

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO LABORATORIAL DE TESTE RÁPIDO PARA O DIAGNÓSTICO DAS PORFIRIAS AGUDAS

Dahara Keyse Carvalho Silva¹; Afrânio Evangelista²; Patrícia Kauanna Fonseca Damasceno²

¹ Bolsista; Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Nível 3; daharacarvalho@gmail.com

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; patricia.damasceno@fieb.org.br

RESUMO

As porfirias agudas são um grupo de doenças hereditárias que possuem como principal indicador, a produção excessiva dos precursores porfirínicos como porfobilinogênio, os quais são excretados na urina. Na prática clínica, crises agudas de porfiria são muitas vezes diagnosticadas por exclusão e de forma tardia. Assim, o atraso no diagnóstico pode impactar diretamente na qualidade de vida ou resultar na morte do paciente. O reagente de Ehrlich é um reagente capaz de detectar porfobilinogênio na urina. Logo, o objetivo desse estudo foi padronizar um teste rápido para as porfirias agudas, baseado na reação de Erlich. Para isso, a reação de Erlich foi utilizada com o padrão de porfobilinogênio para verificar se a reação seria capaz de detectar presença do padrão, através do espectrofotômetro. Em nossos estudos preliminares, a reação de Ehrlich foi capaz de detectar o porfobilinogênio em todas as concentrações testadas, evidenciando a capacidade da reação em detectar porfobilinogênio.

PALAVRAS-CHAVE: Porfirias agudas; porfobilinogênio; Erlich

1. INTRODUÇÃO

As porfirias são um conjunto de doenças raras classificadas como hepáticas ou eritrocitárias, provocadas por deficiência na síntese do radical heme, essencial para as hemoproteínas como a hemoglobina. Este é produzido através da conversão de substâncias conhecidas como porfirinogênios ou porfirinas com a ajuda de oito enzimas diferentes. Pacientes que apresentam uma deficiência hereditária ou adquirida em uma dessas enzimas, podem acumular estes precursores no organismo, causando toxicidade, a qual pode ser manifestada predominantemente na forma de sintomas neuroviscerais, característicos das porfirias agudas e/ou distúrbios de fotossensibilidade cutânea, presente nas porfirias cutâneas.^{1,2,3,4}

As porfirias agudas são um grupo de doenças hereditárias hepáticas conhecidas por apresentarem sintomas agudos neuroviscerais e produção excessiva dos precursores porfirínicos como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e porfobilinogênio (PBG), os quais são excretados na urina e podem aumentar cerca de dez vezes a mais que o normal.^{5,6}

Embora o tratamento eficaz da porfiria aguda tenha sido descrito e aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) há mais de vinte anos, o teste padrão-ouro para seu diagnóstico possui um tempo médio de liberação de aproximadamente quinze dias. Esta demora no diagnóstico pode ser fatal ou contribuir para o agravamento do quadro clínico do paciente, podendo surgir lesões neurológicas graves e irreversíveis. Desta forma, o desenvolvimento e validação de um teste rápido do tipo Point of Care que seja capaz de diagnosticar qualitativamente as porfirias agudas a beira do leito, se apresenta como ferramenta crucial para adoção de medidas terapêuticas efetivas e imediatas que possam salvar vidas.

O reagente de Ehrlich é um reagente que contém p-dimetilaminobenzaldeído. O aldeído de Ehrlich é utilizado para detecção de porfobilinogênio na urina consiste numa solução de p-dimetilaminobenzaldeído em ácido clorídrico. A técnica é simples e rápida. O resultado acontece em cerca de 10 minutos. Caso ocorra a formação de coloração rósea significa que foi positivo para urobilinogênio e porfobilinogênio. Quando há presença de porfobilinogênio, após adição do clorofórmio, a cor rosa não é extraída na camada de clorofórmio. Dessa forma, essa reação pode ser utilizada como teste para diagnóstico das porfirias agudas.⁷

Logo, o objetivo desse estudo é desenvolver de um protótipo de teste rápido point of care para detecção do porfobilinogênio urinário baseado na reação de Erlich, o qual será destinado a triagem diagnóstica das porfirias agudas em pacientes que apresentam quadro clínico sugestivo da doença.

2. METODOLOGIA

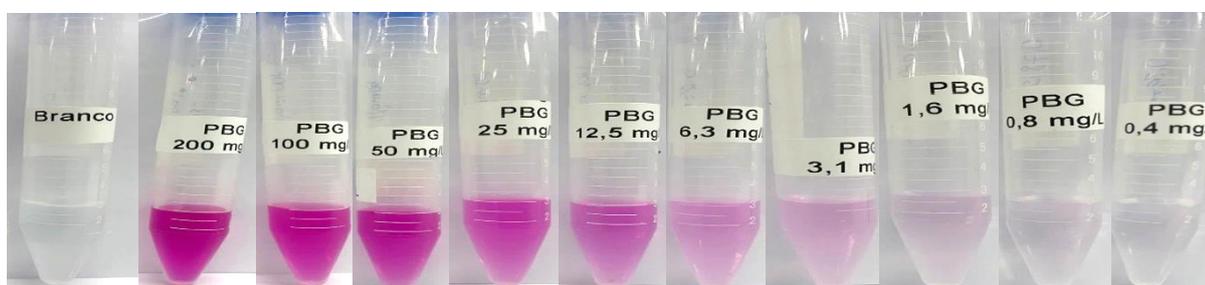
Para validar a reação de Erlich e a sua capacidade de detecção de porfobilinogênio, foi diluído 1mg do padrão de porfobilinogênio (Sigma-Aldrich) em 5mL de água destilada para uma concentração de (200mg/L) do padrão. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada do padrão em 10 pontos com fator de diluição 1:2 (200-0,39mg/L). Para realização da reação de Erlich, inicialmente, foi preparado ácido clorídrico a 2N e em seguida, foi preparado o reagente de Erlich com dissolução de 1g de p-dimetilaminobenzaldeído em 50mL de ácido clorídrico 2N. Posteriormente, 2,5 mL das diferentes concentrações do padrão de porfobilinogênio foi transferida para um tubo cônico de 15mL e adicionado 0,5mL do reagente de Erlich.

Agitou-se e após 10 minutos foi observado se houve ou não presença da coloração rosa. Nesse momento, 12 observadores foram recrutados para indicar até qual concentração do padrão, eles conseguiam observar a coloração rosa a “olho nu”. Depois adicionou-se 1mL de clorofórmio. Agitou-se bem novamente e o tubo foi deixado em repouso para separação de duas fases. Em seguida, a fase aquosa da reação foi coletada para realização de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm. Essa reação de Erlich foi realizada para verificar se a reação acontecia na faixa de concentração desejada e em até qual concentração o aparelho era capaz de detectar presença do analito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

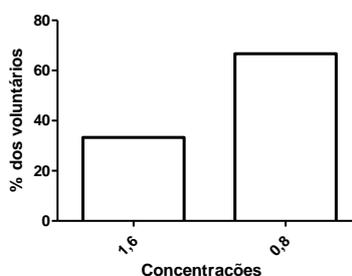
Através da reação de Erlich foi possível detecção porfobilinogênio nas diferentes concentrações do padrão. A formação da coloração rósea é indicativa de presença de porfobilinogênio ou urobilinogênio devido a reação desses mediadores com o p-metilaminobenzaldeído (Figura 1).⁸ Em nossos resultados, foram realizadas uma diluição 1:2. Abrangendo a faixa de 200mg/L até a concentração 0,4mg/L.

Figura 1. Formação da coloração rosa após adição do reagente de Erlich nas diferentes concentrações do padrão de porfobilinogênio.



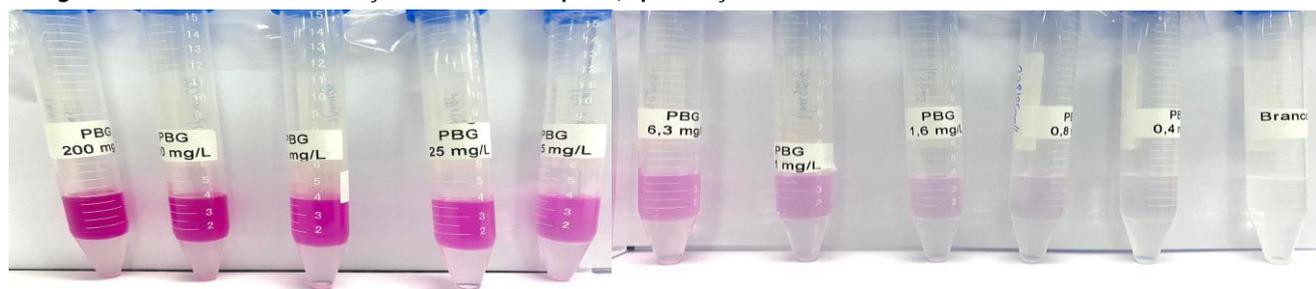
A análise de escala visual, realizada com observadores selecionados aleatoriamente, entre os 12 observadores recrutados, 66,7% indicou observar a coloração rosa até a concentração de 0,8 mg/L (n=8), os outros 33,3% (n=4) dos voluntários indicou observar a coloração rosa até a concentração de 1,6 mg/L (Gráfico 1).

Gráfico 1. Indicação da concentração que os voluntários conseguiam observar a cor rósea nas amostras



Após adicionar o clorofórmio, foi possível observar a coloração rosa na fase aquosa em todas as concentrações do padrão testadas. O aparecimento da coloração rosa na fase aquosa, indica a presença de porfobilinogênio, descartando a reação com outros metabólicos (Figura 2).

Figura 2. Permanência da coloração rosa na fase aquosa, após adição do clorofórmio.



A fase aquosa foi coletada em duplicata para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm. Após a leitura e desconto do valor do branco que foi colocado na coluna 12 (ausência do analito-porfobilinogênio), em todas as concentrações testadas foi observado sinal (absorvância), após a leitura, demonstrando a sensibilidade do teste (Figura 3). As escolhas das concentrações do padrão foram baseadas estabelecidos pelo “Protocolo e Diretriz das Porfirias Agudas”, o qual indica que o nível de porfobilinogênio em pacientes com crises de porfiria aguda pode variar de 200-20mg/L.

Figura 3. Leitura em espectrofotômetro e denominação das amostras.

Temperature(°C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
24,4	A	0,0007	0,2688	0,2308	0,1609	0,1043	0,0703	0,0371	0,0233	0,0115	0,0071	0,0046
	B	-0,0007	0,2644	0,2172	0,1597	0,1038	0,065	0,037	0,026	0,0092	0,0067	0,0034

Código	Concentrações
1	Branco
2	200 mg/L
3	100 mg/L
4	50 mg/L
5	25 mg/L
6	12,5 mg/L
7	6,3 mg/L
8	3,1 mg/L
9	1,6 mg/L
10	0,8 mg/L
11	0,4 mg/L

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reação de Erlich foi capaz de detectar o porfobilinogênio em todas as concentrações testadas. O próximo passo é realizar essa reação com amostras de urina com aumento de porfobilinogênio.

Agradecimentos

Agradecer a toda equipe do ISI-SAS e ao Recordati Rare Diseases que é um grupo farmacêutico internacional parceiro no desenvolvimento deste projeto.

5. REFERÊNCIAS

- KAUPPINEN, Raili. **Porphyrias**. The Lancet, v. 365, n. 9455, p. 241-252, 2005.
- SASSA, Shigeru. **Modern diagnosis and management of the porphyrias**. British journal of haematology, v. 135, n. 3, p. 281-292, 2006.
- PUY, Hervé; GOUYA, Laurent; DEYBACH, Jean-Charles. **Porphyrias**. The Lancet, v. 375, n. 9718, p. 924-937, 2010.
- DINARDO, Carla Luana et al. **Porfirias: quadro clínico, diagnóstico e tratamento**. Revista de Medicina, v. 89, n. 2, p. 106-114, 2010.
- DE ASSIS, José Guilherme Gonçalves Pereira et al. **Projeto de Rastreamento de Porfirias Agudas no Serviço de Urgência**. 2017.
- PRAUCHNER, Carlos André; EMANUELLI, Tatiana. **Porfirias agudas: aspectos laboratoriais**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, p. 249-257, 2002.
- BUIST, N. R. **Set of simple side-room urine tests for detection of inborn errors of metabolism**. British Medical Journal, v. 2, n. 5607, p. 745, 1968.