CINTIA NATSUMI SUEMASU

CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA DELECIONAL POR MLPA

(Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

CAMPINAS 2010

CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA DELECIONAL POR MLPA

(Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, na área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI (Departamento de Patologia Clínica – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP)

CAMPINAS

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8^a / 6044

٦

Su24c	Suemasu, Cíntia Natsumi Caracterização dos genótipos da talassemia alfa delecional por mlpa (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) / Cíntia Natsumi Suemasu. Campinas, SP : [s.n.], 2010.
	Orientador: Maria de Fátima Sonati Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	 Talassemia alfa. 2. População. I. Sonati, Maria de Fátima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Characterization of alpha thalassemic genotypes by MLPA (Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification)

Keywords: • Alpha talassemia

• Population

Titulação: Ciências Médicas Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati Prof. Dr. André Fattori Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu

Data da defesa: 31-08-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado Cintia Natsumi Suemasu

Orientador(a): Profa. Dra. Maria De Fatima Sonati

Membros:		
1. Profa. Dra. Maria De Fatima Sonati -	Annali)-	
2. Prof. Dr. Andre Fattori -	andre Joth.	
3. Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu -	1 StR	

Curso de pós-graduação em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2010

DEDICATÓRIA

À minha família e ao Diego por todo amor, carinho e compreensão que me ajudaram a vencer todos os obstáculos.

AGRADECIMENTOS

- * À Profa. Dra Maria de Fátima Sonati, pela confiança, amizade e pelos preciosos ensinamentos;
- Aos membros da banca, Dra. Juliana Forte Mazzeu e Dr. André Fattori pela pronta disponibilidade em participar da minha banca e pelas importantes observações e sugestões;
- Aos amigos do laboratório: Daniela, Denise, Elza, Felipe, Magnun, Pollyana, Susan, Tânia, Vanessa e Vânia, pelo carinho, pelas diversas conversas, conselhos e também, "puχões de orelha" que me ajudaram a ver a vida por outras perspectivas e contribuíram imensamente para o meu amadurecimento profissional e pessoal;
- Às moradoras e ex-moradoras da pensão: Jaíra, Liliane, Mônica e Paula, por todas as conversas, desabafos, jantares, marmitas, baladas e acima de tudo, por terem sido a minha segunda família nestes 3 anos.
- Ao pessoal do Hemocentro, CBMEG e Genética-FCM por terem colaborado imensamente com a realização deste trabalho, sempre muito solícitos e amigáveis.
- Ao pessoal do LPC HC pelas brincadeiras, conversas e ensinamentos;
- À minha família e ao Diego, que mesmo distantes, sempre estiveram muito presentes em minha vida, me dando amor e suporte para que eu pudesse vencer as adversidades da vida;
- * À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro;
- A todos aqueles que por descuido deixar de mencionar, mas que fizeram parte da minha vida nestes 3 anos.

Muito obrigada!

"Quando tudo nos parece dar errado, acontecem coisas boas que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo."

Renato Russo

RESUMO

A talassemia alfa (α) constitui um grupo de doenças hereditárias causadas pela redução ou ausência da síntese das cadeias α da hemoglobina. Os genes responsáveis pela codificação dessas cadeias são duplicados ($\alpha_2 e \alpha_1$) e estão localizados em um agrupamento gênico ou cluster, situado próximo ao telômero do cromossomo 16 (16p13.3). As deleções são as principais causas da doença, podendo afetar um ou ambos os genes a do cromossomo (formas α^+ e α^0 , respectivamente). Nos últimos anos, várias técnicas foram desenvolvidas para identificar as deleções envolvendo o *cluster* dos genes α no cromossomo 16. A *gap*-PCR, o Southern blot e o FISH são comumente aplicados com esta finalidade; entretanto, muitas deleções ainda não são detectadas utilizando-se essas estratégias metodológicas. Em 2005, uma técnica simples e adequada a análises quantitativas rápidas, o Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), foi adaptada ao diagnóstico das hemoglobinopatias. Esta técnica é baseada na ligação e na amplificação, em reação de PCR, de dois oligonucleotídeos (sondas) que se hibridizam de forma adjacente ao DNA alvo. Cada oligonucleotídeo é projetado para gerar um produto de comprimento único e, por possuírem terminações comuns, todas as sondas podem ser amplificadas utilizando um único par de iniciadores. Por fim, o uso de fluorocromos permite a separação dos fragmentos, que foram gerados pela amplificação das sondas, em sistema de seqüenciamento por capilaridade. No presente estudo nós utilizamos o MLPA para investigar as bases moleculares da talassemia alfa em nove pacientes não relacionados, cinco deles com Doença da Hb H, cujos diagnósticos moleculares não puderam ser esclarecidos pelas técnicas usuais, incluindo o seqüenciamento de DNA. No total, foram utilizadas 44 sondas, distribuídas desde o telômero ao gene MSLN, cobrindo uma região de cerca de 800 kb, na região 16p13.3. Oito diferentes deleções foram detectadas. Enquanto quatro delas comprometem uma região de grande extensão que inclui todo o *locus a* e seu elemento regulatório, com tamanhos mínimos de 240 kb, 470 kb, 500 kb e 720 kb, respectivamente (posições 97000-334571, 97000-570532, 97000-602492 and 97000-816477 do UCSC Genome Browser, Fevereiro, 2009, respectivamente), quatro outras encontram-se limitadas às regiões que contém o elemento regulatório, deixando os genes a intactos, porém sem expressão. Essas últimas apresentam tamanhos mínimos de 0.4 kb, em um dos casos, e de 95 kb a 100 kb nos demais (posições entre 163464-163904, 97000-193847, 97000-202417 e 97000-202417 do UCSC Genome Browser, Fevereiro, 2009, respectivamente). Em um dos pacientes com fenótipo talassêmico heterozigótico foi demonstrada a presença de uma quadruplicação de cerca de 230 kb de DNA, incluindo todo o cluster a e seu elemento regulatório (97000 a 231370 do UCSC Genome Browser, Fevereiro, 2009). Este estudo representa o primeiro no Brasil a empregar o método de MLPA na caracterização das bases moleculares da talassemia a. A ampla diversidade de alterações identificadas enfatiza a necessidade de se investigar todos os casos cujos valores hematológicos revelem hipocromia e microcitose, na ausência de deficiência de ferro e níveis normais de HbA₂.

ABSTRACT

Alpha (α) thalassemia is an inherited hemoglobin disorder characterized by reduction or absence of the α -globin chain synthesis. These chains are encoded by duplicated genes (α_2 and α_1) that lie in a gene cluster near the telomeric end of the short arm of chromosome 16 (16p13.3). Deletions are the major molecular cause of the disease and may affect one or both α genes in the chromosome (the α^+ and α^0 forms, respectively). In recent years several techniques have been developed to identify deletions involving the α -globin cluster in chromosome 16. The molecular tests commonly used to identify these deletions are gap-PCR, Southern Blot analysis and FISH. However, several thalassemia deletions remain uncharacterized by these methods.

In 2005 a simple technique suitable for rapid quantitative analysis — multiplex ligationdependent probe amplification (MLPA) — was adapted for the diagnosis of thalassemias. The approach is based on the ligation and PCR amplification of two adjacently hybridizing oligonucleotides (probes). Each oligonucleotide pair is designed to give a product of unique length, and by using common ends all the probes can be amplified with one primer pair. Finally, the use of a fluorescent label allows the probe to be separated in a capillary sequencing system. In this study we used MLPA to investigate the molecular basis of thalassemia in nine unrelated patients (five with Hb H disease) in whom the molecular causes of the disease could not be detected by sequence analysis or other conventional techniques. In total, 44 probe pairs were used, covering approximately 800 kb from the telomere to the MSLN gene in the 16p13.3 region. Eight different deletions were detected. While four of them affect a large region including the entire α -globin gene locus and its upstream regulatory element, spanning genomic regions of at least 240 kb, 470 kb, 500 kb and 720 kb (positions 97000-334571, 97000-570532, 97000-602492 and 97000-816477 of the UCSC Genome Browser, February, 2009, respectively). The other four deletions were limited to a region that contains the upstream regulatory element; the α -globin genes, although intact, are therefore not expressed. These deletions span a region of at least 0.4 kb in one case and from 95 kb to 100 kb in the other cases (positions 163464-163904, 97000-193847, 97000-202417 and 97000-202417 of the UCSC Genome Browser, February, 2009, respectively). One carrier who was suspected of having heterozygous α-thalassemia showed a segmental quadruplication spanning about 230 kb and including the α cluster and upstream regulatory element (97000-231370 do UCSC Genome Browser, February, 2009). This study is the first in Brazil to use the MLPA method to characterize thalassemias. The variety of rearrangements identified highlights the need to investigate all cases presenting with microcytosis and hypochromia without iron deficiency or elevated Hb A₂ levels.

LISTA DE ABREVIATURAS

 α_2 : Gene alfa 2 $\alpha_{1:}$ Gene alfa 1 α^+ : Remoção de um gene alfa, em um alelo α^0 : Remoção de dois genes alfa, em um alelo $-\alpha^{3.7}$: Deleção de cerca de 3.7 kb $-\alpha^{4.2}$: Deleção de cerca de 4.2 kb $-\alpha^{20.5}$: Deleção de cerca de 20.5 kb --MED: Deleção de cerca de 18 kb --SEA: Deleção de 20 kb $\alpha\alpha\alpha^{anti\alpha3.7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{anti\alpha4.2}$: Triplicação do gene alfa --FIL: Deleção de cerca de 30 kb --THAI: Delecão de cerca de 38 kb ζ: Gene embrionário zeta ε: Gene embrionário épsilon y: Gene gama δ : Gene delta α-MRE: Alpha Major Regulatory Element ACH: Active Chromatin Hub Array-CGH: array-comparative genome hybridization ATR-16: Alpha thalassemia retardation associated with chromosome 16 CEP: Comitê de Ética em Pesquisa DNA: Ácido Desoxirribonucléico FISH: Fluorescent in situ Hybridization GV: Glóbulos vermelhos Hb: Hemoglobina Hb F: Hemoglobina Fetal Hbpatias: Hemoglobinopatias HCM: Hemoglobina Corpuscular Média HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance HS: Sítio Hipersensível à DNase H₂O: Água IVS: região de intron Kb: Mil pares de base - quilobases LCR: Lócus Control Region Mb: Mil quilobases – megabases Min.: minuto(s) MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification nM: Nanômetros - medida de absorbância Nt: nucleotídeos, bases O2: Oxigênio OMS: Organização Mundial da Saúde Pb: Pares de base PCR: Reação em cadeia de Polimerase PHHF: Persistência Hereditária da Hemoblogina Fetal q-Real Time PCR: PCR quantitativo RDW: Red Cell Distribution Width ou índice de anisocitose Sítio CAP: Sítio onde se inicia a transcrição TE: Solução composta por Tris e EDTA VCM: Volume Corpuscular Médio

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos, hematológicos e moleculares dos pacientes	Página 58
Tabela 2. Dados demográficos, hematológicos e moleculares dos familiares	Página 59
Tabela 3. Sequências das sondas sintéticas	Página 68
Tabela 4. Interpretação dos tipos de deleções mais comuns	Página 72

FIGURAS

Figura 1. Molécula de hemoglobina e o seu grupo heme	Página 32
Figura 2. Ontogenia das cadeias globínicas	Página 33
Figura 3. Representação dos clusteres alfa e beta e seus respectivos elementos	
regulatórios	Página 35
Figura 4. Representação da <i>a</i> -ACH em células não eritróides murinas	Página 36
Figura 5. Representação dos genótipos da talassemia α	Página 41
Figura 6. Origem das deleções $-\alpha^{3.7} e -\alpha^{4.2} e$ suas triplicações	Página 42
Figura 7. Representação das 7 deleções mais comuns da talassemia α	Página 44
Figura 8. MLPA x demais técnicas	Página 47
Figura 9. Estrutura das sondas comerciais de MLPA	Página 49
Figura 10. Procedimentos na técnica de MLPA	Página 50
Figura 11. Ciclos da reação de PCR para o MLPA	Página 62
Figura 12. Disposição das sondas do kit ao longo do <i>lócus</i> α	Página 70
Figura 13. Localização das sondas do kit ao longo do <i>lócus</i> α	Página 74

Figura 14. Gráfico de MLPA para um paciente normal	Página 74
Figura 15. Sondas alteradas na deleção $-\alpha^{3.7}$, em heterozigose	Página 75
Figura 16. Gráfico de MLPA para a deleção $-\alpha^{3,7}$ em heterozigose	Página 75
Figura 17. Sondas alteradas na deleção $-\alpha^{3.7}$, em homozigose	Página 76
Figura 18. Gráfico de MLPA para a deleção $-\alpha^{3,7}$ em homozigose	Página 76
Figura 19. Sondas alteradas na triplicação do gene α	Página 77
Figura 20. Gráfico de MLPA para triplicação do gene α	Página 77
Figura 21. Sondas alteradas na deleção $-\alpha^{20.5}$	Página 80
Figura 22. Gráfico de MLPA para a deleção $-\alpha^{20.5}$	Página 80
Figura 23. Sondas alteradas na deleção -MED	Página 81
Figura 24. Gráfico de MLPA para a deleção -MED	Página 81
Figura 25. Sondas alteradas na deleção ^{-SEA}	Página 82
Figura 26. Gráfico de MLPA para a deleção -SEA	Página 82
Figura 27. Sondas alteradas na deleção ^{-FIL}	Página 83
Figura 28. Gráfico de MLPA para a deleção ^{-FIL}	Página 83
Figura 29. Sondas alteradas para indivíduo com $-\alpha^{3.7} e -\alpha^{MED}$	Página 84
Figura 30. Gráfico de MLPA para indivíduo com - $\alpha^{3.7}$ e - α^{-MED}	Página 84
Figura 31. Sondas alteradas na mutação HpH	Página 85
Figura 32. Gráfico de MLPA para a mutação HpH	Página 85
Figura 33. Resultado geral da validação do método de MLPA	Página 86
Figura 34. Sondas alteradas no paciente 1 – sondas kit	Página 88
Figura 35. Gráfico de MLPA para o paciente 1 – sondas kit	Página 88
Figura 36. Sondas alteradas no paciente 2 – sondas kit	Página 89

Figura 37. Gráfico de MLPA para o paciente 2 – sondas kit	Página 89
Figura 38. Sondas alteradas no paciente 3 – sondas kit	Página 90
Figura 39. Gráfico de MLPA para o paciente 3 – sondas kit	Página 90
Figura 40. Sondas alteradas no paciente 4 – sondas kit	Página 91
Figura 41. Gráfico de MLPA para o paciente 4 – sondas kit	Página 91
Figura 42. Sondas alteradas no paciente 5 – sondas kit	Página 92
Figura 43. Gráfico de MLPA para o paciente 5 – sondas kit	Página 92
Figura 44. Sondas alteradas no paciente 6 – sondas kit	Página 94
Figura 45. Gráfico de MLPA para o paciente 6 – sondas kit	Página 94
Figura 46. Sondas alteradas no paciente 7 – sondas kit	Página 95
Figura 47. Gráfico de MLPA para o paciente 7 – sondas kit	Página 95
Figura 48. Sondas alteradas no paciente 8 – sondas kit	Página 96
Figura 49. Gráfico de MLPA para o paciente 8 – sondas kit	Página 96
Figura 50. Sondas alteradas no paciente 9 – sondas kit	Página 98
Figura 51. Gráfico de MLPA para o paciente 9 – sondas kit	Página 98
Figura 52. Resultado geral com as sondas do kit	Página 99
Figura 53. Sondas alteradas na mãe do paciente 3 – sondas kit	Página 102
Figura 54. Gráfico de MLPA para a mãe do paciente 3 – sondas kit	Página 102
Figura 55. Sondas alteradas no irmão do paciente 3 – sondas kit	Página 103
Figura 56. Gráfico de MLPA para o irmão do paciente 3 – sondas kit	Página 103
Figura 57. Sondas alteradas no pai do paciente 7 – sondas kit	Página 104
Figura 58. Gráfico de MLPA para o pai do paciente 7 – sondas kit	Página 104
Figura 59. Sondas alteradas no pai do paciente 8 – sondas kit	Página 105

Figura 60. Gráfico de MLPA para o pai do paciente 8 – sondas kit	Página 105
Figura 61. Disposição das sondas parte I no cromossomo 16	Página 106
Figura 62. Sondas alteradas no paciente 1 – sondas parte I	Página 108
Figura 63. Gráfico de MLPA para o paciente 1 – sondas parte I	Página 108
Figura 64. Sondas alteradas no paciente 2 – sondas parte I	Página 109
Figura 65. Gráfico de MLPA para o paciente 2 – sondas parte I	Página 109
Figura 66. Sondas alteradas no paciente 3 – sondas parte I	Página 110
Figura 67. Gráfico de MLPA para o paciente 3 – sondas parte I	Página 110
Figura 68. Sondas alteradas no paciente 4 – sondas parte I	Página 111
Figura 69. Gráfico de MLPA para o paciente 4 – sondas parte I	Página 111
Figura 70. Sondas alteradas no paciente 5 – sondas parte I	Página 112
Figura 71. Gráfico de MLPA para o paciente 5 – sondas parte I	Página 112
Figura 72. Sondas alteradas no paciente 6 – sondas parte I	Página 113
Figura 73. Gráfico de MLPA para o paciente 6 – sondas parte I	Página 113
Figura 74. Sondas alteradas no paciente 7 – sondas parte I	Página 114
Figura 75. Gráfico de MLPA para o paciente 7 – sondas parte I	Página 114
Figura 76. Resultado geral com as sondas parte I	Página 115
Figura 77. Disposição das sondas parte II no cromossomo 16	Página 116
Figura 78. Sondas alteradas no paciente 1, mix 6 – sondas parte II	Página 118
Figura 79. Gráfico de MLPA para o paciente1, mix 6 – sondas parte II	Página 118
Figura 80. Sondas alteradas no paciente 3, mix 2 – sondas parte II	Página 119
Figura 81. Gráfico de MLPA para o paciente 3, mix 2 – sondas parte II	Página 119
Figura 82. Sondas alteradas no paciente 3, mix 3 – sondas parte II	Página 120

Figura 83. Gráfico de MLPA para o paciente 3, mix 3 – sondas parte II	Página 120
Figura 84. Sondas alteradas no paciente 4, mix 4 – sondas parte II	Página 121
Figura 85. Gráfico de MLPA para o paciente 4, mix 4 – sondas parte II	Página 121
Figura 86. Sondas alteradas no paciente 5, mix 4 – sondas parte II	Página 122
Figura 87. Gráfico de MLPA para o paciente 5, mix 4 – sondas parte II	Página 122
Figura 88. Sondas alteradas no paciente 6, mix 5 – sondas parte II	Página 123
Figura 89. Gráfico de MLPA para o paciente 6, mix 5 – sondas parte II	Página 123
Figura 90. Resultado geral com as sondas parte II	. Página 127

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
1.1. Hemoglobina: Estrutura e Função	31
1.2. Regulação da Expressão dos Genes de Globina	33
1.3. Hemoglobinopatias	38
1.3.1. Talassemias	38
1.3.1.1.1. Talassemias α^+	39
1.3.1.1.2. Talassemias α^0	43
1.3.1.2. Diagnóstico Molecular das talassemias α	45
1.3.1.2.1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	47
2. JUSTIFICATIVA	53
3. OBJETIVO	55
4. MATERIAIS E MÉTODO	57
4.1. MATERIAIS	57
4.2. MÉTODO	61
4.2.1 Validação do Método de MLPA	61
4.2.2. Ensaios de MLPA	61
4.2.2.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas	62
4.2.2.2. Reação de Ligação	62
4.2.2.3. Reação de PCR	63
4.2.2.4. Separação dos fragmentos amplificados	64
4.2.2.5. Análise dos Dados	64
4.2.3. Protocolo MLPA para sondas sintéticas	66
5. RESULTADOS	70
5.1. Validação do método de MLPA	70
5.1.1. Controles negativos	73
5.1.2. Talassemia α^+	73
5.1.3. Talassemia α^0	78
5.2. Ensaios de MLPA dos pacientes	87
5.2.1. Pacientes com Doença da Hb H	87
5.2.2. Heterozigotos da Talassemia α^0	93

5.2.3. Paciente 9	97
5.2.4. Estudos Familiais	100
5.3. Refinamento das deleções	106
5.3.1. Sondas-parte I	106
5.3.2. Sondas-parte II	116
6. DISCUSSÃO	129
7. CONCLUSÕES	137
8. REFERÊNCIAS	139
ANEXO 1. Manuscrito submetido à revista Braz J Med Biol Res	149
ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética Local	172
ANEXO 3. Kits de MLPA empregados nas reações	175
ANEXO 4. Cromatogramas das reações de MLPA para a validação da técnica (A a J)	177
ANEXO 5. Cromatogramas das reações de MLPA, empregando as sondas do kit (A a I)	187
ANEXO 6. Cromatogramas das reações de MLPA, empregando as sondas sintéticas parte I (A a G)	200
ANEXO 7. Cromatogramas das reações de MLPA, empregando as sondas sintéticas parte II (A a F)	207

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobina: Estrutura e Função

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica encontrada em elevadas concentrações nos eritrócitos (640 milhões de moléculas por célula), sendo o pigmento respiratório de todos os organismos vertebrados (HOFFBRAND *et al.*, 2000).

Apesar de sua função primordial estar associada ao transporte de oxigênio (O_2) , alguns seres vivos anaeróbios ou fotossintetizantes, que não dependem da Hb para o transporte de O_2 , surpreendentemente apresentam esta proteína em suas células. Em alguns organismos unicelulares, a Hb pode exercer a função de cofator enzimático de reações, auxiliar no combate aos radicais livres ou ainda funcionar como aceptor de elétrons durante a respiração *in vivo* (HARDISON, 1999).

Estruturalmente, as Hbs são compostas de duas cadeias polipeptídicas do "tipo alfa" (α ou ζ) e duas cadeias do "tipo beta" (β , δ , ${}^{G}\gamma$, ${}^{A}\gamma$ ou ε), sendo que cada uma delas está associada a um grupo prostético heme, que contém um átomo de ferro na forma bivalente. Essa conformação da molécula permite sua ligação de forma reversível ao O₂, garantindo assim, seu transporte dos pulmões aos tecidos, além de conferir estabilidade ao conjunto tetramérico. (PERUTZ *et al.*, 1960; BUNN e FORGET, 1986; WILLIAMS *et al.*, 2001) (Figura 1).



Figura 1. A molécula de Hb e o grupo heme. (Adaptado de: BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND *et al.*, 2000).

A combinação dessas cadeias origina os diferentes tipos de Hbs, que são sintetizadas de acordo com as necessidades do indivíduo, ao longo do desenvolvimento. No início da fase embrionária, a síntese das Hbs é restrita aos eritroblastos do saco vitelino, onde as cadeias zeta (ζ) e épsilon (ε) são produzidas nas primeiras quatro semanas do período prénatal, originando a primeira Hb embrionária, denominada Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$). Logo após este período, inicia-se a síntese das cadeias alfa (α) e gama (γ), formando as Hbs Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$). Após a 6^a semana de gestação, o fígado passa a ser o principal responsável pela síntese das Hbs, produzindo, especialmente a Hb Fetal (Hb F – $\alpha_2\gamma_2$), que predomina até aproximadamente a 30^a semana de gestação. No período de três a seis meses após o nascimento, a síntese de cadeias γ , é amplamente substituída pela de β , na medula óssea, e com isso, a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) apresenta um aumento gradativo em sua produção. Ainda no período pré-natal, a medula óssea inicia a síntese das cadeias delta (δ) que juntamente com as α irão compor a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), segunda Hb mais importante no adulto. Dessa forma, nas hemácias de adultos normais (com idade superior a seis meses) são encontradas cerca

de 95% de Hb A, 2-3% de Hb A₂ e de 0-2% de Hb F (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND *et al.*, 2000; STEINBERG *et al.*, 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001) (Figura 2).



Figura 2. Ontogenia das cadeias globínicas (Adaptado de: HOFFBRAND et al., 2000).

1.2. Regulação da Expressão dos Genes de Globina

Os genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas $\alpha \in \zeta$ (com 141 aminoácidos) e β , δ , $\gamma \in \varepsilon$ (com 146 aminoácidos) são compactos, com cerca de 1 a 2 kb de DNA, sendo formados por 3 *exons* e 2 *introns*. Estes genes estão localizados em dois agrupamentos, ou *clusters*, denominados $\alpha \in \beta$, estando situados nos braços curtos dos cromossomos 16 (16p13.3) e 11 (11p15.5), respectivamente. Nestes, os genes se encontram dispostos na ordem em que são expressos durante o desenvolvimento do indivíduo (HIGGS, 1993).

O *cluster* α apresenta cerca 26 kb e é formado pelo gene embrionário ζ , os pseudogenes $\psi \zeta$, $\psi \alpha_1 \in \psi \rho$, os genes da globina α duplicados ($\alpha_2 \in \alpha_1$) e os genes $\theta \in \alpha^D$

(também conhecidos como μ) (HIGGS, 1993; HUGHES *et al.*, 2005; VOON e VADOLAS, 2008). Já o *cluster* β , com cerca de 70 kb, é composto pelo pseudogene β , pelo gene embrionário ε , pelos genes ^G γ e ^A γ e pelos genes δ e β (FRITSCH *et al.*, 1980). Os produtos protéicos dos genes α_1 e α_2 são idênticos, enquanto as cadeias produzidas pelos genes ^G γ e ^A γ diferem no resíduo 136 (glicina e alanina, respectivamente) (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND *et al.*, 2000; STEINBERG *et al.*, 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001).

A expressão dos genes de globina em ambos os *clusters* é regulada por vários fatores, que permitem que o ritmo de produção das cadeias seja balanceado, de forma a garantir a correta formação do tetrâmero de Hb (BUNN e FORGET, 1986; WILLIAMS *et al.*, 2001). Os mecanismos que regulam esta expressão envolvem, dentre outros, a influência de várias seqüências regulatórias desempenham papel na determinação da transcrição de um gene em particular (HOFFBRAND *et al.*, 2000) e representam importantes sítios de ligação para fatores de transcrição (VOON e VADOLAS, 2008).

A regulação da expressão dos genes situados no *cluster* β é dada por 5 sítios hipersensíveis à DNase I (HS 1-5), específicos de células eritróides, distribuídos de 4 a 20 kb à montante do sítio CAP do gene embrionário ϵ . Este segmento de DNA, que inclui estes sítios, é chamado de β -LCR (*Locus Control Region*). De forma similar, o controle da expressão dos genes localizados no *cluster* α é mediada por 4 sítios HS, localizados 10 (HS-10), 33 (HS-33), 40 (HS-40) e 48 (HS-48) kb a montante do sítio CAP do gene embrionário ζ (HIGGS *et al.*, 1998; RIBEIRO e SONATI, 2008). Este segmento de DNA é chamado de α -LCR, sendo que dos 4 sítios, apenas o HS-40 é capaz de conduzir a síntese dos genes α para níveis significativos e por esta razão ele recebe a denominação de

elemento regulatório principal, ou α -MRE (*Major Regulatory Element*) (Figura 3). Estudos realizados em camundongos transgênicos demonstraram que deleções ocorridas neste sítio culminam em uma importante redução na expressão dos genes α para valores inferiores a 5% (VOON e VADOLAS, 2008).



Figura 3. Representação esquemática dos *clusters* α e β e seus respectivos elementos regulatórios (Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2001; VOON e VADOLAS, 2008).

O elemento regulatório α -MRE se comporta como um clássico *enhancer* sendo que sua função principal é a de ativar e ampliar a expressão dos genes ζ e α , em células eritróides, através de interação elemento/promotor, mediada pelos fatores de transcrição e pela formação de uma estrutura cromatínica semelhante a uma alça, conhecida como *active chromatin hub* (ACH) (ZHOU *et al*, 2006; VOON e VADOLAS, 2008). Estudos em modelo murino revelaram que, o recrutamento dos promotores dos genes ativos do *cluster* α e do elemento regulatório para a ACH, resulta na expressão dos genes globínicos em

células eritróides murinas, ao passo que, a exclusão desses genes e do elemento regulatório desta estrutura cromatínica, em células não-eritróides murinas, é acompanhada pela inativação da expressão gênica (ZHOU *et al.*, 2006) (Figura 4).



Figura 4. Representação da α -ACH em células eritróides e não-eritróides murinas. No painel B, os promotores ativos dos genes do *cluster* α (representados pelas esferas verdes) interagem com os sítios HS (retângulos azuis), formando a α -ACH (esfera tracejada). A α -ACH é compartilhada pelos genes vizinhos ao *cluster* α (esferas verdes). No painel C, os genes do *cluster* α (esferas verdes) e os sítios HS (retângulos cinzas) são excluídos da α -ACH (ZHOU *et al.*, 2006).

O domínio funcional do α-MRE é restrito a um fragmento de 350 pb, onde encontram-se localizados vários sítios, bem conservados, de ligação para fatores de transcrição. Estes incluem 4 sítios para ligação do fator eritróide-específico GATA1, 4 CACC boxes e 2 sítios de ligação para fator-eritróide NF-E2, que são ocupados, *in vivo*, apenas em células eritróides, dependendo do estágio de maturação dos precursores

eritróides (JARMAN et al., 1991; RIBEIRO e SONATI, 2008; VOON e VADOLAS, 2008).

O α-MRE é ainda geneticamente polimórfico, sendo que até o momento foram descritos cerca de 6 diferentes haplótipos, classificados de A a F. Esses haplótipos foram inicialmente estudados por HARTEVELD et al. (2002) em populações da África (de língua Bantu e pigmeus), Europa (Holanda e Itália) e Ásia (China, índios do Leste e Indonésia) e, posteriormente, por RIBEIRO et al. (2003), em duas populações indígenas nativas da Amazônia (Parakanã e Xikrin). A maioria desses polimorfismos está situada entre as regiões de ligação dos fatores nucleares, ou em sítios considerados inativos in vivo (com exceção do haplótipo D) e por esta razão, esperava-se que estes não pudessem interferir na regulação dos genes do cluster a. Entretanto, um estudo in vitro realizado por RIBEIRO et al. (2009), que analisou e comparou a expressão do gene da luciferase em cinco constructos contendo os diferentes α -MREs (haplótipos B a F) como elementos *enhancer*, revelou uma considerável diminuição na expressão desse gene, quando comparados ao constructo contendo o haplótipo selvagem A. A maior redução foi observada com o haplótipo F (+96, $C \rightarrow A$), cujo polimorfismo situa-se próximo ao sítio de ligação das proteínas SP1, que pode, entretanto, não estar ativo in vivo. Esses resultados demonstram que uma simples substituição de base, responsável por estes haplótipos, pode reduzir a expressão gênica in vitro. Entretanto ainda não se sabe se estes diferentes polimorfismos do α -MRE teriam influência sobre a expressão dos genes de α globina *in vivo*.

1.3. Hemoglobinopatias

Para que o tetrâmero funcional possa ser formado, é preciso que a expressão dos genes de globina se dê de forma balanceada, equilibrada. Mutações que afetam os genes

responsáveis pela síntese ou regulação das cadeias globínicas ocasionam as hemoglobinopatias (Hbpatias) hereditárias. Elas constituem hoje o maior grupo de doenças genéticas mundialmente distribuídas (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2001) e, genericamente, podem ser classificadas em:

- Alterações estruturais, com a presença de hemoglobinas anômalas no interior das hemácias, como as Hbs S e C;

- Alterações do ritmo de síntese (talassemias), com a supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas;

Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), uma anomalia caracterizada pela produção persistente de cadeias γ durante a vida adulta (BUNN e FORGET, 1986; DACIE e LEWIS, 2006; HOFFBRAND *et al.*, 2000; STEINBERG *et al.*, 2001; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001).

1.3.1. Talassemias

As talassemias estão entre as doenças monogênicas mais comuns no mundo. Elas acometem principalmente populações originárias do continente africano, da região Mediterrânea, do Sudeste Asiático e do Oriente Médio (WILLIAMS *et al.*, 2001; URBINATI *et al.*, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 20% da população mundial é portadora de algum tipo de talassemia (web site da OMS, 2008)¹.

Essa doença resulta de mutações que podem reduzir ou abolir a produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas, sendo classificadas em talassemias α , β , γ , δ , $\delta\beta$, e $\gamma\delta\beta$, dependendo de qual ou quais sejam as cadeias afetadas. As mais freqüentes são as talassemias α , encontradas em praticamente todas as populações investigadas, e as

¹ http://www.who.int/en/

talassemias β , que, embora com freqüências menores e restritas a algumas populações, apresentam grande importância clínica (SONATI e COSTA, 2008). No Brasil, estima-se que cerca de 1% da população caucasóide da região sudeste é portadora de ao menos um gene talassêmico β , enquanto que as talassemias α (forma α^+) afetam cerca de 23% dos brasileiros de descendência africana.

A fisiopatologia da doença está associada à produção ineficiente de Hb, com a presença de hemácias hipocrômicas e microcíticas (características da doença) e ao acúmulo das cadeias que apresentam sua síntese preservada. As cadeias em excesso podem formar agregados instáveis que precipitam e causam alterações às membranas dos eritrócitos, levando à destruição precoce das células. Dessa forma, as manifestações clínicas dependem, predominantemente, do grau de desequilíbrio de síntese entre as cadeias globínicas e este, por sua vez, ao número de genes afetados e ao tipo de mutação presente no paciente. As alterações clínicas e laboratoriais podem ser desde mínimas ou ausentes até exuberantes e graves, com a presença de anemia hemolítica crônica importante, sendo que nestes casos, os pacientes podem necessitar de transfusões sanguíneas periódicas ou regularmente (HOFFBRAND *et al.*, 2000; WEATHERALL e CLEGG, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001).

1.3.1.1. Talassemias α

Entre todos os defeitos genéticos das Hbs, as talassemias α cursam como uma das mais bem distribuídas mundialmente, embora sua prevalência seja maior em áreas do Mediterrâneo, Ásia, Oriente Médio e África. Ao longo dos anos, correntes migratórias provenientes destas regiões se dirigiram ao continente americano, contribuindo para a

prevalência da doença em países como Estados Unidos, Canadá, México, Caribe, Jamaica, Venezuela, Argentina e Brasil (WEATHERALL, 1994; CANÇADO, 2006).

A doença é causada pela deficiente síntese de cadeias α , sendo classificada em α^+ (alelo - α) ou α^0 (alelo --) quando um ou ambos os genes α de um determinado cromossomo são afetados, respectivamente. Os alelos α^+ e α^0 correspondem, respectivamente, à redução parcial ou supressão total da produção das cadeias α (HOFFBRAND *et al.*, 2000; WEATHERALL e CLEGG, 2001). As talassemias α^+ estão freqüentemente associadas a deleções menores que removem apenas um dos genes α , embora também possam, mais raramente, ser causadas por mutações de ponto ou deleções/inserções de poucos nucleotídeos (talassemia α não-delecional), envolvendo predominantemente o gene α_2 ($\alpha^T \alpha$) ou, mais raramente, o gene α_1 ($\alpha \alpha^T$). Por outro lado, as talassemias α^0 resultam de grandes deleções que removem todo ou parte do *cluster* α ou, esporadicamente, por deleções que envolvem o α -MRE e afetam a expressão dos genes α que, no entanto, apresentam-se estruturalmente intactos (HIGGS *et al.*, 1989; HIGGS, 1993).

Das combinações entre os alelos α^0 e α^+ decorrem cinco diferentes genótipos (- $\alpha/\alpha\alpha$, - $\alpha/-\alpha$, --/ $\alpha\alpha$, --/- α e --/--). Os três primeiros, nos quais há o comprometimento de um ou dois genes α , resultam em uma forma de talassemia sem maior relevância clínica; a presença de um único gene α no genoma diplóide corresponde à Doença da Hb H, uma anemia hemolítica crônica, de intensidade moderada ou grave, enquanto a ausência de genes α leva à Hidropisia Fetal por Hb Bart´s, quadro sindrômico clinicamente muito grave e, em geral, incompatível com a vida devido aos elevados níveis de Hb Bart´s (γ_4), variante com altíssima afinidade pelo O₂ (Figura 5) (BUNN e FORGET, 1986; HIGGS *et al.*, 1989; WEATHERALL e CLEGG, 2001).



Figura 5. Representação esquemática dos genótipos das talassemias α (Adaptado de: HOFFBRAND *et al.*, 2000). Em vermelho, estão indicados os genes α normais e, em branco, os alterados.

1.3.1.1.1. Talassemias α^+

As formas mais freqüentes da talassemia α^+ envolvem a deleção de um dos genes α duplicados (α_2 ou α_1). Dentre estas, destaca-se a deleção - $\alpha^{3,7}$ como uma das mais freqüentes, sendo encontrada em praticamente todas as populações, principalmente em regiões da África e do Mediterrâneo. Nesta, há a perda de um fragmento de 3,7 Kb de DNA, originada a partir de um *crossing over* desigual entre cromossomos homólogos desalinhados e que afeta a região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 , ambos os genes α em *cis*, resultando em um único gene híbrido (α_2 - α_1) (BUNN e FORGET, 1986; HIGGS *et al.*, 1989; WENNING, 2007). A partir de mecanismo genético similar, origina-se a segunda maior causa de talassemia α^+ , a deleção - $\alpha^{4.2}$, uma deleção de 4,2 Kb de DNA que remove totalmente o gene α_2 e é mais prevalente em populações do Sudeste Asiático (KATTAMIS *et al.*, 1996).

Em ambos os casos, como produto adicional do desalinhamento dos cromossomos, origina-se a triplicação dos genes α ($\alpha \alpha \alpha^{anti3.7}$ e $\alpha \alpha \alpha^{anti4.2}$, respectivamente) . No entanto, não são observadas quaisquer alterações hematológicas em seus portadores, exceto em casos em que há a associação com as β talassemias. Neste caso, o excesso de cadeias α pode agravar o quadro clínico destes pacientes (STAMATOYANNOPOULOS, 2001). A Figura 6 demonstra o mecanismo genético que origina estas deleções e as triplicações gênicas.



Figura 6. Representação esquemática do desalinhamento dos cromossomos homólogos que culmina na formação das deleções $-\alpha^{3.7} e -\alpha^{4.2}$, respectivamente. Neste evento, geram-se também os genótipos $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7} e^{-\alpha\alpha^{anti4.2}}$. O alto grau de homologia entre os subsegmentos duplicados, X e Z, facilita o pareamento incorreto dos cromossomos durante a meiose, com conseqüente recombinação desigual entre os mesmos (STAMATOYANNOPOULOS, 2001).

1.3.1.1.2. Talassemias α^0

Eventos de recombinação não homóloga são as causas das deleções responsáveis pelas talassemias α^0 . A maioria remove ambos os genes α do mesmo cromossomo, sendo que as duas mais comuns são a --^{MED}, uma deleção de 18 Kb de DNA, freqüente na Bacia do Mediterrâneo (NICHOLLS *et al.*, 1985; KATTAMIS *et al.*, 1996), e a --^{SEA}, uma deleção de 20 kb que é a forma mais freqüente de talassemia α^0 no Sudeste Asiático. Ainda nesta região, podem ser encontradas, de forma menos freqüente, as deleções (^{--FIL}) e (^{--THAI}). Ambas comprometem uma região de aproximadamente 30 a 38 kb, removendo o gene ζ_2 e ambos os genes α (ENG *et al.*, 2000).

Por fim, também são causas de talassemias α^0 , deleções que removem totalmente um gene α e parcialmente o outro, tornando-o inativo. Destas temos a deleção $-(\alpha)^{20.5}$ (NICHOLLS *et al.*, 1985), que envolve todo o gene α_2 e a porção 5´ do gene α_1 , que, no entanto, não tem expressão (PRESSLEY *et al.*, 1980). Esta mutação é de origem Mediterrânea e acomete cerca de 20.5 Kb de DNA (HIGGS *et al.*, 1989; KATTAMIS *et al.*, 1996; WENNING, 2007). As deleções que mais comumente causam a talassemia α estão expostas na Figura 7.



Figura 7. Esquema representando as sete deleções mais comumente responsáveis pelas talassemias α (Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2001).

Existem, porém, mais de 20 deleções conhecidas, sendo que algumas delas removem ambos os genes α *in cis* ou o *cluster* α inteiro (web site do *GLOBIN GENE SERVER*²). Algumas podem compreender regiões de 100 a 300 kb (HIGGS *et al.*, 2001) ou extensões ainda maiores, de até 2 Mb, observadas em pacientes com Síndrome do Retardo Mental Associado à Talassemia α (ATR-16 *syndrome - Alpha thalassemia retardation associated with chromosome* 16) (HARTEVELD *et al.*, 2007). Além disso, há deleções raras que silenciam a expressão do gene α por remover a seqüência regulatória HS-40 à montante do *cluster* dos genes (HIGGS *et al.*, 1998, HIGGS *et al.*, 2001, VIPRAKASIT *et al.*, 2006). Até o momento, foram descritas mais de 15 deleções envolvendo o α -MRE, que de um

² http://globin.cse.psu.edu/

modo geral, ocasionaram a remoção de 3,4 a 160 kb da região situada à montante do *cluster* α (HATTON *et al.*, 1990; LIEBHABER *et al.*, 1990; WILKIE *et al.*, 1990; ROMAO *et al.*, 1991, 1992; FLINT *et al.*, 1994, 1996; WENNING *et al.*, 2002; VIPRAKASIT *et al.*, 2003, 2006; HARTEVELD *et al.*, 2005; PHYLIPSEN *et al.*, 2010). Nestes casos, o comprometimento da região do α -MRE ocasionou a supressão da expressão dos genes α no cromossomo afetado, culminando com a diminuição dos valores do volume corpuscular médio (VCM < 80fl) e de hemoglobina corpuscular média (HCM < 25pg), quadro este similar ao apresentado por pacientes que contêm dois genes α afetados (—/ $\alpha\alpha$) (HIGGS *et al.*, 1998, RIBEIRO e SONATI, 2008; PHYLIPSEN *et al.*, 2010).

1.3.1.2. Diagnóstico molecular das talassemias α

Nós últimos anos, várias técnicas foram desenvolvidas na tentativa de se detectar alterações no número de cópias gênicas (deleções e duplicações), sendo, portanto, aplicáveis à caracterização das talassemias.

O método de *Southern blot*, apesar de eficiente na detecção de seqüências específicas de DNA, é demorado, laborioso e depende de isótopos radiativos, o que o torna inadequado à rotina laboratorial. Da mesma forma, essas limitações podem ser atribuídas à técnica de FISH, que apesar de ser considerada "padrão ouro" na caracterização de alterações cromossômicas, exige a manutenção de culturas celulares, apresenta baixa resolução (> 20 kb) e não pode ser implementada como método *multiplex* (SCHOUTEN *et al.*, 2002; HARTEVELD *et al.*, 2005, GOUAS *et al.*, 2008).

Procedimentos que envolvem PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são os mais empregados devido à sua rapidez e economia, além de serem adaptáveis como método

45

multiplex, o que permite a análise de vários fragmentos em uma única reação. Para a caracterização das talassemias α , um dos métodos mais utilizados é o *Multiplex gap-PCR*. Desenvolvido por CHONG *et al.* (2000), emprega sete pares de iniciadores que flanqueiam as regiões correspondentes às sete deleções mais comuns ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, --SEA, --MED, $-\alpha^{20.5}$, - FIL, --THAI). Apesar de rápido e eficiente, sua aplicabilidade é limitada às deleções conhecidas, sendo inapropriado para detecção de alterações novas e raras.

Recentemente, a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (q-*Real Time* PCR) e o método molecular citogenético denominado *array* – *Comparative Genomic Hydrization* (*array* – CGH), foram adaptados ao estudo das talassemias (CE *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006, 2008; DALLAPICOLA *et al.*, 2009; BABASHAH *et al.*, 2009). Entretanto, apesar de muito sensíveis, também apresentam algumas desvantagens. No primeiro caso, ao empregar sondas de hibridização, o número de *loci* a ser analisado, em um único tubo, é restrito a quatro ou menos, devido ao espectro de fluorescência das sondas. Em casos em que há a necessidade da análise de vários *loci*, torna-se necessário realizar múltiplas reações, sendo que as sondas ainda têm um custo muito elevado. No segundo caso, as plataformas de *array* permitem análises de todo o genoma, de cromossômicos, com alta resolução. Entretanto, esta técnica também apresenta alto custo e complexidade nas análises dos resultados (SCHOUTEN *et al.*, 2002; HARTEVELD *et al.*, 2005, GOUAS *et al.*, 2008).

Em 2002, SCHOUTEN *et al.* descreveram uma técnica simples e sensível para realização de análises quantitativas rápidas de seqüências específicas do DNA, chamada de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Em 2005, com o

46

desenvolvimento de sondas complementares à região dos *clusters* α e β , por HARTEVELD *et al.*, a técnica tornou-se aplicável à detecção das Hbpatias.

1.3.1.2.1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

A técnica denominada MLPA (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) é um método de *multiplex* PCR, sensível, rápido e simples, que visa à quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de até 50 seqüências de ácidos nucléicos (número variável) em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas (SCHOUTEN *et al.*, 2002; SORENSEN *et al.*, 2008) (Figura 8).



Figura 8. MLPA comparado às outras técnicas. Este método permite a detecção desde mutações de ponto conhecidas até grandes deleções/duplicações cromossomais (web site do MLPA³).

A técnica se baseia em um princípio simples, em que uma amostra de DNA genômico é hibridizada com uma mistura de sondas, com amplificação posterior dos

³ http//: www.mlpa.com

produtos de ligação por PCR, utilizando-se um par de *primers* universal. Os fragmentos finais são, então, separados e analisados em aparelho de eletroforese capilar, sendo possível a quantificação relativa de cópias gênicas. São basicamente 5 fases: Desnaturação do DNA, Hibridização das sondas, Reação de Ligação, Reação de PCR e Separação dos *amplicons* por eletroforese capilar. Nas duas primeiras fases, o DNA genômico é desnaturado, e então hibridizado a uma mistura de sondas (cada uma específica à região a ser estudada). Cada sonda comercial é formada por dois oligonucleotídeos, que se anelam de forma adjacente ao DNA, e são construídos da seguinte maneira:

Sonda Esquerda: oligonucleotídeo sintético curto, constituído por uma seqüência homóloga ao *primer* universal *sense* (que contém marcador fluorescente) (em azul, Figura 9), seguido por uma seqüência específica ao alvo com tamanho variável de 21 a 30 bases (nt) (em vermelho, Figura 9).

Sonda Direita: oligonucleotídeo longo, derivado de fago M13, que contém uma seqüência, específica ao alvo, de 25 a 43 nt (em vermelho, Figura 9), seguida por uma seqüênciacoringa (com extensão diferente para cada sonda, 19 a 370 nt, o que definirá o tamanho a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais - em verde, Figura 9) e, por fim, ainda uma seqüência homóloga ao *primer* universal *antisense* (em laranja, Figura 9).

Em alguns casos, as sondas comerciais podem não ser suficientes para caracterizar o tamanho real das alterações e nestes casos, é possível sintetizar oligonucleotídeos sintéticos. Estruturalmente, as sondas sintéticas são semelhantes às comerciais, contudo não contam com a sequência coringa. Além disso, a sonda direita é também sintética, não sendo derivada de fago M13, como no caso da sonda comercial.

48



Figura 9. Representação esquemática das sondas comerrciais de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas, a esquerda e a direita, que se anelam de maneira adjacente (Adaptado de SCHOUTEN *et al.*, 2002 e do web site do MLPA³)

Uma vez hibridizadas aos seus respectivos alvos, as sondas de MLPA terão seus componentes (sonda esquerda e direita) ligados uns aos outros por uma enzima ligase dependente de temperatura, formando um fragmento único (Fase de Ligação), com a seguinte disposição: 5' fluoróforo (de coloração azul) – região de ligação ao *primer* universal *sense* – sequência complementar ao DNA alvo – sequência coringa (apenas na sonda comercial) – região de ligação ao *primer* universal *antisense 3'*.

Após a ligação, inicia-se a fase de amplificação, no qual os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR, empregando-se um único par de *primers* universais que se anelam às seqüências situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação.

Em seguida, os *amplicons* são separados por eletroforese capilar e podem ser analisados em relação aos controles sem alteração, a partir de programa ou software específico de genotipagem. Dados de área e altura de pico de cada produto de amplificação podem ser utilizados na normalização e refletem o número relativo de cópias de cada
sequência-alvo, permitindo a identificação de deleções e/ou duplicações. Um resumo dos procedimentos adotados nas reações de MLPA encontra-se disposto na Figura 10.



Figura 10. Representação esquemática do procedimento adotado nas reações de MLPA (web site do MLPA³).

São muitas as indicações dessa técnica, que pode ser aplicada com sucesso em um número de genes em que a ocorrência de deleções e duplicações é comum (TAYLOR *et al.*, 2003; SELLER e TAYLOR, 2004; ROOMS *et al.*, 2004) e que não estão acessíveis às demais técnicas moleculares.

Nos últimos anos, vários estudos foram desenvolvidos na tentativa de se ampliar a capacidade de detecção das talassemias, empregando-se a técnica de MLPA. De um modo geral, nestes foi possível detectar deleções e/ou duplicações (em sua maioria de grande extensão) que comprometeram a expressão dos genes de globina, seja afetando diretamente

sua estrutura ou apenas prejudicando ou abolindo sua expressão (deleções do α-MRE). Em muitos desses casos, foram encontradas novas alterações, demonstrando a importância da técnica na caracterização molecular das talassemias. De forma geral, os estudos também mostraram que os resultados obtidos nos ensaios de MLPA foram bastante fidedignos aos de demais técnicas, como FISH, a*rray*-CGH, q-*Real Time* PCR e *Multiplex gap*-PCR, conferindo confiabilidade ao método (HARTEVELD *et al.*, 2007; HARTEVELD *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; BABASHAH *et al.*, 2009; SOLLAINO *et al.*, 2009; SO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; PHYLIPSEN *et al.*, 2010; GALLIENE *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico das talassemias α só pode ser realizado com precisão através do uso de ferramentas de biologia molecular, dentre as quais se destaca o *gap*-PCR, como técnica mais empregada. Entretanto, mutações desconhecidas ou raras acabam não sendo detectadas por este método, ficando os pacientes sem diagnóstico conclusivo.

Dada a crescente importância da técnica de MLPA na caracterização de alterações ocasionadas por deleções e duplicações, como é o caso das talassemias α , este recurso será particularmente importante na investigação de grandes deleções que removem todo o *cluster* α e/ou seu elemento regulatório e que, até o momento, não poderiam ser detectadas.

Nosso laboratório será o primeiro no Brasil a empregar o MLPA na avaliação dos genes de globinas.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal elucidar as bases moleculares das talassemias α em nove pacientes cujas mutações não puderam ser caracterizadas pela metodologia convencional (*Multiplex gap*-PCR, PCR-específico e seqüenciamento de DNA).

4. MATERIAIS E MÉTODO

Este projeto foi desenvolvido com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CEP/FCM/UNICAMP), parecer nº 918/2007, de 18/02/2007 (Anexo 2).

4.1. MATERIAIS

Foram estudadas amostras de DNA de 9 pacientes, previamente analisadas e armazenadas no Laboratório de Hbpatias do Departamento de Patologia Clínica - FCM -UNICAMP. Esses pacientes foram selecionados por apresentarem alterações hematológicas compatíveis com a talassemia α (ou seja, valores reduzidos de VCM e HCM e níveis normais de Hb A₂ e Hb F), mas as bases moleculares da doença não puderam ser demonstradas pelos métodos disponíveis à época (*Multiplex gap*-PCR, PCR específico e seqüenciamento de DNA). Cinco desses pacientes tinham Doença da Hb H. Em parte dos casos também foi possível realizar análise familial. Os dados demográficos, hematológicos e moleculares dos pacientes e de seus familiares, quando disponíveis para estudo, encontram-se dispostos na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Pac.	Id./Sex.	GV (10 ⁶ /mm3)	Hb (g/L)	VCM (fl)	HCM (pg)	RDW	Ret. (%)	HbF (%)	Hb A ₂ (%)	Hb H (%)	Perfil de Hb	Padrão Molecular*	Padrão do Sequenciamento do α-MRE	
P 1	16/F	5,02	9,4	62	18,6	16,8	-	1	1,3	4,5	A2,A,H+Bart's	$-\alpha^{3.7}$ Hetero	Hapl. A	
P2	14/M	4,86	9,2	66,5	18,6	22,5	3,06	0,6	1,2	13,4	A2,A,H+Bart's	$-\alpha^{3.7}$ Hetero	Hapl. D	
P3	26/F	4,66	7,7	68,2	16,5	34,6	5,59	0,4	1,5	14,0	A2,A,H+Bart's	$-\alpha^{3.7}$ Homo	Hapl. A	
P4	14/F	5,03	9	66,2	17,9	24,4	-	1,7	1,6	6,9	A2,A,H	-α ^{3.7} Homo	Hapl. D	
P5	30/M	5,97	10,8	69,7	18,1	24,7	1,93	0,2	1,5	10,0	A2,A,H	-α ^{3.7} Homo	Hapl.D	
P6	23/F	5,64	11,5	61,7	20,4	14,5	-	0,3	2,6	-	A2,A	Normal	Hapl. D	
P7	4m/F	5,35	10,3	60,4	19,3	14,3	-	-	-	-	Bart's	Normal	Hapl. A	
P8	3/M	6,09	11,3	58,3	18,6	15,3	0,35	0,5	3	-	A2,A	Normal	Hapl. A	
P9	24/F	4,3	11,3	78,4	26,3	13,3	1,14	0,2	3,1	-	A2,A	Normal	NR	

Tabela 1. Dados demográficos, hematológicos e moleculares dos pacientes.

Pac. e P.: paciente; Id./Sex: Idade/Sexo; m: meses; M: masculino, F: feminino; m: meses; GV: glóbulos vermelhos; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; RDW(*Red Cell Distribution Width*): índice de anisocitose; Ret. : reticulócitos; *: padrão apresentado no *Multiplex* gap PCR e/ou PCR específico; NR: não realizado; Hetero: Heterozigoto; Homo: Homozigoto; Hapl.: Haplótipo.

Pac.	Id./Sex.	GV (10 ⁶ /mm3)	Hb (g/L)	VCM (fl)	HCM (pg)	RDW	Ret. (%)	HbF (%)	Hb A ₂ (%)	Hb H (%)	Perfil de Hb	Padrão Molecular*
PaP2	40/M	6,13	13,6	70,8	22,2	14,3	-	0,1	2,8	-	A2, A	$-\alpha^{3.7}$ Homo
MP2	34/F	5,9	12,7	68	21,5	15,8	1,15	1,1	2,4	-	MI	MI
MP3	44/F	5,05	11,3	80,4	22,4	16,3	1,71	0,2	2,7	-	A2,A	-α ^{3.7} Homo
IP3	24/M	5,38	14,5	89,2	27	14,4	0,76	-	-	-	A2A	-α ^{3.7} Hetero
PaP7	29/M	6,15	13,3	67,6	21,6	16,8	-	0,8	3,1	-	A2, A	Normal
PaP8	30/M	6,37	13,9	67,8	21,8	14,9	0,57	0,1	3	-	A2,A	Normal
MP8	27/M	4,55	13,3	89,5	29,2	13,3	0,8	0,4	3,4	-	A2,A	Normal
PaP9	54/M	5,01	15,7	91,6	31,3	12,9	2,16	0,5	2,6	-	A2,A	Normal
MP9	54/F	4,97	13,4	80,3	27	14	1,35	0,1	3,1	-	A2,A	Normal
IP9	28/F	4,5	12,6	85,8	28,0	13,6	1,0	0,1	2,7	-	A2,A	Normal
TP9	50/F	5,23	13,8	75,5	26,4	13,5	0,75	0,1	2,9	-	A2,A	Normal

Tabela 2. Dados demográficos, hematológicos e moleculares dos familiares dos pacientes.

Pac. e P. : pacientes; M: mãe; I: irmão (ã); Pa: pai; T: tia ; Id./Sex: Idade/Sexo; M: masculino, F: feminino; RN: recém-nascido; GV: glóbulos vermelhos; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; RDW(*Red Cell Distribution Width*): índice de anisocitose; Ret. : reticulócitos; MI: material insuficiente ou indisponível; *: padrão apresentado no *Multiplex* gap PCR e/ou PCR específico; NR: não realizado; Hetero: Heterozigoto; Homo: Homozigoto. Os dados hematológicos dos pacientes e familiares foram determinados em contador eletrônico de células (Sysmex XE 2100). O perfil das Hbs e a quantificação de suas frações (Hb A₂, Hb F e, quando presentes, Hb H e Hb Bart´s) foram obtidos a partir de eletroforese em acetato celulose, em pH alcalino e neutro (DACIE e LEWIS, 2006) e por cromatografia líquida de alta performance (HPLC - VARIANTTM; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), respectivamente.

A partir de leucócitos do sangue periférico desses pacientes foi realizada a extração do DNA empregando-se o método de fenol-clorofórmio (segundo protocolo descrito por ISOLA *et al.*, 1994) ou kit comercial (*GFX Genomic Blood DNA Purification Kit – GE Health Care*, USA). A concentração do DNA foi efetuada por Espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*, Inc., Rockland, DE, USA), no comprimento de onda de 260nm. A qualidade da amostra foi verificada a partir da razão entre as absorbâncias 260/280nm, sendo considerado satisfatório um valor acima de 1.5. Foram triadas as deleções mais frequentemente encontradas nas populações [- $\alpha^{3,7}$, - $\alpha^{4,2}$, -(α)^{20,5}, --MED, -SEA, - FIL, -THAI</sup>], por *Multiplex gap*-PCR e/ou PCR específico (CHONG *et al.*, 2000), e as mutações não-delecionais Hph, Nco e Tsaudi (KATTAMIS *et al.*, 1996). Além disso, foi realizado o seqüenciamento do elemento regulatório α -MRE, conforme descrito por HARTEVELD *et al*, (2002).

Como as técnicas empregadas não foram capazes, nestes casos, de determinar as bases moleculares da doença, as amostras de DNA desses pacientes foram submetidas aos ensaios de MLPA, quando este método se tornou disponível em nosso laboratório.

4.2. MÉTODO

4.2.1 Validação do Método de MLPA

Antes de dar início aos experimentos foi realizada a padronização e validação do método, a partir da análise de cerca de 20 amostras de DNA controle positivos [com as mutações $-\alpha^{3,7}$, $-(\alpha)^{20,5}$, -MED, -SEA, -FIL, $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$, Hph e de associações entre essas alterações] e negativos (sem alterações hematológicas e nos genes α), previamente analisadas e armazenadas no Laboratório de Hbpatias do Departamento de Patologia Clínica - UNICAMP. Como já mencionado, as deleções foram previamente investigadas pelos métodos de *Multiplex gap*-PCR e confirmadas por *gap*-PCR específicos, e a alteração não-delecional (Hph) foi identificada por PCR específico seguido de análise com a enzima de restrição Hph I.

4.2.2. Ensaios de MLPA

Nos ensaios de MLPA se empregou, inicialmente, o *kit* SALSA MLPA P140B para talassemias α (Anexo 3) e, posteriormente, por conta de sua substituição, o kit SALSA MLPA P140B2 (Anexo 3) (MRC – Holland, Amsterdã, Holanda), composto por 38 sondas, sendo 12 controles internos e 26 sondas específicas a diferentes regiões do cromossomo 16. Ambos os *kits* contam com dois tipos de controles internos, fragmentos Q e D, que são indicativos da qualidade das reações. O primeiro determina se as quantidades de DNA empregadas na reação foram suficientes, e o outro se houve completa desnaturação do DNA. Entre as duas versões, apenas foram introduzidos controles internos específicos aos cromossomos sexuais X e Y, controles de desnaturação com tamanhos de 88 nt e 96 nt, além de melhorias na especificidade de algumas sondas já existentes.

O protocolo adotado nas reações encontra-se em conformidade com o descrito pelo fabricante (MRC-Holand, Holanda – web site do MLPA³), salvo algumas alterações que serão aqui especificadas.

4.2.2.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas

Cada amostra de DNA foi diluída em TE (Tris-EDTA) 1x, na proporção de 200 - 250 ng para 5µl (segundo HARTEVELD *et al.*, 2005) e mantida em termociclador, em temperatura de 98°C, por 5 minutos (min.). Em cada experimento foram empregados de 3 a 5 controles normais (negativos), sendo que para os pacientes as reações foram feitas em duplicata.

Posteriormente, a reação foi resfriada para uma temperatura de 25°C, quando então foram adicionadas 1,5µl de SALSA *Probe-mix* e 1,5µl de *MLPA buffer*. Após ressuspensão, as amostras foram mantidas a 95°C, por 1 min., e incubadas a 60°C, por no mínimo 16 horas.

4.2.2.2. Reação de Ligação

A temperatura do termociclador foi reduzida para 54°C e, em seguida, adicionou-se 32μ l do *Mix Ligase 65* a cada reação, com posterior ressuspensão. Este *mix* é constituído de 25μ l de água (H₂O), 3μ l de Ligase-65 *buffer* A, 3μ l de Ligase-65 *buffer* B, e 1 μ l da enzima Ligase-65.

A reação de ligação foi incubada a 54°C, por 15 min., e posteriormente aquecida a 98°C, por 5 min. Segundo o fabricante, esta pode ser estocada a 4°C por até um mês, e para períodos mais longos, recomenda-se a estocagem a -20°C.

62

4.2.2.3. Reação de PCR

Em novos tubos (um para cada amostra) foram adicionados 26μ l de H₂O, 4μ l de Salsa PCR *Buffer* e 10µl de reação de ligação, sendo mantidos em termociclador a 60°C. Posteriormente, foram acrescentados 10µl do *mix* de Polimerase a cada amostra, podendo assim, iniciar a reação de PCR, segundo programa descrito na Figura 11.



Figura 11. Ciclo utilizado na amplificação dos fragmentos.

Para o *mix* de Polimerase, foram adicionados 5,5 μ l de H₂O, 2 μ l de Salsa PCR*primers* (marcados com a fluorescência FAM - coloração azul), 2 μ l de Salsa *Enzyme Dilution buffer* e 0,5 μ l da enzima Salsa *Polymerase*.

Posteriormente, este protocolo foi alterado para aperfeiçoar o tempo e a qualidade das reações. Neste caso, todos os reagentes da reação de PCR foram adicionados a um *mix* único, sendo distribuídos 35µl deste em cada tubo. Além disso, a quantidade de reação de ligação empregada em cada amostra foi ampliada para 15µl.

4.2.2.4. Separação dos fragmentos amplificados

Após a amplificação, foi realizada a separação dos fragmentos por eletroforese capilar em seqüenciador automático de DNA, de 96 capilares (MegaBACE ^{TM -} *GE Healthcare Life Sciences*, USA), com filtros de fluorescência específicos para genotipagem.

Para a preparação das amostras foi feito um *mix* para placa de 96 *wells*, contendo 775µl de Tween 0,1% e 25µl de marcador ET-550-R, sendo desprezados 8µl em cada poço. Foram, então, adicionados 1µl da reação de MLPA e, em seguida, houve a desnaturação das amostras a 95°C por 2-5 min., seguida do resfriamento em gelo.

Os parâmetros adotados na corrida foram:

- Sample Injection Voltage 3KV;
- Sample Injection Time 100 s;
- Run Voltage: 10KV;
- Run Time: 75min.

Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados e identificados utilizando-se o programa *Fragment Profiler* (MegaBACE ^{TM -} *GE Healthcare Life Science*, USA).

4.2.2.5. Análise dos Dados

Os resultados obtidos foram exportados para uma planilha de Excel, específica para o kit de α talassemia, na qual foi feita a análise qualitativa e quantitativa desses produtos, permitindo avaliar se houve alteração no número de cópias (deleções ou duplicações) do *locus* α nas amostras em estudo. Em todos os casos, foi realizada a normalização dos dados empregando-se os valores referentes a cada sonda do paciente e a média dos controles normais, em relação à somatória dos valores de seus respectivos controles internos:

Média dos Controles Normais	Paciente			
А	A1			
C (controle interno)	C1			
Normalização: <u>A</u> =Y	<u>A1</u> =X			
С	C1			

Posteriormente, com base nos valores normalizados, foi feita a quantificação relativa dos dados do paciente em relação aos da média dos controles normais:

Razão: <u>X</u> Y

Sendo A= Valor da altura/área do pico de fluorescência da sonda A, para a média dos controles normais; A1= Valor da altura/área do pico de fluorescência da sonda A, para o paciente; C= Valor da altura/área do pico de fluorescência do controle interno C, para a média dos controles normais; C1=Valor da altura/área do pico de fluorescência do controle interno C para o paciente.

A partir disso, estabeleceu-se que valores abaixo de 0,5 (variação entre 0,3 a 0,7) corresponderiam a deleções e acima de 1,5 (1,3-1,7) a duplicações. Valores normais estariam próximos a 1 (0,7-1,3).

Uma vez obtidos os resultados de cada paciente, estes foram então exportados para o programa GraphPad Prism, para a geração dos gráficos.

4.2.3. Protocolo MLPA para sondas sintéticas

Após a validação do método, foram realizados ensaios empregando as amostras dos 9 pacientes. Entretanto, os experimentos iniciais demonstraram que o *mix* de sondas disponível no kit comercial não foi suficiente para caracterizar as alterações apresentadas por estes pacientes. Por esta razão, foi necessária a síntese de sondas adicionais (sintéticas), ampliando a região a ser analisada, de 230 kb a 800 kb à jusante do telômero. As sequências desses oligonucleotídeos foram descritas por HARTEVELD *et al* (2005) e estão dispostas na Tabela 3. A síntese das sondas foi realizada seguindo as seguintes especificações:

Sequência: 5′ - 3′ (sequência das sondas + *primers*)

Escala de Síntese: 25N

Modificação na extremidade 5': Fosfato

Purificação: Dessalinizado

Após a confecção, as sondas foram diluídas segundo instruções contidas no protocolo do fabricante (*Synthetic probe design* – web site do MLPA³).

Feita as diluições, os oligonucleotídeos foram separados em grupos, levando-se em consideração os fragmentos a serem analisados, em cada paciente, e a diferença de tamanho de no mínimo 4 bases entre as mesmas, requisito essencial para que haja a adequada separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

Sondas parte I

- Mix 1: 9H, 19H,27H,31H,34H,

CVIPR2 e CKIAA0056 – Controles internos

Sondas parte II

- *Mix 2*: 20H, 23H, 25H

27H, 34H e CKIAA0056 – Controles internos

- Mix 3: 22H,24H, 26H

27H, 34H e CKIAA0056 – Controles internos

- Mix 4: 28H, 29H, 30H

34H e CKIAA0056 – Controles internos

- *Mix 5:* 31H, 34H, 35H

CVIPR2 E CKIAA0056 - Controles internos

- Mix 6: 3H,7H, 9H

27H, 31H, CVIPR2 E CKIAA0056 – Controles internos

O protocolo adotado nas reações de MLPA empregando as sondas sintéticas foi similar ao descrito no item **4.2.2**, com exceção do **4.2.2.1**, em que são empregados $0,5\mu$ l do *mix* de sondas sintéticas, 1 μ l de H₂O e 1,5 μ l de *MLPA buffer*.

Sondas	Sequência de Hibridização a montante – 5'	Sequência de Hibridização a jusante – 3´	Posição no Cr. 16p13.3 [†]	Tamanho Total [‡]
3H (MPG)	CAAGAGCTTTGACCAGAGGGAC	CTGGCACAGGATGAAGCTGTATGGCT	135563-135610	90pb
7H (L1)	CCTGGACAATGAAGCACCAGGGCCAAC	CTCCATTTGCTACAGGGGACATCCT	192952-193003	94pb
9H (HbZ)	CAGATCCAGTACATCTCCCCTCAGCGCTGGGTGGACCTAAC	CCTTGCTTTCTTGGAGGAAACCCAGGAATCCAG	202344–202417	116pb
19H (LUC7L)	GTCTGTTCAGCCTACCTTGGTCTCCATGACAATGACCGTCGC	CTGGCAGACCACTTCGGTGGCAAGTTACACTTGGGG	249097–249174	120pb
20H (LUC7L)	GCTGAATGTGATCGGAGAACTGAGCTCGCCAAGAAGCG	GCTGGCAGAAACACAGGAGGAAATCAGTGCGG	258091-258160	112pb
22H (PDIA2)	GAGCTGGCTGAGGAGTTTGGTGTGACGGAGTAC	CCTACGCTCAAGTTCTTCCGCAATGGGAACCGC	334506-334571	108pb
23H (AXIN1)	GGATGCACACGAGGAGAACCCTGAGAGCATCCTG	GACGAGCACGTACAGCGTGTGCTGAGGACA	348063-348126	106pb
24H (AXIN1) (2)	CTCAGAGCCTCCTCAGCAGAAGTCTGAATACATCACTTACC	CAGAACCAGGTTGCCGGCTTACAGTCATGGT	381022-381093	114pb
25H (MRPL2)	GGAGAGTCCATTGACAAGCTCTTAATCGCAGCTGCCCTTGCAGGGC	CTGTCCCTGAAGTCCCGAGTAATGGGATTT	410870-410945	118pb
26H (DECR2)	CTTGTCCTTCAACGCCTTCAAGACCGTGATGGACATCGATAC	CAGCGGCACCTTCAATGTGTCTCGTGTGCTCTATGA	460277-460354	120pb
27H (RAB11F1P3)	GGACTTAACTAAGTACTTGGATCCCAGTG	GGCTCGGCGTGATCAGCTTTGAAGACTTC	511409-511466	100pb
28H (RAB11F1P3)	GAACGGATGCTTCTGTCTCTCTAGCACTGACCCTCTTGCCGCAAAG	CTGCACAGCATCCTCACTGATGAGGCGTTTGAGT	541110-541189	122pb
29H (RAB11F1P3)	CGCAACCTGAAGGAGCAGAACGAGGAGCTGAACG	GGCAGATCATTACCCTCAGCATCCAGGGCGCCAA	570465-570532	110pb
30H (SOLH)	GTCAAGAAGTTCGTCAGCTGCGACGTCATGCTGGAGCCTGGC	GAGTACGCTGTGGTGTGCTGCGCCTTCAACCA	602419-602492	116pb
31H (RAB40C)	C AGACAGGTGTGTGAGCGTACATTGCCCTCTCCAG	CTTCACAAACAAATGAGTCATCGAAGTGACC	643597–643662	108pb
34H (CCDC78)	GTGCTGGTCCACGTACTCCTGTAG	CTCAGAAAGTTGCTCTTCAGCCATCGTG	772930–772981	94pb
35H (MSLN) (ATR-16)	CTGAGGACATTCGCAAGTGGAATGTGACGTCCCTGGAGAC	CCTGAAGGCTTTGCTTGAAGTCAACAAAGGGCACGA	816402-816477	118pb
CVIPR2	CAAACAGGAAAATGGGACTTTGGTTGTGCTGAAGACGGGCCTGCG	GTGAACACTGTGAACGTGCAGATCGCCTTCTCCGGTTTGACAGAG	*	132pb
CKIAA0056	ACTCAGGCCCTGGCTCCTTCTCGAACGAATTAGCGGAACACCCGCAG	GAGCCTTGTTTGGCTTCCACTTTTCGGCCCGCCCAGTTCTCTGAGCG	*	136pb

* Sondas específicas a regiões externas ao cromossomo 16; †UCSC Genome Browser (maio, 2004) (web site do UCSC Genome Browser)⁴

‡ Incluso sequência dos *primers* direto: GGGTTCCCTAAGGGTTGGA e reverso: TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

⁴ http://genome.ucsc.edu/

5. RESULTADOS

5.1. Validação do método de MLPA

A cada reação, foram analisados os fragmentos gerados a partir das seqüências de 38 sondas, cujos comprimentos variaram de 130 a 409 nt. Desse total, 26 são específicas a regiões situadas no braço curto do cromossomo 16, permitindo a triagem de deleções ou duplicações ocorridas desde a região telomérica à porção 3'não-codificante de α_1 (Figura 12). Dessa forma, em uma única reação foi possível realizar a análise simultânea do elemento regulatório α MRE (HS-40) e de todo *cluster* α .



Figura 12. Disposição das 26 sondas ao longo do cromossomo 16. O tamanho do fragmento analisado foi de aproximadamente 230kb.

Nas reações de MLPA foram avaliadas alterações significantes nos padrões de ligação e amplificação das sondas, observadas por variações relativas nos sinais emitidos por estas, em seqüenciador automático, quando comparadas amostras dos indivíduos alterados às dos controles normais. Em todas as análises, a sonda 17 não apresentou qualquer sinal de amplificação, pois esta é específica para a detecção de uma mutação na posição 142 do gene α_2 que ocasiona a formação da Hb *Constant Spring*, ausente nas amostras estudadas. Ao contrário desta, os sinais relativos aos picos das sondas 27 a 38 (controles internos) estavam presentes, dentro da normalidade, em todas as análises.

Os resultados foram avaliados com base nas informações contidas na Tabela 4 (adaptado da web site do MLPA³).

Tabela 4. Deleções mais comuns e valores de razão esperados para as mesmas.

							Razão	1				
Sondas	Tam (nt)	N	Het -a ^{3.7}	Hom -a ^{3.7}	Het $-\alpha^{4.2}$	Het a-tripl	Het SEA	Het Med1	Het -a ^{20.5}	Het FIL	Het THAI	Del HS-40
1 POLR3RK gene - 04913-L01316	236	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2 HS-40 (1) - 4799-L4797	178	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5
3 HS-40 (2) -4800-L04175	382	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5
4 9.3kb up' HBZ - 04926-L04017	364	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5 3.5kb up' HBZ - 4622-L04001	346	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6 HBZ/HBZP(1) - 04624-L04004	292	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5	1
7 HBZ/HBZP(2) - 04625-L04005	318	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5	1
8 HBA2P/HBA1P - 04637-L04018	184	1	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
9 HBA1P/HBA2(1)-08488-L08410	373	1	1	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
10 HBA1P/HBA2(2)-04627-L04007	201	1	1	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
11 HBA1P/HBA2(3)-08492-L08415	214	1	1	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
12 HBA1P/HBA2(4)-04628-L04008	229	1	1	1	0.5	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
13 HBA1+2, ex 1 04630-L04011	142	1	0.75	0.5	0.75	1.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
14 HBA2 int2(1) - 08498-L08422	160	1	0.5	0	0.5	1.2 a 1.4	0.5	0.5	0.75	0.5	0.5	1
15 HBA2 int2(2) - 04633-L06249	240	1	0.5	0	0.5	1.2 a 1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
16 HBA1+2, ex 1 04632-L06292	166	1	0.75	0.5	0,75	1.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
17 HBA S00290-L0993 Constant Spring	136	٠	•	•		•	•	•	•	•	•	•
18 HBA2 ex 3 08491-L08414	196	1	0.5	0	0.5	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
19 HBA2/HBA1(1) 04626-L04740	190	1	0.5	0	1	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
20 HBA2/HBA1(2) 08493-L08416	220	1	0.5	0	1	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
21 HBA2/HBA1(3) 08494-L08417	256	1	0.5	0	1	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
22 HBA2/HBA1(4) 08497-L08420	339	1	0.5	0	1	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1
23 HBA region 0.2kb d' HBA1 08499-L08423	154	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1
24 HBA region 0.5kb d' HBA1 04638-L04019	283	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1
25 HBA region 2.4kb d' HBA1 04639-L04020	310	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1
26 HBQ1 3.7 dw' HBA1 06707-L06294	402	1	1	1	1	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1

Up': usptream, Dw': downstream, Tam: tamanho, N: indivíduo normal, Het: indivíduo heterozigoto, Hom: indivíduo homozigoto, α-tripl: ααα^{anti 3.7}, *: sem

sinal.

Obs: Em alguns casos, os breakpoints das deleções podem variar. O mesmo é válido para a triplicação de alfa.

Os resultados obtidos na validação do método serão apresentados a seguir.

5.1.1. Controles negativos

Ao serem testadas amostras de controles sem quaisquer alterações nos genes de globina não foram observadas mudanças nos padrões de fluorescência das sondas testadas (Figuras 13 e 14, Anexo 4A).

5.1.2. Talassemia α⁺

A forma mais comum de talassemia α^+ (- $\alpha^{3.7}$) é originada a partir de *crossing over* desigual entre cromossomos homólogos desalinhados, levando a formação de uma deleção de cerca de 3,7 kb, em um dos alelos, e da triplicação dos genes α ($\alpha \alpha \alpha^{anti-3.7}$) no outro (STAMATOYANNOPOULOS, 2001).

A) Deleção -α^{3.7}

Os resultados dos experimentos de MLPA para as amostras contendo esta deleção mostraram a diminuição nos sinais das sondas 14 a 22 (50% no heterozigoto e 100% no homozigoto), que são específicas à região afetada. Entretanto, as sondas 13 e 16 apresentaram uma menor redução (25% no heterozigoto e 50% no homozigoto), já que se ligam a regiões presentes em ambos os genes $\alpha_1 \in \alpha_2$ (Figuras 15 a 18, Anexo 4B e C).

B) Triplicação ααα^{anti-3.7}

No cromossomo homólogo ao da deleção $\alpha^{3.7}$, observa-se a triplicação dos genes α . Na amostra contendo o fenótipo $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$, as análises mostraram um aumento de 50% nos sinais das sondas 14 a 22, e de apenas 25% nas sondas 13 e 16 (Figuras 19 e 20, Anexo 4D).



Figura 13. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*.



Figura 14. Gráfico de MLPA de um indivíduo normal (GraphPad Prism).



Figura 15. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento de 3.7 kb deletado (14 α_2 - 13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 16. Gráfico de MLPA para um indivíduo com a deleção - $\alpha^{3.7}$, em heterozigose (GraphPad Prism). Em destaque (flechas), estão as sondas 13 e 16, que apresentam uma redução de apenas 25%.



Figura 17. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em vermelho correspondem aos fragmentos de 3.7 kb deletados (14 α_2 - 13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 18. Gráfico de MLPA para um indivíduo com deleção - $\alpha^{3.7}$, em homozigose (GraphPad Prism). Em destaque (flechas), estão as sondas 13 e 16, que apresentam uma redução de apenas 50%.



Figura 19. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento triplicado (14 α_2 - 13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 20. Gráfico de MLPA para indivíduo com a triplicação de alfa ($\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}$). Em destaque (flechas), estão as sondas 13 e 16, que apresentam aumento de apenas 25% em relação aos demais oligos.

5.1.3. Talassemia α^0

Neste grupo estão inseridas as deleções que envolvem ambos os genes α , ocasionando a abolição da produção de cadeias α no cromossomo afetado.

C) Deleção - $(\alpha)^{20.5}$

Para esta mutação, em heterozigose, ocorreu a redução de 50% nos sinais das sondas 6 a 22, exceto da sonda 16, que apresentou redução de 25% (Figuras 21 e 22, Anexo 4E).

D) Deleção --^{MED}

Nas amostras dos indivíduos contendo esta deleção, em heterozigose, foi observada a redução de 50% nos sinais das sondas 8 a 25, comprometendo uma grande extensão do *cluster* α (Figuras 23 e 24, Anexo 4F). Entretanto, o número de sondas afetadas pode variar, dependendo da região onde ocorreu o *breakpoint*.

E) Deleção --^{SEA}

Para esta deleção, o fragmento afetado é específico para as sondas 8 a 26, que apresentaram uma redução de 50% em seus sinais, em indivíduos heterozigotos (Figuras 25 e 26, Anexo 4G).

F) Deleção -- FIL

Esta mutação ocasionou o comprometimento de um fragmento ainda maior que nas deleções anteriores, o que levou a uma redução de 50% nos sinais referentes às sondas 6 a 26, em indivíduos heterozigotos (Figuras 27 e 28, Anexo 4H).

78

G) Associação das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $--^{\text{MED}}$

A respeito do indivíduo com a associação entre as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-^{\text{MED}}$, foi constatada uma diminuição de 50% nos sinais das sondas 8 a 26, referente à deleção $^{-\text{MED}}$ e de mesmo valor para os oligonucleotídeos 14 a 22, com redução de apenas 25% nas sondas 13 e 16, relacionadas à deleção $-\alpha^{3.7}$ (Figuras 29 e 30, Anexo 4I).

H) Mutação Hph

No caso do indivíduo com a mutação Hph, que apresenta uma deleção de apenas 5 nucleotídeos na região IVS 1 do gene α_2 (GGTGAGG \rightarrow GG-----), não foi possível detectar alterações nos sinais das sondas (Figuras 31 e 32, Anexo 4J).



Figura 21. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento de 20.5 kb deletado (6 - 13 α_1).



Figura 22. Gráfico de MLPA para um indivíduo com a deleção $-\alpha^{20.5}$, em heterozigose (GraphPad Prism). Em destaque (flecha), está a sonda 16, que apresenta uma redução de apenas 25%.



Figura 23. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento de 18 kb deletado (8 - 25).



Figura 24. Gráfico de MLPA de um indivíduo com a deleção -MED, em heterozigose (GraphPad Prism).



Figura 25. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento de 20 kb deletado (8 - 26).



Figura 26. Gráfico de MLPA de um indivíduo com a deleção –^{SEA}, em heterozigose (GraphPad Prism).



Figura 27. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento de 30 kb deletado (6 - 26).



Figura 28. Gráfico de MLPA para um indivíduo com a deleção ^{-FIL}, em heterozigose (GraphPad Prism).



Figura 29. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em azul e vermelho correspondem, respectivamente, aos fragmentos de 18 kb e 3.7 kb deletados (8-26/14 α_2 -13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 30. Gráfico de MLPA para indivíduo com a associação entre as deleções - $\alpha^{3,7}$, em um dos alelos, e da deleção --^{MED}, no outro (GraphPad Prism). Em destaque (flechas), estão as sondas 13 e 16 que apresentam uma redução de 75%.



Figura 31. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*.



Figura 32. Gráfico de MLPA para indivíduo com mutação Hph (GraphPad Prism).
Os resultados obtidos nas análises das principais deleções, encontradas nos controles positivos, encontram-se dispostas na Figura 33.



*a região deletada situa-se entre as sondas 14 α_2 a 13 α_1 ou 13 α_2 a 22.

Figura 33. Representação esquemática do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), demonstrando uma região de cerca de 30 kb, contendo o *cluster* α . A forma oval (5[']) denota a região telomérica, e as caixas, os principais genes presentes nestas regiões. As barras abaixo da figura representam as deleções detectadas pelo MLPA. As azuis indicam os fragmentos deletados e as regiões em aberto marcam os locais onde possivelmente estão localizados os *breakpoints*. Todas as deleções apresentadas já foram confirmadas por *gap*-PCR (Adaptado de HARTEVELD *et al.*, 2005).

5.2. Ensaios de MLPA dos pacientes

Conforme descrito na Tabela 1, todos os pacientes apresentavam alterações hematológicas características das talassemias α . Entretanto, os estudos protéicos e moleculares não foram conclusivos ao determinar as causas da doença e por esta razão, foram realizados experimentos empregando-se o MLPA para investigar possíveis alterações no *locus* α . Os resultados desses experimentos serão descritos a seguir.

5.2.1. Pacientes com Doença da Hb H

A) Pacientes 1 e 2

Nestes pacientes foi constatada a existência de deleções na região do elemento regulatório do *cluster* α (HS-40) e/ou de regiões adjacentes, em um dos alelos, associada à mutação - $\alpha^{3.7}$ no outro. Dessa forma, observou-se uma redução de 50% nos sinais das sondas 2 e 3 (Paciente 1) e de 1 a 5 (Paciente 2), referentes às deleções da região do HS-40, e de mesmo valor para os oligonucleotídeos 14 a 22, com redução de apenas 25% nas sondas 13 e 16, relacionadas à deleção - $\alpha^{3.7}$ (Figuras 34 a 37, Anexo 5A e B).

B) Pacientes 3, 4 e 5

Nos demais casos, as deleções comprometeram uma região de maior extensão, incluindo o HS-40 e ambos os genes α , em um dos alelos, associada à mutação - $\alpha^{3.7}$ no outro. Dessa forma, houve a diminuição de 50% nos sinais de todas as sondas (1 a 26), em um dos alelos, e de mesmo valor entre as sondas 14 a 22, no outro alelo, sendo que para as sondas 13 e 16 a redução foi de apenas 25%. No Paciente 3, a redução no sinal da sonda 16 foi de 100% (Figuras 38 a 43, Anexo 5C, D e E).



Figura 34. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em azul e vermelho correspondem aos fragmentos deletados no Paciente 1 (2-3/14 α_2 -13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 35. Gráfico de MLPA do Paciente 1 com a doença da Hb H. Neste caso, há a associação entre as deleções $-\alpha^{3.7}$, em um dos alelos, e do HS-40, no outro (GraphPadPrism).



Figura 36. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em azul e vermelho correspondem aos fragmentos deletados no Paciente 2 (1-5/14 α_2 -13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 37. Gráfico de MLPA do Paciente 2, com a doença da Hb H. Neste caso, há a associação entre as deleções $-\alpha^{3.7}$, em um dos alelos, e do HS-40, no outro (GraphPad Prism).



Figura 38. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em azul e vermelho correspondem aos fragmentos deletados no Paciente 3 (1-26/14 α_2 -13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 39. Gráfico de MLPA para Paciente 3, com a doença da Hb H. Neste caso, há a associação entre as deleções $-\alpha^{3.7}$, em um dos alelos, e de uma extensa deleção no outro (GraphPad Prism).



Figura 40. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em azul e vermelho correspondem aos fragmentos deletados no Paciente 4 (1-26/14 α_2 -13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 41. Gráfico de MLPA para Paciente 4, com a doença da Hb H. Neste caso, há a associação entre as deleções $-\alpha^{3.7}$, em um dos alelos, e de uma extensa deleção no outro (GraphPad Prism).



Figura 40. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em azul e vermelho correspondem aos fragmentos deletados no Paciente 5 (1-26/14 α_2 -13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 43. Gráfico de MLPA para Paciente 5, com a doença da Hb H. Neste caso, há a associação entre as deleções $-\alpha^{3.7}$, em um dos alelos, e de uma extensa deleção no outro (GraphPad Prism).

5.2.2. Heterozigotos da Talassemia α^0

C) Paciente 6

Neste caso, foi observada uma deleção que compromete uma região de grande extensão, incluindo o HS-40 e ambos os genes α . Dessa forma, observou-se uma redução de 50% em todas as sondas analisadas, com exceção da 14 e 15, que não apresentaram nenhum sinal, o que poderia ser explicado pela presença de uma pequena deleção nesta região (Figuras 44 e 45, Anexo 5F).

D) Pacientes 7 e 8

Nestes casos, foram constatadas deleções na região do elemento regulatório do *cluster* α (HS-40), em um dos alelos, similares à detectada no Paciente 2. Dessa forma, observou-se uma redução de 50% nos sinais das sondas de 1 a 5, no Paciente 7, e de 1 a 4, no Paciente 8, referentes às deleções do HS-40 (Figuras 46 a 49, Anexo 5G e H).



Figura 44. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 6 (1-26).



Figura 45. Gráfico de MLPA para Paciente 6, heterozigoto da talassemia α^0 . Neste caso, o paciente possui uma deleção extensa, em um dos alelos, que compromete no mínimo todo o *cluster* α e seu elemento regulatório (GraphPadPrism).



Figura 46. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 7 (1-5).



Figura 47. Gráfico de MLPA para Paciente 7, heterozigoto da talassemia α^0 . Neste caso, o paciente possui a deleção da região do HS-40 em um dos alelos (GraphPad Prism).



Figura 48. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 8 (1-4).



Figura 49. Gráfico de MLPA para Paciente 8, heterozigoto da talassemia α^0 . Neste caso, o paciente possui a deleção da região do HS-40 em um dos alelos (GraphPad Prism).

5.2.3. Paciente 9

No Paciente 9 foi constatada a presença de uma quadruplicação de grande extensão, em um dos alelos, que compreende desde a região telomérica do braço curto do cromossomo 16 até a porção 3'do gene α 1. Neste caso, todas as sondas (1 a 26) apresentaram um aumento de cerca de 100% em seus sinais (Figuras 50 a 51, Anexo 5I).



Figura 50. Representação esquemática da localização das sondas do kit ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento alterado no Paciente 9 (1-26).



Figura 51. Gráfico de MLPA para Paciente 9. Neste caso, o paciente possui a quadruplicação de todo o fragmento analisado (GraphPad Prism).

Em síntese, os resultados apresentados pelas análises de MLPA, empregando-se apenas as sondas do kit, encontram-se dispostos na Figura 52.





99

5.2.4. Estudos Familiais

Quando disponíveis, foram realizados as análises hematológicas e/ou moleculares das amostras dos familiares dos pacientes. Os casos serão descritos a seguir.

A) Família do Paciente 2

O pai e a mãe do paciente 2 apresentaram perfis hematológicos típicos de pacientes α talassêmicos (valores reduzidos de VCM e HCM, níveis normais de HbA₂, Hb F e de ferro). A análise molecular por *Multiplex* PCR revelou a presença da deleção $-\alpha^{3.7}$, em homozigose, no pai. No caso da mãe, não havia amostra de DNA disponível para realização dos testes moleculares.

B) Família do Paciente 3

Além de apresentarem hematimetria alterada, as análises de MLPA das amostras de DNA da mãe e do irmão do paciente 3 demonstraram uma redução nos sinais das sondas 14 a 22 (100% e 50%, respectivamente). Entretanto, as sondas 13 e 16 tiveram uma diminuição de 50% e 25%, respectivamente (Figuras 53 a 56, Anexo 5J e K). Estes resultados eram esperados, uma vez que as análises com PCR específico, feitas anteriormente, já haviam detectado a presença da deleção $-\alpha^{3.7}$, em homozigose (mãe) e em heterozigose (irmão), nestes pacientes. A amostra do pai não estava disponível para análises.

B) Família do Paciente 7

Em experimento realizado com a amostra do pai também foi possível constatar a presença de deleção da região do elemento regulatório do *cluster* α (HS-40), em um dos

alelos. Dessa forma, observou-se uma redução de 50% nos sinais das sondas de 1 a 5 (Figuras 57 e 58, Anexo 5L). Por outro lado, a mãe do paciente 7 não apresentou alterações hematológicas e seu DNA estava indisponível para análises.

C) Família do Paciente 8

A análise da amostra do pai revelou a presença da mesma deleção apresentada pelo filho, com uma redução de 50% nos sinais das sondas de 1 a 4, específicas à região do HS-40 e regiões adjacentes (Figuras 59 e 60, Anexo 5M). Os ensaios de MLPA e *Multiplex gap* PCR (dados não mostrados) da mãe do paciente 8 apresentaram resultados dentro da normalidade, corroborando com o perfil hematológico sem alterações.

D) Família do Paciente 9

Neste caso, os pais e a irmã da paciente 9 não apresentaram quaisquer alterações hematológicas, sendo que seus índices hematimétricos estavam todos dentro da normalidade, assim como o *status* de ferro, e dosagens de Hb A_2 e Hb F. Por outro lado, a tia da paciente apresentou discreta microcitose e alega ter feito uso de sulfato ferroso após a gravidez. A análise molecular dos familiares do paciente 9 deverão ser realizadas a seguir.



Figura 53. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. As regiões delimitadas em vermelho correspondem aos fragmentos deletados na mãe do paciente 3 (14 α_2 - 13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 54. Gráfico de MLPA da mãe do Paciente 3 (GraphPad Prism). Em destaque (flechas) estão as sondas 13 e 16, que apresentam uma redução de apenas 50%.



Figura 55. Representação esquemática da localização das sondas do kit (5-26) ao longo do *cluster* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no irmão do paciente 3 (14 α_2 - 13 α_1 ou 13 α_2 - 22).



Figura 56. Gráfico de MLPA do irmão do Paciente 3 (GraphPad Prism). Em destaque (flechas), estão as sondas 13 e 16, que apresentam uma redução de apenas 25%.



Figura 57. Representação esquemática da localização das sondas do kit (1-26) ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes α_2 e α_1 ; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no pai do paciente 7 (1-5).



Figura 58. Gráfico de MLPA do pai do Paciente 7 (GraphPad Prism). Assim como o paciente 7, seu pai também possui a deleção da região do HS-40 em um dos alelos (GraphPad Prism).



Figura 59. Representação esquemática da localização das sondas do kit (1-26) ao longo do *locus* α . Marcados em roxo, estão as sondas 13 e 16, específicas a regiões situadas nos genes $\alpha_2 \in \alpha_1$; em verde, está representado a sonda 17, específica a mutação *Constant Spring*. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no pai do paciente 8 (1-4).



Figura 60. Gráfico de MLPA do pai do Paciente 8, heterozigoto da talassemia α^0 . Assim como o paciente 8, seu pai também possui a deleção da região do HS-40 em um dos alelos (GraphPad Prism).

5.3. Refinamento das deleções

5.3.1. Sondas-parte I

Com base nos resultados apresentados até o momento, foi observada a necessidade de se realizar o refinamento das deleções apresentadas por estes pacientes. Inicialmente, foram sintetizadas mais 5 sondas (**Sondas parte I**: 9H, 19H, 27H, 31H e 34H – marcadas em vermelho), ampliando o tamanho do fragmento a ser analisado de 230 kb para 800 kb (Figura 61).



Figura 61. Disposição das 5 novas sondas ao longo do cromossomo 16. O tamanho do fragmento analisado foi de aproximadamente 800kb.

A princípio, foram realizados os ensaios com as novas sondas empregando-se as amostras dos Pacientes de 1 a 7. Não foram realizados experimentos com o Paciente 8, pois neste caso, o resultado não seria relevante, uma vez que as sondas não são específicas à região deletada. No caso do Paciente 9, futuramente, serão realizados experimentos empregando as sondas sintéticas, bem como procedimentos envolvendo a técnica de *array-CGH.* Com o objetivo de testar a eficiência das novas sondas, foram feitos experimentos empregando a amostra do Paciente 1, sendo que para este não foram observados quaisquer alterações nas novas sondas, o que de fato, era esperado para este caso (Figuras 62 e 63, Anexo 6A)

Os resultados dos ensaios de MLPA empregando as novas sondas estão dispostos a seguir.

A) Paciente 2

Neste caso, foi observada uma redução de 50% no sinal da sonda 9H (1) (Figuras 64 e 65, Anexo 6B).

B) Paciente 3

O ensaio realizado com este paciente revelou uma redução de 50% nos sinais das sondas 9H e 19H (1 e 2) (Figuras 66 e 67, Anexo 6C).

C) Pacientes 4 e 5

Em ambos os casos, foi observada uma redução de 50% nos sinais das sondas 9H a 27H (1 a 3). (Figuras 68 a 71, Anexo 6D e E).

D) Paciente 6

O ensaio realizado com a amostra deste paciente revelou uma redução de 50% nos sinais das sondas 9H a 34H (1 a 5) (Figuras 72 e 73, Anexo 6F).

E) Paciente 7

O padrão apresentado por este paciente foi idêntico ao do Paciente 2 (Figuras 74 e 75, Anexo 6G).



Figura 62. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16.



Figura 63. Resultado do MLPA para o Paciente 1 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 64. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 2.



Figura 65. Resultado do MLPA para o Paciente 2 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 66. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 3.



Figura 67. Resultado do MLPA para o Paciente 3 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 68. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 4.



Figura 69. Resultado do MLPA para o Paciente 4 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 70. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 5.



Figura 71. Resultado do MLPA para o Paciente 5 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 72. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 6.



Figura 73. Resultado do MLPA para o Paciente 6 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 74. Representação esquemática da localização das sondas sintéticas Parte I, ao longo do cromossomo16. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado no Paciente 7.



Figura 75. Resultado do MLPA para o Paciente 7 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 9H, 19H, 27H, 31H,34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.

Em síntese, os resultados apresentados pelas análises de MLPA, empregando-se as sondas disponíveis no kit e as sondas sintéticas- parte I encontram-se dispostos na Figura 76.



Figura 76. Representação esquemática do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), demonstrando uma região de 800 kb contendo o *cluster* α e o HS-40. As barras abaixo da figura representam as deleções detectadas, em 6 dos 9 pacientes, empregando-se as sondas presentes no kit de MLPA P140B2 e as sondas sintéticas-parte I (em vermelho). As barras azuis indicam os fragmentos deletados e as regiões em aberto marcam os locais onde possivelmente estão localizados os *breakpoints* (Adaptado de HARTEVELD *et al.,* 2005).

5.3.2. Sondas-parte II

Após a realização dos experimentos empregando-se as sondas sintéticas-parte I (marcadas em vermelho), observou-se a necessidade de se sintetizar mais oligonucleotídeos, com o objetivo de refinar ainda mais as alterações apresentadas pelos pacientes. Neste caso, foram empregadas as sondas-parte II (marcadas em preto), que foram separadas em diferentes *mixes* (**item 4.2.3**), cujas distribuições podem ser visualizadas na Figura 77.



Figura 77. Distribuição das sondas sintéticas-parte II ao longo do cromossomo 16. Em vermelho, estão representadas as sondas-parte I e, em preto, as sondas parte-II.

Os resultados obtidos nos experimentos com as sondas-parte II serão descritos a seguir.

A) Paciente 1

Neste caso, foram testadas as sondas 3H e 7H, empregando-se como controles internos as sondas 9H, 27H, 31H, CVIPR2 e CKIAA0056 (*mix* 6). Não foram detectadas quaisquer alterações nos padrões das mesmas. (Figuras 78 e 79, Anexo 7A).

B) Paciente 3

Foram realizados experimentos empregando-se as sondas 20H, 23H e 25H (*mix* 2) e 22H, 24H e 26H (*mix* 3). Em ambos os casos, foram utilizados, como controles internos, as sondas 27H, 34H, CVIPR2 e CKIAA0056, sendo que a última foi retirada das análises por problemas em sua amplificação. Para o *mix* 2, foi observado uma redução de 50% no sinal de fluorescência da sonda 20H, sendo a mesma diminuição constatada para a sonda 22H, no experimento que utilizou o *mix* 3 (Figuras 80 a 83, Anexo 7B e C).

C) Paciente 4 e 5

Em ambos os casos foi utilizado o *mix* 4 contendo as sondas, 28H, 29H e 30H e os controles internos, 34A, CVIPR2 e CKIAA0056. Nestes pacientes foram observadas reduções de cerca de 50% nos sinais das sondas 29H e 30H (*mix* 4), sendo que no Paciente 5, adicionalmente, houve uma diminuição de 50% no sinal da sonda 28H (Figuras 84 a 87, Anexo 7D e E).

D) Paciente 6

Para este paciente, foi testado o *mix* 5, contendo as sondas 31H, 34H e 35H e os controles internos CVIPR2 e CKIAA0056. Observou-se uma redução de 50% nos sinais das sondas 31H, 34H e 35H (*mix* 5) (Figuras 88 e 89, Anexo 7F).



Figura 78. Representação esquemática da localização das sondas parte I (em vermelho) e II (em preto) ao longo do cromossomo 16. Neste caso, foram testadas apenas as sondas do *mix* 6 para o Paciente 1.



Figura 79. Resultado do MLPA para o Paciente 1 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 7 equivalem às sondas 3H, 7H, 9H, 27H, 31H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 80. Representação esquemática da localização das sondas parte I (em vermelho) e II (em preto) ao longo do cromossomo 16. Neste caso, foram testados apenas as sondas do *mix* 2 para o Paciente 3. A região marcada em vermelho corresponde ao fragmento deletado.



Figura 81. Resultado do MLPA para o Paciente 3 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 6 equivalem às sondas 20H, 23H, 25H, 27H, 34H e CVIPR2, respectivamente.



Figura 82. Representação esquemática da localização das sondas parte I (em vermelho) e II (em preto) ao longo do cromossomo 16. Neste caso, foram testadas apenas as sondas do *mix* 3 para o Paciente 3. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado.



Figura 83. Resultado do MLPA para o Paciente 3 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 6 equivalem às sondas 22H, 24H, 26H, 27H, 34H e CVIPR2, respectivamente.



Figura 84. Representação esquemática da localização das sondas parte I (em vermelho) e II (em preto) ao longo do cromossomo 16. Neste caso, foram testadas apenas as sondas do *mix* 4 para o Paciente 4. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado.



Figura 85. Resultado do MLPA para o Paciente 4 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 6 equivalem às sondas 28H, 29H, 30H, 34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.


Figura 86. Representação esquemática da localização das sondas parte I (em vermelho) e II (em preto) ao longo do cromossomo 16. Neste caso, foram testadas apenas as sondas do *mix* 4 para o Paciente 5. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado.



Figura 87. Resultado do MLPA para o Paciente 5 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 6 equivalem às sondas 28H, 29H, 30H, 34H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.



Figura 88. Representação esquemática da localização das sondas parte I (em vermelho) e II (em preto) ao longo do cromossomo 16. Neste caso, foram testadas apenas as sondas do *mix* 5 para o Paciente 6. A região delimitada em vermelho corresponde ao fragmento deletado.



Figura 89. Resultado do MLPA para o Paciente 6 (GraphPad Prism). Os valores de 1 a 5 equivalem às sondas 31H, 34H, 35H, CVIPR2 e CKIAA0056, respectivamente.

Em síntese, os resultados obtidos em todos os experimentos (Figura 90), empregando as sondas do kit e as sondas complementares sintéticas parte I e II foram:

A) Paciente 1:

Os experimentos revelaram apenas uma redução nos sinais das sondas 2 e 3, que estão localizadas no elemento regulatório HS-40. Neste caso, o fragmento removido estende-se, aproximadamente, da posição 163464 a 163904 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵), com tamanho mínimo de 0.4 kb, podendo se estender até 57 kb. Os pontos de quebra, provavelmente, situam-se entre as posições 135610 a 163464, na porção 5′, e 163904 a 192952, na porção 3′.

B) Pacientes 2 e 7

Estes apresentaram diminuições nos sinais das sondas 1 do kit à sonda sintética 9H e, em ambos, o fragmento removido estende-se, aproximadamente, da posição 97000 a 202417 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵). O tamanho mínimo desta deleção é de cerca de 100 kb e remove desde o telômero até regiões próximas ao gene ζ . Estas deleções podem ser maiores, apresentando tamanho máximo de 110 kb. O ponto de quebra, na porção 3´, está provavelmente localizado entre as posições 202417 a 209351.

C) Paciente 3

Os ensaios realizados com este paciente mostraram uma redução nos sinais das sondas 1 a 22H, sendo que a região deletada estende-se, aproximadamente , da posição

⁵ http://genome.ucsc.edu/

97000 a 334571 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵). O tamanho mínimo desta alteração é de cerca de 240 kb, removendo desde o telômero até parte do gene PDIA2, podendo se estender até no máximo 250 kb. O ponto de quebra, na porção 3´, situa-se, provavelmente, entre as posições 334571 a 348063.

D) Paciente 4

Os experimentos realizados com este paciente demonstraram uma diminuição nos sinais das sondas 1 do kit a 30H (com exceção da 28H), sendo que a deleção pode se estender da posição 97000 a aproximadamente 570532 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵), comprometendo cerca de 470 kb do fragmento. Entretanto, estes valores podem ser variáveis uma vez que não se sabe ao certo qual mecanismo teria ocasionado a diminuição nos sinais das sondas 29H e 30H, mas não a da 28H, específicas a regiões *in cis*.

E) Paciente 5

Este apresentou uma redução nos sinais das sondas 1 do kit a 30H, situadas, aproximadamente, entre as posições 97000 a 602492 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵), comprometendo um fragmento de cerca de 500 kb, que pode se estender até a 540 kb. Neste caso, houve a remoção da região que se estende desde o telômero até o gene SOLH. O ponto de quebra, na porção 3', está provavelmente situado entre as posições 602492 a 643597.

F) Paciente 6

A redução nos sinais de todas as sondas testadas (1 a 35H), situadas aproximadamente entre as posições 97000 a 816477 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵), revelaram um deleção de no mínimo 720 kb. Entretanto, não foi possível inferir se esta alteração se estende a regiões mais a jusantes, no cromossomo 16, sendo necessária a síntese de mais sondas.

G) Paciente 8

Foi observada uma diminuição nos sinais das sondas 1 a 4 do kit, situadas, aproximadamente, entre as posições 97000 a 193847 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵). O fragmento deletado apresenta cerca de 95 kb e estende-se desde o telômero até a região à montante do gene ζ , podendo ter no máximo cerca de 100 kb. O ponto de quebra, na porção 3', provavelmente está situado entre as posições 193847 a 199192.

H) Paciente 9:

Ao contrário dos demais casos, análises preliminares feitas a partir de testes com as sondas do kit, revelaram a presença de uma quadruplicação de no mínimo 230 kb, que se estende do telômero a porção 3'do gene α_1 , posições 97000 a 231370 do UCSC *Genome Browser* (Fevereiro, 2009) (web site do UCSC *Genome Browser*⁵). Entretanto, são necessários ensaios adicionais empregando-se outras sondas sintéticas para que se possa ter uma melhor estimativa do tamanho desta alteração.



Figura 90. Representação esquemática das regiões afetadas nos 9 pacientes (P) estudados, a partir de todos os resultados.

6. DISCUSSÃO

Os métodos baseados em PCR têm sido os mais utilizados na detecção das mutações α-talassêmicas (CHONG *et al.*,2000; LIU *et al.*, 2000; WINICHAGOON *et al.*, 1995; SIRIRATMANAWONG *et al.*, 2001; SANGKITPORN *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2006), dada a sua maior rapidez e praticidade frente às técnicas como o *Southern Blot* e FISH, que são extremamente laboriosas e demandam muito tempo de execução (GOUAS *et al.*, 2008).

A natureza dessas mutações consiste basicamente de deleções que, na maioria das vezes, remove os genes α e/ou regiões adjacentes, ocasionando a redução ou ausência de síntese de cadeias α (HIGGS *et al.*, 1989; HIGGS, 1993). As deleções mais prevalentes nas diferentes populações podem ser detectadas por um único *Multiplex gap*-PCR (CHONG *et al.*, 2000), que emprega pares de iniciadores que flanqueiam as regiões deletadas [- $\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{4.2}$, -SEA, -MED, -($\alpha^{20.5}$), -FIL, -THAI]. Entretanto, são relativamente freqüentes os casos de pacientes que apresentam valores de VCM e HCM reduzidos (< 80fl e < 27pg, respectivamente), níveis de Hb A₂ e de Hb F normais e *status* de ferro normal, que permanecem sem diagnóstico e que podem ser portadores de formas mais raras ou esporádicas de talassemia α (BORGES *et al.*, 2001; FALLAH *et al.*, 2010). Nestes casos, a interpretação equivocada da hipocromia e microcitose, particularmente em associação com a anemia (geralmente discreta), pode levar à administração desnecessária de sulfato ferroso (PEARSON *et al.*, 2000;BORGES *et al.*, 2001).

Em 2002, SCHOUTEN *et al.* descreveram a técnica de MLPA para a realização de análises quantitativas rápidas de até 50 sequências genômicas do DNA em uma única reação de PCR. Esta foi direcionada, principalmente, ao estudo de doenças cujas causas estejam associadas a deleções e duplicações gênicas. Com o desenvolvimento de uma série

de sondas complementares às regiões dos *clusters* α e β , por HARTEVELD *et al.* (2005), este método se tornou aplicável à detecção e caracterização de deleções α e β -talassêmicas, sejam elas conhecidas, raras ou, eventualmente, novas.

No presente trabalho, nós utilizamos a técnica de MLPA para detecção e caracterização de deleções relacionadas à talassemia α em nove pacientes, previamente investigados, que não puderam ter seus diagnósticos moleculares estabelecidos pelos métodos convencionais (*Multiplex gap*-PCR, PCR específicos e seqüenciamento de DNA).

Os primeiros experimentos realizados, empregando apenas as sondas disponíveis no kit comercial, revelaram a presença de deleções que comprometiam apenas o elemento regulatório e/ou regiões adjacentes, deixando os genes α , *in cis*, intactos (Pacientes 1, 2, 7 e 8). Além disso, foram ainda detectadas deleções extensas que removiam desde o telômero até a porção 3´ do gene α_1 (Pacientes 3 a 6) e ainda uma quadruplicação extensa do mesmo fragmento citado anteriormente (Paciente 9). Adicionalmente, nos pacientes com doença da Hb H, foi possível constatar a presença da deleção - $\alpha^{3.7}$, em um dos alelos, que já havia sido detectada pelo método de *Multiplex gap*-PCR e/ou PCR específico.

Ao final desta etapa, verificamos que as sondas provenientes do kit não eram suficientes para a caracterização das mutações apresentadas por alguns dos pacientes (1 a 7). Foram então sintetizados outros oligonucleotídeos na tentativa de se ampliar a região de análise de 230 kb para 800 kb, além de promover o refinamento das alterações. Os experimentos consistiram de duas partes onde foram empregadas cerca de 20 sondas adicionais (18 específicas ao cromossomo 16 e 2 externas a ele). Com isso foi possível caracterizar, um pouco melhor, as alterações presentes nestes pacientes

Caracterização das alterações

Com a aplicação do método de MLPA foi possível demonstrar, em 4 casos, deleção restrita ao elemento regulatório HS-40 (Paciente 1) e/ ou de regiões adjacentes a ele (Pacientes 2, 7 e 8), deixando os genes α , *in cis*, intactos, porém sem expressão (remoção de 0.4 kb a 100 kb). A associação entre a deleção deste elemento e o fenótipo α talassêmico, embora rara, já é conhecida. Desde o primeiro caso citado na literatura, que apresentou uma deleção de 62 kb incluindo o HS-40 (HATTON *et al.*, 1990), foram descritos apenas cerca de outros 20 pacientes com talassemia α^0 causada por deleções que afetam esta região (LIEBHABER *et al.*, 1990; WILKIE *et al.*, 1990; ROMAO *et al.*, 1991, 1992; FLINT *et al.*, 1994, 1996; WENNING *et al.*, 2002; HARTEVELD *et al.*, 2005; VIPRAKASIT *et al.*, 2003, 2006; PHYLIPSEN *et al.*, 2010). O HS-40 (ou α -MRE) atua como um elemento *enhancer*, ativando a expressão dos genes α , *e* o seu comprometimento atinge importantes sítios de ligação para diversos fatores de transcrição (GATA 1, NF-E2, SP1), suprimindo a expressão desses genes (VOON e VADOLAS, 2009; HIGGS e WEATHERALL, 2009).

Em outros 4 casos (Pacientes 3 a 6), as alterações comprometeram fragmentos maiores, afetando desde o telômero até regiões a jusante do *cluster a* (de 240 kb a 720 kb), sendo que, no caso do Paciente 6, a deleção pode ser ainda mais extensa. Nesses pacientes, as deleções removeram um número considerável de genes, o que poderia levar a outras implicações clínicas, como o observado na Síndrome do ATR-16. Como já referido, esta condição é causada por grandes rearranjos no cromossomo 16, que resultam na remoção de um número considerável de genes, o casionando graus variados de retardo mental associados à talassemia α (DANIELS *et al., 2001;* HORSLEY *et al., 2001*). Entretanto,

nenhuma outra anormalidade concomitante à talassemia α foi relatada nos casos aqui estudados.

Por fim, no paciente 9 foi detectada uma quadruplicação de todo o *locus* α , com extensão de no mínimo 130 kb. Diferentemente dos demais casos, nos quais o fenótipo α talassêmico está relacionado a deleções no *locus* α , no paciente 9, a quadruplicação deste fragmento e, possivelmente, o aumento na síntese das cadeias α , pode ocasionar um fenótipo β talassêmico. Casos de duplicações, triplicações e quadruplicações envolvendo grandes segmentos do cromossomo 16 já foram descritos, embora sejam ainda mais raros do que as extensas deleções (HARTEVELD *et al.*, 2007, DALLAPICCOLA *et al.*, 2009). Para melhor caracterização deste caso, experimentos adicionais deverão ser feitos.

Embora a técnica de MLPA tenha sido eficiente na detecção das deleções e da quadruplicação segmental, não foi possível, em tempo hábil, determinarmos precisamente os pontos de quebra das mesmas. Isso só seria possível empregando-se outros métodos, como o PCR seguido de seqüenciamento dos fragmentos (PHYLIPSEN *et al.*, 2010) ou o *array*-CGH (DALLAPICCOLA *et al.*, 2009), que, de um modo geral, apresentam uma série de limitações. Ao utilizarmos o primeiro método, seria necessário analisar toda a região que flanqueia a deleção, o que demandaria consideráveis proporções de tempo e trabalho. Com relação ao segundo método, embora com alta resolução, suas análises ainda têm um custo bastante elevado, e os resultados são de difícil interpretação (HARTEVELD *et al.*, 2005; GOUAS *et al.*, 2008).

A partir da análise comparativa com as deleções e duplicações descritas na literatura, pôde-se inferir que as deleções apresentadas pelos Pacientes 1, 2, 3, 7 e 8 têm extensões similares ou próximas às de alguns casos descritos (WILKIE *et al.*, 1990; ROMAO *et al.*,

1992, FLINT *et al.*, 1994; WENNING *et al.*, 2002; HARTEVELD *et al.*, 2005; PHYLIPSEN *et al.*, 2010). Já as alterações apresentadas pelos Pacientes 4 e 5 não encontram similaridade na literatura.

No caso do Paciente 4, foi observado um comportamento distinto da sonda 28H em comparação ao apresentado pelo Paciente 5. Apesar de, em ambos, os ensaios revelarem uma redução nos sinais das sondas 29H e 30H, no caso do Paciente 4, a sonda 28H apresentou sinal dentro da normalidade (Figuras 84 e 85). Uma possível explicação seria a da ocorrência de uma dupla quebra nas posições delimitadas pelas sondas 28H e 30H, com conseqüente inversão e remoção deste fragmento. Com isso, a região específica à sonda 28H teria sido preservada. Entretanto, tal afirmação só poderá ser confirmada por outros métodos (como o sequenciamento das regiões de *breakpoints*), uma vez que a técnica de MLPA não permite determinar a distribuição espacial dos genes e nem possíveis rearranjos, mas apenas alterações que envolvam mudanças no número de cópias gênicas (deleções/duplicações).

Por fim, não puderam ser feitas comparações com as alterações identificadas nos pacientes 6 e 9, pois nestes casos, procedimentos complementares ainda deverão ser adotados para a melhor caracterização das regiões afetadas.

Estudos familiais

Em alguns dos casos citados anteriormente (Pacientes 3, 7, 8 e 9) foi possível estudar alguns membros familiares dos pacientes. Em experimentos realizados com a mãe e com o irmão do Paciente 3, só pode ser demonstrada a presença da deleção $-\alpha^{3.7}$, em homozigose e heterozigose, respectivamente. Como a amostra do pai do paciente não estava disponível para análises, não foi possível concluir se esta alteração foi herdada ou se originou a partir de mutações na linhagem germinativa (mutação *de novo*). Nos casos dos Pacientes 7 e 8, as mesmas deleções foram detectadas em seus respectivos pais, confirmando a origem paterna das alterações. A presença de microcitose no paciente 9 e em sua tia, sugere que a quadruplicação possa ter origem materna, entretanto, isso só poderá ser confirmada a partir de análise molecular, já que a mãe apresentou hematimetria normal.

Considerações finais

As talassemias α são causadas por uma ampla variedade de alterações moleculares que incluem desde pequenas deleções e/ou inserções até deleções de grande extensão. A origem dessas alterações está associada à presença de inúmeras regiões homólogas (fragmentos X, Y e Z), de sequências repetitivas (elementos *Alu*, palíndromos) e de *motif* GAGG, distribuídos ao longo do *locus* α , que podem contribuir para a ocorrência de eventos de recombinação homóloga e não homóloga (HIGGS *et al.*, 1984, 2010).

Os resultados apresentados neste estudo ressaltam a diversidade destas alterações, sendo possível identificar 8 deleções e uma quadruplicação, todas responsáveis pelo fenótipo talassêmico. Em todos os casos, os pacientes apresentaram alterações hematológicas típicas, cujas bases moleculares não puderam ser identificadas pelos métodos convencionais. Apenas com a adaptação do método de MLPA ao estudo das Hbpatias é que se tornou possível caracterizar as diversas alterações apresentadas por estes pacientes.

Nossos resultados ressaltam assim a importância de se investigar devidamente todos os casos que apresentem alterações hematológicas indicativas da presença de talassemia, como a hipocromia, a microcitose e a poliglobulia, associados a níveis normais de Hb A₂ e

status de ferro também normal, para a devida caracterização diagnóstica e para se evitar a administração desnecessária de sulfato ferroso, na prática observada.

Em relação ao método usado, além de ampliar a capacidade de detecção e caracterização das alterações moleculares relacionadas às talassemias, antes restrita às mutações mais frequentes, o MLPA se mostrou uma técnica rápida e de fácil execução. Todos os reagentes necessários às reações encontram-se disponíveis em um único kit e a realização dos experimentos depende apenas do termociclador e do seqüenciador automático (web site do MLPA³). Apesar de atrativo, porém, ele também apresentou algumas desvantagens. A presença de resíduos nas amostras de DNA interferiu em algumas análises, pois a técnica é extremamente sensível a contaminantes (web site do MLPA³). Além disso, não foi possível caracterizar os pontos de quebra das alterações detectadas, sendo para isso necessária a aplicação de métodos complementares.

Em síntese, o MLPA se mostrou uma importante ferramenta na detecção e caracterização das bases moleculares de doenças causadas por deleções e duplicações segmentais de DNA, como as talassemias α. Em função do custo ainda elevado, seu uso deve ser restrito aos casos que permaneçam sem explicação, nos quais não seja possível, pelos métodos convencionais, se identificar nenhuma alteração que corrobore com os achados hematológicos e clínicos dos pacientes.

7. CONCLUSÕES

- Este estudo representa o primeiro no Brasil a empregar o método de MLPA para caracterização das bases moleculares da talassemia *a*;

- No total, foram identificadas oito deleções (quatro restritas ao elemento regulatório e/ou regiões adjacentes e quatro de maior extensão) e uma quadruplicação envolvendo o *locus* α , que só puderam ser detectadas pelo método de MLPA;

- Nossos resultados ilustram a diversidade das alterações que afetam os genes de globina e enfatizam a necessidade de se investigar, mais detalhadamente, as causas associadas às alterações hematológicas dos pacientes, em especial, nos casos em que sejam detectados valores reduzidos de VCM e HCM, poliglobulia, e normalidade nos níveis de Hb A₂ e no *status* de ferro.

8. REFERÊNCIAS

1. Babashah S, Jamali S, Mahdian R, Nosaeid MH, Karimipoor M, Alimohammadi R, Raeisi M, Maryami F, Masoudifar M. Detection of unknown deletions in β -globin gene cluster using relative quantitative PCR methods. Eur J Haematol. 2009; 83(3): 261-9.

2. Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF e Sonati MF. High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Braz J Med Biol Res. 2001; 34(6): 759-762.

3. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. 1.ed. Philadelphia, London, Toronto: W.B.Saunders Company; 1986.p.690.

4. Cançado RD. Talassemias alfa. Rev Bras Hematol Hemoter. 2006; 28(2): 81-7.

5. Ce YB, Zhuanfeng Z, Zhengsong L. Oligonucleotide array for detection of common severe determinants of alpha thalassemia. J Biotec. 2005; 115: 1-9.

6. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. Blood. 2000; 95: 360-2.

7. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of {alpha}-thalassemia. Clin Chen.2000; 46(10): 1692-5.

8. Dacie JV, Lewis SM. Hematologia Prática. 9a. ed., Artmed, Porto Alegre; 2006.p.571.

9. Dallapiccola B, Bernardini L, Novelli A, Mingarelli R. Expanding the phenotype of duplication of the Rubinstein-Taybi region on 16p13.3. Am J Med Genet Part A. 2009; 149A: 2867-2870.

10. Daniels RJ, Peden JF, Lloyd C, Horsley SW, Clark K, Tufarelli C, Kearney L, Buckle VJ, Doggett NA, Flint J, Higgs DR. Sequence, structure and pathology of the fully

annotated terminal 2Mb of the short arm of human chromosome 16. Human Molecular Genetics. 2001; 10: 339-352.

11. Eng B, Patterson M, Borys S, Chui DHK, Waye JS. PCR-based diagnosis of the Filipo (- ^{FIL}) and Thai (- ^{THAI}) α -Thalassemia-1 Deletions. American Journal of Hematology. 2000; 63: 54-6.

12. Fallah MS, Mahdian R, Aleyasin SA, Jamali S, Nosaeid MH, Karimipour M, Raeisi M, Zeinali S. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of unknown α -globin gene deletions. Blood Cells, Molecules and Disease. 2010, doi:10.1016/j.bcmd.2010.03.001.

13. Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanello R, Cao A, Wood G, Ayyyb H, Higgs DR. Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. Am J Human Genet. 1994; 55: 505-512.

14. Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dodé C, Vignes B, Horsley SW, Kearney L, Buckle VJ, Ayyub H, Higgs DR. Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related *Alu* elements. Hum. Mol. Genet. 1996; 5: 1163-9.

15. Fritsch EF, Lawn RM, Maniats T. Molecular cloning and characterization of the human β -like globin gene cluster. Cell. 1980; 959-72.

16. Galliene AE, Iberson NM, Dréau HM, Jackson H, Bignell PA, Old JM, Schuh A, Henderson SJ. Characterization of a novel deletion causing beta-thalassemia major in an Afghan family. Hemoglobin. 2010; 34(1): 110-4.

 Gouas L, Goumy C, Vérnonèse L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. Pathologie Biologie. 2008; 56: 345-53.

18. Hardison R. The evolution of hemoglobin. American Scientist. 1999; 87:126-35.

19. Harteveld CL, Muglia M, Passarino G, Kielman MF, Bernini LF. Genetic polymorphism of the major regulatory element HS-40 upstream of the human alpha-globin gene cluster. 2002; 119(3): 848-54.

20. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, Giordano PC. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing α and β thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation dependent probe amplification. J Med Genet. 2005; 42: 922-31.

21. Harteveld CL, Kriek M, Bijsma EK, Erjavec Z, Balak D, Phylipsen M, Voskamp A, di Capua E, White SJ, Giordano PC. Refinement of the genetic cause of ATR-16. Human Genet. 2007; 122(3-4): 283-92.

22. Harteveld CL, Refaldi C, Cassinerio E, Cappellini MD, Giordano PC. Segmental duplication involving the alpha-globin gene cluster are causing beta-thalassemia intermedia phenotypes in beta-thalassemia heterozygous patients. Blood Cells Mol Dis. 2008; 40(3): 312-6.

23. Hatton C, Wilkie AOM, Drysdale HC, Wood WG, Vickers MA, Sharpe J, Ayyub H, Pretorius IM, Buckle VJ, Higgs DR. Alpha thalassemia caused by a large (62kb) deletion upstream of the human α globin gene cluster. Blood. 1990; 76: 221-7.

24. Higgs DR, Hill AVS, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. Independent recombination events between duplicated human α -globin genes: Implications for their concerted evolution. Nucl Acids Res. 1984; 12: 6965-77.

25. Higgs DR, Vichers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. Blood. 1989; 73: 1081-104.

26. Higgs DR. Alpha-Thalassaemia. In: Higgs DR, Weatherall DJ (eds). Baillieres Clin Haematology. 1993; 6(1): 117-50.

27. Higgs DR, Sharpe JA, Wood WG. Understanding alpha globin gene expression: a step toward effective gene therapy. Sem Hematol. 1998; 35: 93-104.

28. Higgs DR. Molecular mechanisms of alpha thalassemia. In Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambrigde: United Kingdom Press; 2001.p.405-30.

29. Higgs DR, Weatherall DJ. The alpha thalassemias. Cell. Mol. Life Sci. 2009; 66: 1154-1162.

30. Hoffbrand AV, Pettit JE, MOSS PAH. Essential Haematology. 4.ed, London, Edinburgh, Boston: Blackwell Science; 2000.p.437.

31. Horsley SW, Daniels RJ, Anguita E, Raynhan HA, Peden JF, Villegas A, Vickers MA, Green S, Waye JS, Chui DH, Ayyub H, MacCarthy AB, Buckle VJ, Gibbons RJ, Kearney I, Higgs DR. Monossomy of the most telomeric, gene-rich regions of the short arm of human chromosome 16 causes minimal phenotypic effects. European Journal of Human Genetics. 2001; 9: 217-225.

32. Huang CH, Chang YY, Chen CH, Ko TM. Molecular characterization of a betaglobin gene deletion of 1357 bp in a Taiwanese beta-thalassemia carrier. Hemoglobin. 2008; 32(5): 498-504.

33. Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar S, Clark K, Anguita E, Gobbi M, Jong P, Rubin E, Higgs DR. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification and functional assessment of multispecies conserved sequences. USA: Proc Natl Acad Sci. 2005; 102: 9830-35.

34. Isola J, de Vries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffinembedded tumor samples. Am J Pathol. 1994; 145(6): 1301-08.

35. Jarman AP, Wood WG, Sharpe JA, Gourdon G, Ayyub H, Higgs DR. Characterization of the major regulatory element upstream of the human alpha-globin gene cluster. Mol Cell Biol 1991; 11: 4679-89.

36. Kattamis AC, Carnaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P. Human α-thalassemia
syndromes: detection of molecular defects. American Journal of Hematology. 1996; 53: 8191.

37. Lee ST, You EH, Kim JY, Ki CS. Multiplex ligation-dependent probe amplification screening of isolated increased HbF levels revealed three cases of novel rearrangements/deletions in the beta-globin gene cluster. Br J Haematol. 2010; 148(1): 154-60.

38. Liebhaber SA, Griese EU, Weiss I, Cash FE, Ayyub H, Higgs DR, Horst J. Inactivation of human α -globin gene expression by a *de novo* deletion located upstream of the α -globin gene cluster. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(23): 9431-5.

39. Liu YT, Old JM, Miles K, *et al.* Rapid detection of alpha-thalassemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Br J Haematol. 2000; 108(2): 295-299.

40. Liu J, Yan M, Wang Z, *et al.* Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis.Transl Res. 2006; 148(1): 6-12.

41. Liu JZ, Han H, Schouten JP, Wang LR, Fan XP, Duarte HB, Zhu CJ, Cai R, Xiao B, Wang QT. Detection of alpha-thalassemia in China by using multiplex ligation-dependent probe amplification. Hemoglobin. 2008; 32(6): 561-71.

42. Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. α^0 Thalassemia due to recombination between the α_1 -globin gene and Alu I repeat. Blood. 1985; 65: 1434-8.

43. Pearson HA, Ehrenkranz RA, Rinder HM. Hemosiderosis in normal child secondary to oral iron medication. Pediatrics. 2000; 105: 429-31.

44. Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of hemoglobin. Nature. 1960; 185:416-22.

45. Phylipsen M, Prior JF, Lim E, Lingam N, Vogelaar IP, Giordano PC, Finlayson N J, Harteveld CL. Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Blood Cells Mol Dis. 2010; 44(3): 146-51.

46. Pressley L, Higgs DR, Metaxatou-Mavromati A, Clegg JB, Weatherall DJ. Characterization of a new α thalassemia-1 defect due partial deletion of the α globin gene complex. Nucleic Acids Research. 1980; 8(21): 4889-98.

47. Ribeiro DM, Figueiredo MS, Costa FF, Sonati MF. Haplotypes of alpha-globin gene regulatory element in two Brazilian native populations. Am J Phys Anthropol. 2003; 121(1): 58-62.

48. Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. Genet. Mol. Res. 2008; 7(4): 1045-53.

49. Ribeiro DM, Zaccariotto TR, Santos MN, Costa FF, Sonati MF. Influence of polymorphisms of the alpha-major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression. Braz J Med Biol Res. 2009; 42(9): 783-6.

50. Romao L, Osorio-Almeida L, Higgs DR, Lavinha J, Liebhaber SA. Alphathalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alphaglobin structural genes. Blood. 1990; 78: 1589-95.

51. Romao L, Cash F, Weiss I, Liebhaber S, Pirastu M, Galanello R, Loi A, et al. Human a-globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the 4-globin gene. Hum Genet.1992; 89: 323-328.

52. Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, Van Den Ende J, Van Bever Y, Kooy RF. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Human Mutat. 2004; 23: 17-21.

53. Sangkitporn SK, Wangkahat K, Sangnoi A, Songkharm B, Charoenporn P, Sankitporn S. Rapid diagnosis of alpha (0)-thalassemia using the relative quantitative PCR and the dissociation curve analysis. Clin Lab Haematol. 2003; 25(6): 359-65.

54. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. Human Mutat. 2004; 23: 413-9.

55. Schouten JP, Mc Celgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg, D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation - dependent probe amplification. Nucleic Acids Research. 2002; 30 (12): e57.

56. Siriratmanawong N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, *et al.* Simultaneous PCR detection of beta-thalassemia and alpha-thalassemia 1 (SEA type) in prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. Clin Biochem. 2001; 34(5): 377-380.

57. So CC, So ACY, Chan AYY, Tsang STY, Ma ESK, Chan LC. Detection and characterization of β -globin gene cluster deletions in Chinese using multiplex ligation-dependent probe amplification. J Clin Pathol. 2009; 62(12): 1107-11.

58. Sollaino MC, Paglietti ME, Perseu L, Giagu N, Loi D, Galanello R. Association of alpha globin gene quadruplication and heterozygous beta thalassemia in patients with thalassemia intermédia. Haematologica. 2009; 94(10): 1445-8.

59. Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. Jornal de Pediatria. 2008. 84(4): 40-51.

60. Sorensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO.

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for copy number analysis on small amounts of DNA Material. Anal Chem. 2008 Nov 8.

61. Stamatoyannopoulos G. The Molecular Basis of Blood Diseases. 6.ed. W.B. Saunders Company, 2001.p.1028.

62. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin – Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge University Press: Ed. USA, 2001.p.603.

63. Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. Human Mutat. 2003; 22: 428-33.

64. Viprakasit V, Kidd AM, Ayyub H, Horsley S, Hughes J, Higgs DR. *De novo* deletion within the telomeric region flanking the human alpha globin locus as a cause of α thalassaemia. Br. J. Haematol. 2003; 120: 867-75.

65. Viprakasit V, Harteveld CL, Ayyub H, Stanley JS, Giordano PC, Wood WG, Higgs DR. A novel deletion causing alpha thalassemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element. Blood. 2006; 107(9): 3811-12.

66. Voon HPJ, Vadolas J. Controlling α -globin expression and its impact on β -thalassemia. Haematologica. 2008; 93(12): 1868-76.

67. Urbinati F, Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies Part II: Thalassaemias. Expert reviews in molecular medicine. 2006; 8(10): 1-26.

68. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes. Oxford: Ed. Blackwell Science, 2001.p.374.

69. Wenning MR, Harteveld CL, Giordano PC, Kimura EM, Saad ST, Costa FF, Sonati MF. Hemoglobin H disease resulting from the association of the –alpha3.7 righward deletion and the (alpha alpha)MM deletion in a Brazilian patient. Eur J Haematol. 2002; 69(3): 179-181.

70. Wenning M.R.S.C. Expressão Gênica Diferencial em Reticulócitos de Pacientes com Doença da Hemoglobina H. Tese de Doutorado em Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.

71. Williams WJ, Beutler E, Erlev AJ, Lichtman MA. Hematology, 6.ed.; New York: Mc Graw Hill Book Company, 2001.p.1480.

72. Wilkie AOM, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR A truncated human chromosome 16 associated with a thalassemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)n. Nature, 1990; 346: 868-871.

73. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S, Fukumaki Y. Detection of alphathalassemia-1 (Southeast Asian type) and its application for preatal diagnosis. Clin Genet. 1995; 47(6): 318-320.

74. Zhou GL, Xin L, Song W, Di LJ, Liu G. Active Chromatin Hub of the Mouse Alpha-Globin Forms in a Transcription Factory of Clustered Housekeeping Genes. Molecular and Cellular Biology. 2006; 26(13): 5096-105.

75. Web site of the World Health Organization – WHO/OMS

http://www.who.int/en/

76. Web site of Gene Globin Server

http://globin.cse.psu.edu/

77. Web site of MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification http://www.mlpa.com.

78. Web site do UCSC Genome Browser : http://genome.ucsc.edu/

ANEXO 1.

CHARACTERIZATION OF ALPHA THALASSEMIC GENOTYPES BY MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Manuscrito submetido ao Brazilian Journal of Medical and Biological Research em Julho

de 2010

CHARACTERIZATION OF ALPHA THALASSEMIC GENOTYPES BY MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

C.N. Suemasu¹; E.M. Kimura¹; D.M. Oliveira¹; M.A.C. Bezerra²; F.F. Costa², M.F. Sonati¹

¹ Laboratório de Hemoglobinopatias, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

² Centro de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Characterization of alpha thalassemic genotypes by MLPA

Keywords: Alpha thalassemia; Hb H disease; Multiplex ligation-dependent probe amplification; Genetic polymorphisms; Brazilian population.

Research supported by FAPESP (2008/57441-0) and CNPq. C.N. Suemasu was the recipient of a fellowship from CAPES (330030170M6).

Correspondence to: M.F. Sonati, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brasil. Fax: +55-19-3521-9451, E-mail: sonati@fcm.unicamp.br

Abstract

Alpha-thalassemia is the most common inherited disorder of hemoglobin synthesis. Genomic deletions involving the alpha globin gene cluster on chromosome 16p13.3 are the most frequent molecular cause of the disease. Although common deletions can be detected by a single multiplex gap-PCR, the rare and novel deletions depend on more laborious techniques for their characterization. The multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique has recently been used for this purpose and was successfully used in the present study to detect the molecular alterations responsible for the alpha-thalassemic phenotypes in eight unrelated individuals in whom the molecular basis of the disease could not be determined by conventional methods. A total of 44 probe pairs were used for MLPA, covering approximately 800 kb from the telomere to the MSLN gene in the 16p13.3 region. Eight deletions were detected. Four of these varied in size from 240 kb to 720 kb and affected a large region including the entire alpha-globin gene cluster and its upstream regulatory element (alpha-MRE), while the other four varied in size from 0.4 kb to 100 kb and were limited to a region containing this element. This study is the first in Brazil to use the MLPA method to determine the molecular basis of alpha-thalassemia. The variety of rearrangements identified highlights the need to investigate all cases presenting with microcytosis and hypochromia but without iron deficiency or elevated hemoglobin A_2 levels and suggests that these rearrangements may be more frequent in our population than previously estimated.

Introduction

The human alpha (α)-globin gene cluster is located on the distal portion (p13.3-pter) of the short arm of chromosome 16 and includes three functional α -like protein coding genes (ζ , α_2 and α_1), two expressed genes with unknown function (μ and θ_1) and three pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$, $\psi\rho$) arranged in the order 5'- ζ - $\psi\zeta$ - μ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - $\psi\rho$ - θ_1 -3' (1,2) (Figure 1). The α -globin regulatory elements lie upstream of the start of the ζ -globin gene (10 to 50kb) and consist of four conserved DnaseI hypersensitive sites (HS-48, HS-40, HS-33 and HS-10) that bind erythroid-specific transcription factors (3,4). Of these four sites, HS-40 is the only one capable of directing high-level expression of the α -globin chains and is thus the major regulatory element (α -MRE) (5) (Figure 1).

Molecular lesions affecting the α -globin genes or their regulatory element (α -MRE) lead to α -thalassemia, an inherited hemoglobin disorder characterized by a reduction in or absence of α -globin chain synthesis. Deletions are the major molecular cause of the disease and may affect one or both α genes in the chromosome (the α^+ and α^0 forms, respectively) (1,6). The clinical phenotype of carriers varies according to the number of genes affected. Carriers of three functioning α -globin genes (- $\alpha/\alpha\alpha$) do not present with detectable red blood cell abnormalities or globin-chain imbalance, while carriers of two functioning α -genes (- $\alpha/-\alpha$, - $-/\alpha\alpha$) have mild microcytic, hypochromic anemia with normal hemoglobin A₂ levels. Carriers of only one functioning α -gene (- $-/-\alpha$) present with moderate to severe anemia with markedly unbalanced globin-chain synthesis ratios. Failure to inherit any functional α -globin genes (- $-/-\alpha$) is usually incompatible with life and leads to Hb Bart's (γ_4 tetramers) hydrops fetalis (1,7).

Although α -thalassemia is found throughout the world, its distribution varies greatly among different populations. In Brazil, most of the recognized α -thalassemia mutations involve deletions of one α -globin gene (α ⁺-thalassemias), although several cases of α ⁰-thalassemias have been reported in the literature (8-12). It has been shown that the - α ^{3.7} deletion is the most frequent mutation in the Brazilian population, occurring in 20-25% of the black population in the Southeastern region of the country (13).

The most common α -thalassemia deletions can be detected by a single multiplex gap-PCR [i.e., $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--^{\text{MED}}$, $--^{\text{SEA}}$, $--^{\text{FIL}}$, $--^{\text{THAI}}$] (14). However, there are many cases whose iron profile, HbA2 and HbF levels are normal but whose red blood cells have reduced mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH), hematological alterations that are characteristic of defects in hemoglobin synthesis and whose causes remain unidentified. Southern blot and/or FISH have been employed to determine the cause of these abnormalities; however, both techniques are time consuming and labor intensive (15).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a simple technique that is suitable for rapid quantitative analysis and allows any deletions or duplications in the screened regions to be detected (15). More recently, it has been used to study large alterations in globin genes. In the present study, we used this technique to determine the molecular basis of alpha-thalassemic phenotypes in eight unrelated individuals, five of whom had Hb H disease.

Materials and Method

Patients

Eight patients with different ethnic backgrounds suspected of having hemoglobinopathies were referred to the UNICAMP Hospital, Campinas, in Southeastern Brazil for hematological and DNA analysis. These patients were selected because although their iron status was normal, they had a thalassemia phenotype. Their red blood cells had reduced MCV and MCH values and normal HbA₂ and HbF levels, but no abnormalities were found by multiplex gap-PCR. Restriction analysis excluded the main non-deletional mutations, namely, HphI, NcoI and Tsaudi. Five of the patients presented with hemoglobin H (Hb H) disease, but analysis revealed only one mutation ($\alpha^{3.7}$ deletion), suggesting a deleted allele in trans. Direct sequencing of the α -MRE reinforced this hypothesis as homozygous polymorphisms were detected in all the cases. Family analysis was only possible for certain patients because samples were not available for all family members. When samples were available, these were tested using the same methods as those used for the patient samples. Demographic, hematological and molecular data for patients and their families are shown in Tables 1 and 2, respectively.

Hematological data for patients and relatives were obtained by means of an electronic cell counter (Sysmex XE2100). Hemoglobin evaluation was carried out by electrophoresis on cellulose acetate at alkaline and neutral pHs, and the levels of HbA₂, Hb F, Hb H and Hb Bart's, when these were present, were quantified using cation exchange-high performance liquid chromatography (VARIANTTM; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Preparations to detect Hb H inclusions were processed by incubating an aliquot of whole blood for 1h at 37°C with 1% Brilliant Cresyl Blue in buffered saline (16).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples collected in EDTA using a commercial kit (Blood GenomicPrep Mini Spin, GE Healthcare, Amersham, UK). DNA concentration and quality were determined by NanoDrop – 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, DE, USA) at 260 and 280 nm. Multiplex gap-PCR was used to screen for the common deletions $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--^{\text{MED}}$, $--^{\text{SEA}}$, --FIL, and $-^{\text{THAI}}$ (14). Likewise, common non-deletional mutations were investigated by specific PCR in combination with restriction enzyme analysis (17). Direct nucleotide sequencing of the α -MRE was performed using primers described elsewhere (18) and an ABI 377 DNA Analysis System (ABI PRISMTM 377 DNA Automated Sequencer, Applied BioSystems, Foster City, CA, USA).

MLPA Reaction

A commercially available kit was used to screen for copy number variations involving the α -globin cluster on chromosome 16p13.3 (SALSA MLPA kit P140B2 HBA, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). First, twenty-six probes included in the commercial kit were used, spanning a 130 kb region of the α globin gene cluster from gene POLR3K (next to the tip of the short arm of chromosome 16) to the 3' of the α_1 globin gene. HS-40 and all the coding genes (ζ , α_2 and α_1) were targeted (Figure 2, represented as darker arrows). The probe mix included twelve reference probes targeting chromosomal sites other than those in the 16p13.3 region; these were used as internal controls to normalize the results in each sample. Eighteen additional synthetic probes described elsewhere (15) were then synthesized to enlarge and fine map deletions and duplications

distributed along an 800 kb genomic region from the POLR3K gene that can cause α thalassemias. These oligonucleotides, synthesized in a salt-free environment (25nmol scale), were from Invitrogen (Carlsbad, California, USA) and were used without further purification. The MLPA reactions using these probes were carried out in two steps (Figure 2, represented as dotted and narrow arrows.)

A 200-250 ng aliquot of DNA sample was used for each subject. Tests were performed with a standard thermocycler (Eppendorf - Hamburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Amplification products were separated by capillary electrophoresis on a MegaBACE TM sequencer (GE Healthcare Life Sciences – Uppsala, Sweden) and the results were analyzed with *Fragment Profiler*® (MegaBACE ^{TM -} GE Healthcare Life Science - Uppsala, Sweden). At least three normal control samples were run for every batch of patient samples. Deletions previously confirmed by gap-PCR ($-\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{20.5}$, -SEA, -MED, -FIL) were used as positive controls for MLPA of the α -globin gene cluster.

MLPA data analysis

Data from *Fragment Profiler* were exported to Microsoft Excel for analysis. The relative probe signals were determined by dividing the peak height of each amplification product by the total peak height of the reference probes in the probe mix. Each normalized peak was then divided by the average height of the normalized peaks for normal control subjects. The upper threshold for deletions was set at 0.7, and the lower threshold for duplications at 1.3. Normal values were defined as falling between 0.7 and 1.3. All samples were tested at least twice, and in some cases the same tests were carried out with samples from other members of the families.

Results

In most diagnostic laboratories, a subset of thalassemia phenotypes for which no molecular defect has been found by conventional techniques remains uncharacterized. However, thalassemia is still a possibility in these cases as they present with persisting hematological alterations such as hypochromia and microcytosis. We used MLPA to test DNA samples from eight patients whose hematological alterations could not be explained by conventional analysis of the globin genes.

Five cases with Hb H (P1 to P5) were found to have a combination of the α^0 deletion with the common $\alpha^{+3.7}$ deletion, and three other patients were simple α^0 heterozygote carriers (P6 to P8). Patient 1 (P1) showed a deletion limited to a region containing the upstream regulatory element HS-40 (probes 2 and 3). Hence, although the α -globin genes were intact, they were not expressed in this patient. Three individuals (P2, P7 and P8) showed the same type of deletion, in which the region from the telomere to the 5' of gene ζ encompassing probes 1 to 9H (P2 and P7) and 1 to 4 (P8) is absent. Large deletions involving the entire α globin gene locus, including the α -MRE, were found in four other cases (P3, P4, P5 and P6). These encompassed probes 1 to 22H, 1 to 30H (except 28H), 1 to 30H and 1 to 35H, respectively. A schematic overview of all the deletions is shown in Figure. 3.

In the family analyses, the MLPA assay revealed that the mother and brother of Patient 3 were homozygous and heterozygous, respectively, to the common $-\alpha^{3.7}$ deletion (probe $14\alpha_2$ to $13\alpha_1$), a result that is in agreement with the multiplex-PCR findings. Patients 7 and 8 had the same deletions as those detected in their parents (Figure 4).
Discussion

Alpha-thalassemias are caused by a wide variety of molecular alterations, ranging from small deletions and/or insertions to very large deletions. This diversity of alterations is associated with the presence of several homologous regions, such as the Alu family of repeats, subsegments X, Y and Z (between α -globin genes) and the motif GAGG, that are distributed along the α locus and facilitate homologous and non-homologous recombination events (19, 20). Our results illustrate this diversity. The deletions found in this study are probably different from each other, and the breakpoints are probably unique because the deletions are rare and the patients were unrelated. As the MLPA method has been adapted for high-resolution mapping of deletions, we were able to investigate cases whose molecular alterations could not be identified by conventional techniques (multiplex gap-PCR, specific PCR and DNA sequencing).

Four of our patients (P1, P2, P7 and P8) had deletions limited to a region containing the upstream regulatory element; hence, the α -globin genes, although intact, were not expressed. These deletions span a region of at least 0.4 kb in one case and from 95 kb to 100 kb in the others [positions 163464-163904, 97000-193847, 97000-202417 and 97000-202417 of the UCSC Genome Browser (21), February 2009, respectively]. Since the first description of a deletion of this type, which removes 62 kb including the HS-40 element (22), deletions involving this region have been described in more than 20 patients (10,15,23-31). The regulatory element α -MRE behaves as a classic enhancer: its main function in the normal chromosomal environment is to activate and enhance expression from the ζ -globin and α -globin promoters (32). Impairment of this element affects important ligation sites for

several transcriptional factors (GATA 1, NF-E2 and CACC box) and suppresses α -globin gene expression. Like the deletions that remove the α -globin genes, at least some of the α -MRE deletions seem to be the result of recombination events between partially homologous Alu repeats and subtelomeric rearrangements (2,20).

Four other patients (P3, P4, P5 and P6) had large deletions spanning genomic regions of at least 240 kb, 470 kb, 500 kb and 720 kb [positions 97000-334571, 97000-570532, 97000-602492 and 97000-816477 of the UCSC Genome Browser (21), February 2009, respectively] that affect the entire α -globin gene cluster and its upstream regulatory element. In these cases, the deletions affected a considerable number of genes and could result in other clinical implications (e.g., mental retardation), as observed in ATR-16 syndromes (33,34). However, no other abnormalities concomitant with α -thalassemia were reported in our patients.

Although the exact breakpoint positions and deletion lengths could not be determined at the time of the study, the deletions found in six patients (P1, P2, P3, P6, P7 and P8) are close in terms of size and genome position to previously described alterations (10,24,26,27,31). Two deletions, found in Patients 4 and 5, showed no resemblance to previously described deletions and are possibly novel. Unlike in other cases, the α^0 deletion found in Patient 4 may be the result of a breakage in the segment defined by probes 28H and 30H, followed by inversion and deletion of the same segment. The binding site of probe 28H appears to be preserved as we obtained a normal peak signal for this probe, whereas for the other probes located in cis (27H, 29H and 30H) there was a reduction in peak signal (Figure 3).

In the family analysis, MLPA assays for the mother and brother of Patient 3 revealed a $-\alpha^{3.7}$ deletion in a homozygous and heterozygous state, respectively. As a sample from the

159

patient's father was not available for analysis, it was not possible to conclude whether the α^0 deletion was inherited from the father or arose in the mother's germline. The same type of deletions found in Patients 7 and 8 were found in their respective fathers, confirming the paternal origin of these mutations (Figures 4 and 5).

This study is the first in Brazil to use the MLPA method to investigate the molecular basis of α -thalassemias. We identified different α^0 deletions in eight patients, demonstrating that MLPA is a suitable method for detecting unknown uncommon deletions and is particularly suited to characterizing cases that remain unsolved after standard diagnostic tests. The variety of rearrangements identified in the present study highlights the need to investigate all cases presenting with microcytosis and hypochromia but without iron deficiency and elevated Hb A₂ levels, since these hematological alterations are often interpreted as indicators of iron deficiency and may result in patients being mistreated with oral iron therapy.

References

- 1. Higgs DR, Vichers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. Blood. 1989; 73:1081-104.
- Voon HPJ, Vadolas J. Controlling α-globin expression and its impact on β-thalassemia. Haematologica. 2008; 93(12):1868-76.

- Tuffarelli C, Hardison R, Miller W, Hughes J, Clark K, Ventress N, et al. Comparative analysis of the α-like globin clusters in mouse, rat, and human chromosomes indicates a mechanism underlying breaks in conserved synteny. Genome Res. 2004; 14:623-30.
- 4. Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar S, Clark K, Anguita E, et al. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification and functional assessment of multispecies conserved sequences. USA: Proc Natl Acad Sci. 2005; 102:9830-35.
- 5. Sharpe JA, Summerhill RJ, Vyas P, Gourdon G, Higgs DR, Wood WG. Role of upstream DNase I hypersensitive sites in the regulation of human α globin gene expression. Blood. 1993; 82:1666-71.
- Higgs DR. α-thalassemia. In: Higgs DR, Weatherall, editors. The Haemoglobinopathies. London: W.B. Saunders; 1993. p. 117-50.
- Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes. Oxford: Ed. Backwell Science; 2001
- Wenning MRSC, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervásio S, Jorge SB, et al. α-Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2000; 33:1041-45.
- Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF e Sonati MF. High prevalence of α-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Braz J Med Biol Res. 2001; 34(6):759-62.
- Wenning MR, Harteveld CL, Giordano PC, Kimura EM, Saad ST, Costa FF, et al. Hemoglobin H disease resulting from the association of the –alpha3.7 rightward deletion and the (alpha alpha)MM deletion in a Brazilian patient. Eur J Haematol. 2002; 69 (3):179-81.

- 11. Cançado RD. Talassemias alfa. Rev Bras Hematol Hemoter. 2006; 28(2):81-7.
- 12. Bezerra MA, Araujo AS, Phylipsen M, Balak D, Kimura EM, Oliveira DM, et al. The deletion of SOX8 is not associated with ATR-16 in an HbH family from Brazil. Br J Haematol. 2008; 142(2):324-6.
- 13. Sonati MF, Farah SB, Costa FF. High prevalence of alpha thalassemia in a black population of Brazil. Hemoglobin. 1991; 15:309-11.
- Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of {alpha}-thalassemia. Clin Chem. 2000; 46(10): 1692-5.
- 15. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing α and β thalassaemia characterized by high resolution multiplex ligation dependent probe amplification. J Med Genet. 2005; 42:922-31.
- Dacie JV, Lewis SM. Practical Haematology. 8 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone;
 1995.
- 17. Kattamis AC, Carnaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P. Human α-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. Am J Hematol. 1996; 53: 81-91.
- Harteveld CL, Muglia M, Passarino G, Kielman MF, Bernini LF. Genetic polymorphism of the major regulatory element HS-40 upstream of the human alpha globin gene cluster. 2002; 119(3): 848-54.
- Higgs DR, Hill AVS, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. Independent recombination events between duplicated human α-globin genes: Implications for their concerted evolution. Nucl Acids Res. 1984; 12:6965-77.

- 20. Higgs DR, Weatherall DJ. Alpha thalassemias. Cell Mol Life Sci. 2009; 66:1154-62.
- 21. UCSC Genome Browser. http://genome.ucsc.edu/. Acessed June 26, 2010.
- 22. Hatton C, Wilkie AOM, Drysdale HC, Wood WG, Vickers MA, Sharpe J, et al. Alpha thalassemia caused by a large (62kb) deletion upstream of the human α globin gene cluster. Blood. 1990; 76:221-7.
- 23. Liebhaber SA, Griese EU, Weiss I, Cash FE, Ayyub H, Higgs DR, et al. Inactivation of human α-globin gene expression by a *de novo* deletion located upstream of the α-globin gene cluster. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(23): 9431-5.
- 24. Wilkie AOM, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR A truncated human chromosome 16 associated with a thalassemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)n. Nature, 1990; 346:868-71.
- 25. Romao L, Osorio-Almeida L, Higgs DR, Lavinha J, Liebhaber SA. Alpha thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha globin structural genes. Blood. 1990; 78:1589-95.
- 26. Romao L, Cash F, Weiss I, Liebhaber S, Pirastu M, Galanello R, et al. Human a-globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the 4-globin gene. Hum Genet.1992; 89:323-28.
- 27. Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanello R, et al. Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. Am J Human Genet. 1994; 55: 505-12.
- 28. Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dodé C, Vignes B, Horsley SW, et al. Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related *Alu* elements. Hum. Mol. Genet. 1996; 5:1163-9. W

- 29. Viprakasit V, Kidd AM, Ayyub H, Horsley S, Hughes J, Higgs DR. *De novo* deletion within the telomeric region flanking the human alpha globin locus as a cause of α thalassaemia. Br. J. Haematol. 2003; 120:867-75.
- 30. Viprakasit V, Harteveld CL, Ayyub H, Stanley JS, Giordano PC, Wood WG, et al. A novel deletion causing alpha thalassemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element. Blood. 2006; 107(9): 3811-2.
- 31. Phylipsen M, Prior JF, Lim E, Lingam N, Vogelaar IP, Giordano PC, et al. Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Blood Cells Mol Dis. 2010; 44(3): 146-51.
- 32. Zhang Q, Reddy PM, Yu CY, Bastiani C, Higgs DR, Stamatoyannopoulos G. et al. Transcriptional activation of human ζ2 globin promoter by the α globin regulatory element (HS-40): functional role of specific nuclear factor-DNA complexes. Mol. Cell. Biol. 1993; 13:2298-2308.
- 33. Daniels RJ, Peden JF, Lloyd C, Horsley SW, Clark K, Tufarelli C, et al. Sequence, structure and pathology of the 131 fully annotated terminal 2Mb of the short arm of human chromosome 16. Human Molecular Genetics. 2001; 10:339-52.
- 34. Horsley SW, Daniels RJ, Anguita E, Raynhan HA, Peden JF, Villegas A, et al. Monosomy of the most telomeric, gene-rich regions of the short arm of human chromosome 16 causes minimal phenotypic effects. Eur J Hum Genet. 2001; 9:217-

25.

Cases	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Age/Gen.	16/F	14/M	26/F	14/F	30/M	23/F	4m/F	3/M
RBC	5.02	186	1 66	5.03	5.07	5.64	5 25	6.00
(10 ⁶ /mm3)	5.02	4.00	4.00	5.05	5.91	5.04	5.55	0.09
Hb (g/L)	9.4	9.2	7.7	9	10.8	11.5	10.3	11.3
MCV (fl)	62	66.5	68.2	66.2	69,7	61.7	60.4	58.3
MCH (pg)	18.6	18.6	16.5	17.9	18.1	20.4	19.3	18.6
RDW	16.8	22.5	34.6	24.4	24.7	14.5	14.3	14.9
HbF (%)	1	0.6	0.8	1.7	0.2	0.3	-	0.1
Hb A ₂ (%)	1.3	1.2	1.5	1.6	1.5	2.6	-	3
Hb H (%)	4.5	13.4	9.5	24.4	10	-	-	-
Lib Drofilo	A2,A,	A2,A,	A2,A,		А2,А,Н	A2,A	Bart's	A2,A
110 I I Offic	H+Bart's	H+Bart's	H+Bart's	A2,A,II				
Molecular	$-\alpha^{3.7}$ Hetero	-α ^{3.7} Hetero	-α ^{3.7} Homo	-α ^{3.7} Homo	-α ^{3.7} Homo	Normal	Normal	Normal
Analysis*								
Sequencing	Hapl A	Hanl D	Hapl A	Hanl D	Hapl D	Hapl D	Hapl A	Hapl A
of a-MRE	паріля	Парі.D	11api.A	парі.D	Hapi.D	парі.	парі.А	парі.А

Table 1. Demographic, hematological and molecular data for the patients.

P: Patient; Gen: gender, m: months; RBC: red blood cells; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; RDW: Red Cell Distribution Width; (*): by *Multiplex* gap-PCR or/and specific PCR; Homo: homozygous; Hetero: heterozygous; Hapl: haplotype.

Cases	MP3	BP3	FP7	MP8	FP8	
Age/Gen.	44/F	24/M	29/M	27/M	30/M	
RBC (10 ⁶ /mm3)	5.05	5.38	6.15	4.55	6.37	
Hb (g/L)	11.3	14.5	13.3	13.3	13.9	
MCV (fl)	80.4	89.2	67.6	89.5	67.8	
MCH (pg)	22.4	27	21.6	29.2	21.8	
RDW	16.3	14.4	16.8	13.3	14.9	
HbF (%)	0.2	-	0.8	0.4	0.1	
Hb A ₂ (%)	2.7	-	3.1	3.4	3	
Hb H (%)	-	-	-	-	-	
Hb Profile	A2,A	A2,A	A2, A	A2, A	A2, A	
Molecular	a ^{3.7} Homo	a ^{3.7} Hetero	Normal	Normal	Normal	
Analysis*	-a nomo -a netero		inormal	mormal	nomilai	

Table 2. Demographic, hematological and molecular data for patients' families.

MP: patient's mother; BP: patient's brother; FP: patient's father; Gen: gender, RBC: red blood cells; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean; corpuscular hemoglobin; RDW: Red Cell Distribution Width; * by *Multiplex* gap-PCR or/and specific PCR; Homo: homozygous; Hetero: heterozygous; Hapl: haplotype.



Figure 1. Schematic representation of the α -globin locus. The four conserved DnaseI hypersensitive sites (HS-48, HS-40, HS-33 and HS-10) known to bind erythroid transcription factors are located between 10 and 50 kb upstream of the start of the ζ -globin gene. The coding genes (ζ , α_2 , α_1), the genes with unknown function (μ and θ_1) and the pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$, $\psi\rho$) of the α -globin cluster are arranged in a 5' to 3' direction on chromosome 16 (16p13.3). (Adapted from Ref. 2)



Figure 2. Schematic representation of the short arm of chromosome 16 (16p13.3), showing a 800kb region containing the α MRE (HS-40) and the α -globin gene cluster. The oval shape denotes the telomeric repeat region and the vertical arrows show the locations of the probe pairs; the different types of arrows correspond to each group of probes: darker arrows represent probes included in the kit, and dotted and narrow arrows correspond to synthetic probes (Adapted from Ref. 15).



Figure 3. Schematic representation of the short arm of chromosome 16 (16p13.3), showing an 800kb region containing the α -globin gene cluster and HS-40. The oval shape denotes the telomeric repeat region, and the solid boxes the genes throughout the regions. The vertical arrows show the locations of the probe pairs; the different types of arrows correspond to each group of probes: darker arrows represent probes included in the kit and dotted and narrow arrows correspond to synthetic probes. The bars below the figure indicate deletions found by MLPA in eight patients (P); the vertical lines mark the first and last probe deleted. The open boxes mark the region where deletion breakpoints are expected to be located (Adapted from Ref. 15).



Figure 4. Schematic representation of the short arm of chromosome 16 (16p13.3), showing a 230kb region containing the α -globin gene cluster and HS-40. The oval shape denotes the telomeric repeat region, and the solid boxes the genes throughout the regions. The vertical arrows show the locations of the probe pairs: the narrow arrows correspond to probes included in the kit, and the dotted arrow corresponds to synthetic probe 9H. Probes 13 and 16 included in the kit bind either gene α_2 and α_1 . The bars below the figure indicate deletions found by MLPA in patients' families; the vertical lines mark the first and last probe deleted. The open boxes mark the region where deletion breakpoints are expected to be located (Adapted from Ref. 15).



Figure 5. Pedigrees of the three families. A) The propositus (P3) had Hb H disease (α^0 and $-\alpha^{3.7}$ deletions), while her mother and brother were homozygous and heterozygous for the $-\alpha^{3.7}$ deletion, respectively. A sample from the father was not available. B) The propositus (P7) and her father were heterozygous for an α^0 deletion. A sample from the mother was not available. C) The propositus (P8) and his father were heterozygous for an α^0 deletion, while his mother was normal.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

(\$) www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.htm]

CEP, 18/12/07. (Grupo III)

PARECER CEP: Nº 918/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) CAAE: 0667.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA DELECIONAL POR MLPA (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)". PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cintia Natsumi Suemasu INSTITUIÇÃO: Departamento de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/12/2007 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/12/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto é comparar esta nova abordagem metadológica com aquela atualmente empregada em nosso laboratório, em relação ao poder diagnóstico da técnica, sua reprodutibilidade, facilidade de execução, tempo e viabilidade econômica. Não há ainda, de nosso conhecimento, nenhum laboratório no Brasil que utilize este novo método para avaliação dos genes das globinas humanas.

III - SUMÁRIO

A talassemia alfa (a-tal) constitui um grupo de doenças hereditárias, de distribuição mundial, causada pela dficiência das cadeias a da hemoglobina. Os genes responsáveis pela produção dessas cadeias estão localizados no cromossomo 16 (16p13.3), são duplicados (a2 c a1) (genótipo normal = aa/aa), e codificam cadeias a idênticas. Mecanismos genéticos variados podem ocasionar a redução ou a ausência da expressão desses genes, mas as deleções são as causas mais comuns da doença, afetando um ou ambos os genes do genoma haplóide e resultando nas talassemias a+ e ao, respectivamente. Nos últimos anos, várias técnicas foram desenvolvidas para identificar as delecões envolvendo o cluster dos genes a no cromossomo 16. A gap-PCR, o Southern blot e o FISH são comumente aplicados com esta finalidade; entretanto. muitas deleções ainda não são detectadas utilizando-se essas estratégias metadológicas. Em 2005, a técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), recentemente desenvolvida, foi adequada ao diagnóstico de deleções envolvendo os genes da globina a e seu principal elemento regulatório, o HS-40. O objetivo do presente projeto é comparar esta nova abordagem com a forma de diagnóstico atualmente empregada em nosso laboratório, uma multiplex gap-PCR, seguida de confirmação por uma gap-PCR especificamente desenhada para a deleção detectada. Amostras de DNA previamente investigadas e armazenadas serão submetidas à técnica de MLPA, que consiste da desnaturação do DNA genômico, seguida da hibridização de sondas complementares à região em análise e da amplificação dos produtos por PCR, com posterior separação dos mesmos por eletroforese capilar em sequenciador automático

173NE (010) 2631 90?/

Comité de Ética em Pesquisa - UNICAMP

(\$) www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

de DNA. A análise qualitativa e quantitativa desses produtos permite avaliar se há alteração no número de cópias (deleção ou duplicações) do cluster alfa nas amostras em estudo. Ao final, uma avaliação do poder diagnóstico da técnica de sua reprodutibilidade, facilidade de execução, tempo e custos será efetuada em relação à multiplex gap-PCR.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto importante para aplicação de nova técnica laboratorial para detecção de variáveis talassêmicas, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode ser dispensado, uma vez que vai se utilizar amostras já guardadas. Portanto, não há do ponto de vista ético nenhum óbice à sua realização.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, assim como todos os anexos incluidos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na integra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Comité de Ética em Pesquisa - UNICAMP

FACULDADE DE CIÉNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

3 www.fem.unicamp br pesquisa ettea/index.html

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. Carmen Stivia Bertuzzo PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP

ANEXO 3. Kits de MLPA empregados nas reações.

Kit de MLPA HBA140B.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position
64-70-76-82*	DQ-control fragments	
92	Synthetic Control probe	2q14
130	Control probe 0797-L0463	5q31
		Signal only on samples containing the
136**	HBA region, probe S0290-L9493	Constant Spring mutation !
142 †	HBA region, probe 4630-L4011	HBA1 +HBA2 exon 1
148**	Control probe 3707-L3161	9q22
154**	HBA region, probe 8499-L8423	0.2 kb downstream HBA1
160**	HBA region, probe 8498-L8422	HBA2 intron 2
166†	HBA region, probe 4632-L6292	HBA1+HBA2 exon 3
172	Control probe 2020-L1539	15q11
178	HS-40, probe 4799-L4797	HS-40
184	HBA region, probe 4637-L4018	Between HBA2P and HBA1P
190	HBA region, probe 4626-L4740	Between HBA2 and HBA1
196**	HBA region, probe 8491-L8414	End of HBA2 exon 3
201	HBA region, probe 4627-L4007	Between HBA1P and HBA2
208	Control probe 2813-L2242	17q21
214**	HBA region, probe 8492-L8415	Between HBA1P and HBA2
220**	HBA region, probe 8493-L8416	Between HBA2 and HBA1
229	HBA region, probe 4628-L4008	Between HBA1P and HBA2
236	POLR3K probe 4913-L1316	16p13, 60 Kb telomeric of HS40
240	HBA region, probe 4633-L6249	HBA2 intron 2
247	Control probe 2869-L2336	1p21
256**	HBA region, probe 8494-L8417	Between HBA2 and HBA1
265**	Control probe 3075-L2475	5p15
274	Control probe 1542-L0985	5q22
283	HBA region, probe 4638-L4019	0.5 kb downstream HBA1
292	HBA region, probe 4624-L4004	Between HBZ and HBZP
301	Control probe 3255-L2692	11p13
310	HBA region, probe 4639-L4020	2.4 kb downstream HBA1
318	HBA region, probe 4625-L4005	Between HBZ and HBZP
325	Control probe 3085-L4948	16p13, 2.6 Mb centromeric of HBA1
339**	HBA region, probe 8497-L8420	Between HBA2 and HBA1
346	HBA region, probe 4622-L4001	3.5 kb upstream HBZ
355	Control probe 0547-L0116	11g22
364	HBA region, probe 4926-L4017	9.3 kb upstream HBZ
373**	HBA region, probe 8488-L8410	Between HBA1P and HBA2
382	HS-40, probe 4800-L4175	HS-40
391**	Control probe 1701-L1469	5q22
402**	HBA region, probe 6707-L6294	3.7 kb downstream HBA1
409	Control probe 3272-L2709	3q29

Kit de MLPA HBA 140-B2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 OR 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chrome	osome		
130	Reference probe 0797-L00463	5q31		
136	HBA region, probe S0290-L09493	Signal only on samples containing the Constant Spring mutation !		
142 †	HBA region, probe 4630-L04011	HBA1 +HBA2 exon 1		
148	Reference probe 3707-L03161	9q22		
154	HBA region, probe 8499-L08423	0.2 kb downstream HBA1		
160 ±	HBA region, probe 8498-L08422	HBA2 intron 2		
166 †	HBA region, probe 4632-L06292	HBA1+HBA2 exon 3		
172	Reference probe 2020-L01539	15q11		
178	HS-40, probe 4799-L04797	HS-40		
184	HBA region, probe 4637-L04018	Between HBA2P and HBA1P		
190	HBA region, probe 4626-L04740	Between HBA2 and HBA1		
196	HBA region, probe 8491-L08414	End of HBA2 exon 3		
201	HBA region, probe 4627-L04007	Between HBA1P and HBA2		
208	Reference probe 2813-L02242	17q21		
214	HBA region, probe 8492-L08415	Between HBA1P and HBA2		
220 ¥	HBA region, probe 8493-L08416	Between HBA2 and HBA1		
229	HBA region, probe 4628-L04008	Between HBA1P and HBA2		
236	POLR3K probe 4913-L01316	16p13, 60 Kb telomeric of HS40		
240	HBA region, probe 4633-L06249	HBA2 intron 2		
247	Reference probe 2869-L02336	1p21		
256	HBA region, probe 8494-L08417	Between HBA2 and HBA1		
265	Reference probe 3075-L02475	5p15		
274	Reference probe 1542-L00985	5q22		
283	HBA region, probe 4638-L04019	0.5 kb downstream HBA1		
292	HBA region, probe 4624-L04004	Between HBZ and HBZP		
301	Reference probe 3255-L02692	11p13		
310	HBA region, probe 4639-L04020	2.4 kb downstream HBA1		
318	HBA region, probe 4625-L04005	Between HBZ and HBZP		
325	Reference probe 3085-L04948	16p13, 2.6 Mb centromeric of HBA1		
339 *	HBA region, probe 8497-L08420	Between HBA2 and HBA1		
346	HBA region, probe 4622-L04001	3.5 kb upstream HBZ		
355	Reference probe 054/-L00116	11q22		
364	HBA region, probe 4926-L04017	9.3 kb upstream HBZ		
373	HBA region, probe 8488-L08410	Between HBA1P and HBA2		
382	HS-40, probe 4800-L04175	HS-40		
391	Reference probe 1701-L01469	5q22		
402	HBA region, probe 6707-L06294	3.7 kb downstream HBA1		
409	Reference probe 3272-L02709	3q29		

ANEXO 4. Cromatogramas das reações de MLPA para a validação da técnica.



A) Cromatogramas de reação para indivíduo normal (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE ^{TM-} *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



B) Cromatogramas de reação para indivíduo com a deleção $-\alpha^{3.7}$ (P), em heterozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE ^{TM -} *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



C) Cromatogramas de reação para indivíduo com a deleção $-\alpha^{3.7}$ (P), em homozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



D) Cromatogramas de reação para indivíduo com a triplicação de alfa (ααα^{anti3.7}) (P), em heterozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE ^{TM-} *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



E) Cromatogramas de reação para indivíduo com a deleção $-\alpha^{20.5}(P)$, em heterozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



F) Cromatogramas de reação para indivíduo com a deleção ^{--MED} (P), em heterozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



G) Cromatogramas de reação para indivíduo com a deleção ^{--SEA} (P), em heterozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



H) Cromatogramas de reação para indivíduo com a deleção ^{--FIL} (P), em heterozigose, em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



I) Cromatogramas de reação para indivíduo a associação entre -α^{3,7} e -^{SEA} (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).



J) Cromatogramas de reação para indivíduo com a mutação Hph (P) em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences,USA*).

ANEXO 5. Cromatogramas das reações de MLPA, empregando as sondas do kit.



A) Cromatogramas de reação para paciente 1, com doença da Hb H (associação entre deleção do HS-40 e a -α^{3,7}) (P), em comparação à reação controle em alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



B) Cromatogramas de reação para paciente 2, com doença da Hb H (associação entre deleção do HS-40 e a -α^{3,7}) (P), em comparação à reação controle em alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



C) Cromatogramas de reação para paciente 3, com doença da Hb H (associação entre uma deleção extensa e a $-\alpha^{3,7}$) (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*). Os mesmos resultados foram observados para os pacientes 4 e 5.



D) Cromatogramas de reação para paciente 4, com doença da Hb H (associação entre uma deleção extensa e a -α^{3,7}) (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



E) Cromatogramas de reação para paciente 5, com doença da Hb H (associação entre uma deleção extensa e a -α^{3.7}) (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



F) Cromatogramas de reação para paciente 6, que apresenta uma deleção extensa do *cluster* α e do α MRE (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



G) Cromatogramas de reação para paciente 7, que apresenta uma deleção do HS-40 (P), em comparação à reação controlesem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* [®] (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).


H) Cromatogramas de reação para paciente 8, que apresenta uma deleção do HS-40 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



I) Cromatogramas de reação para paciente 9, que apresenta uma quadruplicação do *cluster* α e do HS-40 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



J)Cromatogramas de reação para mãe do paciente 3 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



K) Cromatogramas de reação para o irmão do paciente 3 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



L) Cromatogramas de reação para o pai do paciente 7 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



M) Cromatogramas de reação para o pai do paciente 8 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).

ANEXO 6. Cromatogramas das reações de MLPA, empregando as sondas sintéticas parte I.



A) Cromatogramas de reação para paciente 1 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



B) Cromatogramas de reação para paciente 2 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



C) Cromatogramas de reação para paciente 3 (P), em comparação a reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences*).



D) Cromatogramas de reação para paciente 4 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



E) Cromatogramas de reação para paciente 5 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



F) Cromatogramas de reação para paciente 6 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



G) Cromatogramas de reação para paciente 7 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte I, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACETM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*.

ANEXO 7. Cromatogramas das reações de MLPA, empregando as sondas sintéticas parte II.



A) Cromatogramas de reação para paciente 1 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte II, *mix* 6, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



B) Cromatogramas de reação para paciente 3 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte II, *mix* 2, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



C) Cromatogramas de reação para paciente 3 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte II, *mix* 3, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



D) Cromatogramas de reação para paciente 4 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte II, *mix* 4, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



E) Cromatogramas de reação para paciente 5 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte II, *mix* 4, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).



F) Cromatogramas de reação para paciente 6 (P), em comparação à reação controle sem alteração (C) para o kit SALSA MLPA P140B2, empregando sondas parte II, *mix* 5, segundo o programa *Fragment Profiler* ® (MegaBACE TM - *GE Healthcare Life Sciences, USA*).