

ocorrer hiperpigmentação da pele, artrite, cardiopatia, cirrose hepática, *diabete mellitus*, hipotireoidismo e, em casos mais raros, carcinoma hepatocelular.³ Os sintomas clínicos apresentam-se mais evidentes após a quarta década de vida, sendo, antes disso, bastante heterogêneos, fato que dificulta o diagnóstico precoce da doença

O gene da hemocromatose hereditária (HFE) está localizado no braço curto do cromossomo 6, associado ao complexo de histocompatibilidade.⁴ A função da proteína produzida pelo gene *HFE* ainda é objeto de estudo e existem evidências de que seja responsável por parte dos mecanismos de regulação dos níveis de ferro no organismo.⁵

Dois tipos de mutação no gene *HFE* são freqüentemente relatados, C282Y e H63D. A mutação C282Y caracteriza-se por apresentar transição de G para A no nucleotídeo 845 do gene, substituindo uma tirosina por uma cisteína no aminoácido 282 da proteína, com freqüência alélica, na população caucasiana, de 5% a 10%. A mutação H63D é originada pela transversão de C para G no nucleotídeo 187, determinando a substituição de ácido aspártico por histidina no aminoácido 63, freqüência alélica de 16% na população européia e com expressão fenotípica branda.^{2,3} A expressão fenotípica pode ser influenciada também por fatores ambientais e epigenéticos que interferem no metabolismo do ferro e no curso clínico da doença. O número reduzido de doentes frente à elevada freqüência dos mutantes sugere hipótese de penetração incompleta para o gene.

A freqüência dos mutantes C282Y e H63D ainda é alvo de estudos na população brasileira, porém sabe-se que eles estão presentes em 2/3 dos pacientes brasileiros com hemocromatose hereditária, indicando, provavelmente, outras mutações no gene *HFE* ou que outros genes possam estar envolvidos na regulação metabólica do ferro.

Nesse número da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia encontramos uma importante contribuição para o entendimento das manifestações clínicas da sobrecarga de ferro associada aos mutantes mais freqüentes do gene *HFE*, incluindo-se o S65C, em que foram estudados cinquenta indivíduos com sobrecarga de ferro, constatada por métodos usuais, e os mutantes rastreados por PCR. A avaliação de interferentes ambientais e genéticos evidencia a importância e cuidado dessa conduta na suspeita diagnóstica de hemocromatose hereditária e confirmam os dados da literatura internacional quanto à freqüência do mutante C282Y e sua importância na gravidade da hemocromatose hereditária. Os resultados obtidos com a análise molecular desses mutantes possibilitam a exclusão de falso-positivos e/ou falso-negativos decorrentes de outras condições ambientais.

Indivíduos com hemocromatose hereditária apresentam notada predisposição a certas infecções causadas por patógenos como *Vibrio vulnificus*, *Listeria* e vírus da hepatite C.⁶ Mecanismos causadores de prejuízos no metabolismo de ferro podem estar envolvidos na suscetibilidade a infecções bacterianas decorrentes de *Vibrio vulnificus*. Mutações no gene *HFE* podem interferir no prognóstico de doenças hepáticas em pacientes com hepatite crônica; além disso, pacientes com hemocromatose hereditária associada à hepa-

tite C parecem ter uma maior sobrecarga de ferro, apresentando riscos no desenvolvimento de fibrose. O melhor conhecimento sobre a hemocromatose hereditária no Brasil permitirá uma instituição de tratamento precoce, prevenindo complicações.

Referências Bibliográficas

1. Powell LW. Diagnosis of hemochromatosis. *Semin. Gastrointest. Dis.* 2002;13(2):80-8.
2. Lyon E, Frank E.L. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clinical Chemistry.* 2001;47(7):1147-56.
3. Geier D, Hebert B, Potti A. Risk of primary non-hepatocellular malignancies in hereditary hemochromatosis. *Anticancer Res.* 2002;22(6b):3797-9.
4. Bittencourt PL, Palacios SA, Couto CA, Cançado ELR, Carrilho FJ, Laudanna AA, *et al.* Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2002;35:329-35.
5. Fraser DM, Anderson GJ. Iron Imports. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 289:631-5.
6. Gerhard GS, Levin KA, Goldstein JP, Wojnar MM, Chorney MJ, Belchis DA. *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with the hemochromatosis HFE C282Y mutation. *Arquivos of pathology and laboratory medicine.* 2003;125(8):1107-9.

Avaliação: O tema abordado foi sugerido e avaliado pelo editor
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 22/11/2007

Aceito: 22/11/2007

Correspondência: Claudia Regina Bonini-Domingos
Professora doutora pela Unesp. Departamento de Biologia
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
São José do Rio Preto, SP
E-mail: bonini@ibilce.unesp.br

Conjugação de controle isotópico para citometria de fluxo

Conjugation of isotopic control for flow cytometry

Juliana Pereira

Um artigo de Golim *et al* publicado neste fascículo da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia aborda um tema extremamente controverso na literatura – o uso do controle isotópico em citometria de fluxo. Por outro lado é um incentivo ao investimento em pesquisa e conseqüente construção de possibilidades de geração de conhecimento e desenvolvimento na área das ciências médicas no Brasil.

A padronização *in house* da conjugação e validação do controle isotípico (CI) IgG1-FITC estimula e evidencia o potencial do nosso país na produção de tecnologia, reduzindo custos sem perda de qualidade. E nos recupera à memória o enorme potencial dos pesquisadores nacionais na área das ciências médicas, que freqüentemente ficam isolados nas Universidades por falta de oportunidades de investimento.

Durante a leitura deste artigo, vários leitores certamente irão perguntar se a metodologia empregada será levada à prática comercial ou ficará guardada nos arquivos da teoria, mesmo tendo sido demonstrado preliminarmente que o controle isotípico produzido por Golim *et al.* demonstrou ser superior aos reagentes comerciais.

Basicamente, o controle isotípico é definido como quantidade mínima ou irrelevante de anticorpo (Ac) de mesma classe da imunoglobulina (Ig) do Ac alvo utilizado no painel em CMF. Funciona como controle negativo, revelando a fluorescência basal emitida pela célula alvo marcada com anticorpo não específico a nenhuma proteína desta célula. Desta forma, a principal função do controle isotípico é permitir a quem executa o procedimento padronizar o limite acima do qual os sinais de fluorescência serão interpretados como positivos ou verdadeiros e não apenas "ligações não específicas".

Entretanto, o CI não é um controle negativo perfeito, devido à variabilidade durante a purificação do Ac e da conjugação dos fluorocromos entre os diferentes lotes e fabricantes. Idealmente, a subclasse, a relação fluorocromo/proteína e a concentração do anticorpo isotípico e do anticorpo teste devem ser respeitadas, dificultando seu uso na prática laboratorial. Por outro lado, na execução de um painel de marcadores de superfície para leucemia ou linfoma, para cada anticorpo monoclonal (AcMo) utilizado deve haver um controle isotípico correspondente de mesma subclasse de Ig, mesma relação F/P e mesma fluorescência, o que raramente ocorre no laboratório clínico.

Estas limitações devem ser conhecidas e relevadas durante o uso do controle isotípico. Para alguns autores, em muitos casos, o uso do controle isotípico pode ser preterido devido à presença de um controle negativo em um dos tubos do painel, o que não é incorreto quando a população positiva de interesse é claramente separada da negativa. Neste caso, a população negativa pode ser usada como ponto discriminante entre células positivas e negativas, sem interferir na porcentagem de células positivas, além da redução de custo dos testes.

Outros autores advogam ser imprescindível o uso de CI na formação de laboratoristas em citometria de fluxo, na implantação de novos laboratórios de citometria e durante a avaliação de novos AcMos e novas técnicas. Assim como em procedimento de imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucemia e linfoma. Neste caso, o CI fornece elementos indicativos de integridade, de forma que a presença de alto nível de ligação não específica identificada pelo controle isotípico denuncia interferências graves na interpretação dos resultados.

Durante a pesquisa de antígeno expresso em baixa densidade em que não há clara separação entre população positiva e negativa, o controle isotípico também é útil. Apesar de não garantir a estimativa exata da porcentagem de células positivas, contribui para estabelecer confiança de que a população positiva realmente expressa o antígeno pesquisado.

Da mesma forma, na marcação intracelular é apropriado o uso de controle isotípico para monitorar os efeitos do procedimento de fixação, permeabilização e lavagem sobre a autofluorescência e ligações de anticorpos não específicas.

Em resumo, tradicionalmente o controle isotípico é usado para estimar o número de células que reagem de forma não específica com o anticorpo investigado. Entretanto, com o advento dos AcMo diretamente conjugados e da análise multiparamétrica se reduziu a necessidade do uso de um tubo de controle negativo. Alguns consensos em citometria de fluxo recomendam que o uso do controle isotípico é irrelevante e potencialmente fator de erro ou de confusão na pesquisa de antígenos de superfície por citometria de fluxo.

Ao lado de todas as considerações acima, o artigo de Golim *et al.*, que relata a padronização de uma técnica de conjugação de controle isotípico com resultados superiores comparativamente aos reagentes comerciais, é de fundamental importância para todos os que trabalham com citometria de fluxo e estão em busca de redução de custo preservando a qualidade. É importante para o do ponto de vista tecnológico e não deve ser esquecida, mas, outrossim, divulgada e levada adiante pelos autores e outros pesquisadores de interesse comum.

Referências Bibliográficas

1. O'Gorman MR. Isotype controls - Time to Let Go? Communications in Clinical Cytometry. 1999;38:78-80.
2. Keeney M, Gratama JW, Chin-Yee IH, Sutherland DR. Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34 stem and progenitor cells by flow cytometry - Time to Let Go! Communications in Clinical Cytometry. 1998;34:280-3.
3. Sreena JJ, Tbakhi A, Edinger MG, Tubbs RR. The use of isotypic control antibodies in the analysis of CD3+ and CD3+, CD4+ lymphocyte subsets by flow cytometry. Are they really necessary? Arch Pathol Lab Med. 1997;121:118-21.

Avaliação: O tema abordado foi sugerido e avaliado pelo editor
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 03/12/2007

Aceito: 03/12/2007

Pesquisadora HC-FMUSP.

Correspondência: Juliana Pereira
Alameda Franca, nº 1560, apto 24 – Jardim Paulista
01422-001 – São Paulo-SP – Brasil
Tel.: (11) 3061-5544
E-mail: drajulianapereira@uol.com.br
