

V Simpósio Brasileira de Doença Falciforme e Outras Hemoglobinopatias

Hemoglobina Stanleyville-II associada à deleção do gene alfa 3.7 do tipo I em homozigose: estudo de duas famílias

Fernanda Silva Pimentel, Marcos Borato Viana, Maria Helena da Cunha Ferraz, Dora Mendez del Castillo, José Nélio Januário, Carlos Perone, Nara de Oliveira Carvalho, Marcela Hooper Carmo



Introdução

Doença falciforme:

- Doença genética causada por uma mutação no gene que codifica a cadeia β da globina, localizado no braço curto do cromossomo 11
- Substituição do ácido glutâmico pela valina (GAG>GTG), na posição 6, dando origem à hemoglobina S (Hb S)
- Incidência em MG: 1:1.400 (Programa Estadual de Triagem Neonatal - PETN-MG)
- Há relatos na literatura de, pelo menos, 3 hemoglobinas variantes de cadeia β e 5 de cadeia α , com pontos isoelétricos (IEF) semelhantes ou iguais à da HbS, o que pode gerar resultado falso positivo

Objetivos

- a) Identificar através de seqüenciamento gênico as hemoglobinas variantes encontradas em uma família da região de Ouro Preto (OP) e outra da região do Lago de Furnas (LF), em Minas Gerais, ambas em homozigose nas duas crianças triadas pelo PETN-MG

- b) Verificar relevância clínica dessas variantes

Métodos

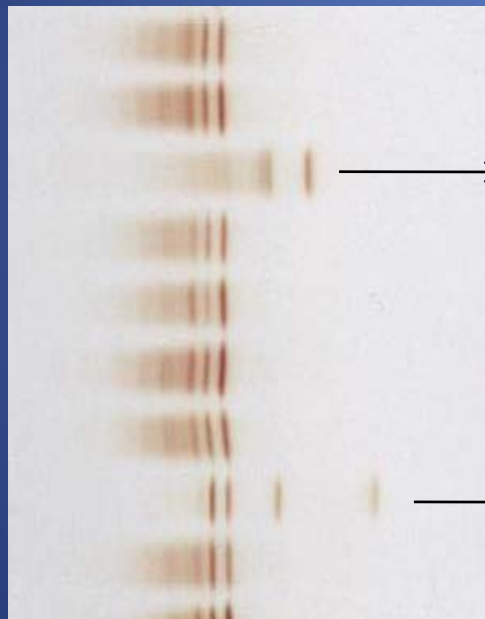
- Foram colhidas novas amostras para repetição da IEF e realização de PCR alelo-específica para HbS
- O sequenciamento do gene da beta globina foi feito em um caso (OP) e o da alfa globina em ambos
- Foi realizada PCR multiplex para o diagnóstico das deleções mais comuns causadoras de α -talassemia
- Utilizou-se como referência para o gene α a sequência NCBI NG_000006.1

Resultados

- As duas famílias não possuem parentesco conhecido entre elas. A história familiar da criança OP revelou que os pais são primos, mas não sabem informar em que grau
- Os perfis das amostras das crianças ao nascimento foram indeterminados; os do 6º mês de vida e os das amostras de repetição evidenciaram Hb na região de S
- As PCR alelo-específicas para Hb S foram negativas; o sequenciamento da β globina não evidenciou mutações na criança OP e em seus pais

Resultado da IEF na criança de OP

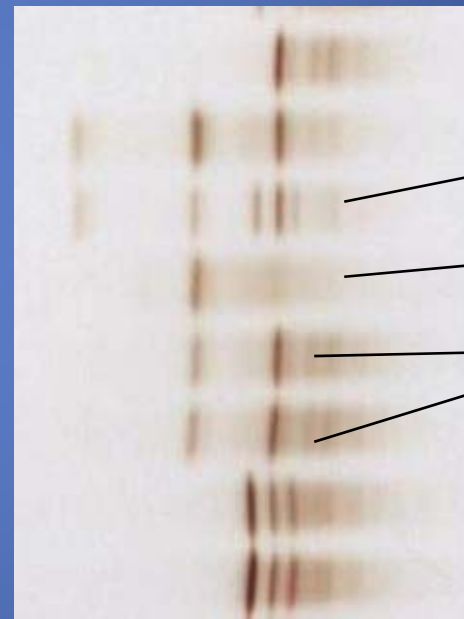
IEF ao nascimento



Resultado da criança
ao nascimento

Controle AFSC

IEF no sexto mês

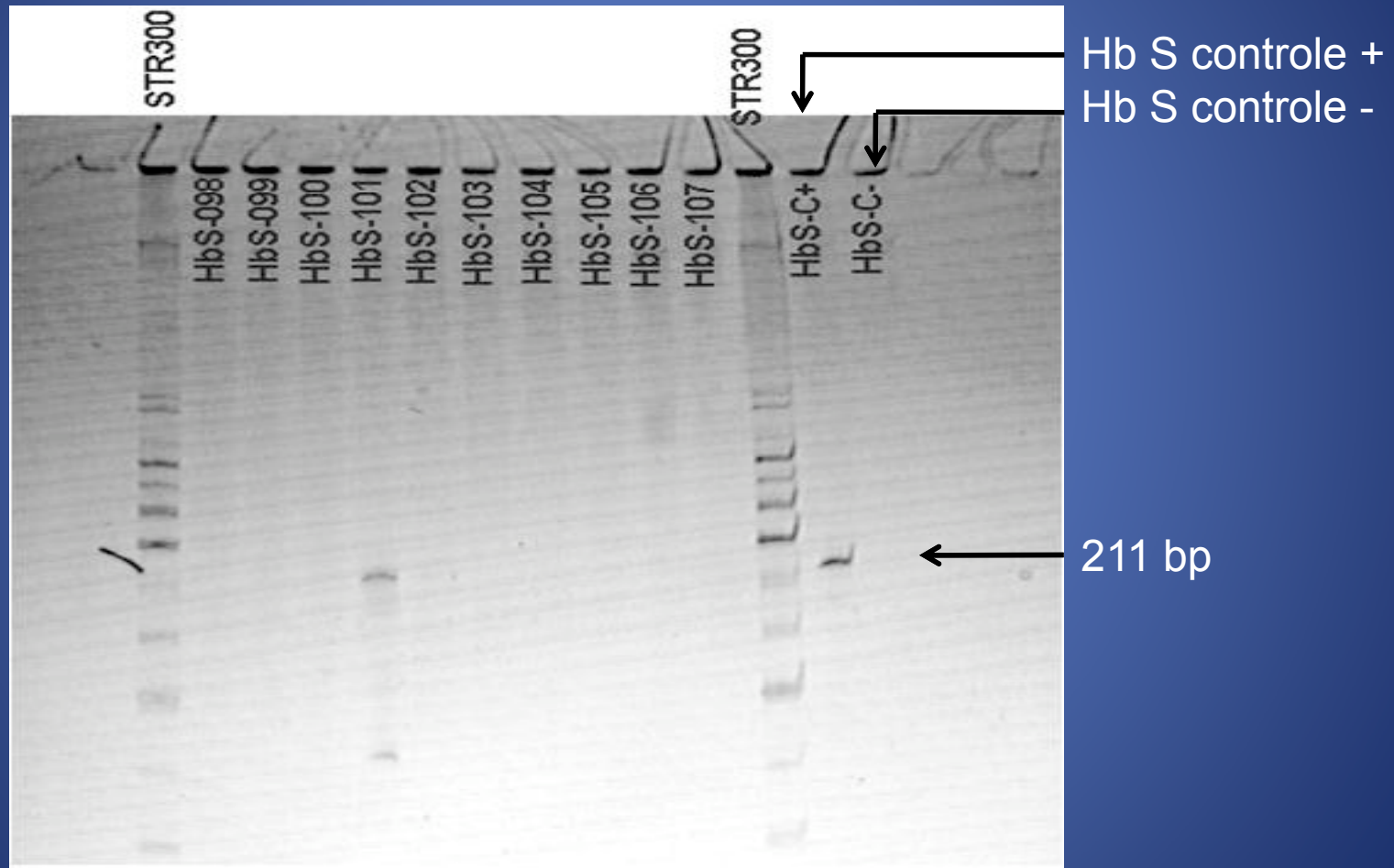


Controle AFSC

Resultado 6º mês
da criança OP

Resultado Estudo
Familiar (pai e
mãe)

PCR alelo-específica* para hemoglobina S

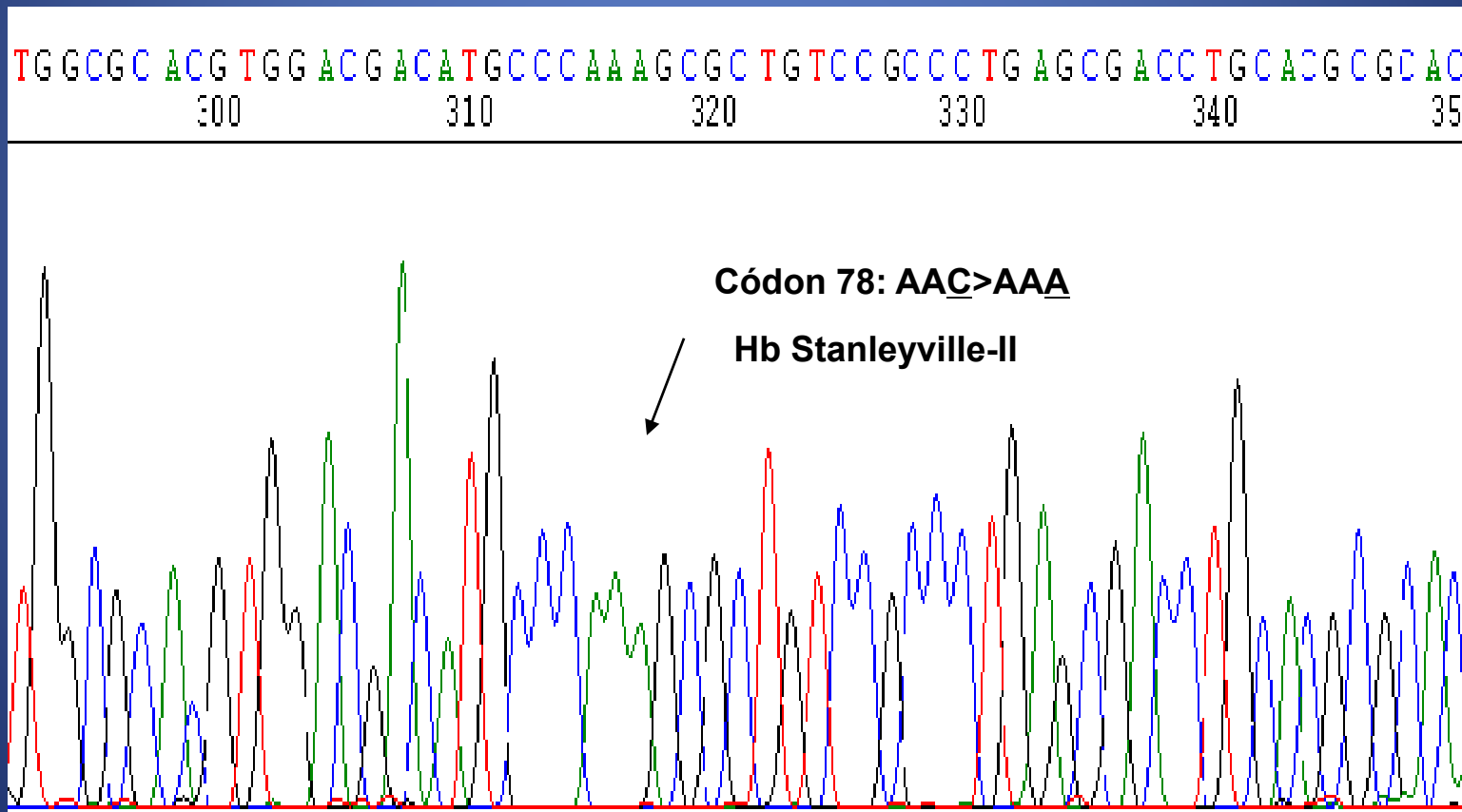


*Sanchaisuriya, K et al, Clinica Chimica Acta 2004; 343:129

Resultados

- O PCR multiplex para alfa talassemia revelou deleção de dois genes para alfa globina nas duas crianças ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) e de apenas um gene em seus pais ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$)
- O sequenciamento do gene híbrido $\alpha^{3.7}$ em ambas as crianças identificou uma mutação na terceira posição do códon 78 (AAC>AAA; Asn>Lys), em homozigose (Hb Stanleyville-II)
- Em todos os genitores foram detectadas as mesmas alterações, em heterozigose

Sequenciamento do gene híbrido $\alpha^{3.7}$ mostrando a mutação (AAC>AAA; Asn>Lys), em homozigose (Hb Stanleyville-II)



Análise do 2º íntron de $\alpha 2$ e $\alpha 1$: deleção $-\alpha^{3.7}$ do tipo I

- O subfragmento sequenciado correspondia ao íntron 2 do gene $\alpha 1$
- *Crossover* ocorreu a 5' do sítio da enzima de restrição Apa-I, no íntron 2 do gene $\alpha 1$ primitivo, característico da deleção tipo I

5' GTCAACTTCAAGGTGAGCGGGCGGGCCGGGAGCGATCTGGGTGCGAGGGGCGAG
5' GTCAACTTCAAGGTGAGCGGGCGGGCCGGGAGCGATCTGGGTGCGAGGGGCGAG

ATGGCGCCTTCCTCTCAGGGCAGAGGATCACGCGGGTTGCGGGAGGTGTAGC
ATGGCGCCTTCCTCGCAGGGCAGAGGATCACGCGGGTTGCGGGAGGTGTAGC

GCAGGCGGGCGGCTGCGGGCCTGGGCC GC ACTGACCCTCTTCTCTG
GCAGGCGGGCGGCTGCGGGCCTGGGCCCTCGGCCCCACTGACCCTCTTCTCTG

CACAGCTCCTAAGCCAC 3'
CACAGCTCCTAAGCCAC 3'

Gene $\alpha 2$ Gene $\alpha 1$
3 últimos códons do exon2 3 primeiros códons do exon3
 Sítio de restrição de ApaI (GGG↓CCC)
 Nucleotídeos discordantes entre $\alpha 1$ e $\alpha 2$

Resultados

Hemograma e hematoscopia da criança de Ouro Preto

Hemograma	Valor
Hb	11,4 g/dL
VCM	65 fL
HCM	20,1 pg
CHCM	30,9 g/dL

Resultados de outros exames realizados

- * Hematoscopia: discreta poiquilocitose, anisocitose e moderada microcitose
- * Exames da cinética de ferro: normais
- * Pesquisa de drepanócitos: negativa

Conclusões

- As crianças estudadas apresentam alfa-talassemia por presença da deleção 3.7 (tipo I) associada à mutação Stanleyville-II (substituição da asparagina por lisina), em homozigose ($\alpha_2^{\text{Sta}}\beta_2$)
- Os pais são heterozigotos
- Os dados indicam que a criança de OP apresenta tão somente manifestação hematológica correspondente à alfa talassemia com 2 genes deletados

Referências Bibliográficas

1. Serjeant GR. Sickle Cell Disease. 2^a ed., Oxford: Oxford University Press, 1992.
2. Zago MA, Costa FF. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. Trans R Soc Med Hyg. 1983; 79:385-388.
3. Januário JN. Incidência da doença falciforme em 1.000.000 de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001) – MG (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina da UFMG - 2004.
4. Naoum PC. Diagnóstico das Hemoglobinopatias. Sarvier. São Paulo, 1987; 3:12-17.
5. Viprakasit V, Wiriyasateinkul A, Sattayasevana B, Miles KL, Laosombat V. Hb G-Makassar [β 6(A3)Glu-->Ala; codon 6 (GAG-->GCG)]: molecular characterization, clinical, and hematological effects. Hemoglobin. 2002 Aug;26(3):245-53
6. Huisman, T.H.J. The Separation and Identification of Hemoglobin Variants by Isoelectric Focusing Electrophoresis: An Interpretive Guide. Isolab, 1997.
7. Sanchaisuriya, K. et al. Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-punjab and Hb Tak. Clinica Chimica Acta, v. 343, p. 129-134, 2004.
8. Chong, S.S. et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood, Washington, v.98, n.1a, p.250-251, july 2000a.
9. Chong, S.S. et al. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of α -thalassemia. Clinical Chemistry, Charlottesville, v.46, n.10, p.1692-1695, oct. 2000b.
10. Chong, S.S; et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. Blood, Washington, v.95, n.1c, p.360-362, jan. 2000

OBRIGADA!!!