

DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA C POR PCR-AE EM PACIENTES DO LABORATÓRIO CLÍNICO DA PUC GOIÁS*

JULIANA LIMA MARANHÃO SÁ, RHAYSSA CARVALHO VILELA,
MARIANA SCHWENGBER RABELO, KATIA KARINA VEROLLI DE
O. MOURA, KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA

Resumo: hemoglobinopatias é o nome dado aos grupos de doenças autossômicas recessivas que compreendem as talassemias, doença falciforme, hemoglobinas instáveis e hemoglobinas variantes com alterações funcionais. Utilizando a técnica de Reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR alelo específica) foi encontrado, nos pacientes atendidos no laboratório clínico da PUC Goiás, tendo como resultado 1% tem heterozigose da Hemoglobina C.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias. Hemoglobinas variantes. Hemoglobina C e PCR.

As hemoglobinopatias são decorrentes de mutações nos genes que codificam as cadeias globínicas dando origem a alterações estruturais na molécula de hemoglobina formando hemoglobinas anômalas ou variantes. A consequência dessa falha de produção é a de, provocar deficiência de hemoglobinizacão e os eritrócitos apresentam-se microcíticos e hipocrômicos. Dessa forma, a heterogeneidade genética e, conseqüentemente, a miscigenação progressiva da população brasileira, facilitam a propagação e a interação entre os vários tipos de hemoglobinas variantes descritas (MELO-REIS, 2004).

Com o estudo e a sua correta identificação e classificação as hemoglobinas variantes têm grande importância nas áreas médica, genética e bioquímica. Com o grande avanço do estudo na genética humana sobre as alterações que originam doenças hereditárias, vão surgindo métodos e estratégias para a descoberta dessas hemoglobinas variantes (LEONELI et al., 2000).

Embora existam centenas de hemoglobinopatias hereditárias, apenas três delas exigem a implantação de programas de saúde pública no Brasil: a hemoglobina S, a hemoglobina C e a talassemia beta. Foram descritas mais de 1.200 mutações nos genes dessas cadeias. Dentre essas, uma das mais

frequentes e clinicamente significantes, na qual é o nosso estudo, é a hemoglobina variante estrutural C (GARANITO, 2008).

Segundo dados da OMS (Organização Mundial da Saúde), no entanto, essas três hemoglobinopatias são suficientes para causar um alto grau de morbidade e mortalidade no Brasil (RAMALHO et al., 1999). Dependendo da região estudada, pode variar a frequência das hemoglobinopatias, devido à história de povoação do Brasil.

Entre as doenças genéticas, as hemoglobinopatias são as mais frequentes na população. De acordo com a OMS, estima-se que mais de 5% da população mundial seja portadora de algum tipo de hemoglobinopatia (ALMEIDA-SOBRINHO et al., 2011).

Estudos realizados em populações brasileiras revelaram a possibilidade de que, existam hoje no Brasil aproximadamente 10 milhões de pessoas portadoras de hemoglobinas anormais (DUCATTI et al., 2001; MELO-REIS et al., 2006; LISOT; SILVA, 2004).

A formação do povo goiano também teve, por sua vez, a contribuição de diferentes etnias. A partir de 1726 começou o povoamento de Goiás, que se intensificou durante o período do Ciclo do Ouro, na era colonial. Inicialmente vieram os portugueses e os escravos africanos, favorecendo a mestiçagem entre eles. Posteriormente ocorreram as migrações internas oriundas dos estados vizinhos e outros povos, que ocorreram de forma aleatória e sem controle da entrada e saída (MELO-REIS et al., 2006). Segundo MELO-REIS et al. (2006) a segunda hemoglobina variante mais prevalente foi a hemoglobina C representada por 1% da população estudada.

HEMOGLOBINA C

A hemoglobina C, é uma proteína de populações procedente do Oeste da África, dispersou-se pelo mundo da mesma forma que a hemoglobina S, e está amplamente distribuída (NAOUM, 2007). A hemoglobina C consiste na expressão do gene da globina beta no códon 6 (GAG-AAG), resultando na substituição do sexto aminoácido da cadeia beta da hemoglobina humana, o ácido glutâmico, pelo aminoácido lisina, resultando numa alteração na estrutura da hemoglobina (ORLANDO et al., 2000).

A hemoglobina C tem a propriedade de alterar a troca de íons pela membrana da hemácia e alterar sua forma, cristalizando e precipitando dentro do eritrócito. No esfregaço sanguíneo são visualizadas hemácias em alvo, microcitose, hipocromia e esferócitos (ANGULO et al., 2009).

Os indivíduos heterozigotos para estas hemoglobinas anormais, ou seja, portadores de um único gene afetado são chamados de traço C (AC) e caracterizam-se por níveis de Hb C, na eletroforese de hemoglobina, inferiores a 50% (GARANITO, 2008). Quando em heterozigose, são assintomáticos, não desenvolvendo a doença e muitas vezes desconhecem sua condição (ORLANDO et al., 2000).

A hemoglobina C pode ser detectada por causa da migração lenta na eletroforese alcalina em acetato de celulose, consequência da substituição dos aminoácidos, não se separando da fração A2 (Hb A2). No entanto, pode ser separada na eletroforese ácida e na focalização isoeletrica. A cromatografia de alto desempenho (HPLC) separa completamente as frações das hemoglobinas C e A2, permitindo caracterizar a presença da interação com talassemia beta (ÂNGULO et al., 2009).

Devido à heterogeneidade clínica dessas alterações genéticas, é fundamental estabelecer a investigação laboratorial das diferentes formas de hemoglobinas variantes e de talassemias (NAOUM, 2007). Cabe ressaltar a importância do diagnóstico laboratorial precoce destas patologias, evitando as consequências piores da doença. O estudo populacional permite o diagnóstico de heterozigotos e o aconselhamento genético fornecendo subsídios para que os indivíduos decidam conscientemente sobre sua prole, além da melhoria na qualidade de vida dos doentes (ORLANDO et al., 2000). As associações de hemoglobinas variantes entre si e com outras formas de hemoglobinas anormais trazem também, uma diversidade de fenótipos e manifestações clínicas, com resposta diferenciada aos tratamentos (NAOUM, 2007).

O objetivo deste estudo foi pesquisar por meio da técnica de PCR-AE (reação em cadeia da polimerase alelo específica) a prevalência de hemoglobina C em pacientes atendidos no Laboratório Clínico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue total com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) de 199 pacientes do Laboratório Clínico da PUC Goiás no período de agosto/2012 a julho/2013, e apenas 25 pacientes foram analisados pelas técnicas moleculares por indicação dos parâmetros do hemograma (RABELO, 2012).

Os critérios de inclusão foram os pacientes encaminhados aos serviços do Laboratório Clínico da PUC Goiás para realização de hemograma, acima de 18 anos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras foram submetidas à extração de DNA com a purificação das mesmas, prosseguindo com as instruções do Kit GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech) e analisadas por eletroforese alcalina em gel de agarose para certificação da integridade do DNA. As reações de PCR-AE para determinação dos alelos A ou S, utilizando 2 tubos para cada amostra de DNA para um volume final de 100 uL de reação, acrescentando 20 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de MgCl₂; 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 mmol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta A-b; no tubo 2 os *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta C-b (BERTHOLO, 2005). O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, acrescida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 65°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final a 65°C por 5 minutos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2%.

RESULTADOS

Na análise molecular a presença da amplificação da banda A foi de 92% (23 casos). Foi observado 8% (2 casos) para hemoglobina C, apresentando banda A e C (heterozigoto). A prevalência encontrada na população estudada foi de 1% (2/199) para Hemoglobina C.

Tabela 1: Análise de perfil molecular (PCR-AE)

GENÓTIPO	AA	AC	CC	TOTAL
CASOS	23	02	0	25
%	92	08	0	100

DISCUSSÃO

A prática das aplicações das técnicas de PCR e suas derivadas em diagnósticos moleculares tem se mostrado de grande efetividade, especialmente no diagnóstico de doenças, pois ele ocorrendo precocemente se torna crucial no sucesso do tratamento (NAOUM, 2007).

Segundo MELO-REIS (2006), foi realizado um estudo com 404 amostras de sangue de alunos de diversos cursos da Universidade Católica de Goiás, oriundos de 55 cidades do estado de Goiás, onde 1% (4) das amostras apresentaram genótipo AC.

Também em outro estudo pelo grupo de MELO (2000) em 23.981 doadores de sangue de Uberlândia, Minas Gerais, e cidades subjacentes, os autores encontraram 3,42% (820) portadores de hemoglobinopatias, e dentre eles 0,73% (6) com genótipo AC. Na Universidade Estadual de São Paulo, de São José do Rio Preto, por ORLANDO (2000), das 262 amostras testadas em doadores de sangue, 4,96% (13) apresentaram hemoglobinas anormais, dentre, 1,14% (3) com Hb AC.

Assim como o relatado por DOMINGUEZ (2013), em populações localizadas nos rios Cayapas e Onzoles na Província de Esmeraldas no Equador, 22% das hemoglobinas variantes foram observadas no seu estudo com 114 amostras analisadas, com resultados de 1% (2) de Hb AC. Em Ouro Preto, segundo NICOLATO (2010), no período de agosto de 2008 a setembro de 2010, foram triados 943 pacientes tendo prevalência de variantes estruturais de hemoglobina em 6,6% (62), sendo 1,59% (1) para o genótipo AC. Todos estes relatos são semelhantes a prevalência de Hemoglobina C encontrado em nosso estudo, ou seja, em torno de 1%.

Entretanto, outros relatos de prevalência são diferentes do encontrado em nosso grupo populacional. De acordo com MENDONÇA (2010), no período de 10/04/2006 a 10/03/2010 no Rio de Janeiro, foi feita uma análise de HPCL em 42.798 amostras, e dentre elas 0,05 % (23) com genótipo AC. Em Caxias do Sul segundo LISOT (2004), aproximadamente 9.000 pessoas doaram sangue entre abril e dezembro de 2001. Dentre essas, 864 foram randomicamente selecionadas, e 70,40% aceitaram participar do estudo. Na população do estudo, foram encontrados 11,68% (71) indivíduos afetados, desses, 0,16% (1) apresentaram genótipo AC. No Rio Grande do Norte, de acordo com LISOT (2004), foram estudados 630 doadores do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, e os autores encontraram 2,38% (15) indivíduos com hemoglobinas anormais; a prevalência do genótipo AC foi detectado apenas em um indivíduo, gerando uma prevalência em torno de 0,16%.

Provavelmente esta diferença está relacionada aos povos imigrantes nestas regiões.

Tendo em vista os estudos feitos, a prevalência das hemoglobinopatias na população varia de uma região brasileira para outra, pois está fortemente ligada ao processo de formação populacional. Vários povos de diferentes etnias imigraram para o Brasil, o que ocasionou uma grande miscigenação da população, acontecimento que certamente influencia a diferença de prevalência de hemoglobinas variantes nas diversas regiões do país. Da mesma maneira, a formação do povo goiano também teve a contribuição de diferentes etnias (ORLANDO et al., 2000).

CONCLUSÃO

As hemoglobinopatias estão entre as doenças mais habitualmente encontradas nas populações. Em nosso estudo, 1% da população pesquisada apresentou heterozigose C para hemoglobina. A complexidade de seus processos fisiopatológicos, a seriedade e a diversidade de manifestações clínicas associadas, fazem das hemoglobinopatias um desafio para a medicina e para a ciência. Perante o exposto fica claro que deve ser garantido ao indivíduo o amplo acesso à saúde através de uma política de atenção integral a essas pessoas desde a triagem neonatal até medidas preventivas e tratamento das complicações agudas e crônicas.

DETECTATION OF HEMOGLOBIN C BY PCR-AE IN PATIENTS CLINICAL LABORATORY PUC GOIÁS

Abstract: hemoglobin is the name given to groups of autosomal recessive diseases that include thalassemia, sickle cell disease, unstable hemoglobins and hemoglobin variants with functional changes. Using the technique of reaction polymerase chain specific allele (allele specific PCR) was found in the patients enrolled in the clinical laboratory at PUC Goiás, resulting in 1% have heterozygous hemoglobin C.

Keywords: Hemoglobinopathy. Hemoglobin variants. Hemoglobin C and PCR.

Referências

AGARWAL, A. et al. *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. Blood*, Bethesda, v. 96, n. 7, p. 2358 - 2363, feb./oct. 2000.

ALMEIDA-SOBRINHO, E. F. et al. Manifestações retinianas em pacientes portadores de anemia de células falciformes. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, Belém, v. 70, n. 5, p. 284 -289, dez./ago. 2011.

ÂNGULO, I. L.; PICADO, S. B. Hemoglobina C em homozigose e interação com talassemia beta. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1-5, jan./nov. 2009.

BERTHOLO, L. C. *Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais*. Dissertação (Pós-Graduação em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, São Paulo, 2005.

CASTRO, F. S. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 30, n. 1, p. 24-28, jan./fev. 2008.

DOMINGUEZ, Y. et al. Prevalence of common hemoglobin variants in an afro-descendent Ecuadorian population. *Biomed Central*, v. 4, n. 6, p. 132, nov./abr. 2013.

DUCATTI, R. P. et al. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. São José do Rio Preto, v. 23, n. 1, p. 23-29, jan./abr. 2001.

GARANITO, M. P. Hemoglobinopatias - Interpretação do teste de triagem neonatal. *Pediatria*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 172-176, set./nov. 2008.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 22, n. 3, p. 396 - 403, set./dez. 2000.

LISOT, C. L.; SILLA, L. M. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 20, n.6, p. 1595-1601, nov./dez. 2004.

MELO, S. M. A. et al. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 22, (supl. 51), 2000.

MELO-REIS, P. R. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinopatias variantes no estado de Goiás, Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, p. 425-430, nov./dez. 2006.

MENDONÇA, R. et al. *Prevalência das Hemoglobinopatias em Triagem Neonatal: a experiência do laboratório Sérgio Franco, Rio de Janeiro, Brasil*. Salvador, set./2010. Disponível em: <http://www.sbtn.org.br/anais_evento_2010/trabalhos/triagem/poster/P306.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2014.

NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 226 - 228, jul./set. 2007.

NICOLATO, R. L. *Avaliação da incidência de hemoglobinopatias em pacientes atendidos no laboratório piloto de análises clínicas da escola de farmácia (UFOP)*. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.

ORLANDO, G. M. et al. Diagnóstico Laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 22, n. 2, p. 111-12, fev./jun. 2000.

RABELO, M. S. *Caracterização Molecular de Hemoglobinopatias em Pacientes do Laboratório Clínico da PUC Goiás*. Dissertação (Mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

RAMALHO, A. S. et al. Triagem de Hemoglobinopatias: resposta de uma comunidade brasileira a programas opcionais. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 591-595, jul./set. 1999.

SAKAMOTO, T. M. *Hemoglobinopatias e anemias em gestantes no Hospital Universitário de Campo Grande - MS*. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.

* Recebido em: 15.06.2014. Aprovado em: 23.06.2014

JULIANA LIMA MARANHÃO SÁ

Acadêmica do 9º período do Curso de Biomedicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás). E-mail: jumaranhao31@hotmail.com

RHAYSSA CARVALHO VILELA

Acadêmica do 9º período do Curso de Biomedicina da PUC Goiás. E-mail: rhayssinhavilela@hotmail.com

MARIANA SCHWENGBER RABELO

Biomédica, Mestranda MGENE, PUC Goiás. E-mail: mari_schw@hotmail.com

KATIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA

Biomédica, Professora Dr^a adjunta CBB/PUC Goiás. E-mail: kkverolli@pucgoias.edu.br

KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA

Biomédica, Professora Dr^a adjunta CBB/PUC Goiás. E-mail: karllagreick@yahoo.com.br