

Análise molecular para diagnóstico de doenças genéticas no sudoeste do Paraná

RESUMO

Lucimara Ascari Barboza
luascaribarboza@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil.

Paulo Henrique Claudino
claudinop05@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil.

Nédia de Castilho Ghisi
nediaghisi@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná,
Brasil.

OBJETIVO: Este estudo teve como objetivo realizar a padronização de um protocolo para diagnóstico molecular da Doença de Huntington (HD), estabelecendo um padrão através de uma paciente com caso clinicamente confirmado da doença e seguindo os mesmos parâmetros para outros familiares. **MÉTODOS:** Amostras de saliva foram coletadas com cotonete estéril; o DNA foi extraído e posteriormente realizou-se a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) com protocolos diferentes, mas com *primer* específico para a doença. Realizou-se a corrida de eletroforese para quantificação do tamanho do gene na paciente. As bandas foram comparadas com um padrão (*ladder*). **RESULTADOS:** De Porte dos resultados pode ser confirmado que a paciente possui a HD pelo fato de possuir mais de 300 pb de repetições da sequência CAG responsável pela mutação. Quando analisado os DNAs de seus familiares, três apresentam alelos considerados normais. No entanto um dos voluntários demonstrou possuir mais de 100 pares de base, porém menos de 200pb. Todavia não se pode afirmar que os indivíduos é portador para a doença HD. No entanto, de acordo com a literatura há chances de apresentar sintomas clínicos leves em relação a paciente confirmada com a doença. **CONCLUSÕES:** Após todos os procedimentos realizados e um padrão estabelecido foi possível observar que o método de Čuljković e cols (1997) é o melhor a ser aplicado.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Huntington. Mutação Autossômica. Proteína Alterada.

INTRODUÇÃO

A doença de Huntington (HD) é um distúrbio genético neuro-degenerativo autossômico dominante caracterizado pelo surgimento gradual e progressão da deficiência motora, déficits neurocognitivos e sintomas psiquiátricos. (BORA et al. 2016). Uma porção significativa de pacientes exibem sintomas psiquiátricos que podem passar despercebidos e serem tratados inadequadamente. No intervalo entre o início dos sintomas e o tratamento é comum a depressão, o que pode ser perigoso devido ao risco de comportamento suicida nos afetados. Por isso a necessidade de detecção precoce eficaz e rápida no tratamento de sintomas psiquiátricos em HD (CUSIN et al. 2013).

A HD é causada pela expansão de CAG (Citosina, Adenina, Guanina)- no gene IT15 no braço curto do cromossomo 4, e o número de repetições está correlacionado com a idade de início dos sintomas. Quanto maior o número de cópias, mais graves são os sintomas da doença, e mais cedo eles começam geralmente se iniciando entre os 30 a 50 anos e terminando em morte de 10 a 15 anos após o diagnóstico (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Essa expansão resulta em uma proteína funcional alterada responsável pela degeneração cérebro.

A síndrome foi descrita por George Huntington em 1872. Tem uma incidência estimada de 5 a 10 casos por 10.000 indivíduos. As pessoas com HD sofrem degeneração progressiva do sistema nervoso central, que está correlacionada com o número de cópias da trinca. Como o distúrbio é causado por uma mutação dominante, cada filho de um paciente heterozigoto para HD tem uma chance de 50% de ser afetado. O fato da idade de descoberta da doença ser relativamente tardia faz com que a maior parte das pessoas já tenha filhos nesta época.

O presente estudo teve como objetivo, realizar o diagnóstico molecular para familiares tendo como base um caso relatado e clinicamente confirmado de HD no sudoeste do Paraná.

MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres humanos da UTFPR (CEP-UTFPR) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), com o protocolo de nº CAAE 48185515.7.0000. 5547. As coletas dos materiais celulares foram realizadas na cidade de Dois Vizinhos – PR. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da UTFPR. Procederam-se visitas para orientar e verificar a viabilidade de realização e participação das famílias do paciente com diagnóstico para HD no experimento. Para confirmar a participação dos envolvidos, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os voluntários da pesquisa. Em seguida com a ajuda dos participantes foi possível montar o Heredograma com a história da família, ajudando a entender a transmissão da doença através as gerações.

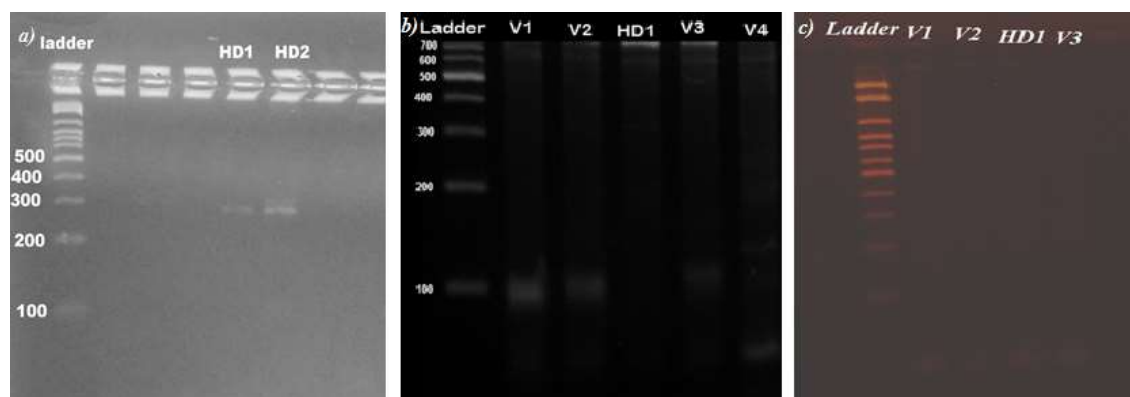
Amostras de saliva foram coletadas com cotonete estéril. Para extrair o DNA, foi utilizando o protocolo do *kit Promega®*. Procedeu-se a quantificação do DNA através da eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo e analisado sob luz ultravioleta. Realizou-se a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) *primer* específico para a doença. Através de PCR foi amplificado exclusivamente o gene da HD. Os primers utilizados na solução de PCR foram os seguintes: *primer* (r) 5'-ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TCC-3'; e *primer* (f) 5' GGC GGT GGC GGC TGC CTG TGC TGC TGC TGC-3'. As condições exatas foram as seguintes: para reações de PCR num volume final de 29,2 µl, adicionou-se 5 µl de DNA genômico isolado a partir de células de mucosa oral, 1µL de cada primer (10mM), 1µL de dNTP mix, 0,2µL Taq DNA polimerase Platinun (Invitrogen®), 0,75µL MgCl₂ (1,5 mM), 2,5µL de tampão de PCR e completou-se com 17,75µL de água miliQ. As amostras foram acondicionadas em termociclador Amplitherm 95X, com teste de dois programas diferentes. No primeiro teste: 94°C por 3 min, seguidos de 39 ciclos de: 94°C por 30 s, 55°C por 1 min, 72°C por 45 s, e extensão final de 72°C por 10 min (descrito por Čuljković et al., 1997). E no segundo teste: 94°C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 3 min, e extensão final de 72°C por 10 min (descrito por Warner et al., 1993).

As amostras foram pipetadas em um gel de agarose 4%, realizando-se a corrida de eletroforese durante 40 min a 120 V. Logo após os produtos de PCR foram visualizados em um transiluminador sob luz UV a um comprimento de onda de 254 nm e fotografado. As bandas foram comparadas com um padrão (*Ladder*) para estimativa do tamanho das bandas em pares de bases.

RESULTADOS

A Fig. 1a) representa as bandas genéticas de DNA, onde HD1 e HD2 são o DNA da pessoa com diagnóstico médico comprovado para HD, possuindo em torno de 300 pares de bases o que indica que este paciente é portador da doença. Tanto nas letras a-c os *primers* foram utilizados os mesmos Já os Protocolos de PCR foram utilizados os de Čuljković e cols.(1997). Nas letras a) e b). Utilizou-se o protocolo de Warner et al.(1993) para figura representada pela letra c).

Figura 1 - a) Resultado obtido para o paciente clinicamente confirmado com HD. b) Familiares do paciente com HD. V1-V4: familiares. c): Familiares do paciente com HD. V1-V4: familiares.



Fonte: Autoria própria(2017)

DISCUSSÃO

Nossa metodologia de avaliação da doença se baseia nos trabalhos de Čuljković et al. (1997) e Warner et al. (1993). Assim, consideramos alelos normais aqueles 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 de CAG (de 226 até 472 pares de bases). Esta condição resultou na amplificação específica e eficiente do trecho CAG no gene IT15

Ao realizar a comparação genética dos familiares, verifica-se que indivíduos V1, V2, V3 (Fig. 1.b) não são portadores da doença, pois possuem cerca de 100 pares de base. V4 possui mais de 100 pares de base, porém menos de 200pb. Todavia não se pode afirmar que os indivíduos V4 é portador para a doença HD. No entanto, de acordo com a literatura há chances de apresentar sintomas clínicos leves em relação a pacientes confirmados HD, pois quanto maior o número de cópias de CAG presentes, mais graves são os sintomas da doença. Como descrito nos procedimentos foram utilizados de métodos diferentes, tendo algumas mudanças nas temperaturas e tempos das PCR's. Essas diferenças nós permitiram perceber que as temperaturas maiores dão um resultado de maior precisão como podemos ver nas (Fig. 1a e Fig. 1b), onde o DNA aparece bem nítido. Nos resultados dos experimentos mostrados nas (fig. 1c) foram utilizadas de temperaturas maiores e não apresentou amplificação do DNA, apenas o percurso feito por ele durante a corrida da eletroforese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após todos os procedimentos realizados e um padrão estabelecido foi possível observar que o método de Čuljković et al. (1997) é o melhor a ser aplicado. Quanto ao método de Warner et al. (1993) não possibilitaram resultado de boa qualidade. Os participantes foram convidados para um esclarecimento sobre os resultados obtidos. Assim, pode-se orientar sobre o tratamento e ajuda junto a entidade e profissionais com conhecimento sobre o assunto.

Molecular analysis for the diagnosis of genetic diseases in southwestern Paraná

ABSTRACT

OBJECTIVE: This study aimed to standardize a protocol for molecular diagnosis of Huntington's Disease (HD), establishing a pattern through a patient with a clinically confirmed case of the disease and following the same parameters for other relatives.

METHODS: Saliva samples were collected with sterile swab; The DNA was extracted and subsequently the PCR (Polymerase Chain Reaction) with different protocols, but with primer specific for the disease was carried out. The electrophoresis run was performed for quantification of the gene size in the patient. The bands were compared to a ladder.

RESULTS: De Porte's results can be confirmed that the patient has the HD because she possesses more than 300 bp of repetitions of the CAG sequence responsible for the mutation. When analyzed the DNAs of their relatives, three present alleles considered normal. However one of the volunteers has shown to have more than 100 base pairs, but less than 200bp. However it can not be said that individuals are carriers for HD disease. However, according to the literature there are chances to present mild clinical symptoms in relation to the patient confirmed with the disease. **CONCLUSIONS:** After all the procedures performed and an established standard it was possible to observe that the method of Čuljković et al (1997) is the best one to be applied.

KEYWORDS: Huntington's disease. Autosomal Mutation. Altered Protein.

REFERÊNCIAS

BORA, E.; VELAKOULIS, D.; WALTERFANG, M. Social cognition in Huntington's disease: A meta-analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 297, p. 131–140, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.001>>. Acesso em : 24 jul. 2017.

ČULJKOVIĆ, B.; RUŽDIJIĆ, S.; RAKIĆ, L.; ROMAC, S. Improved polymerase chain reaction conditions for quick diagnostics of Huntington disease. **Brain Research Protocols**, v. 2, n. 1, p. 44–46, 1997.

CUSIN, C.; FRANCO, F. B.; FERNANDEZ-ROBLES, C.; DUBOIS, C. M.; WELCH, C. A. Rapid improvement of depression and psychotic symptoms in Huntington's disease: A retrospective chart review of seven patients treated with electroconvulsive therapy. **General Hospital Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 678.e3-678.e5, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2013.01.015>>. Acesso em : 27 Out. 2015.

SNUSTAD, Peter D.; SIMMONS Michael J. **Fundamentos da Genética**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WARNER, J. P.; BARRON, L. H.; BROCK, D. J. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. **Molecular and cellular probes**, 1993.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar: BARBOZA, A. L. et al. Análise molecular para diagnóstico de doenças genéticas no sudoeste do Paraná: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. Anais eletrônicos... Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em:

<<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>> Acesso em: 22 de Ago. 2017.

Correspondência:

Lucimara Ascari Barboza

Rua Araucária, 64, São Francisco de Assis, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

