|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | <https://eventos.utfpr.edu.br//sei/sei2017> |
|  |  | Abordagem molecular da Doença de Huntington  RESUMO |
| Paulo Henrique Claudino  claudinop05@gmail.com  Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil  Lucimara Ascari Barboza  luascaribarboza@gmail.com  Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil  Nédia de Castilhos Ghisi (orientador)  nediaghisi@gmail.com  Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil |  | O presente trabalho teve como objetivo fornecer alternativas de diagnóstico e embasamento para aconselhamento genético envolvendo a Doença de Huntington (HD), tendo em vista que é uma doença autossômica dominante, fatal e sem tratamento eficiente disponível na rede pública de saúde. As amostras utilizadas nos estudos foram colhidas de quatro participantes voluntários pertencentes a uma família possuindo histórico de HD, sendo dois homens e duas mulheres, todos maiores de dezoito anos. As etapas laboratoriais envolveram amplificação do gene de interesse por PCR com *primers* apropriados e corrida eletroforética. O DNA de um indivíduo diagnosticado com HD foi usado como padrão para avaliar a situação dos demais, comparando o número de pares de bases de cada um. Além disso, trabalho de cunho educativo/social foi realizado para esclarecer dúvidas sobre a doença. Ao fim da metodologia, a corrida eletroforética revelou padrões entre os indivíduos que se relacionavam ao número de pares de bases, e estes por sua vez, à manifestação ou não dos sintomas da HD. Concluiu-se então que as ferramentas de Biologia Molecular mostraram-se grandes aliadas no diagnóstico da HD e podem representar novas chances para inovações e atenção por parte do sistema de saúde pública no que se refere às doenças genéticas em geral. Os benefícios em sua utilização são inclusive de ordem financeira, já que os diagnósticos mais rotineiros envolvem uma série de exames custosos, o que pode ser atenuado ou revertido por práticas laboratoriais.  PALAVRAS-CHAVE: Huntingtina. Diagnóstico molecular. Aconselhamento genético. |

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o aconselhamento genético tem como objetivo prestar esclarecimento sobre genótipos que poderiam causar problemas aos indivíduos que os portam (GROSSI et al., 2009). Ao longo das gerações de uma família, pode-se acompanhar o curso das doenças genéticas, bem como incentivar atitudes ideais frente à situação. Porém, tal processo é demorado e depende de uma equipe multidisciplinar de profissionais para atuar desde o diagnóstico, até o tratamento, mesmo que paliativo, de cada caso. Dessa maneira, o aconselhamento genético acontece de uma forma mais educativa do que generalizada, se encarado do ponto de vista médico (GROSSI et al., 2009).

Não diferente da escala global, o Brasil passa por momentos de incertezas em relação às respostas governamentais para questões relativas à saúde e educação, atingindo por consequência políticas públicas voltadas para as doenças genéticas, as quais são muitas vezes consideradas ineficazes ou insuficientes frente à realidade enfrentada pelo país. Segundo dados do próprio Sistema de Saúde, 5% dos nascidos vivos apresentam alguma alteração congênita resultante de problemas hereditários, o que por si só já representa certa significância. Entretanto é importante ressaltar que esse panorama é traçado sem levar em conta manifestações tardias de males da mesma natureza, o que agravaria ainda mais a situação (HOROVITZ et al., 2006).

As dificuldades enfrentadas na administração das doenças genéticas são ampliadas em casos, não raros, em que nem mesmo os médicos das imediações estão preparados para lidar com tal cenário. Um grande exemplo é a região Sudoeste do Paraná. No local já foram diagnosticadas doenças como a Doença de Huntington, a Síndrome de Marfan, Acondroplasia, entre outras. Além da baixa renda, a pouca escolaridade da maioria dos habitantes, aliadas à falta de recursos para saúde pública, torna difícil a gestão dos sintomas e consequências dessas doenças. Comumente, famílias que possuem membros afetados, têm de se deslocar até a capital do estado, Curitiba, em busca de apoio, implicando em gastos e sofrimentos que seriam por pressuposto desnecessários, tendo em vista que o direito a atendimento previsto pelo Sistema Único de Saúde (SUS) estaria assegurado.

1.1 DOENÇA DE HUNTINGTON (HD)

A Doença de Huntington (HD) em específico, mostra-se de difícil diagnóstico e afeta indivíduos a ponto de leva-los à morte, assim reivindicando maior atenção na área do aconselhamento genético. Esta patologia se caracteriza pelo quadro neurodegenerativo enfrentado pelo paciente, que acaba levando a sintomas como a perda da coordenação motora, o declínio cognitivo e a demência progressiva. A HD foi descrita em 1872 por George Huntington, e os avanços nos estudos sobre a doença permitiram identificar seu perfil genético e bioquímico, proporcionando um maior entendimento sobre sua atuação no organismo de indivíduos afetados (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011).

Hoje se sabe que os pacientes possuem expansões na trinca CAG (Citosina-Adenina-Guanina) no gene IT15, o que provoca produção anormal da proteína Huntingtina, motivo pelo qual a degeneração do sistema nervoso acontece. A HD também se caracteriza por ser autossômica dominante com penetrância completa, o que torna ainda mais propício o seu alastramento por famílias portadoras do gene (GONÇALVES, 2013).

Assim, este projeto teve como objetivo propiciar um diagnóstico mais preciso e padronizado utilizando as ferramentas de Biologia Molecular, para evitar esforços dispendiosos por parte da família afetada e trazer à sociedade novas chances de acesso à saúde sem grandes dificuldades.

2 MÉTODOS

Por envolver pesquisa com seres humanos, o projeto foi previamente submetido à avaliação do comitê de ética responsável a nível institucional (CEP- Comitê de ética em Pesquisa - UTFPR) e também Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o protocolo de n° CAAE 48185515.7.0000. 5547. O material utilizado foi coletado em Dois Vizinhos – PR e os procedimentos científicos que se seguiam foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UTFPR.

Os indivíduos envolvidos na pesquisa foram visitados com o intuito de verificar a viabilidade do projeto bem como para promover a elucidação de dúvidas que estes pudessem ter à cerca da Doença de Huntington. Tratavam-se de quatro pessoas (dois homens e duas mulheres), todos maiores de dezoito anos e obviamente, pertencentes à mesma família com parentesco direto com alguém que possuía a doença. É importante salientar que muitas das pessoas desta família possuem baixa escolaridade e origem humilde, o que torna especialmente trabalhoso o esclarecimento da situação e o desenrolar da problemática envolvida.

Durante a visita aos participantes, os objetivos e procedimentos foram explanados de maneira simples para que houvesse entendimento por parte de todos. A partir de informações levantadas foi possível montar o heredograma da família e assim determinar como a doença foi transmitida ao longo das gerações.

Ao longo do projeto também foi realizado um trabalho de cunho social, para que os conhecimentos dos cidadãos em geral fossem avaliados e ampliados em relação à doença, visto que é um mal pouco conhecido pela imensa maioria da população. O último passo antes da etapa prática em si, foi a autorização para pesquisa por parte dos indivíduos que doariam as amostras, sendo que esta foi explicitada a partir do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi assinado por todos os participantes da pesquisa.

As amostras foram obtidas por saliva que foi coletada com um cotonete estéril. Uma paciente com um caso clinicamente avançado de HD teve seu DNA definido como um padrão positivo para a doença, para que assim fosse possível lançar um parecer sobre a situação dos demais indivíduos.

O DNA genômico foi extraído com um kit/protocolo *Promega*® e a quantificação de material foi feita através de uma eletroforese com gel de agarose 1% e posterior visualização sob luz UV. A partir desse ponto foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (GRIFFITHS, 2009). Às amostras foram acrescidos os seguintes *primers*: *primer* n°1 (r): 5’-ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TCC-3’ e *primer* n°2 (f): 5’- CAG CAG CGG CTG TGC CTG -3’.

O volume total utilizado na PCR em cada microtubo foi de 50 µL, sendo que este conteúdo foi obtido através dos seguintes constituintes: 5 µL de DNA genômico, 0,5 µL de cada *primer,* 4 µL de dNTP, 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 1,5 µL de solução de MgCl2, 5 µL de tampão para PCR e por fim 33 µL de água miliQ. Os reagentes utilizados foram da marca *Ludwig Biotech*® (CULJKOVIC, 1997).

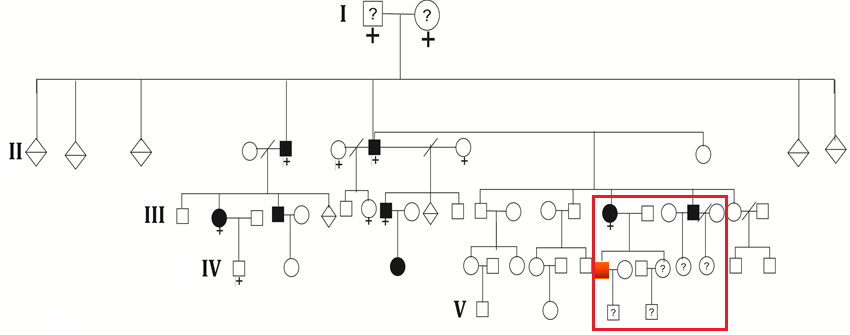
Após terem sido condicionadas, as amostras foram dispostas em um termociclador Amplitherm 95x, com programação obedecendo às seguintes etapas: Desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, e posterior a isso, 35 ciclos de: 94°C por um minuto, 60°C por um minuto, 72°C por três minutos com uma extensão final de 72°C por 10 minutos, com repouso de 30 minutos a 20°C. Foram retiradas alíquotas de 5 µL (em duplicata) de cada amostra, e estas foram então utilizadas na eletroforese. Cada amostra recebeu 1 µL de *DNA* *loading buffer* e 2 µL de GelRed® (corante). A corrida eletroforética se deu com a pipetagem desse montante em um gel de agarose 2% com uma corrente de 106 V durante 40 minutos. Posteriormente o gel foi levado até um transiluminador onde foi visualizado e fotografado.

O resultado obtido na eletroforese foi comparado com o padrão (*ladder*) para que houvesse a estimativa do tamanho das bandas moleculares e seus respectivos pesos. De acordo com as informações levantadas a partir da bibliografia consideram-se alelos normais àqueles que possuem 11 a 34 repetições da trinca dos nucleotídeos CAG (142 até 211 pares de base). Alelos da doença HD são aqueles que apresentam de 39 a 121 repetições da trinca CAG (de 226 até 472 pares de bases).

**3 RESULTADOS**

Através de conversas e entrevistas coma família, foi possível obter o heredograma, como apresentado na figura 1.

Figura 1- Heredograma da família participante. Nota: Probando é o indivíduo e particular interessado no aconselhamento genético. O quadro vermelho apresenta os indivíduos entrevistados.





Fonte: Obtida pelas informações levantadas com a família.

No estudo foi possível perceber que a doença já está presente há quatro gerações, tendo um número considerável de casos em cada uma. Na I geração estão presentes os tataravôs do probando, porém ninguém soube informar qual deles era portador da doença. O casal teve sete filhos, formando a geração II, sendo que dois morreram em decorrência da doença. O primeiro filho afetado da geração II casou-se com uma pessoa normal e teve quatro filhos, onde dois portavam a doença e já faleceram. O segundo filho afetado da geração II (avô do probando) teve três relacionamentos gerando 10 filhos, sendo que três eram afetados, incluindo a mãe do probando que veio a falecer. Dessa forma uma das metas dessa iniciativa foi avaliar a presença dos trechos responsáveis pela HD nos membros da IV e V geração.

O protocolo para realizar o diagnóstico foi o de Culjkovic e cols. (1997). Segundo este, os produtos da PCR com tamanho entre 226 e 472 pares de bases (39 a 121 repetições de CAG) são indicativos para considerar o indivíduo portador da Doença de Huntington, sendo que tamanhos moleculares menores indicam o oposto. O diagnóstico por PCR é provavelmente um dos meios mais eficientes de se confirmar a condição genética de indivíduos neste, e em outros casos de doenças relacionadas a mutações e sequências conhecidas. É claro, desde que haja uma amplificação correta e eficiente do trecho de DNA que se tem interesse no momento.

Por meio de uma eletroforese, feita a partir do material que provinha da paciente definida como padrão, pôde-se observar que bandas que representavam os trechos de DNA amplificados se encontravam em regiões correspondentes a 300 pares de bases do *Ladder*, o que corrobora com o diagnóstico positivo da doença. Já em comparação com outros familiares, é improvável que estes sejam portadores da doença, pois apresentaram cerca de 100 pares de bases cada um. Entretanto, um dos indivíduos possui bandas em uma região que compreende de 100 a 200 pares de bases em relação ao *Ladder*, o que pode indicar o aparecimento de sintomas ao longo do tempo, porém, num grau menor do que pacientes clinicamente afetados, pois quanto maior o número de repetições, mais severa é a condição resultante (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011).

4 CONCLUSÃO

Com a coleta de dados potencialmente úteis sobre a situação, é possível vislumbrar inovações no modelo de saúde da Região Sudoeste do Paraná, já que na atualidade serviços como diagnósticos moleculares e aconselhamento genético não são disponibilizados à população. Mudanças nesses aspectos são fundamentais, tendo em vista que ações coniventes raramente são postas em prática, apesar de existirem políticas de integração entre o SUS e projetos de atenção genética. A combinação da ineficiência da saúde pública com a falta de informação e o mau planejamento familiar acabam favorecendo o aparecimento de doenças genéticas na população.

As metodologias modernas permitem além de encaminhar famílias para tratamentos precoces, evitar novos casos da HD (e outras doenças) através do diagnóstico acompanhado do planejamento familiar adequado. No caso associado ao projeto, cada participante recebeu esclarecimentos referentes aos resultados obtidos, e o indivíduo que aparentemente pode vir a apresentar os sintomas foi orientado a procurar um profissional de psicologia, bem como um laboratório especializado na área. Outros participantes também foram convidados a fazer o mesmo se assim o quiserem.

Página | 21

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | Molecular approach of the Huntington’s Disease |
|  |  | ABSTRACT  This researsch provided diagnosis alternatives and theorical background for genetic counseling involving the Huntington’s Disease, whereas this is a dominant autosomal, mortal illness with no efficient treatment available in the public health system.The samples were taken from volunteers who belong to a family with historical occurrence of the disease. The laboratory phases involved PCR with appropriated primers and electrophoresis. The DNA of an affected individual was used as a standard to evaluate the situation of the others comparing their respective number of bases pairs. Besides it, a service with educational characteristics was made to elucidate questions about the disease. At the end of the metodology , the electrophoresis indicated particular standards between the individuals that were related to their number of bases pairs, and consequently to the expression of the symptoms. It was possible to conclude that Molecular Biology techniques have shown themselves as great allied for the HD diagnosis, as well as new chances for innovations and attention from public health services in areas like genetics and ills related to it.  KEYWORDS: Huntingtin. Molecular diagnosis. Genetic counseling. |

Página | 22

AGRADECIMENTOS

À UTFPR pela concessão da bolsa referente ao projeto.

REFERÊNCIAS

CULJKOVIĆ, B.; RUŽDIJIĆA, S.; RAKIĆ, L.; ROMAC, S.Improved polymerase chain reaction conditions for quick diagnostics of Huntington disease. **Brain Research Protocol**, v. 2, p.44–46, 1997.

GIL-MOHAPEL , M. J; REGO, A. C.DOENÇA DE HUNTINGTON: UMA REVISÃO DOS ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, v. 4, 2011. Trimestral. Disponível em:< http://www.revistaneurociencias.com.br/edicoes/2011/RN1904/revisao 19 04/595 revisao.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2017.

GONÇALVES, N. F.C. **Doença de Huntington: Uma revisão.**2013. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/cpu/Downloads/a21264\_5019pdf.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2017.

GRIFFITHS, Anthony. Introdução à Genética. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009

GROSSI, R. et al. SERVIÇOS DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO: UM PANORAMA NACIONAL. In: CONGRESSO BRASILEIRO MULTIDISCIPLINAR DE EDUCAÇÃO ESPECIAL, 5, 2009, Londrina. **Anais... .**Londrina: UEL, 2009. p. 2736 - 2743. Disponível em: <http://www.uel.br/eventos/congressomultidisciplinar/pages/arquivos/anais/2009/327.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2017.

HOROVITZ, D. D. G. et al. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: características do atendimento e propostas para formulação de políticas públicas em genética clínica. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 22, n. 12, p.2599-2609, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2006001200010.

|  |
| --- |
| Recebido: 01 set. 2017.  Aprovado:.16 out. 2017  Como citar:  CLAUDINO, P. H. et al. Abordagem molecular da Doença de Huntington. In: SEMINÁRIO DE EXTENSÃO E INOVAÇÃO DA UTFPR, 7., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos 7º SEI.** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <[https://eventos.utfpr.edu.br/ //sei/sei2017/1484](https://eventos.utfpr.edu.br/%20//sei/sei2017/3744)>. Acesso em: 16/10/2017.  Correspondência:  Paulo Henrique Claudino  Rua João Dalpasquale, número 105, Centro Norte, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.  Direito autoral:  Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional.  Licença Creative Commons |