

CENTRO UNIVERSITÁRIO TIRADENTES – UNIT
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA EDUARDA LOPES DE MORAES

USO DA TÉCNICA DE PCR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DA DOENÇA DE HUNTINGTON

MACEIÓ - AL
2017

MARIA EDUARDA LOPES DE MORAES

**USO DA TÉCNICA DE PCR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Centro Universitário Tiradentes – UNIT como requisito para obtenção do Grau de Bacharel no curso de Biomedicina. Sob a orientação do Professor Dr. Vitor de Góes Lima Dantas.

**MACEIÓ – AL
2017**

MARIA EDUARDA LOPES DE MORAES

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Data de defesa: 14 de Junho de 2017.

Data da Aprovação: 14 de Junho de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Vitor de Góes Lima Dantas
Orientador

Prof. Dr. Jaim Simões de Oliveira
Avaliador

Prof. MSc. Wendel Alexandre Pinheiro de Almeida
Avaliador

**MACEIÓ – AL
2017**

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DOENÇA DE HUNTINGTON

PCR METHODOLOGY ON HUNTINGTON'S DISEASE MOLECULAR DIAGNOSIS

MARIA EDUARDA LOPES DE MORAES¹
VITOR DE GÓES LIMA DANTAS²

RESUMO

A doença de Huntington é uma patologia de caráter degenerativo e progressivo do sistema nervoso central, com um padrão de herança autossômico dominante de penetrância completa. A perda das células neurais ocorre em um conjunto específico de neurônios localizados nos gânglios basais e no córtex cerebral, ocasionando distúrbios de movimentos, transtornos psiquiátricos e demência. Os indivíduos afetados apresentam a partir de 40 sequências de trinucleotídeos CAG (onde o normal é de até 35 repetições), na posição 5' do gene *IT15* localizado na região cromossômica 4p16.3, resultando no mal funcionamento da proteína huntingtina. O gene *IT15* compreende cerca de 180 kb e contém 67 éxons. A principal metodologia diagnóstica empregada é através da quantificação dos trinucleotídeos CAG. A técnica de PCR é o primeiro passo para a realização do diagnóstico molecular. Esse método é extremamente sensível, uma vez que o produto da separação e hibridização é comparado a sequências controle positivo e negativo possibilitando o diagnóstico diferencial da quantidade de repetições mesmo com uma repetição de diferença.

Palavras chave: Doença de Huntington, diagnóstico molecular da DH, técnica de PCR no diagnóstico de Huntington.

¹Graduanda do Curso Bacharel em Biomedicina do Centro Universitário Tiradentes – UNIT/Maceió – AL, e-mail: eduardamoraes_biomedicina@hotmail.com

²Orientador Dr. Vítor de Góes Lima Dantas – professor titular I, Centro Universitário Tiradentes – UNIT/Maceió – Al. vitorgldantas1983@gmail.com

ABSTRACT

Huntington's disease is a degenerative and progressive pathology of the central nervous system, with an autosomal dominant inheritance pattern of complete penetrance. The loss of neural cells occurs in a specific set of neurons located in the basal ganglia and cerebral cortex, causing to affected individuals movement disorders, psychiatric disorders and dementia. Affected individuals show a replicate of about 40 CAG trinucleotide sequences (where normal is up to 35 replicates), at the 5' position of the *IT15* gene located in the chromosomal region 4p16.3, resulting in huntingtin protein malfunction. The *IT15* gene comprises about 180 kb and contains 67 exons. The main diagnostic methodology used is counting the amount of the crack nucleotide CAG. The PCR (polymerase chain reaction) technique is the first step in molecular diagnosis. This method is extremely sensitive, since the product of separation and hybridization is compared to positive and negative control sequences allowing the differential diagnosis of the number of replicates even with a repetition of difference, even in individuals with no family history positive for the disease

Keywords: Huntington's disease, molecular diagnosis of DH, PCR technique in the diagnosis of Huntington's disease.

INTRODUÇÃO

A doença de Huntington (DH) foi descrita pela primeira vez em 1860, pelo físico norueguês Johan Christian Lund, que lhe deu o nome de Chorea St. Vitus; entretanto, a repercussão do fato foi praticamente nula. Em 1872, um médico de Long Island (EUA), Dr. George Huntington, descreveu detalhadamente uma afecção que chamou de “coréia hereditária”. A história admite que pessoas identificadas como “bruxas” em épocas passadas, muitas delas eram, na verdade, vítimas dessa enfermidade (BARSOTTINI, 2007).

SINTOMATOLOGIA

Clinicamente, a DH caracteriza-se por coreia progressiva que apresenta movimentos involuntários súbitos, breves, espontâneos, sem objetivo, contínuos, irregulares e imprevisíveis, que fluem de uma parte do corpo a outra, declínio cognitivo e perturbações psiquiátricas. Os primeiros sinais se apresentam como alterações moderadas na execução dos movimentos, dificuldades na resolução de problemas, irritabilidade e depressão. As alterações motoras, associadas à perda de coordenação dos movimentos voluntários apresentam uma progressão lenta. Os movimentos involuntários dos músculos tornam-se mais graves progressivamente e os pacientes perdem gradualmente a capacidade para se moverem e de se comunicarem (SPITZ, 2010; REGO, 2011).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da coréia de Huntington é realizado após a observação das manifestações clínicas típicas da doença, associada a um histórico familiar positivo para coréia de Huntington. A confirmação do diagnóstico é feita utilizando a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia

da Polimerase), que permite a contagem do número de repetições do códon CAG presentes na região 5' do gene *IT15* (CHEMALE, 2000).

TRATAMENTO

Não existe tratamento curativo ou preventivo para a doença de Huntington. Os sintomas relacionados a distúrbios comportamentais e depressivos podem ser tratados com antidepressivos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (BONELLI; HOFMANN, 2007).

O tratamento é feito utilizando antidepressivos tricíclicos (possuem a presença de três anéis de átomo), em nível pré-sináptico que atuam no bloqueio da recaptura de monoaminas, principalmente norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT), e em menor proporção dopamina (DA) (MORENO, SOARES, 2000).

Os inibidores seletivos para recaptação de serotonina inibem a recaptação pré-sináptica e deste modo aumentam a disponibilidade da serotonina sináptica, ajudando as células cerebrais a enviar e receber mensagens químicas, que por sua vez impulsionam o humor (SOARES, 2005).

A utilização de fármacos no combate aos transtornos psicóticos pode ser manejada com antipsicóticos tradicionais, como o Haloperidol® (Aldol), porém tem se optado pelos novos antipsicóticos, conhecidos como antipsicóticos atípicos, como por exemplo, a Risperidona®. Os sintomas motores como a coreia são tradicionalmente tratados com bloqueadores dopaminérgicos, como Haloperidol®, Clozapina®, Risperidona® e Quetiapina® (SAVANI; LOGIN, 2007).

O referido assunto foi escolhido devido à grande utilização da técnica de PCR, que é um método de ótimo custo benefício em relação a outros métodos de diagnóstico moleculares, além disso se obtém um diagnóstico final mesmo que a alteração seja de apenas uma repetição de trinca de nucleotídeos CAG.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo em contexto de revisão bibliográfica com enfoque no diagnóstico molecular da doença de Huntington utilizando a técnica da PCR (Reação em cadeia da polimerase).

Os artigos foram selecionados a partir de busca ativa em bancos de dados eletrônicos, utilizando como descritores “Doença de Huntington”, “diagnóstico molecular da DH”, e “técnica de PCR no diagnóstico de Huntington”. Além do uso de periódicos disponibilizados na biblioteca virtual do Centro Universitário Tiradentes (Unit - AL), base de dados Lilacs (Literatura Latino-americana em Ciências da Saúde), Scielo (*Scientific Electronic Library Online*) e alguns sites com assuntos relacionados.

Foram lidos artigos em língua portuguesa e inglesa, publicados no período de 1987 a 2016. Após o fichamento dos textos selecionou-se (19) artigos para compor o presente trabalho.

Os critérios de inclusão foram todos os trabalhos publicados durante o período selecionado e que abordassem como temática o diagnóstico molecular da doença de Huntington, abordando a técnica de PCR e determinação de indivíduos que possuem a patologia descrita no presente trabalho, sendo excluídos todos os trabalhos que não atendessem aos critérios básicos de período de publicação e ao diagnóstico molecular da doença de Huntington.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A DH é de caráter monogênico. O gene mutante foi mapeado próximo a extremidade telomérica do braço curto do cromossoma 4 (região 4p16.3) (Fig. 1), por James Gusella e colaboradores no ano de 1983. Depois de uma década de pesquisa o gene responsável pela doença foi identificado. O gene *IT15* foi identificado em 1993 pela metodologia de clonagem posicional. (POLTRONIERI, 2015).

Em 1993, o *Huntington Disease Collaborative Research Group* isolou o gene responsável pela DH e descobriu que a mutação responsável pela doença de Huntington é uma expansão da repetição dos trinucleotídeos CAG localizada na região 5' do éxon 1 do gene *IT15* (Fig.2) (GIL; REGO, 2008).

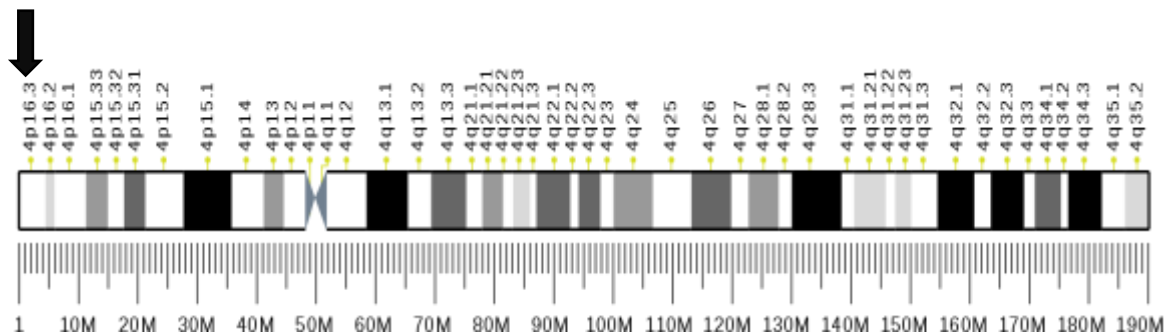


Fig. 1 - Cromossoma 4, mostrando a região 4p.16.3 que é afetada pela doença de Huntington. Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FGFR3>.

```
1 gctgccggga cgggtccaag atggacggcc gctcaggttc tgcttttacc tgcggcccag
61 agccccattc attgccccgg tgctgagcgg cgccgcgagt cggccccagg cctccgggga
121 ctgccgtgcc gggcgggaga ccgccatggc gaccctggaa aagctgatga aggcttctca
181 gtcctcaag tccttcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca
241 gcagcagcag cagcagcagc aacagccgc accgccgcc cgccgccgc gcctctctca
```

```
301 gcttcctcag ccgcccgcg aggcacagcc gctgctgcct cagccgcagc cgcccccgcc
361 gccgcccccg ccgcccacccg gcccggtgt ggctgaggag ccgctgcacc gaccaaagaa
421 agaactttca gctaccaaga aagaccgtgt gaatcattgt ctgacaatat gtgaaaacat
```

Fig. 2 - Em amarelo: repetições da trinca CAG no éxon 1 para doença de Huntington.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_002111.8

A mutação genética responsável pela DH caracteriza-se por repetições anormais, em tandem, superiores a 36, onde o normal é menos de 20 repetições da sequência dos nucleotídeos citosina, adenina e guanina (CAG) que codificam o aminoácido glutamina (ZACCOLO; PEREIRA, 2008).

Pessoas que apresentam entre 27 e 35 repetições CAG são consideradas portadoras da pré-mutação, uma faixa de classificação intermediária com potencial expansão nas próximas gerações. Já nos pacientes com DH, as repetições observadas estão entre 36 a 100 sequências de CAG (PORTINERI, 2015). Embora não seja uma doença terminal, as complicações por ela induzidas reduzem a expectativa de vida (ZACCOLO; PEREIRA, 2008).

Os trinucleotídeos CAG codificam para o aminoácido glutamina. O excesso de glutamina altera a função proteica normal causando o fenótipo Huntington. Quando a proteína está alterada ocorre a morte seletiva dos neurônios, principalmente nos neurônios localizados na região basal do cérebro (Fig. 3).



Fig. 3 - Danos cerebrais causados pela destruição dos gânglios basais.

Fonte: <http://envelhecimento22012.blogspot.com.br/2013/02/doenca-de-huntington.html>

O gene *HTT* codifica a proteína huntingtina, uma proteína nuclear expressa de forma ubíqua que se liga a uma série de fatores de transcrição para regular a transcrição. (FUTTER, *et al.*, 2009).

A huntingtina é uma proteína que apresenta 3.144 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 350kDa. A huntingtina se expressa preferencialmente nos neurônios, no entanto, se expressa em todas as células do organismo com concentrações inferiores no fígado, coração e pulmões (LI,LI, 2004).

A huntingtina é uma proteína de expressão ubiqüitária (que pode se expressar em vários lugares ao mesmo tempo), apenas o estriado (um dos núcleos de base que compõe o diencefalo.) e as camadas mais profundas do cortex são afetados durante a progressão da doença (RIGAMONTI D. *et al.*, 2000; RIGAMONTI D. *et al.*, 2001).

A função tóxica da huntingtina mutante (mHTT) pode manifestar-se e produzir a Doença de Huntington através de múltiplas alterações celulares. Durante o processo de modificação pos-transcricional da mHTT, a clivagem da proteína pode originar pequenos fragmentos constituídos por expansões de poliglutamina.

A natureza polar da glutamina causa interações com outras proteínas, principalmente quando em excesso. Assim, as cadeias de mHtt formam ligações de hidrogénio entre si e com outras proteínas, dando origem a agregados proteicos em vez de se dobrarem em proteínas funcionais. Ao longo do tempo, esses agregados interferem com as funções normais dos neurónios, resultando em corpos de inclusão celulares. Os agregados proteicos em excesso, acumulam-se nos axónios e dendritos dos neurónios, e podem interromper a ação dos neurotransmissores, por impedir o movimento das vesículas pelo citoesqueleto (BANO; ZANETTI, 2011) (ARRASATE; FINKBEINER, 2012).

O diagnóstico é realizado através de um conjunto de fatores que envolvem o histórico familiar, a sintomatologia da DH e exames como o de tomografia computadorizada e acompanhamento neurológico. A comprovação é realizada através de exames específicos de triagem Genética para Doença de Huntington, que é realizada através da aplicação da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde há a contagem do número de expansões da sequência CAG (XIMENES,TEIXEIRA, 2009).

A técnica de PCR é o primeiro passo para o diagnóstico molecular. O DNA isolado, a partir do sangue, é amplificado utilizando-se um par de

oligonucleotídeos (*HD1 forward* (atgaaggccttcgagtcctcaagtcctcc) e *HD2 reverse* (gactcctcggcgacgtggctggcactcaaa)). O produto amplificado é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida seguido de uma hibridização com a utilização de sondas de oligonucleotídeos (CTG) marcadas radioativamente. Esse método é extremamente sensível uma vez que o produto da separação e hibridização é comparado a sequências controle positivo e negativo possibilitando o diagnóstico diferencial da quantidade de repetições mesmo com uma repetição de diferença (ELLES, MOUNTFORD, 2004).

Para a realização do procedimento de amplificação pela PCR, o DNA é extraído de células e adicionado a uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com um trifosfato na região 5' da dextroribose, os *primers* (também chamados de oligonucleotídeos ou iniciadores) e a enzima Taq-polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado).

Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada de 94 a 96 °C por pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação: quebra das pontes de hidrogênio). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 a 60 °C dependendo da quantidade de citosina (C) e guanina (G) encontrada no *primer*, para que os *primers* se anelem (emparelham) com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72 °C para que a enzima Taq-polimerase possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 35 a 40 ciclos para cada reação na qual a taxa de replicação é exponencial.

O resultado é analisado através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 4) e depois é interpretado com base em uma escala de resultados (Tabela 1) (<https://pt.khanacademy.org>).

Faixas de tamanho para a Repetição de Trinucleótido CAG.

Normal	9-26 + 1
Intermediário	27-35 + 1
Penetração reduzida	36-39 + 1
Afetado	40-100 +

Tabela 1 - Fonte: Molecular diagnosis of genetic diseases

+1 significa a variação de repetições de trinca de nucleotídeo de acordo com as referências citadas.

O Diagnóstico pré-natal é possível, entre a 10^a e a 12^a semanas. No entanto, a maioria dos serviços de genética não o realiza, devido ao impacto que poderia causar ao feto pelo alto risco de aborto, e principalmente aos familiares, pois estudos comprovam que a maioria das pessoas prefere a ignorância da existência da doença até sua manifestação; ao risco de conviver com a certeza de ser portador de uma doença incurável (CHEMALE *et.al*,2000) (BITTENCOURT, LIMA, MOREIRA, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de PCR permite determinar a quantidade de repetições de trincas de nucleotídeos CAG, para o fenótipo de Huntington com precisão de até 1 repetição de trica de nucleotídeos.

É um método que apresenta um bom custo benefício para o paciente, que obtém um diagnóstico final da doença.

Por ser uma doença genética de manifestação tardia e herança autossômica dominante com penetrância completa sem cura a possibilidade de transmissão para gerações posteriores pode ser 50%. Desse modo cabe ao indivíduo a escolha de ter ou não o conhecimento acerca de seu status em relação a doença

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arrasate M, Finkbeiner S. Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol*. 2012 Nov;238(1):1-11. PubMed PMID: 22200539. Epub 2011/12/28. Eng.

BDNF - gene transcription in Huntington's disease. - 2001 Jul 20;293(5529):493-8.

B. Granger, S. Albu, The Haloperidol Story, *Annals of Clinical Psychiatry* (after Jan 1, 2004), Volume 17, Number 3, Number 3/July-September 2005.

BARSOTTINI, Orlando Graziani Pavoas. - *einstein: Educ Contin Saúde*. 2007, 5(3 Pt 2): 83-88.

BANO D, ZANETTI F, MENDE Y, NICOTERA P. - Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death Dis.*;2: e 228. PubMed PMID: 22071633. Pubmed Central PMCID: 3223696. 2011.

BITTENCOURT, A.; LIMA, R.L.L.F.; MOREIRA, L.M.A. *Percepções Sobre a Doença de Huntington e Realização de Testes Preditivos em indivíduos com História da Doença na Família R. Ci. méd. biol.*; v.9, n. 2, p. 126-129, 2010.

CHEMALE, F.A. et al. *Doença de Huntington. Dissertação entregue para conclusão de curso na Disciplina de Genética e Evolução da Fundação*

Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Departamento de ciências Morfológicas, 2000, 37 fl.

ELLES, Rob; MOUNTFORD, Roger – Molecular diagnosis of genetic diseases - Secound edition.2004.

FUTTER, M., DIEKMANN, H., SCHOENMAKERS, E., SADIQ, O., CHATTERJEE, K., RUBINSZTEIN, D. C. Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. J. Med. Genet. 46: 438-446, 2009.

GIL-MOHAPEL, J.M.; REGO, AC. Doença de Huntington: Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos. Rev Ncienc v.19, n.4, p.724-734, 2011.

HARJES P., WANKER E.E. - The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. Trends Biochem Sci. 2003;28(8):425-33.

<https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr> - Acesso em 06 de junho de 2017.

HUNTINGTON STUDY GROUP. Tetrabenazine as Antichorea Therapy in Huntington Disease. A Randomized Controlled Trial. Neurology. v. 66, p. 366-72, 2006.

MORENO, Ricardo Alberto; MORENO, Doris Hupfeld; SOARES, Márcia Britto de Macedo - Rev. Bras. Psiquiatr. vol.21 s.1 São Paulo May 1999.

PAVIOT, L. M. Deux cas de chorée héréditaire avec autopsies. Archives of Neurology, Paris, FR, n. 4:, p. 333-4, 1987.

RIGAMONTI D., BAUER J. H., DE-FRAJA C., CONTI L., SIPIONE S., SCIORATI C., CLEMENTI E., HACKAM A., HAYDEN M. R., LI Y, COOPER J. K., ROSS C. A., GOVONI S., VINCENZ C., CATTANEO E. - Loss of huntingtin-mediated BDNF gene Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3 - J Neuroscience. 2000 May 15;20(10):3705-13.

SOARES, Paulo José R. - Inibidores seletivos da recepção da serotonina - The International Journal of Psychiatry - Outubro de 2005 - Vol.10 - Nº 10.

XIMENES, B.A.A.; TEIXEIRA, E.H. Doença de Huntington: Aspectos Diagnósticos e Implicações Éticas. Rev. Ciênc. Méd., Campinas, v.18, n.5/6, p.287-291, set.-dez. 2009.

ZACCOLO, Ana Maria Vargas; PEREIRA, Maria Luiza Vargas – Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico laboratorial da doença de Huntington, 2008.

ZUCCATO C, CIAMMOLA A., RIGAMONT D., LEAVITT B.R., GOFFREDO D., CONTI L., MACDOLNARD M.E., FRIEDLANDER R.M., SILANI V., HAYDEN M.R., TIMMUSK T., SIPIONE S., CATTANEO E. Loss of huntingtin-mediated