

Seminário Final de Avaliação – PPSUS/FAPDF

Desenvolvimento de tecnologia para confirmação precoce de doença falciforme e outras hemoglobinopatias em contexto de triagem neonatal: subsídio para intervenções clínicas, medidas preventivas e estudo epidemiológico.

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

Instituto do Câncer Infantil e Pediatria Especializada- ICIPE
Hospital da Criança de Brasília José Alencar

Equipe e instituição:

Dra. Isis Quezado Magalhaes

Dr. José Carlos Córdoba

Dra. Valdenize Tiziani

Dr. Ricardo Camargo

Ma. Larissa Cavalcante

Marília Rosa

Cleide Barbosa



Breve contextualização do problema e relevância do tema

Hemoglobinopatias graves - Falciforme e Talassemias 300 000 / ano
 (mundial) 80% países de baixa e media renda

Weatherald. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden . *Blood* 2010;115:4331.



✓ **Doença Falciforme como problema de saúde pública**

World Health Organization .Fifty-ninth World Health Assembly: resolutions and decisions . Geneva:WHO,2006

✓ **Programa Nacional de Triagem Neonatal**

Portaria nº 822/GM, junho de 2001

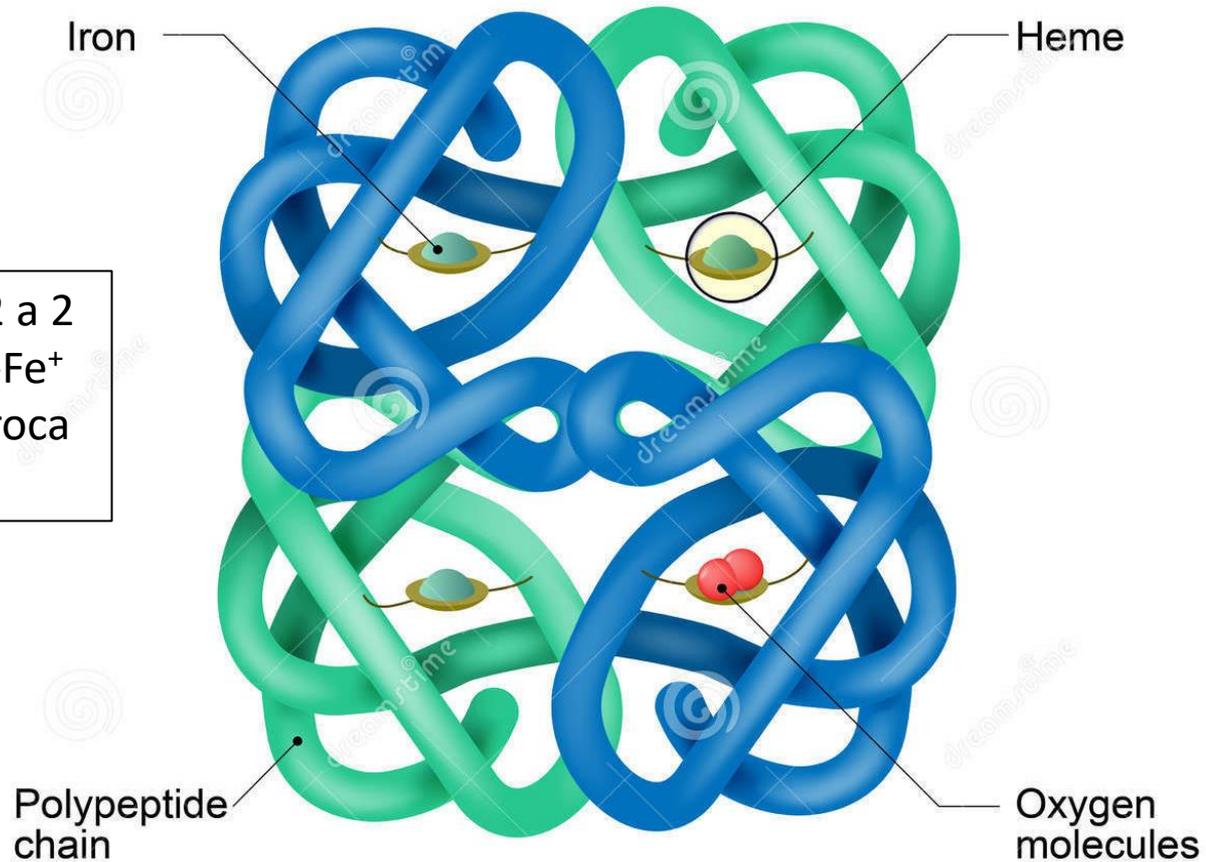
✓ **Politica Nacional de Atenção às Pessoas com Doença Falciforme**

Portaria nº 1.018 /GM julho 2005

	Doentes	Traços
BA	1:500	7 %
MG	1:1383	3,3%
RJ	1:1400	4%

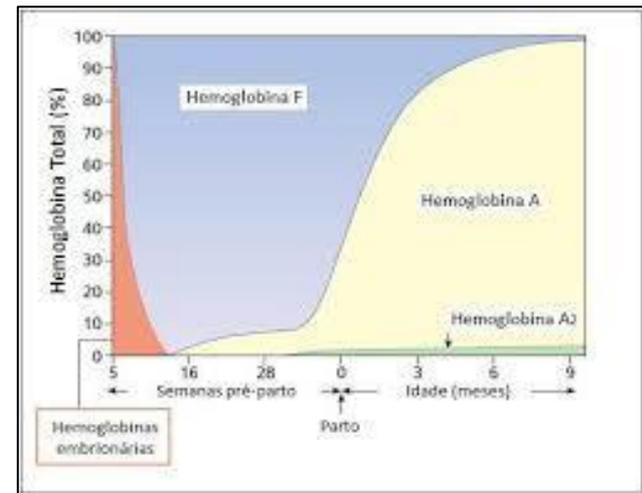
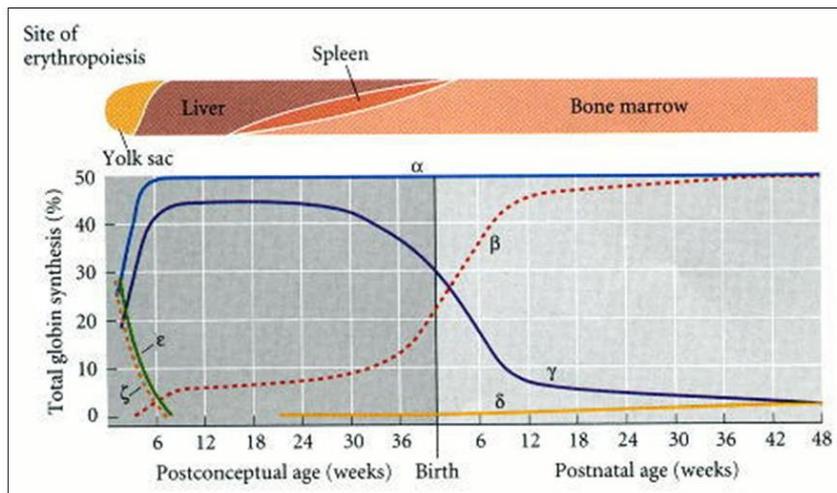
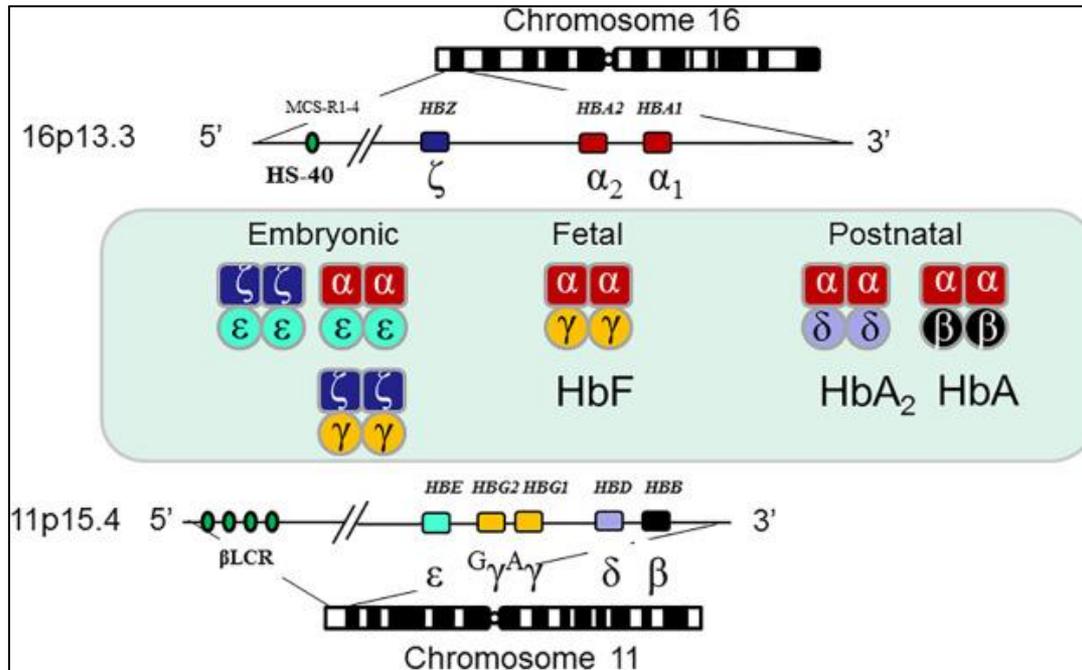
Huttle *et al* Sickle Cell Disease in Latin America and the United States. *Ped Blood Cancer* 2015;62;1131

Hemoglobina



- Tetramêros: 2 a 2
- Grupo Heme-Fe⁺
- Transporte/Troca de gases.

Ontogenia das hemoglobinas



DOENÇA FALCIFORME – FISIOPATOLOGIA

- Uma única substituição de base no DNA do gene da hemoglobina [GTG>GAG], causa substituição do ácido glutâmico por valina na 6ª posição da cadeia β da globina;
- Produção de hemoglobina S, estruturalmente anormal;
- Em condições de desoxigenação → polimerização da hemoglobina;
- Hb S polimerizada causa dano de membrana, desidratação celular, aderência aumentada às células endoteliais, liberando produtos tóxicos ao endotélio (agentes oxidantes), com **lesão vascular**.
- rede de anormalidades celulares → os dois maiores eventos fisiopatológicos:

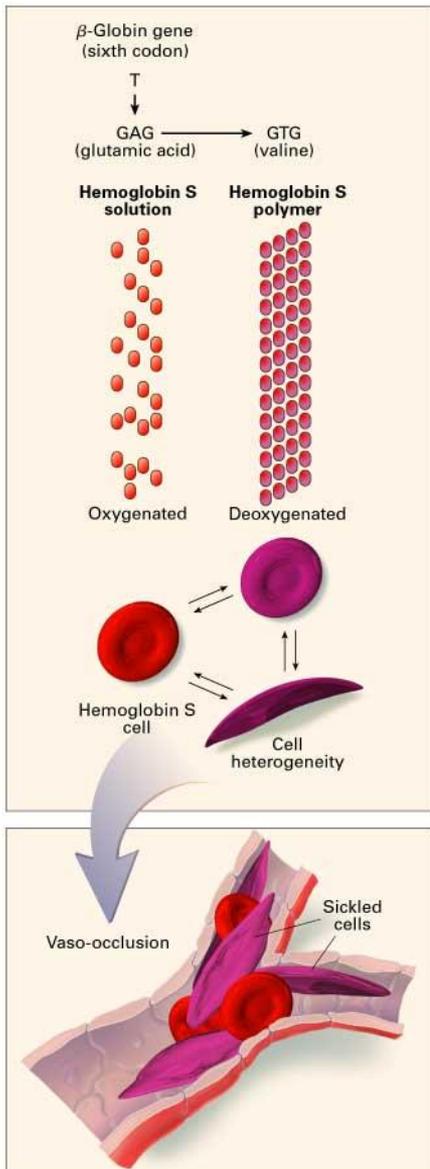


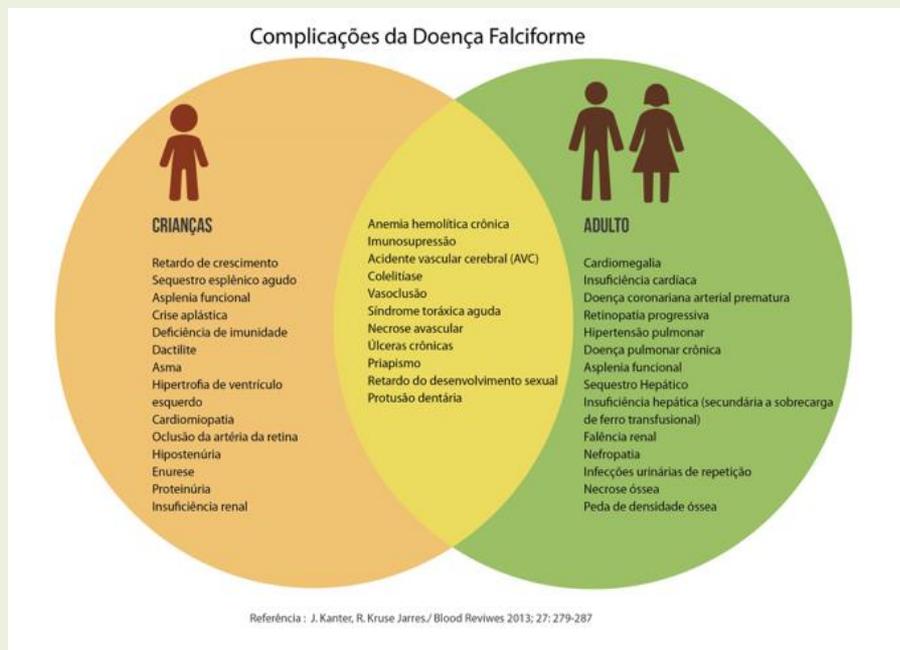
Image from: <http://emedicine.medscape.com/article/205926-overview#aw2aab6b2b4>



HEMÓLISE e VASO-OCCLUSÃO

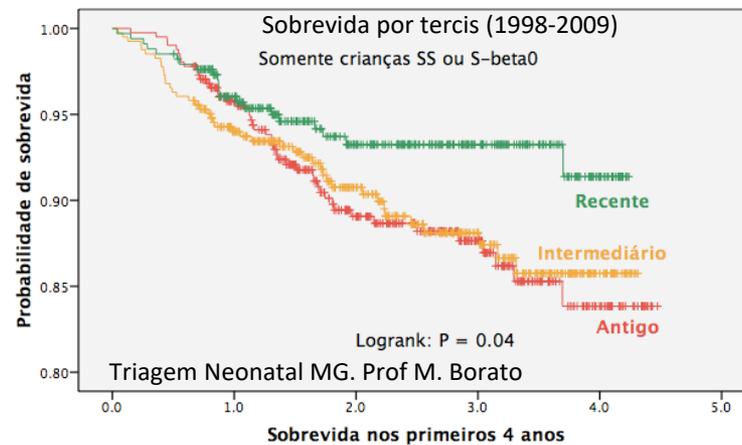
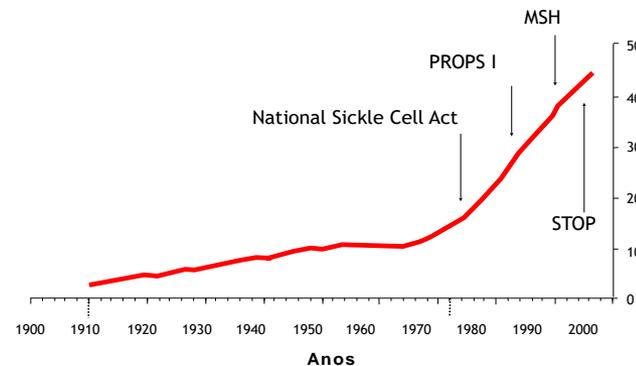
**Isquemia tecidual
Disfunção orgânica aguda e crônica**

Breve contextualização do problema e relevância do tema



Hb S (Sickle cell disease /doença falciforme)

Aumento na expectativa de vida dos pacientes com anemia falciforme nos EUA



Breve contextualização do problema e relevância do tema

Distrito Federal:

Programa Triagem Neonatal

Cobertura 100% nascidos hospitalares públicos;

HAB LAB focalização isoelétrica (IEF)
 HPLC ;

HCB Centro de Referência diagnóstico
 e acompanhamento Hbpatias SES DF

Problemas e necessidades :

- ✓ hemoglobinas variantes com perfil eletroforético semelhante Hb S;
- ✓ diagnóstico da talassemia beta;
- ✓ diagnóstico da alfa talassemia;
- ✓ Co heranças de diferentes defeitos das hemoglobinas dando origem a série de genótipos complexos e fenótipos clínicos.

NBS	Description	Genotype
FA	Normal	AA
FS	Anemia Falciforme S/Beta ⁰ talassemia S/ HPFH	SS Sβ ⁰ -Talassemia S-HPFH
FSC	Duplo heterozigoto S e C	SC
FSA	S/Beta ⁺ talassemia	Sβ ⁺ -Talassemia
FSU	S/Hb variante	S-Variante
FC	Hemoglobina C disease C/Beta ⁰ talassemia	CC Cβ ⁰ -Talassemia
FAS	Traço S	AS
FAC	Traço C	AC
FAB	Presença de Barts	

Objetivos propostos x realizados

OBJETIVO GERAL: estabelecer diagnóstico confirmatório complementar as metodologias disponíveis por meio de técnica de biologia molecular da doença falciforme e outras hemoglobinopatias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- implantação e validação de métodos diagnósticos de biologia molecular p/ hbpatias;
- estabelecer algoritmo racional complementar as metodologias disponíveis ;
- ampliar precisão diagnóstica e qualificação do serviço de triagem neonatal da SES DF e do Centro de Referência em Hemoglobinopatias da SES DF;
- beneficiar de imediato os pacientes com diagnóstico precoce e intervenções clínicas quando indicado pela união da pesquisa translacional com a prática clínica;
- gerar conhecimento pelo estudo epidemiológico na população examinada;

Materiais e Métodos

- Não houve modificação da metodologia proposta inicialmente;
- Diante de alguns casos inconclusivos, mas com clínica clara, propomos a incorporação do kit de MLPA para o *cluster* gênico da beta globina e o sequenciamento da delta globina ao rol de testes moleculares:
- Justifica-se o uso desse kit para pesquisa de alterações no número de cópias (CNVs) no *cluster* gênico da beta globina com intuito de diagnosticar beta-talassemias raras, persistência hereditária de hemoglobina fetal, talassemia delta-beta, entre outras alterações no número de cópias;
- O sequenciamento da delta globina é necessário para diagnóstico de variantes e alterações na expressão da hemoglobina A2.

Atividades planejadas x realizadas

Atividade	Mes/ano inicio atividade	Mes/ano fim da atividade
Coleta de amostras	Julho 2017	Mai 2020
Extracao DNA a partir de leucocitos de sangue	Julho 2017	Mai 2020
Implantação dos testes moleculares para hemoglobinopatias quantitativas e qualitativas	Julho 2017	Abril 2019.
Deteção de mutações relacionadas a persistência de Hb fetal	Abril 2019	Junho 2020
Sequenciamento dos casos indicativos de outras variantes	Julho 2017	Junho 2020
Estudos epidemiologicos na populacao estudada	Fevereiro 2019	Julho 2020
Análise de dados para publicação	Fevereiro 2019	Março 2021
Apresentacao de trabalho em evento científico	Julho 2018	Junho 2019
Redação de artigo científico	Janeiro 2020	Julho 2021

Vigência do projeto 28/06/2017 a 29/12/2019 + 6 meses de Prorrogação



MINISTÉRIO DA
SAÚDE



Recurso aprovado x gasto

EXECUÇÃO FINANCEIRA

	Recursos Liberados	Recursos Gastos	Saldo
-			
Capital	R\$ 33. 640,00	R\$ 33.640,00	0
Custeio*	R\$ 157 923,98	R\$ 152.322,12	R\$ 5.601,86
Saldo	R\$ 191.563,98	R\$185.962,12	R\$ 5601,86 + R\$2.515,76 (rendimentos) = R\$ 8.117,62 devolvidos
Data da situação	12/12/2018	13/12/2019	19/08/2020

Resultados alcançados

Teste do Pezinho – Triagem Clínica

HPLC / Focalização Isoelétrica

Variantes

PCR-RFLP (S, C, D,
Hasharon, G Philadelphia)

Se negativo

Sequenciamento Sanger

Talassemias

Alfa

MLPA, GAP-PCR

Beta

PCR- AE (IVS1-1, IVS1-6,
IVS1-110, CD39)

Se negativo

Sequenciamento Sanger

PHHF

MLPA, GAP-PCR

DELTA-BETA

MLPA, GAP-PCR

Resultados alcançados

- 424 pacientes no total: 335 crianças e 89 familiares

Do total das solicitações de exame de biologia molecular para esclarecimento de hemoglobinopatias:

- 92 casos tinham hipótese diagnóstica de Alfa-talassemia
- 36 de Beta-talassemia
- 03 de co-herança de hemoglobina variante com Alfa-talassemia
- 15 de co-herança de hemoglobina variante com Beta-talassemia
- 08 de hemoglobina variante
- 181 casos de traço S (F>S>A = S beta Thal+ ao teste do pezinho)



MINISTÉRIO DA
SAÚDE



Resultados alcançados

Achados:

Variantes de Beta-globina

- Hb S
- Hb C
- Hb D-Los Angeles
- Hb Korle-Bu
- Hb Grange-Blanche
- Hb Porto Alegre
- Hb La Desirade
- Hb N-Baltimore
- Hb City of Hope

Variantes de Alfa-globina

- Hb Kokura
- Hb Kurosaki

β -talassemia:

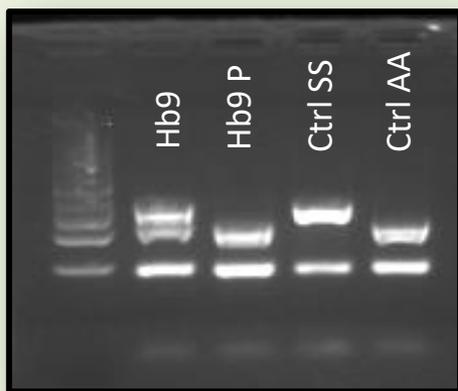
- IVS-I-6
- IVS-I-5
- CD39
- IVS-I(-2)
- IVS-I-110
- c.-79A>G
- c.-151C>T
- c.-138C>T
- PHHF 1 e 2

α -talassemia:

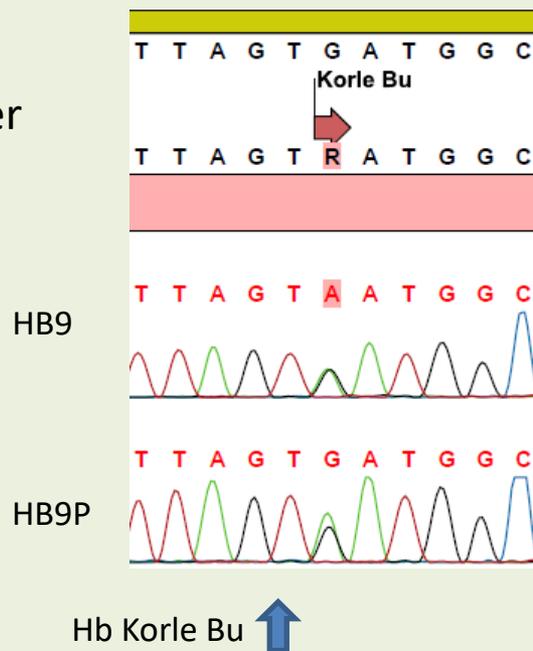
- $\alpha^{-3,7}$
- $\alpha^{-4,2}$
- HBA2: c.69delC (p.Glu24Serfs*26)

Resultados alcançados

- Pai: AS-like; Mãe: AS; Paciente: S??
- Métodos: PCR-RFLP para S e Sanger



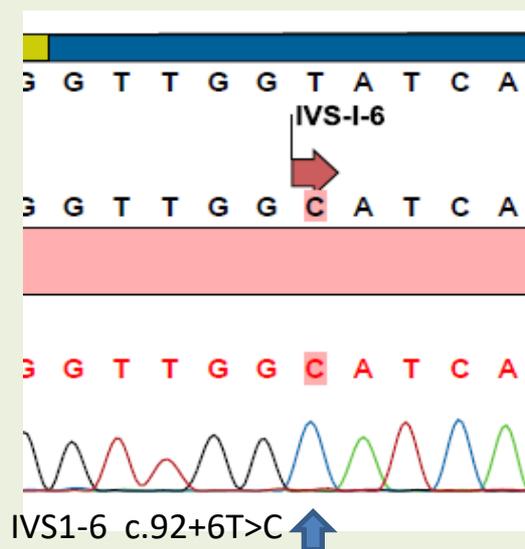
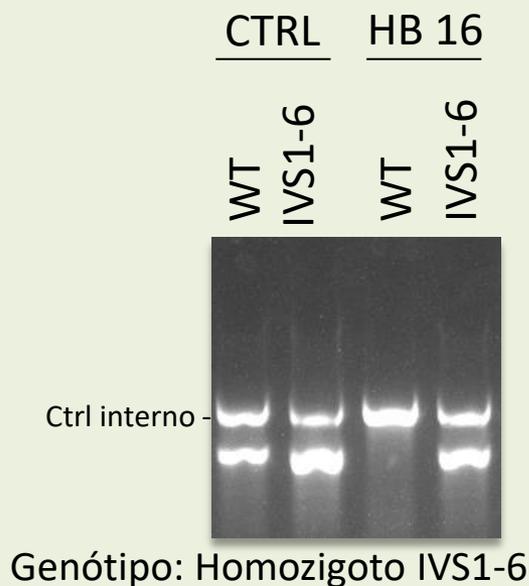
Genótipo: AS AA SS AA



Paciente é HbS/HbKB

Resultados alcançados

- Indicação: β -talassemia intermediária
- Métodos: PCR-Alelo Específica e Sanger



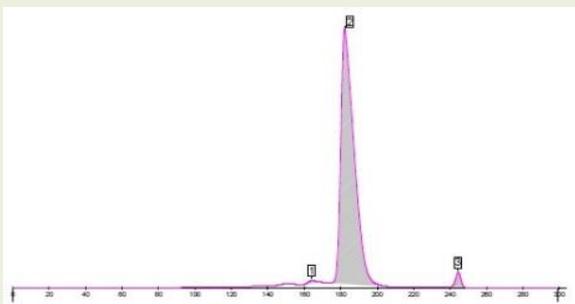
Paciente é homozigoto IVS1-6

Resultados alcançados

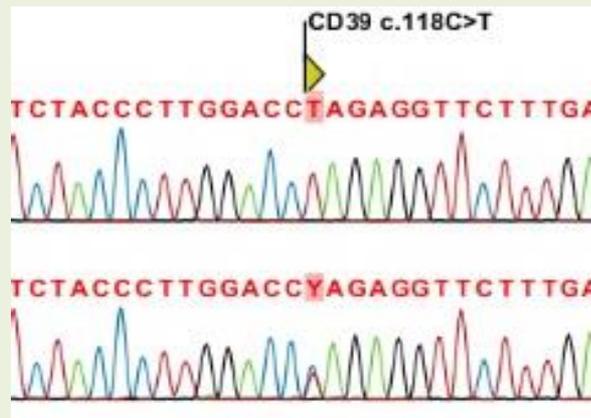
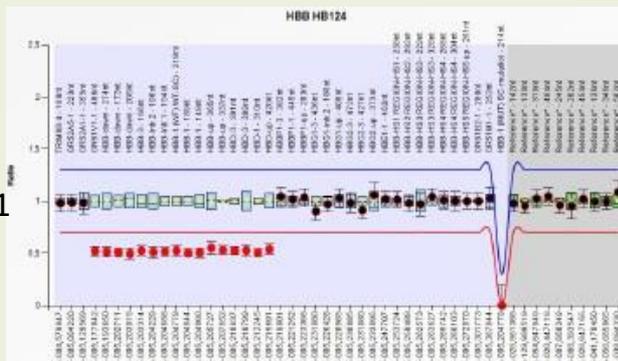
- Indicação: Triagem neonatal FF
- Idade: 1 ano e 2 meses
- Métodos: Eletroforese capilar, MLPA de β -globina e Sanger

FIGURA

A = 0,5%
F = 97%
A2 = 2,5%

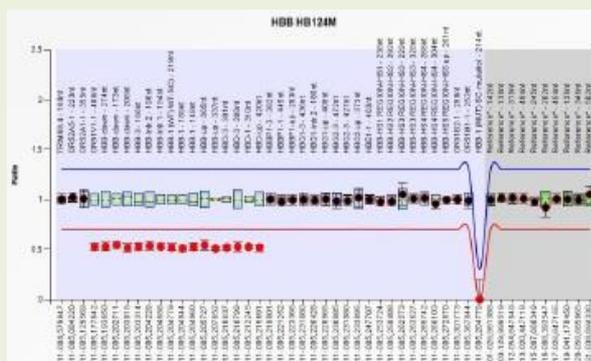


Criança:
PHHF tipo 1



Criança: CD39
Homozigoto

Pai: CD39
Heterozigoto

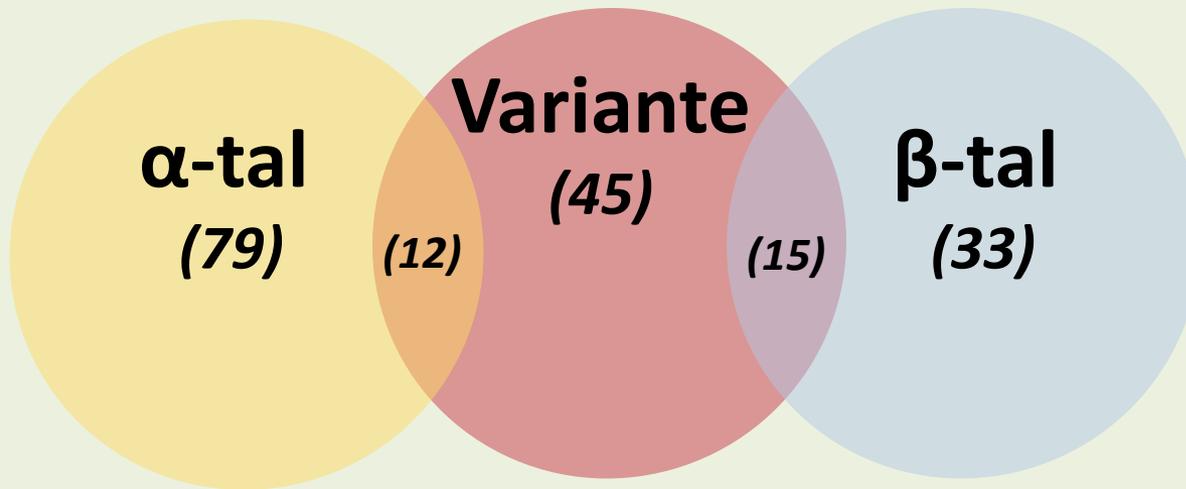


Mãe:
PHHF tipo 1

Paciente é PHHF1 + CD39

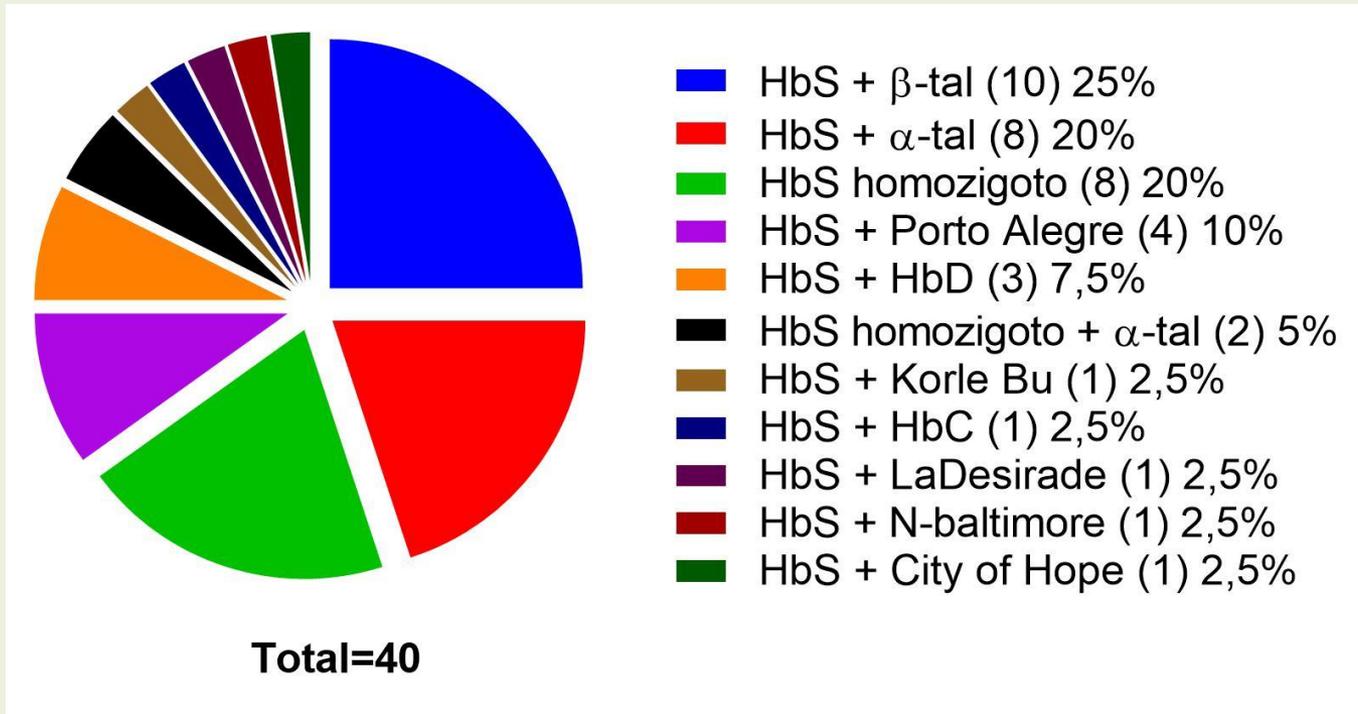
Resultados alcançados

- Número de alterações encontradas em pacientes e familiares



Resultados alcançados

- Perfil genotípico de doentes falciformes



Resultados alcançados

- Notório os benefícios alcançados com incorporação de métodos moleculares de alta sensibilidade para diagnóstico confirmatórios precoces e instituição de estratégias terapêuticas adequada, assim como elucidação de falsos positivos como p.ex **teste triagem FS para combinações de HbS/PHFH, FSA x FAS;**
- Interação ciência laboratorial e prática clínica - os casos até fechamento do diagnóstico são discutidos em conjunto entre hematologistas e biólogos;
- Capacitação profissional (bolsista de iniciação científica) e educação para saúde com criação do GRUPO de ESTUDOS em HEMOGLOBINOPATIAS;
- Educação em saúde para o usuário com a comunicação dos resultados da pesquisa aos familiares com orientações genéticas e sobre os cuidados em saúde dentro de sua condição específica.



GRUPO DE ESTUDOS EM HEMOGLOBINOPATIAS

HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA

A doença falciforme é uma das doenças genéticas mais frequentes, com prevalência elevada no Brasil (1:1000). As hemoglobinopatias despertam particular interesse de saúde pública em decorrência das morbidades associadas ao curso da doença, que inicia nos primeiros meses de vida com repercussões até a idade adulta, caracterizadas por uma miríade de complicações graves sabidamente em decorrência de comprometimento vascular sistêmico. Recentes avanços tecnológicos têm permitido maior compreensão das alterações genéticas associadas às diferentes manifestações clínicas das hemoglobinopatias hereditárias.

PARTICIPANTES

- Hematologistas pediátricos e biólogos do Hospital da Criança de Brasília;
- Profissionais da equipe de Triagem Neonatal do Hospital de Apoio de Brasília;
- Técnicos do núcleo de apoio a protocolos e estudos;
- Pediatras;
- Residentes médicos e estudantes de graduação.

CALENDÁRIO DE REUNIÕES

27 de março
29 de maio
31 de julho
25 de setembro
27 de novembro

14h às 16h

Como os resultados poderão ser incorporados pelo SUS?

- O algoritmo se mostrou eficiente para detecção das hemoglobinopatias, possui baixo custo e exige laboratório de biologia molecular com estrutura básica: termocicladores e sequenciador Sanger.
- Métodos de menor custo são primeiramente aplicados numa sequência lógica, utilizando dados clínicos hematológicos e de prevalência conhecidas. O teste de maior valor constante no algoritmo foi o MLPA (R\$ 80,00);
- O MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) é um método capaz de detectar perda (deleção) ou ganho (duplicação) de material genético. Através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex, permite analisar alterações no número de cópias em diversos genes.
- o MLPA é aplicado no diagnóstico das alfas talassemias, onde 90% das causas são deleções gênicas. A execução desse teste *in loco*, desde que com estrutura laboratorial já montada, apresenta custo 30 vezes menor do que o praticado em laboratórios privados .

Como os resultados poderão ser incorporados pelo SUS?

- Diante da modernização da medicina - agora personalizada – é condição *sine qua non* Laboratórios de Biologia Molecular no serviço público de saúde;
- Dessa forma, laboratórios básicos, podem por em prática a pesquisa das alterações mais frequentes e com impacto clínico no universo das hbpatrias apenas com a aquisição de um termociclador, uma cuba para eletroforese e um fotodocumentador;
- Assim, além da economia do teste executado *in house*, é indiscutível a rapidez do fechamento diagnóstico, UM DIAGNÓSTICO PRECOCE E DEFINITIVO, culminando em uma terapêutica assertiva e personalizada. Por consequência, reduzindo internações, consultas, medicações, mortalidade e morbidades.

OBRIGADA !



MINISTÉRIO DA
SAÚDE

