCTTGATG TCATAGCTGT TTCTGAGGCC TCAATACTGA CCATTTAAAT CATACCTGAC CTCCATAGCA
00881 GAAAGTCAAA AGCCTCCGAC CGGAGGCTTT TGACTTGATC GGCACGTAAG AGGTTCCAAC TTTCAACATA ATGAAATAAG
00961 ATCACTACCG GCGGTATTTT TTGAGTTATC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAATAA GAGTATTCAA CATTCCGCTG
01041 TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT CCGGCATTTT GCGTCTCTGT TTTTGTCTAC CCAGAAACCG TGGTGAAGT AAAAGATGCT
01121 GAAGATCAGT TGGGTGCAAG AGTGGGTTAC ATCGAAGTGG ATCTCAACAG CGTAAAGATC CTTGAGGATT TACGCCCGGA
01201 AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTCTGCTA TGTGGGCGGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC
01281 AACTCGGTGG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCCACG AAAAGCATCT CACGGATGGC
01361 ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGTCTGC ATAACCATGA GTGATAACAC TGGGGCCAAAC TTACTTCTGG CAACGATCCG
01441 AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCCTGA TCGTGGGAAA CCGGAGCTGA
01521 ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCAAGATGCC TGTAGCAATG GCAACAAAGT TCGCCAAACT ATTAAGTGGC
01601 GAACTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATGACT GATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGATCAC TTCTGGCTC
01681 GGCCTCCCGG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCGGGTGGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG
01761 GGCAGATGG TAAGCCCTCC CGCATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG
01841 ATGCTGAGA TAGGTGCCCT ACTGATTAAG CATTGGTAAT GAGGGGCCAA ATGTAATCAC CTGGCTCACC TTGGGTGGG
01921 CCTTTCTTGA GGACCTAATA GTAATCACCT GGCTCACCTT CGGGTGGGCC TTTCTGGGTT GCTGGCGTTT TTCATAGGC
02001 TCCGCCCCCG TGACGAGCAT CACAAAATC GATGCTCAAG TCAGAGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG
02081 GCGTTTCCCG CTGGAAGCTC CCTCGTGGC TCTCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTCTCCG
02161 TTCGGGAAGC GTGGCGCTT CTCTAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGT CCGGTGTAGT CCGTCTCCG AAGCTGGGCT
02241 GTGTGCACGA ACCCCCGGTT CAGCCCGACC GCTGGCGCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAAACC GGTAAAGACAC
02321 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCCAG GTATGTAGGC GTTGCTACAG AGTCTTGA
02401 GTGTGGGCT AACTAGGCT AACTAGAG AACAGTATT GGTATCTCG CTCTGCTGAA GCGGTTACC TCGGAAAAG
02481 AGTTGGTAGC TCTTGATCG GCAAAACAA CACCGCTGGT AGCGGTGGT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGGCGA
02561 GAAAARAGG ATCTCAAGAA GATCCTTGA TTTCTACCG AAGAAAGGCC CA

```

Only the synthesized DNA fragment (in blue) has been sequence verified and IDT does not guarantee the correctness of the vector sequence.

Figura 12: Detalhes da sequência obtida através do sequenciamento do plasmídeo pIDTSMART-AMP:63mut65mut. Em azul a sequência do gene sintético, em laranja sítios de anelamento para os iniciadores de amplificação do bacteriófago M13 e em verde o vetor contendo o gene de resistência a ampicilina e uma porção do plasmídeo de origem pUC.

5.5.2 Desenho do gene sintético.

Entre os iniciadores retornados, os iniciadores selecionados para amplificar a região flanqueadora da sequência contendo a região do ensaio PCR 5' Nuclease estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores selecionados para amplificar a região externa da sequência contendo a região do ensaio PCR 5' Nuclease.

Nome	Oligonucleotídeos 5'-3'	TMDNA	%GC
HEMO_EXT_F	TGAGTTGATGCAGGTGTGTGG	65	52
HEMO_EXT_R	AATTCCTTCCCTCTTCCCTGC	64	52

Na ordem das colunas: Nome do iniciador, oligonucleotídeo 5'-3' que indica a sequência do iniciador, TMDNA que indica a temperatura de melting do iniciador quando anelando em sequências de DNA e %GC que indica o conteúdo de bases GC em porcentagem.

Em seguida a força de interação da ligação 3' dos iniciadores foi avaliada com a ferramenta MFEprimer-2.0. A força de interação da porção 3' dos iniciadores "forward" e "reverse" foram respectivamente, -3,4Kcal/mol e -4,1Kcal/mol.

Nenhuma estrutura secundária foi observada neste par de iniciadores utilizando a ferramenta LNA™ Oligo Optimizer.

5.6 Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real para as mutações H63D e S65C do gene da Hemocromatose.

Foram realizadas matrizes para testar as concentrações dos iniciadores juntamente com testes de temperatura. As condições da reação de PCR 5' Nuclease e ciclagem de temperatura nas quais o ensaio foi padronizado foram as seguintes: Os iniciadores HEMO_F e HEMO_R e as quatro sondas 63N65N, 63N65M, 63M65N e 63M65M foram adicionadas ao tampão 2x *TaqMan® genotyping PCR Master Mix* (LifeTechnologies™) nas concentrações finais respectivamente de 0,9mM e 0,35mM. A linearidade dos resultados foi obtida com a concentração final de DNA variando entre 5ng a 50ng e volume final da reação foi 25µl. As condições de temperatura foram as seguintes: 60°C por 1 minuto, desnaturação a 95°C por 10 minutos, 50 ciclos em dois passos a 95°C por 15 segundos e 63°C por 2 minutos e extensão final a 60°C por 1 minuto.

5.6.1 Critérios de determinação de resultados

Para cada paciente somente pode ser observada a presença de no máximo dois sinais que identificam os haplótipos presentes em cada cromossomo. Para os resultados serem aceitos como válidos, estabelecemos um ponto de corte para cada sinal em relação ao Ct. Para os sinais 63M65M, 63N65M e 63M65N (Figura 13 A, B e C respectivamente) foram estabelecidos dois critérios: o Ct menor ou igual a 31 e formação de platô bem definido. Caso apenas um desses critérios tenha sido atendido o exame deve ser repetido.

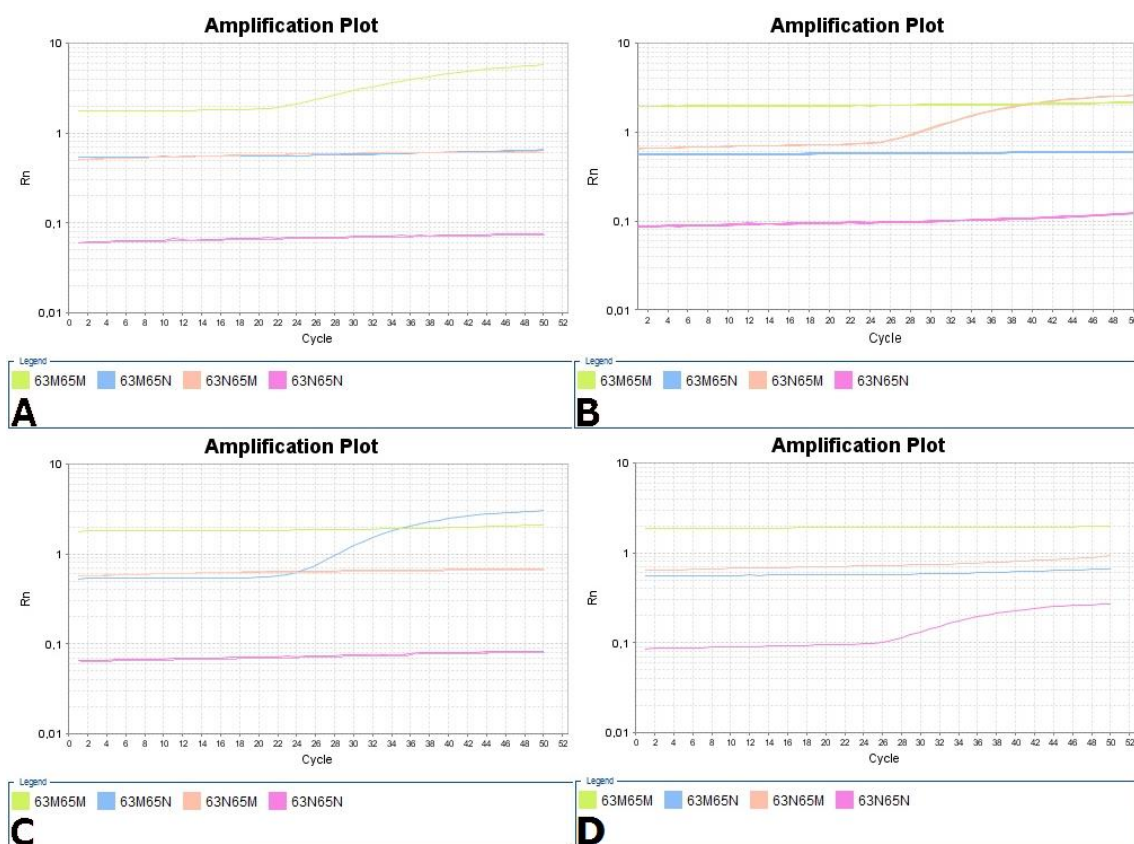


Figura 13: Resultado dos sinais 63M65M, 63N65M, 63M65N e 63N65N para os haplótipos 6365 DC/DC, 6365 HC/HC, 6365 DS/DS e 6365 HS/HS respectivamente.

Para o sinal 63N65N também foram definidos os critérios de Ct menor ou igual a 31 com formação de platô. Entretanto, devido ao fato deste sinal apresentar a menor intensidade entre os 4 fluoróforos (Figura 14), a formação de platô deve ser confirmada através da verificação da ascendência do sinal no gráfico $\Delta Rn \times$ Ciclos. O sinal positivo apresenta ascendência (Figura 15-C) enquanto um sinal negativo ou falso-positivo não apresenta esta ascendência (Figura 15-D). Além desses dois

critérios, acrescentamos a elevação do sinal na escala logaritmo acima de $0,2\log$ para sinais positivos. A amostra deve ser repetida caso apenas um ou dois dos três critérios sejam atendidos.



Figura 14: Comparação da intensidade de fluorescência dos cinco fluoróforos. FAM fluoróforo do sinal 63M65M, CY5 fluoróforo do sinal 63N65M, JOE fluoróforo do sinal 63M65N, CY3 fluoróforo do sinal 63N65N e ROX fluoróforo do sinal passivo.

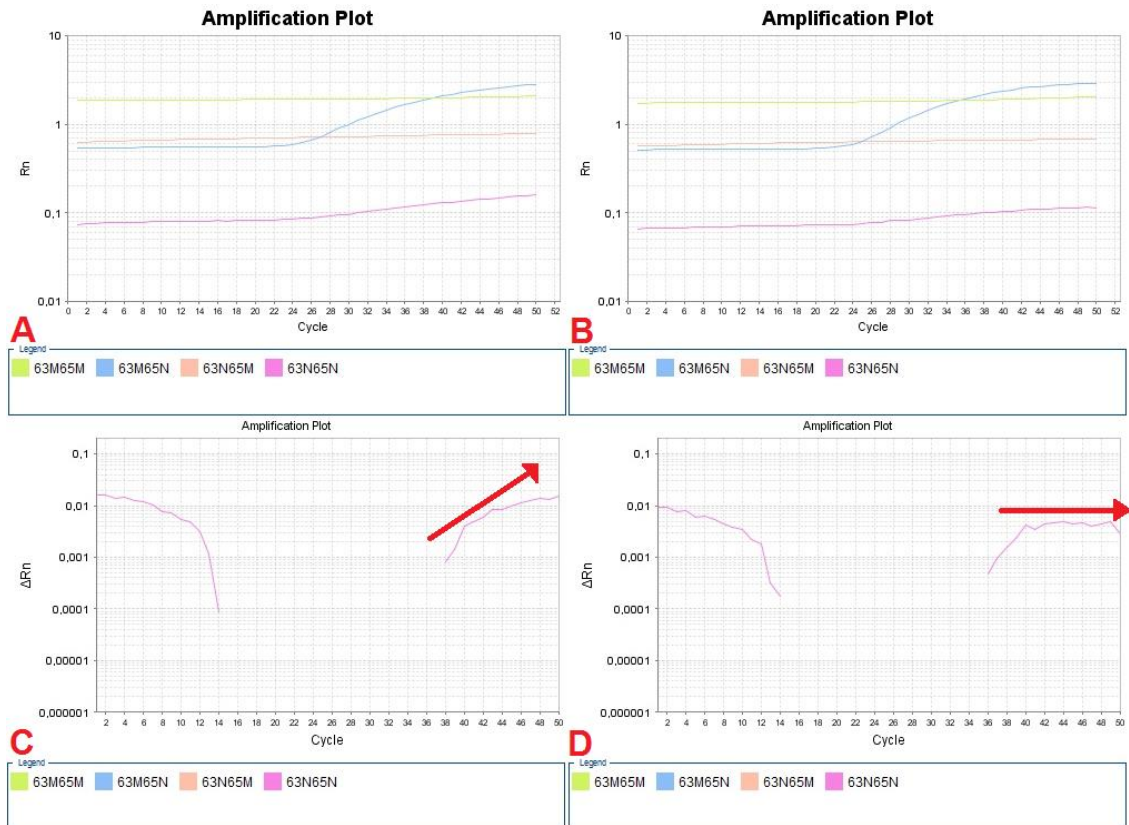


Figura 15: Diferenciação de um sinal 63N65N positivo e negativo. A e C amostra de paciente com sinal positivo evidenciado apenas no gráfico através do gráfico ΔRn x Ciclos pelo crescimento exponencial indicado pela seta. B e D amostra de paciente com sinal negativo evidenciado pela ausência de crescimento exponencial. Em A e B pode-se observar que a interpretação da formação de platô dos sinais pode ser confundida quando o sinal é visualizado apenas através do gráfico Rn x Ciclos.

5.7 Avaliação do desempenho analítico.

5.7.1 Avaliação da seletividade dos iniciadores.

Nenhuma banda inespecífica foi observada em todas as condições de temperatura de anelamento testadas. A especificidade do ensaio foi comprovada pela amplificação apenas da banda esperada de aproximadamente 94pb (Figura 16).



Figura 16: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados do teste de seletividade dos iniciadores em diversas temperaturas de anelamento (58 – 62°C). Primeira e última canaletas – padrão de peso molecular 10pb (Life Technologies™). Canaletas 1 e 2 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 58°C . Canaletas 3 e 4 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 59°C. Canaletas 5 e 6 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 60°C. Canaletas 7 e 8 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 61°C de anelamento. Canaletas 9 – Produto de PCR amplificado com temperatura de anelamento de 62°C e canaletas 10 – branco de reação.

5.7.2 Avaliação de interferentes no resultado

Foram avaliadas amostras com leitura de absorvância indicativa de contaminação, sendo 50 amostras com indicação de contaminação por RNA com leitura de absorvância da relação A260/A280 variando de 2,0 a 3,0 OD e 50 amostras com indicação de contaminação por sal e moléculas orgânicas com leitura de absorvância da relação A260/A230 variando de 0,12 a 1,48 OD. Todas as amostras cumpriram os critérios de determinação de resultados e foram corretamente genotipadas.

5.7.3 Limite de detecção utilizando amostras clínicas portando os principais genótipos

Os valores de Ct observados nas 12 réplicas, para cada sinal positivo, em todas as concentrações e amostras testadas não apresentaram coeficiente de variação superior a 25% que é considerado uma variação baixa. Portanto, esta característica não foi utilizada na definição do limite de detecção.

Com relação a genotipagem correta das mutações, apenas nas concentrações de 0,5ng e 1,0ng de DNA os critérios de determinação de resultados não foram 100% atendidos. O sinal 63N65N apresentou inespecificidade em 3 amostras de pacientes com o haplótipo 6365 HS/DC e, portanto, o limite de detecção foi estabelecido em 5ng de DNA genômico. A partir dessa concentração de DNA, obtivemos 100% de concordância com as amostras previamente genotipadas, incluindo a amostra sintética 6365 DC/DC (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado de 12 réplicas de indivíduos com os haplótipos mais frequentes, 6365 HS/HS, 6365 HS/DS, 6365 DS/DS, 6365 HS/HC, 6365 HS/DC, 6365 HC/HC e o controle sintético 6365 DC/DC.

Haplótipo	signal	Concentração de DNA (ng)	Média Ct	Desvio Padrão	Coefficiente de variação	Concordância com o resultado
63Mut65Mut	63M65M	50	13,00	0,00	0,00	100%
		10	15,00	0,00	0,00	100%
		5	17,00	0,00	0,00	100%
		1	19,00	0,00	0,00	100%
		0,5	20,00	0,00	0,00	100%
63Het65Het	63M65N	50	23,17	0,39	1,68	100%
		10	26,00	0,00	0,00	100%
		5	26,00	0,00	0,00	100%
		1	29,00	0,00	0,00	83,33%
		0,5	30,00	0,00	0,00	91,66%
	63N65M	50	24,00	0,00	0,00	100%
		10	26,00	0,00	0,00	100%
		5	26,42	0,67	2,53	100%
		1	29,92	0,29	0,96	83,33%
		0,5	30,00	0,00	0,00	91,66%
63Neg65Neg	63N65N	50	27,00	0,00	0,00	100%
		10	28,33	0,65	2,30	100%
		5	29,92	0,29	0,96	100%
		1	30,83	0,39	1,26	100%
		0,5	31,33	0,49	1,57	100%
63Het65Neg	63M65N	50	26,00	0,00	0,00	100%
		10	28,00	0,00	0,00	100%
		5	28,00	0,00	0,00	100%
		1	31,00	0,00	0,00	100%
		0,5	32,00	0,00	0,00	100%
63Neg65Het	63N65N	50	28,00	0,00	0,00	100%
		10	29,67	0,49	1,66	100%
		5	30,33	0,49	1,62	100%
		1	32,17	1,11	3,47	100%
		0,5	33,75	0,62	1,84	100%
	63N65M	50	26,00	0,00	0,00	100%
		10	28,08	0,29	1,03	100%
		5	30,00	0,00	0,00	100%
		1	31,83	0,58	1,81	100%
		0,5	33,00	0,00	0,00	100%
63Mut65Neg	63M65N	50	23,00	0,00	0,00	100%
		10	25,00	0,00	0,00	100%
		5	27,00	0,00	0,00	100%
		1	30,00	0,00	0,00	100%
		0,5	31,91	0,30	0,94	100%
63Neg65Mut	63N65M	50	25,00	0,00	0,00	100%
		10	29,00	0,00	0,00	100%
		5	30,00	0,00	0,00	100%
		1	32,00	0,00	0,00	100%
		0,5	34,00	0,00	0,00	100%

5.7.4 Reprodutibilidade

Considerando as avaliações realizadas pelos três observadores, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa em todas as avaliações de concordância testadas. Todos os haplótipos foram igualmente identificados por todos os observadores (

Tabela 5).

Tabela 5: Relação de concordância de haplótipos entre observadores.

Observador	Haplótipos							Total
	6365 HS/HS	6365 DS/DS	6365 HS/DS	6365 HC/DS	6365 HS/HC	6365 HS/DC	Branco	
1	16	1	9	1	1	1	1	30
2	16	1	9	1	1	1	1	30
3	16	1	9	1	1	1	1	30

Uma perfeita concordância foi observada para todas as categorias (haplótipos e branco) testadas pela estatística Kappa. Os valores de p e os intervalos de confiança de 95% do Kappa para cada categoria estão apresentados na Figura 17.

	Cat. 1 6365 HS/HS	Cat. 2 6365 DS/DS	Cat. 3 6365 HS/DS	Cat. 4 6365 HC/DS	Cat. 5 6365 HS/HC	Cat. 6 6365 HS/DC	Cat. 7 Branco
Kappa da categoria	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P-valor do Kappa da categoria	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa da categoria	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793

Figura 17: O índice Kappa de concordância entre observadores calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa.

O valor para a concordância Kappa geral também foi perfeita considerando o ensaio de forma geral. A estatística do teste mostrou que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os observadores para o ensaio e o intervalo de confiança de 95% do índice Kappa geral teve resultado entre 0,864- 1,0.

5.7.5 Precisão

Não houve diferença estatisticamente significativa intra operador. Todos os resultados foram concordantes mesmo sendo interpretados em dias diferentes.

Uma perfeita concordância foi observada para todas as categorias (haplótipos e branco) testadas pela estatística Kappa. Os valores de p e os intervalos de confiança de 95% do Kappa para cada categoria estão apresentados na Figura 18.

	Cat. 1 6365 HS/HS	Cat. 2 6365 DS/DS	Cat. 3 6365 HS/DS	Cat. 4 6365 HC/DS	Cat. 5 6365 HS/HC	Cat. 6 6365 HS/DC	Cat. 7 Branco
Kappa da categoria	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P-valor do Kappa da categoria	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa da categoria	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793	sup: 1.0 inf: 0.793

Figura 18: O índice Kappa de concordância intra observador calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa.

O índice Kappa de concordância geral intra observador para o ensaio foi perfeita (1,0), o teste da estatística mostrou que as análises para a determinação dos haplótipos foram estatisticamente equivalentes ($p < 0,001$) e o intervalo de confiança do Kappa geral ficou entre 0,864- 1,0.

5.7.6 Acurácia do ensaio genético e taxa de falsos resultados

A concordância da capacidade da Técnica 5' Nuclease em identificar os genótipos das mutações H63D e S65C do gene *HFE* da Hemocromatose com a técnica RFLP (Teste referência) foi 100% considerando individualmente todos os haplótipos testados e a taxa de falsos resultados foi 0% (Tabela 6 e 7). A concordância completa se deu tanto no ensaio com 76 amostras de pacientes representando duas rotinas habituais quanto no ensaio com 153 amostras com novos pacientes escolhidos para representarem os haplótipos raros e amostras sintéticas representando os haplótipos raríssimos.

Tabela 6: Tabela de contingência RFLP versus 5'Nuclease de 76 amostras de pacientes.

		Técnica RFLP H63D e S65C					Total
		6365 HS/HS	6365 DS/DS	6365 HS/DS	6365 HC/DS	6365 HS/HC	
5' Nuclease	6365 HS/HS	46	0	0	0	0	46
	6365 DS/DS	0	2	0	0	0	2
	6365 HS/DS	0	0	25	0	0	25
	6365 HC/DS	0	0	0	2	0	2
	6365 HS/HC	0	0	0	0	1	1
Total		46	2	25	2	1	76

Tabela 7: Tabela de contingência RFLP versus 5'Nuclease de 153 amostras de pacientes mais amostras sintéticas.

		Técnica RFLP H63D e S65C								Total	
		6365 HS/HS	6365 DS/DS	6365 HS/DS	6365 HC/DS	6365 HS/HC	6365 HC/HC	6365 DS/DC	6365 HC/DC		6365 DC/DC
5' Nuclease	6365 HS/HS	90	0	0	0	0	0	0	0	0	90
	6365 DS/DS	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6
	6365 HS/DS	0	0	39	0	0	0	0	0	0	39
	6365 HC/DS	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
	6365 HS/HC	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6
	6365 HC/HC	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	6365 DS/DC	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
	6365 HC/DC	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	6365 DC/DC	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	Total		90	6	39	5	6	1	2	2	2

O índice Kappa de concordância para cada categoria (Haplótipo), valor p e intervalo de confiança de 95% está mostrado na Figura 19 e Figura 20.

	Cat. 1 6365 HS/HS	Cat. 2 6365 DS/DS	Cat. 3 6365 HS/DS	Cat. 4 6365 HC/DS	Cat. 5 6365 HS/HC
Kappa da categoria	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P-valor do Kappa da categoria	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa da categoria	sup: 1.0 inf: 0.775	sup: 1.0 inf: 0.775	sup: 1.0 inf: 0.775	sup: 1.0 inf: 0.775	sup: 1.0 inf: 0.775

Figura 19: O índice Kappa de concordância entre as técnicas RFLP versus 5'Nuclease calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa de 76 amostras de pacientes.

	Cat. 1 6365 HS/HS	Cat. 2 6365 DS/DS	Cat. 3 6365 HS/DS	Cat. 4 6365 HC/DS	Cat. 5 6365 HS/HC	Cat. 6 6365 HC/HC	Cat. 7 6365 DS/DC	Cat. 8 6365 HC/DC	Cat. 9 6365 DC/DC
Kappa da categoria	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P-valor do Kappa da categoria	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa da categoria	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842	sup: 1.0 inf: 0.842

Figura 20: O índice Kappa de concordância entre as técnicas RFLP versus 5'Nuclease calculado para cada categoria, juntamente com o valor-p e o intervalo de confiança de 95% do Kappa de 153 amostras de pacientes mais amostras sintéticas.

Considerando o ensaio como um todo, a concordância Kappa geral foi perfeita, o teste da estatística revelou que não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelas técnicas no ensaio com 76 amostras e no ensaio com 153 amostras de pacientes mais amostras sintéticas, e o intervalo de confiança de 95% do Kappa geral foi 0,814 a 1,0 e 0,896 a 1,0 respectivamente.

6. DISCUSSÃO

6.1 Obtenção da sequência genética do gene *HFE* (região flanqueadora das mutações H63D e S65C).

O banco de dados do OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man® foi utilizado por se tratar de um catálogo constantemente atualizado de genes e desordens genéticas humanas com o específico interesse na relação entre variações genéticas e expressão fenotípica¹⁶. O catálogo apresenta informações úteis a respeito do gene como a nomenclatura, a estrutura do gene, sua função, principais mutações e diversas outras informações. Portanto através de seu sistema de busca, encontramos os números de identificação de SNP dos polimorfismos de interesse. Através desse número, utilizamos o banco de dados dbSNP-Short Genetic Variations¹⁷ para ter acesso à sequência flanqueadora do polimorfismo para utilizá-la como a sequência de consulta, visando a obtenção da sequência completa, através da ferramenta BLAST.

O BLAST é uma ferramenta usada para buscar sequências em uma base de dados usando um algoritmo que otimiza alinhamentos¹⁸. O banco de dados do RefSeq foi escolhido devido ao fato de se tratar de um banco tratado, onde somente as sequências bem pontuadas e sem redundância são incluídas¹⁹. Como no resultado deste banco de dados apareceram 5 sequências humanas, o critério de escolha foi baseado na descrição da sequência. A sequência de Nº de acesso NG_008720.1 é denominada a sequência referência no banco de dados do RefSeq. Além disso, teve 100% de identidade na comparação com a sequência de consulta.

Como a sequência completa contém 14961 nucleotídeos, para facilitar a construção do ensaio molecular no tratamento da sequência, reduzimos sua extensão para 500 nucleotídeos em torno das mutações alvo.

6.2 Pesquisa por outros polimorfismos no banco de dados Ensembl do EMBL que podem estar presentes na região de interesse.

Para procurar por polimorfismos nesta sequência que pudessem comprometer o desenho do ensaio, a sequência alvo de 500pb foi localizada no banco de dados do projeto Ensembl do EMBL (European Molecular Biology Laboratory)²⁰. O banco de dados do projeto Ensembl foi escolhido por conter informações genômicas de diversas espécies, especialmente a humana e principalmente por ter uma base de dados dedicada às variações genéticas que são derivadas do dbSNP, DGVA-Database of Genomic Variants archive e outras fontes²¹. Portanto, teríamos uma informação mais completa acerca das variações presentes na sequência alvo.

A ferramenta BLAT foi utilizada, pois ela funciona como a ferramenta BLAST de alinhamento de sequências de proteína, RNAm/DNA que rapidamente busca sequências com comprimento maior que 40 bases e similaridade superior a 95%. Além disso, ela fornece a coordenada da sequência²² que era necessária para a ferramenta de busca das variações genômicas da sequência alvo de 500pb.

As redundâncias no resultado da busca utilizando a ferramenta “Region Report” foram retiradas e foram apresentadas na anotação genômica >gj|224514668:26030968-26031467 utilizando o código IUPAC para que tivéssemos uma visão panorâmica de todas as variações.

6.3 Análise dos polimorfismos no banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations e a base de dados do HGMD.

Em nosso estudo buscamos discriminar dois polimorfismos simultaneamente utilizando uma única sonda. Entretanto, é importante ter em mente que além dos polimorfismos H63D (rs1799945) e S65C (rs1800730), outros polimorfismos que estejam presentes na região de interesse podem interferir na construção das sondas e iniciadores. Portanto, algumas informações pertinentes a respeito dos polimorfismos do gene *HFE* foram pesquisadas nos banco de dados do dbSNP Short Genetic Variations²³ e na base de dados do HGMD® Professional 2012.1²⁴. As

informações levantadas nos bancos de dados foram reunidas e apresentadas, sendo que, quando havia discrepâncias entre os diferentes bancos, a informação obtida no banco HGMD foi escolhida por se tratar de uma base de dados atualizada mais recentemente^{23, 24}. As informações coletadas foram: Posição na sequência referência NG_008720.1, variação alélica, alelo selvagem, frequência dos alelos, população onde o polimorfismo foi encontrado, importância clínica e contexto na sequência. Estas informações foram escolhidas devido aos seguintes fatores: 1) A posição do polimorfismo na sequência referência NG_008720.1 é importante para verificar sua localização e avaliar a proximidade em relação aos polimorfismos alvos do presente estudo. 2) A variação alélica e o alelo selvagem foram levantados para conhecer a natureza da alteração desses polimorfismos. 3) A frequência dos alelos e a população onde o polimorfismo foi encontrado são importantes para se verificar se são variações comuns e se já foram descritos em nossa população. 4) O contexto da sequência e importância clínica foram levantados com o objetivo de conhecer a alteração provocada pelo polimorfismo e sua possível relação com a Hemocromatose.

6.4 Construção das sondas e iniciadores do ensaio 5'Nuclease.

6.4.1 Sondas LNA

O ponto mais crítico no desenvolvimento de um ensaio de PCR 5' Nuclease é o desenho da sonda, já que ela é responsável pela discriminação dos alelos selvagens e mutantes. A premissa básica no desenho de uma sonda é a identificação do polimorfismo presente na sequência e, seguindo alguns critérios que serão abordados mais tarde, são geralmente construídas duas sondas: uma que anela perfeitamente à sequência selvagem e outra que anela perfeitamente à sequência mutante.

Entretanto, no nosso caso, como desejávamos genotipar dois SNPs simultaneamente, foi necessário desenvolver 4 sondas para contemplar todas as possibilidades: uma sonda que anelasse perfeitamente à sequência contendo os dois alelos selvagens (C e A respectivamente), uma sonda que anelasse à

sequência contendo o alelo selvagem de H63D e o alelo mutante de S65C (C e T respectivamente), uma sonda que anelasse à sequência contendo o alelo mutante de H63D e o alelo selvagem de S65C (G e A respectivamente) e por último a quarta sonda que anelasse à sequência contendo dois alelos mutantes (G e T respectivamente).

O primeiro obstáculo na construção dessas sondas foi o polimorfismo rs147426902, que está localizado entre os polimorfismos alvo do presente estudo e, portanto, não poderia ser evitado. Entretanto, conforme já foi mostrado nos resultados, esse polimorfismo possui baixa frequência do alelo mutante C 0,005 e por isto não irá representar um problema. Além disso, em um trabalho realizado no Brasil com 19 indivíduos com hemocromatose portadores da mutação C282Y em heterozigose não foi observada esta mutação²⁵. Apesar do número de amostras neste trabalho ser muito pequeno, é importante ressaltar que este polimorfismo é citado somente 4 vezes na base de dados da Pubmed utilizando o descritor “H63H”³³. Em nenhum desses 4 trabalhos foi encontrada a mutação nas populações estudadas.

Para tentar evitar todos os outros polimorfismos próximos aos SNPs de interesse, optamos por construir sondas menores. Estas sondas empregaram dispositivos que aumentam a afinidade de ligação com o DNA e, portanto atingiram temperaturas de anelamento adequadas com sequências que variam entre 12 a 20 nucleotídeos. Sondas que não empregam estes dispositivos geralmente precisam conter entre 14 a 40 nucleotídeos para atingirem a mesma temperatura de anelamento²⁶.

Existem duas tecnologias principais para se construir sondas pequenas: Sondas MGB (Minor Groove Binder) e sondas LNA (Locked Nucleic Acid). As sondas MGB são sintetizadas com uma molécula que se liga no sulco menor do DNA através de ligações do tipo van der Waals, hidrofóbicas e interações eletrostáticas, aumentando a afinidade da sonda pelo DNA e conseqüentemente aumentando sua temperatura de anelamento²⁷. As sondas LNA são sintetizadas com análogos de nucleotídeos contendo uma ribose modificada que grosseiramente se assemelham ao 2'-O-Metil-RNA. Contudo o grupo O-Metil no resíduo LNA se liga ainda mais forte nos carbonos 2' e 4' do anel da ribose. Essa ligação covalente resulta no aumento da afinidade por DNA ou RNA e conseqüentemente no aumento da temperatura de anelamento^{28,29}.

Entre estas duas alternativas optamos pelas sondas sintetizadas com LNA devido ao fato que a empresa que sintetiza as sondas MGB® não sintetizam 4 fluorescências distintas excluindo a marcação ROX (6-carboxi-rodamina) que está reservada para a fluorescência passiva.

A ferramenta “LNA™ Oligo Tm Prediction” para prever a temperatura das sondas LNA foi escolhida por se tratar de uma das poucas ferramentas disponíveis que utiliza um algoritmo próprio para as interações LNA³¹. Várias sequências foram testadas até que se encontrasse um conjunto de sondas que possuísse temperatura de anelamento entre 67°C a 70°C. Em um ensaio de PCR 5’Nuclease a sonda precisa ter uma Tm superior a Tm dos iniciadores para que se garanta que a sonda será degradada pela atividade 5’-3’ exonuclease da polimerase³⁰. Em geral, é recomendado que a Tm da sonda seja superior em 7 a 10°C à Tm dos iniciadores²⁸.

Além da característica mencionada acima foram seguidas as recomendações de You *et al* em 2006 que fizeram diversas observações sobre a utilização de LNA na síntese de sondas. As recomendações seguidas na construção das 4 sondas para aumentar o poder de discriminação foram: utilizar nucleotídeos LNA no sítio da mutação, manter os sítios de mutação preferencialmente no centro da sonda e manter o conteúdo de GC entre 30% e 60%.

Dois últimos critérios estabelecidos por nós foram usados na escolha do conjunto de sondas: 1) as sondas precisavam ter a mesma Tm, para minimizar as possíveis diferenças de intensidade do sinal e 2) as sondas deveriam conter o menor número possível de polimorfismos, que não fossem alvo deste estudo, descritos nesta sequência, para que eles não interferissem no anelamento.

Nas sondas selecionadas, um segundo polimorfismo, CM033969, não pode ser evitado. No entanto este polimorfismo foi relatado apenas uma única vez e, portanto não pode ser considerado um problema quanto sua interferência no anelamento das sondas³².

Os fluoróforos FAM, JOE, Cy3 e Cy5 foram escolhidos de acordo com as fluorescências presentes no kit de calibração espectral do instrumento 7500 Fast Real-time³⁸ e disponibilidade do fabricante dos oligonucleotídeos marcados com LNA® (Exiqon A/S, Vedbaek, Alemanha). O “quencher”, que é responsável por

manter o fluoróforo desligado na ausência de interação, foi escolhido de acordo com a recomendação do fabricante dos oligonucleotídeos (Exiqon A/S, Vedbaek, Alemanha).

6.4.2 Iniciadores.

Os iniciadores foram selecionados utilizando as recomendações de Xiaowei Wang and Brian Seed³⁴. Foram observadas as seguintes características: 1) o tamanho dos iniciadores deveria estar entre 16 a 28 nucleotídeos, 2) o conteúdo de GC deveria estar entre 35% a 65%, 3) as Tms dos iniciadores deveriam ser similares entre si, 4) o tamanho do fragmento deveria ser inferior a 250pb, 5) deveria-se evitar que a força de interação da porção 3'dos iniciadores fosse muito estável, 6) os iniciadores deveriam possuir especificidade pela sequência alvo e 7) não deveriam formar estruturas secundárias com eles mesmos ou com outro oligonucleotídeo presente na reação.

As três últimas características foram testadas *in silico* com ferramentas específicas devido a complexidade da informação. A ferramenta MFEprimer-2.0 foi escolhida para testar a especificidade do par de iniciadores e a força de interação da porção 3' dos iniciadores. Esta ferramenta possui um algoritmo que avalia a habilidade do par de iniciadores de se ligar ao DNA molde pelo PPC (Pair Prime Covarage – Cobertura do par de iniciadores). Este algoritmo leva em consideração o par na avaliação de interação e não somente um iniciador ou os dois iniciadores de forma independente. Além disso, a ferramenta MFEprimer-2.0 também avalia a força de interação da porção 3' das últimas cinco bases dos iniciadores^{35, 36}.

O resultado apresentou dois sítios de anelamento no genoma humano. O primeiro sítio de anelamento indicou o produto de PCR de interesse, pois estava localizado no cromossomo 6 e possuía o tamanho esperado de 94pb, de acordo com a sequência parcial do gene *HFE*: >gi|224514668:26030968-26031467. O segundo sítio tratava-se de um produto inespecífico, pois estava localizado no cromossomo 1. Apesar da ferramenta MFEprimer-2.0 ter demonstrado que o par de iniciadores poderia anelar em dois sítios do genoma, o segundo resultado apresentou um PPC

igual a -38,3%. Este valor é considerado muito baixo, pois o valor máximo é 100% e, portanto este conjunto não está hábil a se ligar com eficiência ao DNA molde^{35,36}.

Quanto à força de interação da porção 3' do iniciadores, ambos os produtos avaliados apresentaram boa força de interação. Todos os iniciadores se ligaram com força superior a -9 Kcal/mol. Isto quer dizer que os iniciadores não possuem uma força de interação muito alta na porção 3', que poderia provocar interações inespecíficas³⁷.

6.4.3 Verificação de formação de dímeros e estruturas secundárias nos oligonucleotídeos.

A ferramenta LNA™ Oligo Optimizer foi escolhida para prever a formação de dímeros e estruturas secundárias, pois ela considera a interação dos nucleotídeos especiais LNA® e, portanto consegue prever a interação com mais precisão do que outras ferramentas que calculam a força de interação dessas estruturas considerando as interações entre nucleotídeos comuns. A pontuação (score) apresentada para as interações (dímeros e estruturas secundárias) detectadas por meio desta ferramenta representa a temperatura na qual a estrutura está estável e, portanto, como todas as interações foram classificadas com pontuação (score) abaixo de 30, não representam problema num ensaio desenhado para ter temperatura entre 60°C a 65°C.

6.5 Construção de controle positivo sintético H63D mutante e S65C mutante.

Optamos pela construção do gene sintético devido ao fato de ser muito raro encontrar um alelo mutante para as duas mutações H63D e S65C *in Cis*. Alguns genótipos, como por exemplo, o homocigoto mutante para as duas mutações ou o heterocigoto para H63D e homocigoto mutante para S65C também são muito raros e, portanto não teríamos amostras para testá-los. Como o ensaio foi desenvolvido exatamente para detectar estas condições, os testes de padronização e validação não poderiam ser realizados sem a presença desta sequência, mesmo sendo amostras sintéticas. Este procedimento justifica-se porque as amostras sintéticas

irão apresentar praticamente as mesmas complexidades que as amostras *in natura*, já que os testes foram realizados com amostras de DNA extraídas por meio de um procedimento que tem um alto poder de purificação, restando no final do processo praticamente apenas DNA. As quantidades equitativas de DNA genômico e amplificado foram usadas para manter ainda mais próxima a condição *in natura* e sintética.

6.5.1 Desenho do gene sintético.

A idealização do controle sintético foi feita considerando a possibilidade de que fossem usados iniciadores que pudessem amplificar a região de interesse a partir do plasmídeo sintetizado.

Escolheu-se fazer uma pré-amplificação da região de interesse com o objetivo de economizar o plasmídeo, pois apesar dele ser construído para a clonagem em bactéria e posterior multiplicação, esta etapa não foi prevista em nosso estudo. Portanto os iniciadores poderiam ser utilizados para multiplicar os fragmentos de DNA a serem posteriormente utilizados como controles no ensaio PCR 5' Nuclease. Desta forma, seria possível obter uma fonte ilimitada desta sequência controle rara para a etapa de validação.

A região de interesse, neste caso, é a porção gênica para a qual o ensaio PCR 5' Nuclease foi construído e que está sublinhada na sequência abaixo:

```
CCAGACACAGCTGATGGTATGAGTTGATGCAGGTGTGTGGAGCCTCAACATCCTGCTCCCCTCCTACT
ACACATGGTTAAGGCCCTGTGCTCTGTCTCCAGGTTCACTCTCTGCACTACCTCTTCATGGGTGCC
TCAGAGCAGGACCTTGGTCTTTCCTTGTGTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGTTTCGTGTT
CTATGATGATGAGTGTGCGCCGTGTGGAGCCCCGAACCCATGGGTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCAGA
TGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGTCTGAAAGGGTGGGATCACATGTTCACTGTTGACTTCTGGACTATT
ATGGAAAATCACAACCACAGCAAGGGTATGTGGAGAGGGGGCCTCACCTTCTGAGGTTGTCAGAGCT
TTTCATCTTTTCATGCATCTTGAAGGAAACAGCTGGAAGTCTGAGGTCTTGTGGGAGCAGGGAAGAGG
GAAGGAATTTGCTTCCTGAGATCA
```

Os iniciadores responsáveis pela amplificação da sequência contendo a região do ensaio PCR 5' Nuclease foram pesquisados, considerando-se uma distância de pelo menos 20 nucleotídeos para cada um dos lados a partir dessa região, para que os iniciadores não tivessem dificuldade em anelar ao fragmento.

As recomendações gerais de Shen Z *et al* foram utilizadas por se tratarem de recomendações para PCR convencionais. As recomendações a seguir foram todas atendidas pelo par de iniciadores selecionados: 1) tamanho entre 18pb a 30pb; 2) produto com tamanho entre 100pb a 500pb; 3) temperatura de melting entre 58°C e 65°C e diferença inferior a 3°C entre o iniciador “forward” e “reverse”; 4) conteúdo de GC entre 40% a 60% e 5) força de interação das últimas cinco bases da porção 3’ do iniciador menor ou igual a -9Kcal/mol³⁹. Este par de iniciadores não foi avaliado quanto a sua especificidade devido ao fato de não ser utilizado para amplificar o genoma humano e sim apenas o plasmídeo pIDTSMART-AMP: 63mut65mut, de modo que as regiões para o anelamento inespecífico praticamente são inexistentes.

O par de iniciadores também não apresentou formação de estruturas secundárias e, portanto foi considerado um excelente conjunto, capaz de apresentar bons resultados durante os testes de padronização e validação.

6.5.2 Síntese do gene sintético.

A sequência gênica escolhida para a construção do gene sintético foi a anotação genômica da base de dados Ensembl >gi|224514668:26030968-26031467 com substituição das bases selvagens pelas bases mutantes na posição 26091179-26091179 e 26091185-26091185, respectivamente para as mutações H63D e S65C. O vetor escolhido, apesar de ser construído para a propagação em bactérias, não foi utilizado para esta finalidade em nosso estudo.

A construção do plasmídeo pIDTSMART-AMP: 63mut65mut foi confirmada pelo sequenciamento realizado pela empresa IDT® apresentando 100% de identidade com a sequência enviada.

6.6 Padronização do ensaio de PCR 5' Nuclease com detecção em tempo real para as mutações H63D e S65C do gene da Hemocromatose.

A padronização pode ser considerada a parte do estudo na qual ocorre a sistematização das etapas do processo de forma a uniformizar o produto final⁴⁰. As principais etapas do ensaio de PCR 5' Nuclease que foram sistematizadas foram:

1) Purificação de DNA genômico. O kit de extração Gentra Puregene Blood (QIAGEN®) foi escolhido por se tratar de um método que consegue purificar o DNA genômico com qualidade suficiente para ser utilizado em diversas técnicas de biologia molecular⁴¹. Além disso, a capacidade de extração de DNA do kit está bem ajustada ao limite de detecção do ensaio (5ng de DNA), pois não foram necessários procedimentos de concentração de DNA e poucas amostras necessitaram ser diluídas.

2) Reação em cadeia da polimerase (PCR) 5' Nuclease. As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) 5' Nuclease foram baseadas na sugestão da empresa Life Technologies™ em manuais de diluição de iniciadores e sondas⁴². No entanto, quantidade final de cada sonda foi aumentada para 0,35µM devido ao baixo sinal do fluoróforo CY3 (Figura 14).

3) Condições de amplificação. As condições de ciclagem de PCR foram baseadas no ensaio padrão 5'Nuclease TaqMan® contido no termociclador 7500 Fast Real time (Life Technologies™) com modificação na temperatura de anelamento para 63°C, na qual foram obtidos os resultados com os sinais com máxima intensidade.

4) Análise de resultados. As análises precisaram ser determinadas manualmente devido ao fato de que a modalidade de leitura automática simultânea para 4 fluorescências não existia no programa de análise. Embora o tipo de experimento realizado seja “genotipagem”, as opções disponíveis para análise automática não permitiam a genotipagem simultânea de duas mutações, ou seja 4 sinais de fluorescência diferentes. A opção de experimento de quantificação com curva padrão “*Quantification Standard curve*” foi utilizada, pois é a única modalidade que possibilita a leitura de 4 fluorescências no mesmo experimento. E, portanto, os critérios de determinação de resultados tiveram de ser estipulados, pois a

interpretação dos resultados não ocorreria automaticamente pelo programa de análise.

O estabelecimento de critérios de determinação de resultados nos ajudam a diferenciar sinais positivos de sinais negativos e assim interpretá-los. Os critérios de determinação de resultados para os sinais 63N65M, 63M65N e 63M65M foram facilmente estabelecidos, pois os sinais se comportaram como o esperado, apresentando formação de platô bem distinguível e com boa elevação. No entanto o sinal 63N65N apresentou inicialmente uma pequena inespecificidade que dificultava a distinção entre sinais positivos e negativos. O aumento da temperatura de anelamento na ciclagem do programa de PCR para 63°C resolveu parcialmente o problema, mas ainda assim, necessitamos acrescentar os outros 2 critérios de determinação de resultado para diferenciarmos sinais positivos de sinais negativos.

Esta sistematização permitiu resultados mais uniformes e, portanto prosseguimos para a fase de validação do ensaio de PCR 5' Nuclease. A validação pode ser definida como o processo para estabelecer as características de desempenho de um teste. Normalmente, uma comparação com um método “padrão ouro” ou referência pode ser feito para identificar se o teste é capaz de “conhecer” o *status* da amostra sem erro^{43, 44, 45}.

Optamos por avaliar o desempenho não clínico do teste, pois se trata de uma tendência entre guias e standardizações direcionadas para testes genéticos^{43, 44}. Em geral, estes guias consideram que como os genótipos não necessariamente estão diretamente ligados ao *status* da doença (fenótipo) por várias razões, como penetrância incompleta/fatores modificadores ou porque o paciente é pré-sintomático, a validação deve se ater a capacidade do teste em identificar o genótipo corretamente^{43, 44}. Neste caso específico a hemocromatose hereditária se enquadra nestes dois exemplos, pois uma proporção significativa de indivíduos que possuem as mutações no gene *HFE* não desenvolve a doença, indicando a baixa penetrância, e os indivíduos podem ser pré-sintomáticos já que os sintomas normalmente surgem a partir dos 40 anos¹¹.

6.7 Avaliação do desempenho analítico.

6.7.1 Avaliação da seletividade dos iniciadores.

A seletividade do ensaio pode ser definida como a capacidade do teste de detectar exclusivamente seu alvo. Em nosso ensaio testamos a seletividade dos iniciadores *in silico* e também avaliamos sua seletividade verificando se outros fragmentos inespecíficos são amplificados junto com a banda de interesse. Como foi visto no gel de agarose, nenhuma banda inespecífica foi visualizada. Este resultado mostrou a seletividade dos iniciadores do ensaio do PCR 5'Nuclease. Este bom resultado foi obtido inicialmente pelo planejamento e seguimento de recomendações para o desenho de iniciadores e em seguida pelos testes realizados *in silico*, que possibilitaram avaliá-los previamente. A seletividade dos iniciadores garante que outras regiões do genoma não serão amplificadas no ensaio e assim possam interferir nos resultados finais.

6.7.2 Avaliação de interferentes no resultado

A avaliação de interferentes é uma parte importante na validação do ensaio. Normalmente são avaliadas substâncias que podem estar presentes devido a etapas anteriores à genotipagem propriamente dita, e que poderiam afetar o ensaio e comprometer os resultados⁴³. O comprometimento pode estar relacionado à falha em liberar o resultado ou a liberar um resultado incorreto. O primeiro deve ser evitado por motivos operacionais e financeiros relacionados ao custo do ensaio por paciente. Alguns ensaios podem se tornar impraticáveis pela alta taxa de repetição⁴³. O segundo é mais grave e deve ser evitado totalmente. Algumas substâncias já são conhecidas como interferentes da técnica de PCR como, por exemplo, a heparina ou o etanol. Neste estudo avaliamos a possível interferência de resíduos provenientes do método de purificação utilizado. As substâncias identificadas como resíduos do método de extração e possíveis contaminantes foram o etanol, o Tris, o EDTA e proteínas^{46, 47} conforme o manual do fabricante do kit de extração⁴¹. As amostras utilizadas nesta etapa foram selecionadas a partir da leitura no espectrofotômetro *NanoVue™* (*GE Healthcare*) e de sua relação de

absorbância nos comprimentos de onda A260/A280 e A260/A230. Conforme o manual do espectrofotômetro, amostras com leitura de absorbância superior a 1,9 na relação de comprimento de onda A260/A280 podem estar contaminadas com RNA e proteínas, e amostras com leitura de absorbância inferior a 2,0 na relação de comprimento de onda A260/A230 podem estar contaminadas com sal e/ou solventes orgânicos^{46, 47}.

O teste com as amostras contaminadas mostrou que os resíduos provenientes do método de extração não foram capazes de comprometer os resultados, tanto em relação a repetições quanto na identificação errada das mutações pesquisadas. Este bom resultado garante que as amostras testadas por este ensaio não necessitarão ser repetidas com frequência gerando aumento nos custos por paciente, nem ocorrerão falsos resultados devido aos interferentes comumente presentes devido ao método de extração evidenciando a robustez do método.

6.7.3 Limite de detecção utilizando amostras clínicas entre os principais genótipos

O termo limite de detecção tem sido aplicado para testes qualitativos para expressar a menor quantidade de DNA genômico que produz resultados informativos⁴⁵. A primeira tentativa de estabelecer o limite de detecção do ensaio foi através da verificação da variação dos valores de Ct dos resultados obtidos pelas 12 réplicas para cada amostra. Mas conforme os resultados observados o coeficiente de variação em todas as concentrações testadas foi inferior a 25%, que é considerado um valor baixo e, portanto não o utilizamos como critério para estabelecer o limite de detecção.

Entretanto, o cumprimento de todos os critérios de determinação do resultado não ocorreram nas concentrações 0,5 η g e 1,0 η g de DNA. Duas amostras na concentração 1,0 η g e uma amostra na concentração 0,5 η g de DNA tiveram o sinal 63N65N elevando-se acima de 0,2log sendo que o sinal deveria ser interpretado como negativo. Por isso, os resultados obtidos com 0,5 η g e 1,0 η g de DNA genômico foram considerados discordantes e o limite de detecção foi determinado como sendo 5 η g de DNA genômico. Este limite é bastante apropriado considerando que a maioria dos métodos de extração de DNA disponíveis no mercado garante

rendimento do DNA superior a este limite, como por exemplo, DNAZOL® (10µg-20µg)⁴⁸, ChargeSwitch® gDNA Blood Kits (600ng-3µg)⁴⁹, QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (4µg-12µg)⁵⁰ e Wizard® Genomic DNA Purification Kit (200ng-700ng)⁵¹. Além disso, o limite de detecção para vários kits comerciais são superiores ao determinado em nosso estudo, como por exemplo, o kit HemochromaStrip (OPERON, SA)⁵² que necessita de pelo menos 250ng de DNA, demonstrando que comparativamente o ensaio desenvolvido por nós produz resultados informativos com menos quantidade de material genético.

6.7.4 Reprodutibilidade e Precisão

A reprodutibilidade do ensaio foi testada quanto à variação entre observadores. Apesar dos critérios de determinação de resultados serem objetivos, podem ocorrer variações no assinalamento dos sinais devido à interpretação dos diferentes observadores, o que pode ocasionar resultados falsos. A estatística Kappa com várias categorias foi utilizada para avaliar a reprodutibilidade, pois se adere melhor a condição do ensaio de PCR 5'Nuclease já que nesse teste não existe a condição dicotômica como positivo e negativo, ou presente e ausente. Neste caso específico a identificação dos haplótipos torna a resposta multicategórica.

Os resultados obtidos indicaram que a concordância entre os 3 observadores foi perfeita (1,0). Este resultado mostra que com determinação de critérios objetivos a variação dependente de operador não interfere na definição dos resultados do ensaio. Considerando o valor mais baixo do intervalo de confiança do teste de 95%, a concordância Kappa foi considerada excelente utilizando a escala de Landis JR e Koch GG ou Nigel Pameth⁵³.

A precisão foi avaliada em condições de repetitividade e o mesmo ensaio foi avaliado em três momentos diferentes pelo mesmo operador. Essa variação intra-operador também não apresentou interferência nos resultados do ensaio PCR 5' Nuclease pois a concordância entre as leituras utilizando o método Kappa foi perfeita (1,0). Também, considerando o valor mais baixo do intervalo de confiança de 95% do teste Kappa geral a concordância foi excelente conforme a escala proposta por Landis JR e Koch GG ou Nigel Pameth⁵³.

6.7.5 Acurácia do ensaio genético e taxa de falsos resultados

A concordância da genotipagem das duas mutações, H63D e S65C, foi realizada utilizando a estatística Kappa considerando o teste de PCR RFLP como teste referência. O método de PCR RFLP é amplamente utilizado até os dias de hoje e é considerado um método de referência para a genotipagem das mutações C282Y, H63D e S65C^{(1), 4, 54, 55}.

Para a avaliação da acurácia foram utilizadas duas amostragens sendo que uma primeira continha 76 amostras de pacientes representando duas rotinas habituais e uma segunda contendo 153 amostras com pacientes adicionados para representarem os haplótipos raros 6365 HC/HC e dentre essas, 6 amostras sintéticas representando os haplótipos raríssimos 6365 DS/DC, 6365 HC/DC e 6365 DC/DC. A primeira amostragem foi utilizada dessa forma, pois assim estaríamos testando a acurácia do ensaio considerando uma condição mais próxima da realidade, isto é, o ensaio estaria sendo posto à prova com amostras que mimetizam a população de pacientes encaminhados para a realização do teste molecular da hemocromatose hereditária. Na segunda amostragem, com 153 amostras, foram acrescentados outros pacientes com haplótipos ainda não representados na primeira amostragem e também foram testadas amostras sintéticas que representaram os haplótipos raríssimos. Essa segunda amostragem foi realizada para testar a concordância Kappa do ensaio de PCR 5' Nuclease em um condição com todos os haplótipos possíveis e que em uma amostragem normal não seriam representados. Os resultados da estatística Kappa com ambas as amostragens foram idênticas e perfeitas (1,0). Considerando independentemente cada haplótipo também não houve discordância observada pela estatística Kappa.

A taxa de resultados falsos foi calculada, pois caso tivéssemos algum resultado diferente do esperado teríamos uma segunda medida já que o valor superior do intervalo de confiança de 95% da estatística Kappa pode mascarar uma leve discordância. No entanto nenhum resultado foi classificado erroneamente.

As duas amostragens mostraram concordância Kappa perfeita (1,0) e, considerando o valor inferior do intervalo de confiança de 95% do teste Kappa geral, ambas ainda foram classificadas como apresentando concordância excelente de acordo com a

escala de Landis JR e Koch GG ou Nigel Pameth⁵³. Estes resultados revelaram que o ensaio 5'Nuclease foi capaz de identificar simultaneamente as mutações H63D e S65C quando comparadas com a técnica de PCR RFLP (teste referência).

7. CONCLUSÃO

A utilização de sondas capazes de identificar dois polimorfismos simultaneamente em um ensaio de PCR 5' Nuclease, descrita no presente estudo, jamais foi vista antes na literatura. Esta característica singular permite que regiões que possuem outros polimorfismos, que não sejam alvo do estudo, possam ser estudadas sem a interferência desta segunda mutação, utilizando a metodologia de PCR em tempo real.

A interferência de polimorfismos próximos da mutação pesquisada em experimentos de PCR em tempo real já foi relatada, inclusive no caso específico das mutações H63D e S65C. Nesse caso, indivíduos portadores do genótipo 6365 HC/DS foram genotipados erroneamente como 6365 DS/DS¹¹.

A percepção de que sondas podem ser usadas para discriminar dois polimorfismos simultaneamente em um ensaio de PCR 5' Nuclease pode ser útil para a genotipagem de regiões com alta densidade de mutações ou "hotspots". Este tipo de situação ocorre, por exemplo, em dois importantes genes envolvidos na tumorigênese: BRCA1, que faz papel crítico no reparo de DNA, controle do ciclo celular e manutenção da estabilidade genômica⁵⁶, e p53, um fator de transcrição que responde ao estresse celular e regula genes que induzem a parada do ciclo celular, apoptose, senescência e reparo de DNA^{57,58}. Ambos possuem regiões com mutações muito próximas umas das outras. Enquanto BRCA1 possui as mutações CYS61GLY (rs28897672) e CYS64GLY (rs80357064), que estão a apenas 9 nucleotídeos de distância, o gene TP53 apresenta as mutações GLY245SER (rs28934575), ARG248GLN (rs11540652) e ARG249SER (rs28934571) bastante próximas entre si.

Outra vantagem na utilização de sondas que discriminam dois polimorfismos simultaneamente é que através desta técnica podemos identificar mini haplótipos. Por exemplo, um paciente que é duplo heterozigoto pode possuir as duas mutações em *Cis* ou em *Trans*. Se ele possuir as duas mutações em *Cis* ele tem 50% de chance de passar as duas mutações para sua prole e os outros 50% de chance de

não passar nenhuma mutação, mas caso ele tenha as mutações em *Trans* ele tem 50% de passar apenas uma mutação e os outros 50% de passar a outra mutação.

Em relação ao ensaio de PCR 5' Nuclease para detecção simultaneamente das mutações H63D e S65C concluímos que o planejamento e testes *in silico* contribuíram para o sucesso na validação do ensaio. A utilização de ferramentas de bioinformática não substituem os testes *in vitro*, pois não conseguem simular todas as complexidades biológicas envolvidas em um teste diagnóstico, mas funcionaram como bons preditores do sucesso dos testes *in vitro* e diminuíram as chances de falhas na padronização e validação.

Todas as características de desempenho testadas do ensaio de PCR 5'Nuclease para detecção simultânea das mutações H63D e S65C foram validadas com sucesso. A utilização de guias de validação gerais e especializados na área de genética norteou o estudo, mas foram necessárias adaptações específicas para este ensaio como, por exemplo, a criação de critérios de determinação de resultados manual devido à falta de algoritmos disponíveis para este novo tipo de ensaio implementados nos programas computacionais de análise de resultados de PCR em tempo real.

Comparado com o método referência (PCR RFLP) o novo ensaio foi capaz de identificar corretamente todos os genótipos de todos os 153 pacientes testados em menos tempo e com menor custo. Além disso, a utilização do controle sintético permitiu que o ensaio pudesse ser testado com amostras que dificilmente estariam disponíveis. Apesar do controle sintético não possuir a complexidade de uma amostra biológica, ele pôde mimetizar muito bem a região alvo do estudo e, portanto concluímos que o controle sintético pode ser uma boa opção para resolver um grande problema nas validações na área de genética que é a obtenção de amostras positivas para testar a capacidade do ensaio em detectar a condição mutante.

O ensaio validado também está adequado às recomendações de dois guias de boas práticas para o diagnóstico de hemocromatose ^{11,12}. A Sociedade de Genética Molecular Clínica do Reino Unido e a Associação Americana para o estudo de doenças do Fígado sugerem que em pacientes com sintomas sugestivos, saturação de transferrina 45% elevada e ferritina elevada justifica-se o teste molecular para

hemocromatose. A estratégia indicada para o diagnóstico confirmatório é, primeiramente, testar a mutação C282Y e, em caso de heterozigose, as mutações H63D e S65C devem ser pesquisadas para a verificação do “status” duplo heterozigoto C282Y/H63D e C282Y/S65C. Portanto, após o teste da mutação C282Y, um único teste pode ser realizado para identificar as outras duas principais mutações do gene *HFE* simultaneamente.

Além dessa vantagem, o ensaio teve seu tempo de execução reduzido em 78% em relação ao método referência. A técnica de PCR em tempo real reduz etapas como a digestão enzimática por endonucleases e aplicações das amostras em géis de agarose. Por ter menos etapas, considera-se que há menos eventos para a troca de amostras e portanto também são considerados processos mais confiáveis.

Portanto concluímos que o ensaio de PCR 5'Nuclease para detecção simultânea das mutações H63D e S65C pode ser utilizado na prática clínica para o auxílio do diagnóstico de Hemocromatose em indivíduos pré-sintomáticos ou com história familiar com o objetivo de prevenir as complicações severas desta doença.

REFERÊNCIAS

1. GROTTO, H. Z. W. *Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 30, 5, 390-397. 2008.*
2. LE GAC, G; FÉREC, C. *The molecular genetics of haemochromatosis. Eur J Hum Genet., 13, 11, 1172-85. 2005.*
3. KUCINSKAS, L; JUZENAS, S; SVENTORAITYTE, J; CEDAVICIUTE, R; VITKAUSKIENE, A; KALIBATAS, V; KONDRACKIENE, J; KUPCINSKAS, L. *Prevalence of C282Y, H63D, and S65C mutations in hereditary HFE-hemochromatosis gene in Lithuanian population. Ann Hematol., 91, 4, 491-5, Apr. 2012.*
4. SPÍNOLA, C; BREHM, A; SPÍNOLA, H. *Prevalence of H63D, S65C, and C282Y hereditary hemochromatosis gene variants in Madeira Island (Portugal). Ann Hematol., 90, 1, 29-32, Jan. 2011.*
5. DOUABIN, V; DEUGNIER, Y; JOUANOLLE, A. M; MOIRAND, R; MACQUERON, G; GIREAU, A; LE GALL, J. Y; DAVID, V. *Polymorphisms in the haemochromatosis gene. In: International Symposium Iron in Biology and Medicine. Saint-Malo, France, 267, 1997.*
6. DRAKESMITH, H; SWEETLAND, E; SCHIMANSKI, L; EDWARDS, J; COWLEY, D; ASHRAF, M; BASTIN, J; TOWNSEND, A. R. M. *The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci., 99, 15602-15607. 2002.*
7. FEDER, J. N; GNIRKE, A; THOMAS, W; TSUCHIHASHI, Z; RUDDY, D. A; BASAVA, A, DORMISHIAN, F; DOMINGO, R J; ELLIS, M. C; FULLAN, A; HINTON, L. M; JONES, N. L; KIMMEL, B. E; KRONMAL, G. S; LAUER, P; LEE, V. K; LOEB, D. B; MAPA, F. A; MCCLELLAND, E; MEYER, N. C; MINTIER, G. A; MOELLER, N; MOORE, T; MORIKANG, E; PRASS, C. E; QUINTANA, L; STARNES, S. M; SCHATZMAN, R. C; BRUNKE, K. J; DRAYNA, D. T; RISCH, N. J; BACON, B. R; WOLFF, R. K. *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet., 13, 4, 399-408, Aug. 1996.*
8. MURA, C; RAGUENES, O; FEREC, C. *HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. Blood, 93, 2502-2505. 1999.*
9. Kowdley, K. V; Bennett, R. L; Motulsky, A. G. *HFE-Associated Hereditary Hemochromatosis. 2000 Apr 3 [Atualizado 2012 Apr 19]. In: Pagon, R. A; Bird, T.D; Dolan, C. R; et al., GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/>*
10. FEDER, J. N; PENNY, D. M; IRRINKI, A; LEE, V. K; LEBRÓN, J. A; WATSON, N; TSUCHIHASHI, Z; SIGAL, E; BJORKMAN, P. J; SCHATZMAN, R. C. *The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 4, 1472-7, Feb. 1998.*
11. KING, C; BARTON, D. E. *Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of Type 1 (HFE-related) hereditary haemochromatosis. BMC Med Genet. 7, 81, Nov. 2006.*
12. BACON, B. R; ADAMS, P. C; KOWDLEY, K. V; POWELL, L. W; TAVILL, A. S. *American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 54, 1, 328-43, Jul. 2011.*
13. ALLEN, M. K; *Hereditary hemochromatosis: a literature review and case report. Physiother Can. 62, 3, 276-84. 2010.*

14. NEWTON, C. R; GRAHAM, A; HEPTINSTALL, L. E; POWELL, S. J; SUMMERS, C; KALSHEKER, N; SMITH, J. C; MARKHAM, A. F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Res.** 17, 7, 2503-16, Apr. 1989.
- 15 REID, M. C; LACHS, M. S; FEINSTEIN, A. R. Use of methodological standards in diagnostic test research. Getting better but still not good. **JAMA.** 274, 8, 645-51, Aug. 1995.
16. ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2012. Disponível em < <http://omim.org/> > Acessado em junho de 2012
17. Kitts, A; Sherry, S. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. 2002 Oct 9 [Atualizado 2011 Feb 2]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. In: The NCBI Handbook: National Center for Biotechnology Information (US). Capítulo 5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/> Acesso em: junho de 2012.
18. ALTSCHUL, S. F; GISH, W; MILLER, W; MYERS, E.W; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** 215, 3, 403-10, Oct. 1990.
19. PRUITT, K. D; TATUSOVA, T; KLIMKE, W; MAGLOTT, D. R. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. **Nucleic Acids Res.** 37, D32-6, Jan. 2009.
20. FLICEK, P; AMODE, M. R; BARRELL, D; BEAL, K; BRENT, S; CARVALHO-SILVA, D; CLAPHAM, P; COATES, G; FAIRLEY, S; FITZGERALD, S; GIL, L; GORDON, L; HENDRIX, M; HOURLIER, T; JOHNSON, N; KÄHÄRI, A. K; KEEFE, D; KEENAN, S; KINSELLA, R; KOMOROWSKA, M; KOSCIELN, Y. G; KULESHA, E; LARSSON, P; LONGDEN, I; MCLAREN, W; MUFFATO, M; OVERDUIN, B; PIGNATELLI, M; PRITCHARD, B; RIAT, H. S; RITCHIE, G. R; RUFFIER, M; SCHUSTER, M; SOBRAL, D; TANG, Y. A; TAYLOR, K; TREVANION, S; VANDROVCOVA, J; WHITE, S; WILSON, M; WILDER, S. P; AKEN, B. L; BIRNEY, E; CUNNINGHAM, F; DUNHAM, I; DURBIN, R; FERNÁNDEZ-SUAREZ, X. M; HARROW, J; HERRERO, J; HUBBARD, T. J; PARKER, A; PROCTOR, G; SPUDICH, G; VOGEL, J; YATES, A; ZADISSA, A; SEARLE, S. M. Ensembl 2012 **Nucleic Acids Research.** 40, D84-D90. 2012.
21. CHEN, Y; CUNNINGHAM, F; RIOS, D; MCLAREN, W. M; SMITH, J; PRITCHARD, B; SPUDICH, G. M; BRENT, S; KULESHA, E; MARIN-GARCIA, P; SMEDLEY, D; BIRNEY, E; FLICEK, P. Ensembl variation resources. **BMC Genomics.** 11, 293, May. 2010.
22. KENT, W. J. BLAT--the BLAST-like alignment tool. **Genome Res.** 12, 4, 656-64, Apr. 2002.
23. **dbSNP – SHORT NUCLEOTIDE POLYMORPHISM.** Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> > . Acesso em junho de 2012.
24. **HGMD Professional 2012.1.** Disponível em < <http://hgmdtrial.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php> > . Acesso em junho de 2012.
25. BITTENCOURT, P. L; MARIN, M. L; COUTO, C. A; CANÇADO, E. L; CARRILHO, F. J; GOLDBERG, A. C. Analysis of HFE and non-HFE gene mutations in Brazilian patients with hemochromatosis. **Clinics, São Paulo,** 64, 9, 837-41. 2009.
26. KUTYAVIN, I.V; AFONINA, I.A; MILLS, A; GORN, V. V; LUKHTANOV, E. A; BELOUSOV, E. S; SINGER, M. J; WALBURGER, D. K; LOKHOV, S. G; GALL, A. A; DEMPCY, R; REED, M. W; MEYER, R. B; HEDGPETH, J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Res.** 28, 2, 655-61, Jan. 2000.

27. KUTYAVIN, I. V; LUKHTANOV, E. A; GAMPER, H. B; MEYER, R. B. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. **Nucleic Acids Res.** 25, 18, 3718-23, Sep. 1997
28. YOU, Y; MOREIRA, B. G; BEHLKE, M. A; OWCZARZY, R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. **Nucleic Acids Res.** 34, 8, e60, May. 2006.
29. LEVIN, J. D; FIALA, D; SAMALA, M. F; KAHN, J. D; PETERSON, R. J. Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. **Nucleic Acids Res.** 34, 20, e142, Oct. 2006.
30. HOLLAND, P. M; ABRAMSON, R. D; WATSON, R; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88, 16, 7276-80, Aug. 1991.
31. Disponível em <http://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/LNA_folder.pdf>. Acesso em junho de 2012.
32. BIASIOTTO, G; BELLOLI, S; RUGGERI, G; ZANELLA, I; GERARDI, G; CORRADO, M; GOBBI, E; ALBERTINI, A; AROSIO, P. Identification of new mutations of the HFE, hepcidin, and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload. **Clin Chem.** 49, 12, 1981-8, Dec. 2003.
33. **PUBMED.** Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em junho de 2012.
34. WANG, X; SEED, B. High-throughput primer and probe design. In: **Real-time PCR.** M. Tefvik Dorak (Ed.) School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University Newcastle-upon-Tyne, UK. 2007. 93-96.
35. Qu, W; Shen, Z; Zhao, D; Yang, Y; Zhang, C. MFEprimer: multiple factor evaluation of the specificity of PCR primers. **Bioinformatics** 25, 2, 276-278. 2009.
36. QU, W; ZHOU, Y; ZHANG, Y; LU, Y; WANG, X; ZHAO, D; YANG, Y; ZHANG, C. MFEprimer-2.0: a fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. **Nucleic Acids Res.** Jun. 2012. In Press.
37. QU, W; REN, C; LI, Y; SHI, J; ZHANG, J; WANG, X; HANG, X; LU, Y; ZHAO, D; ZHANG, C. Reliability analysis of the Ahringer *Caenorhabditis elegans* RNAi feeding library: a guide for genome-wide screens. **BMC Genomics.** 12, 170, Mar. 2011
38. **Applied Biosystems.** 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems System Maintenance. Disponível em https://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_077749.pdf . Acesso em junho de 2012.
39. Shen, Z; Qu, W; Wang, W; Lu, Y; Wu, Y; Li, Z; Hang, X; Wang, X; Zhao, D; Zhang, C. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. **BMC Bioinformatics.** 11, 143, Mar. 2010.
40. FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. **Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa.** 3. ed. Curitiba:Positivo, 2004.
41. **Qiagen**®. Gentra® Puregene® Handbook. Disponível em [http://dna.uqa.edu/docs/Gentra_Puregene_Handbook_\(Qiagen\).pdf](http://dna.uqa.edu/docs/Gentra_Puregene_Handbook_(Qiagen).pdf). Acesso em outubro de 2012.
42. **Applied Biosystems.** Reconstituting and Diluting Primers and TaqMan® Probes http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_043004.pdf. Acesso em outubro de 2012.

43. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A; EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet.* 18,12,1276-88. 2010.
- 44 CAC/GL 74-2010 GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA AND VALIDATION OF METHODS FOR DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SPECIFIC DNA SEQUENCES AND SPECIFIC PROTEINS IN FOODS Disponível em http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11667/CXG_074e.pdf Acesso em outubro de 2012.
- 45 Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML; College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med.* 133,5, 743-55. 2009.
- 46 **Eppendorf**. Troubleshooting Guide for the measurement of nucleic acids with the BioPhotometer plus Disponível em http://www.lhybride.info/media/file/Userguide_BioPhotometer_plus.pdf Acesso em outubro de 2012.
- 47 GE Healthcare®. **NanoVue Plus™ Product User Manual**. Disponível em http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/Information_Sheets/NanoDrop/NanoVue.pdf. Acesso em outubro de 2012.
- 48 Life Technologies™ **DNAZOL® BD Reagent**. Disponível em <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3898.pdf>. Acesso em outubro de 2012.
- 49 Life Technologies™ **ChargeSwitch® gDNA Blood Kits For purification of genomic DNA from small volumes of human blood** Disponível em http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/chargeswitch_gdna_blood_man.pdf. Acesso em outubro de 2012
50. Qiagen®. **Manual do QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit**. Disponível em <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=202700>. Acesso em outubro de 2012.
51. Promega® **Wizard® Genomic DNA Purification Kit**. Disponível em <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>. Acesso em outubro de 2012
52. Operon **HemochromaStrip para el genotipado de mutaciones puntuales asociadas a Hemocromatosis**. Disponível em http://www.operon.es/sites/default/files/pdf/09051002_Hemo_web.pdf Acesso em outubro de 2012
- 53 LANDIS, J.R, KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174, 1977.
- 54: DRASTÍKOVÁ, M, BERÁNEK, M, HEGEROVÁ, J, PUTZOVÁ, D. The importance of DNA analysis of C282Y, H63D and S65C mutations in the HFE gene. *Cas Lek Cesk.* 151,9,428-431.2012.
55. TRIFA, A.P, POPP, R.A, MILITARU, M.S, FARCAȘ, M.F, CRIȘAN, T.O, GANA, I, CUCUIANU, A, POP, I.V. HFE gene C282Y, H63D and S65C mutations frequency in the Transylvania region, Romania. *J Gastrointestin Liver Dis.* 21,2,177-80. 2012.
56. WANG B, MATSUOKA S, BALLIF BA, ZHANG D, SMOGORZEWSKA A, GYGI SP, ELLEDGE SJ. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science.* 25,316,5828,1194-8.2007.

57. TOLEDO F, WAHL GM. *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas.* **Nat Rev Cancer.** 6,12,909-23. 2006.
58. BOURDON JC, FERNANDES K, MURRAY-ZMIJEWSKI F, LIU G, DIOT A, XIRODIMAS DP, SAVILLE MK, LANE DP. *p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity.* **Genes Dev.** 15,19,18,2122-37. 2005.
59. MOREIRA, FR, MOREIRA, J. *A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde.* **Ciência & Saúde Coletiva,** 9,1,167-181. 2004.
60. CANTONWINE D, HU H, TÉLLEZ-ROJO MM, SÁNCHEZ BN, LAMADRID-FIGUEROA H, ETTINGER AS, MERCADO-GARCÍA A, HERNÁNDEZ-AVILA M, WRIGHT RO. *HFE gene variants modify the association between maternal lead burden and infant birthweight: a prospective birth cohort study in Mexico City, Mexico.* **Environ Health.** 26;9,43.2010.