



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

NATÁLIA DE OLIVEIRA MOTA

CARACTERIZAÇÃO DE DELEÇÕES ALFA-TALASSÊMICAS NOVAS OU RARAS EM
11 PACIENTES NÃO RELACIONADOS

*CHARACTERIZATION OF NOVEL OR RARE ALPHA THALASSEMIA DELETIONS IN 11
UNRELATED PATIENTS*

CAMPINAS

2016

NATÁLIA DE OLIVEIRA MOTA

CARACTERIZAÇÃO DE DELEÇÕES ALFA-TALASSÊMICAS NOVAS OU RARAS EM
11 PACIENTES NÃO RELACIONADOS

*CHARACTERIZATION OF NOVEL OR RARE ALPHA THALASSEMIA DELETIONS IN 11
UNRELATED PATIENTS*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestra em Ciências Médicas, na área de concentração em Ciências Biomédicas.

Master dissertation submitted to the State University of Campinas School of Medical Sciences as part of the requirements for obtaining the title of master degree in Medical Sciences, Biomedical Sciences area.

ORIENTADOR: PROF^a. DRA. MARIA DE FATIMA SONATI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA NATÁLIA DE OLIVEIRA MOTA, E ORIENTADA PELA
PROF^a. DRA. MARIA DE FATIMA SONATI

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01P4353-2015 ; CNPq, 470579/2013-7; FAPESP, 2014/00984-3

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

M856c Mota, Natália de Oliveira, 1989-
Caracterização de deleções alfa-talassêmicas novas ou raras em 11 pacientes não-relacionados / Natália de Oliveira Mota. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Maria de Fatima Sonati.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Talassemia alfa. 2. Anemia hemolítica. 3. Hibridização genômica comparativa. I. Sonati, Maria de Fatima, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of novel or rare alpha thalassemia deletions in 11 unrelated patients

Palavras-chave em inglês:

Alpha-thalassemia

Anemia, Hemolytic

Comparative genomic hybridization

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Maria de Fatima Sonati [Orientador]

Maricilda Palandi de Mello

Elvira Maria Guerra Shinohara

Data de defesa: 27-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

[NATÁLIA DE OLIVEIRA MOTA]

ORIENTADOR: MARIA DE FATIMA SONATI

MEMBROS:

- 1. PROF(A). DR(A). MARIA DE FATIMA SONATI**
 - 2. PROF(A). DR(A). MARICILDA PALANDI DE MELLO**
 - 3. PROF(A). DR(A). ELVIRA MARIA GUERRA SHINOHARA**
-

Programa de Pós-Graduação em [PROGRAMA] da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 27/01/2016

DEDICATÓRIA

À minha mãe Ana Maria, aos meus avós Juraci
e Luiz Carlos e ao meu noivo Leonardo por todo
amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho, me dado forças, oportunidades e colocado pessoas maravilhosas no meu caminho.

À minha mãe, Ana Maria, por todo amor, carinho e encorajamento durante todo esse período.

À minha família, especialmente aos meus avós, Juraci e Luiz Carlos, pelo exemplo de vida e de família e às minhas irmãs Luiza e Mariana.

Ao meu noivo Leonardo por todo amor, compreensão, paciência e companheirismo.

À minha orientadora, Dra. Fatima Sonati, por toda a dedicação, paciência e à chance de realizar esse trabalho. Por ter me proporcionado valiosos ensinamentos e ter me propiciado diversas oportunidades. Muito obrigada.

Aos estimados amigos do laboratório Dani, Tânia e Magnun por todos os momentos de convivência alegre, pelas conversas, conselhos e por toda a ajuda, apoio e paciência. Sem vocês esse mestrado não seria o mesmo.

Às minhas queridas amigas de infância Camila, Natália e Nicolle que mesmo longe passaram por todos os momentos comigo, me ajudando, estimulando, ouvindo, rindo e chorando.

À queridíssima Elzinha, por todos os ensinamentos e todos os momentos de descontração e amizade.

Aos queridos colegas e amigos do laboratório de hemoglobinopatias e do hemocentro Dul, Carol, Denise, Gisele, Susan, Toninho, Bruna, Robertinha e outros que passaram pelo meu caminho durante esses anos e que, de alguma ou de muitas formas, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus colegas do laboratório vizinho Bruna, Isa, Gra, Val, Daiane, Ju e Moisés pela convivência, conversas e bolos.

Ao Daniel Rincon, da Citogem, que me forneceu assessoria científica diversas vezes.

Às agências de fomento Fapesp, CNPq e Capes pelo suporte financeiro.

RESUMO

As talassemias são as hemoglobinopatias hereditárias mais comuns em todo o mundo, caracterizadas pela síntese reduzida/ausente das cadeias globínicas. A talassemia alfa resulta da deficiência de síntese de globinas alfa, sendo as deleções parciais/totais dos genes que as codificam (α_2 e α_1), localizados em 16p13.3, suas causas mais comuns. Nos últimos anos, várias técnicas e métodos têm sido empregados para identificar essas deleções, mas muitos dos casos ainda permanecem sem caracterização. O método de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) tem se mostrado uma ferramenta importante na identificação de deleções e na delimitação de suas extensões, já que visa a quantificação relativa (número de cópias) de várias regiões genômicas em um único experimento. No entanto, a região de *breakpoint* das deleções permanece não caracterizada. O *Fine-tiling array* é um aCGH (*array Comparative Genomic Hybridization*) de alta resolução, customizado com sondas que englobam 2 Mb de DNA a partir da região telomérica do braço curto do cromossomo 16, incluindo o *cluster* α . O presente estudo teve por objetivo caracterizar as deleções alfa-talassêmicas presentes em 11 pacientes (10 famílias), não relacionados, 10 deles brasileiros e um proveniente do Uruguai, cujos genótipos não puderam ser completamente determinados somente pela utilização do *Multiplex-gap-PCR*, empregando os métodos de MLPA e *Fine-tiling array*. Dos oito pacientes analisados apenas pelo MLPA, cinco possuem a Doença da Hb H, ocasionada pela associação da deleção $-\alpha^{3,7}$ com deleções α^0 que comprometem cerca de 15 até 225 kb de DNA; e três casos de heterozigose da talassemia α^0 (uma deleção envolvendo o elemento regulatório HS-40, uma deleção de cerca de 15 kb de DNA e a deleção $-(\alpha)^{5,2}$). Através do *Fine-tiling array*, foram identificadas três deleções com tamanhos aproximados de 470 kb, 560 kb e 774 kb, com fragmentos de *breakpoint* de 3625 pb e 250 pb, sendo os dois primeiros pacientes com Doença da Hb H e o último apresentando heterozigose da talassemia α^0 . As deleções aqui detectadas são novas ou muito raras e enfatizam a diversidade de alterações que afetam os genes de globinas. Além disso, nossos resultados ressaltam a importância da investigação de todos aqueles casos que apresentam alterações hematológicas compatíveis com a presença de talassemia, muitas vezes interpretadas como deficiência de ferro e equivocadamente tratadas. Eles destacam ainda a aplicabilidade dos métodos MLPA e aCGH na identificação e caracterização das talassemias α , permitindo solucionar casos até então sem conclusão. A exata determinação dos *breakpoints* dessas deleções poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos de recombinação gênica que atuam no processo evolutivo desses genes e maior ampliação do conhecimento sobre as funções de genes e elementos contíguos aos genes de globinas.

PALAVRAS CHAVE: Anemias Hemolíticas, Talassemia Alfa, Doença da Hb H, Hibridização Genômica Comparativa (aCGH).

ABSTRACT

The thalassemias are an inherited hemoglobin disorders that comprehend the most common human genetic disorder worldwide, characterized by reduced or absence of globin chains. Alpha thalassemia is the result of deficient alpha globin synthesis, which is mostly caused by partial/total deletion of alpha globin genes (α_2 and α_1), located at 16p13.3. In recent years, several techniques and methods have been employed to identify these deletions, but in many cases they still remain without characterization. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) has been an important tool for identifying deletions and delimiting of its extensions, through relative quantification (copy number) of several genomic regions in a single experiment. However, the breakpoint region of the deletions remains uncharacterized. Fine-tiling array CGH (Comparative Genomic Hybridization) is a high resolution technique, customized with probes spanning 2 Mb of DNA from the telomeric region of the short arm of chromosome 16, including α cluster. The aim of this study was characterize the alpha-thalassemia deletions present in 11 patients (10 families), unrelated, 10 of them Brazilian and one from Uruguay, whose genotypes could not be completely determined only by the use of Multiplex-gap-PCR, using the methods of MLPA and Fine-tiling array. Eight patients were analyzed only by MLPA; five out of them had Hb H disease caused by $-\alpha^{3.7}$ deletion associated with α^0 deletions (around 15 to 225 kb of DNA), and three were heterozygotes for α^0 thalassemia (with deletions involving: the regulatory element (HS-40); a deletion of approximately 15 kb and the $-(\alpha)^{5.2}$ deletion). Through Fine-tiling array, three deletions were identified with distinct sizes, approximately 470 kb, 560 kb and 774 kb, with breakpoint fragments of 3625 bp and 250 bp, respectively. Of these, the first two patients had Hb H disease, and the third was heterozygous for α^0 thalassemia. The deletions detected here are novel or very rare and emphasize the diversity of alterations that may affect the globin genes. Furthermore, our results highlight the importance of the investigation of those cases with hematological changes that are consistent with the presence of thalassemia, often interpreted as iron deficiency and consequently mistakenly treated. They also highlight the applicability of the MLPA and aCGH methods in the identification and characterization of α thalassemia, allowing to resolve cases so far inconclusive. The exact determination of the breakpoints of these deletions may contribute to a better understanding of the different genetic recombination mechanisms that operate in the evolutionary process of these genes and expands the knowledge on the functions of genes and contiguous elements to the globin genes.

KEYWORDS: Hemolytic anemias, Alpha thalassemia, Hb H disease, array Comparative Genomic Hybridization (aCGH).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PÁG.
Figura 1 - Representação esquemática da molécula de Hb humana.....	15
Figura 2 - Ontogenia das cadeias globínicas.....	16
Figura 3 - Representação esquemática dos <i>clusters</i> α e β e seus respectivos elementos regulatórios.....	17
Figura 4 - Distribuição mundial da talassemia α	20
Figura 5- Representação esquemática do desalinhamento dos cromossomos homólogos na formação das deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$, respectivamente, assim como dos alelos $\alpha\alpha^{\text{anti3,7}}$ e $\alpha\alpha^{\text{anti4,2}}$	22
Figura 6 - Esquema representando as sete deleções mais comuns responsáveis pela talassemia α	23
Figura 7 - Representação esquemática das sondas comerciais de MLPA.....	30
Figura 8 - Representação esquemática das etapas adotadas no MLPA.....	31
Figura 9 - Programa “MLPA” utilizado no termociclador.....	32
Figura 10 - Representação esquemática da técnica de aCGH.....	34
Figura 11 - A. Formato do <i>array</i> utilizado. B. Representação esquemática da cobertura das sondas.....	35
Figura 12 - Imagem obtida após o escaneamento da lâmina de aCGH.....	37
Figura 13 - Resultado do MLPA do P9 identificado por Suemasu, <i>et al.</i> , 2011.....	72
Figura 14 - Resultado do <i>Fine-tiling array</i> para o Paciente 9.....	73
Figura 15 - Resultado do MLPA do P10 identificado por Suemasu, <i>et al.</i> , 2011.....	73
Figura 16 - Resultado do <i>Fine-tiling array</i> para o Paciente 10.....	74
Figura 17 - Resultado do MLPA do P11 identificado por Suemasu, <i>et al.</i> , 2011.....	74
Figura 18 - Resultado do <i>Fine-tiling array</i> para o Paciente 11.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MRE: *Alpha Major Regulatory Element*

°C: Graus Celsius

μ l: Microlitros

aCGH: *array-Comparative Genome Hybridization*

ATR-16 syndrome - *Alpha thalassemia retardation associated with chromosome 16*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CNV: Variação no número de cópias do DNA

Cy3: Cianina 3

Cy5: Cianina 5

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: Desorribonucleotídeo trifosfatado

--^{FIL}: Deleção de cerca de 30 kb

Fl: Fentolitro

g/dL: Gramas por decilitro

g: Força G

GV: Glóbulos vermelhos

H₂O: Água

Hb F: Hemoglobina Fetal

Hb: Hemoglobina

Hbpatias: Hemoglobinopatias

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance

HS: Sítio Hipersensível à DNase

HTC: Hematócrito

Kb: Mil pares de base - quilobases

kDa: Kilodaltons - peso molecular

kV: quilovolt

LCR: Região de controle de locus

LPO - *Left Probe Oligonucleotide*

Mb: Mil quilobases – megabases

--^{MED}: Deleção de cerca de 18 kb

Min.: minuto (s)

mL: mililitro

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

mM: Milimolar – unidade de medida

ng: Nanogramas

Nt: Nucleotídeos

O₂: Oxigênio

OR: Receptores Olfatórios

Pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia de Polimerase

Pg: Picograma

PHHF: Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal

RDW: *Red cell distribution width*

RNAm: RNA mensageiro

RPO - *Right Probe Oligonucleotide*

--^{SEA}: Deleção de cerca 20 kb

TE: Solução composta por Tris e EDTA

--^{THAI}: Deleção de cerca de 38 kb

U: Unidades

VCM: Volume Corpuscular Médio

LISTA DE SÍMBOLOS

α : Gene alfa

β : Gene beta

μ : Gene mu ou α^D

γ : Gene gama

δ : Gene delta

ε : Gene embrionário épsilon

ζ : Gene embrionário zeta

θ : Gene theta

Ψ : Pseudogene

α^+ : Remoção de um gene alfa, em um alelo

α^0 : Remoção de dois genes alfa, em um alelo

α^T : Mutação de ponto, pequenas deleções ou inserções em um alelo

$-\alpha^{2,7}$: Deleção de cerca de 2,7 kb

$-(\alpha)^{20,5}$: Deleção de cerca de 20,5 kb

$-\alpha^{4,2}$: Deleção de cerca de 4,2 kb

$-(\alpha)^{5,2}$: Deleção de cerca de 5,2 kb

$\alpha(\alpha^{5,3})$: Deleção de cerca de 5,3 kb

α_1 : Gene alfa 1

α_2 : Gene alfa 2

$-\alpha^{3,5}$: Deleção de cerca de 3,5 kb

$-\alpha^{3,7}$: Deleção de cerca de 3,7 kb

$\alpha\alpha\alpha^{\text{antia}3,7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{antia}4,2}$: Triplicação do gene alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Hemoglobina: Estrutura e Função.....	15
1.2 Regulação da Expressão dos Genes de Globina.....	16
1.3 Hemoglobinopatias.....	18
1.4 Talassemias.....	18
1.5 Talassemias α	19
1.6 Talassemias α^+	22
1.7 Talassemias α^0	23
1.8 Talassemias Não Delecionais.....	24
1.9 Diagnóstico Molecular das Talassemias α	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1.1 MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>).....	30
3.1.2 Etapas do MLPA.....	32
3.1.3 Desnaturação do DNA e Hibridização das Sondas.....	32
3.1.4 Reação de Ligação.....	32
3.1.5 Reação de PCR.....	32
3.1.6 Separação dos Fragmentos Amplificados.....	33
3.1.7 Análise dos Dados.....	33
3.2 <i>FINE-TILING ARRAY</i>	34
3.2.1 Etapas do <i>Fine-tiling array</i>	35
3.2.2 Preparação das amostras.....	35
3.2.3 Hibridização das sondas.....	36
3.2.4 Escaneamento do <i>array</i>	36
3.2.5 Análise dos resultados.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Capítulo 1 – A new and extensive α^0 deletion in a Brazilian child with HbH Disease	38

4.2 Capítulo 2 – Deleções alfa-talassêmicas detectadas em cinco pacientes brasileiros por <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA).....	47
4.3 Capítulo 3 – Associação das deleções - $\alpha^{3,7}$ e -- ^{MEDII} causando Doença da Hb H em paciente brasileiro.....	60
4.4 Capítulo 4 – Deletional alpha thalassemia 5.2 detected by <i>Multiplex-gap</i> -PCR in Uruguayan family.....	66
4.5 Capítulo 5 – <i>Fine - tiling array</i>	72
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética Local.....	88
ANEXO 2. Declaração de Submissão de Manuscritos.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina: Estrutura e Função

A hemoglobina (Hb) humana é uma proteína presente em elevadas concentrações no interior dos eritrócitos (aproximadamente 640 milhões de moléculas/célula) cuja principal função é o transporte de oxigênio (O_2), dos pulmões para os tecidos (1,2). A Hb é um tetrâmero globular, com peso molecular de 64,45 kDa, formado por duas cadeias polipeptídicas do tipo α (α ou ζ) e duas cadeias do tipo β (β , δ , γ^G , γ^A ou ϵ); cada cadeia se liga covalentemente a um grupo prostético heme, que possui um átomo de ferro reduzido na posição central e que faz a ligação reversível com o O_2 , permitindo assim o seu transporte (Figura 1) (3,4).

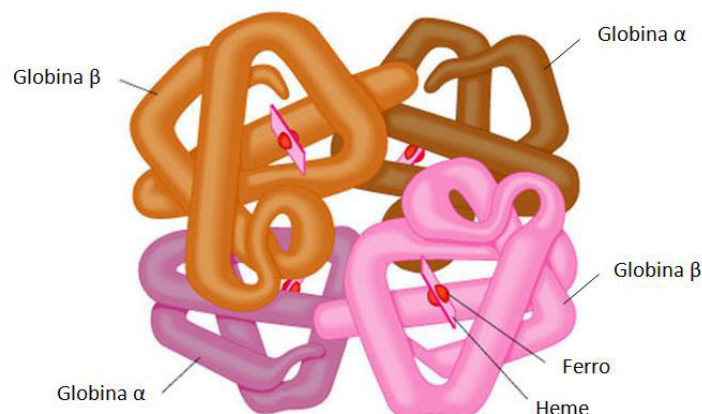


Figura 1. Representação esquemática da molécula de Hb humana (Adaptado de themedicalbiochemistrypage.org, LLC).

A produção de diferentes tipos de Hb reflete uma série de adaptações fisiológicas do organismo às diferentes necessidades de O_2 em vários estágios de desenvolvimento (5). Portanto, no período embrionário, a síntese de Hb se inicia no saco vitelínico, onde há produção das Hbs *Gower 1* ($\zeta_2\epsilon_2$), *Gower 2* ($\alpha_2\epsilon_2$) e *Portland* ($\zeta_2\gamma_2$). Após a 6ª semana de gestação, o fígado passa a ser o principal responsável pela síntese dessas proteínas, e a principal Hb do feto é produzida, a Hb Fetal (Hb F - $\alpha_2\gamma_2$). De três a seis meses após o nascimento, as cadeias γ são substituídas pelas cadeias β ; assim, há um aumento progressivo na produção da Hb A ($\alpha_2\beta_2$). Ainda no período pré-natal há também a formação da Hb A₂

($\delta_2\alpha_2$), conforme ilustrado na Figura 2. Sendo assim, a principal hemoglobina do adulto é a A, compreendendo aproximadamente 97% do total de Hb, seguida pela Hb A₂ que corresponde a 2-3% e, finalmente, traços de Hb F (5-7).

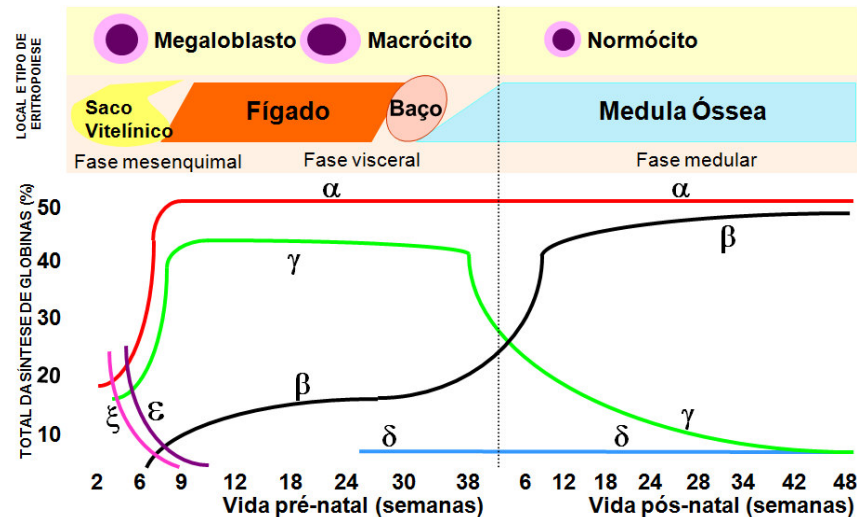


Figura 2. Ontogenia das cadeias globínicas (Adaptado de HOFFBRAND & MOSS, 2000) (7).

1.2 Regulação da expressão dos genes de globina

A síntese da Hb é controlada pelos *clusters* α e β , localizados nos braços curtos dos cromossomos 16 (16p13.3) e 11 (11p15.5), respectivamente, onde os genes de globina estão dispostos na ordem em que são expressos durante o desenvolvimento para a produção de diferentes tipos de tetrâmeros (8). Assim, é necessário que esta expressão se dê de forma totalmente equilibrada, para que não haja excesso de um ou outro par de subunidades de globina em qualquer fase da ontogenia (5,9).

O *cluster* α é formado pelo gene embrionário ζ , os pseudogenes (ψ) $\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$ e $\psi\rho$, os genes da globina α duplicados (α_2 e α_1) e os genes θ e μ . O *cluster* β contém o $\psi\beta$, o gene embrionário ϵ , os genes γ^G e γ^A , e os genes δ e β (Figura 3) (5). Os pseudogenes, presentes em ambos os *clusters*, possuem estrutura e sequências homólogas aos genes de globina que são ativamente expressos, no entanto, não são capazes de produzir proteínas, uma vez que sofreram mutações que os tornaram inativos (4,10).

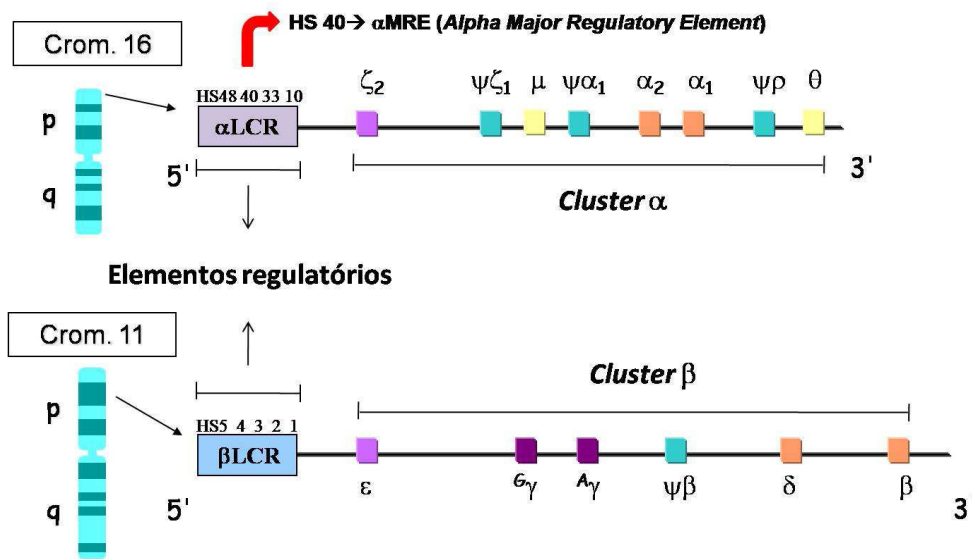


Figura 3. Representação esquemática dos *clusters* α e β e seus respectivos elementos regulatórios (Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2001 (17); VOON e VADOLAS, 2008 (18)).

Há diferentes tipos de genes ao redor dos *clusters* α e β. O *cluster* α é cercado por uma variedade deles e muitos desempenham papéis fundamentais no metabolismo celular e fisiológico, como o gene POLR3K que codifica uma subunidade da RNA polimerase III e o gene MPG que codifica a enzima 3-metiladenina-DNA glicosilase, envolvida no processo de reparo do DNA. Já o *cluster* β é rodeado por genes de receptores olfatórios (OR) que englobam aproximadamente 100 genes e compreendem cerca de 10-35 kb, à montante da região de controle de locus (LCR) do gene β e mais dois genes na região 3' desse *cluster* (4,5).

Os genes que codificam as cadeias globínicas são relativamente pequenos, possuem três *exons* e dois *introns*. Nos genes do *cluster* α as sequências intrônicas localizam-se entre os códons 31-32 e 99-100, enquanto que nos genes do *cluster* β estão entre os códons 30-31 e 104-105, ou seja, em ambos os *clusters*, os íntrons estão precisamente na mesma posição, assim, é dada a possibilidade de que ambos os genes originalmente tenham evoluído de um ancestral comum. As sequências desses genes são homólogas e infere-se que a posição dos *introns* antecede a separação dos genes α e β há cerca de 500 milhões de anos (4,10).

Vários elementos são importantes e necessários para a expressão dos genes de globina, na qual estão envolvidos um grande número de fatores de transcrição que facilitam ou inibem as funções de um complexo formado por promotores, *enhancers* e silenciadores que atuam na regulação tecido específica e dependente do estágio de desenvolvimento para a

produção dos diferentes tipos de Hb (11-13). A regulação da expressão dos genes no *cluster* β ocorre através de cinco sítios eritróides específicos hipersensíveis à DNase I (HS 1-5), que estão localizados em uma região de 4-20 kb a montante do gene ϵ (14). Estes sítios hipersensíveis interagem com proteínas regulatórias e permitem que modificações na estrutura da cromatina facilitem o acesso de fatores de transcrição para ativação dos genes no *cluster* β (9).

Por sua vez, a regulação da expressão dos genes do *cluster* α é mediada por quatro sítios eritróides específicos, situados a 10 (HS-10), 33 (HS-33), 40 (HS-40) e 48 (HS-48) kb a montante do gene embrionário ζ (13,14). O HS-40 (*α -major regulatory element* - α -MRE) é o mais importante e sua integridade é essencial para a expressão dos genes α . Como já foi amplamente demonstrado, quando esse elemento regulatório não é funcional, devido a deleções, efetivamente há o silenciamento da expressão dos genes das globinas do tipo α (15,16).

1.3 Hemoglobinopatias

Os defeitos genéticos da Hb, denominados Hemoglobinopatias (Hbpatias), correspondem às causas mais comuns de desordens hereditárias em todo o mundo, afetando aproximadamente 7% da população mundial. Pesquisas estimam que a cada ano nascem entre 300 mil e 400 mil crianças com alguma alteração grave da Hb e que até 90% destes nascimentos ocorrem em países de baixa ou média renda (7,19).

As Hbpatias podem ser classificadas em:

- Alterações estruturais, quando há mudanças na estrutura da cadeia de globina, levando à formação de Hbs anômalas;
- Talassemias, quando há alterações no ritmo de síntese de um ou mais tipos de cadeias globínicas;
- Persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF), quando a produção de Hb fetal (síntese de cadeias γ) persiste em níveis aumentados na vida adulta (17,20-21).

1.4 Talassemias

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de doenças associadas à síntese reduzida ou ausente de um ou mais tipos de cadeias globínicas, levando ao acúmulo do outro

tipo de cadeia cuja síntese está preservada. São, portanto classificadas em α , β , γ , δ , $\delta\beta$ e $\gamma\delta\beta$, de acordo com o(s) tipo(s) de cadeia cuja produção encontra-se afetada (1,20,22). As formas mais comuns são as talassemias α e β , sendo as primeiras as mais frequentes, encontradas em praticamente todas as populações investigadas (23), com no mínimo 60,000 nascidos afetados a cada ano (8). Já em relação às talassemias β , estima-se que 1,5% da população mundial seja acometida, com incidência anual de 1/100,000 indivíduos sintomáticos em todo mundo (24).

A fisiopatologia da doença está associada à produção deficiente de Hb, resultando em hemácias hipocrômicas e microcíticas. O desequilíbrio na proporção entre as cadeias α e β leva a um acúmulo das cadeias cuja síntese encontra-se preservada; estas, em excesso, formam agregados instáveis que precipitam e lesam a membrana eritrocitária, levando à destruição prematura das hemácias. As manifestações clínicas e laboratoriais das talassemias são bastante variáveis, indo desde a completa ausência de sintomatologia até a morte intra-uterina ou logo após o nascimento, dependendo do número de genes afetados e do tipo de mutação presente no paciente (20,25-26).

1.5 Talassemias α

As talassemias α têm prevalência elevada no continente africano, nas regiões banhadas pelo Mar Mediterrâneo e em grande parte do Sudeste Asiático. Estima-se que atinja cerca de 5% da população mundial (27). As formas mais leves ocorrem com uma frequência de 10-25% nas regiões tropicais, da África Subsaariana até regiões do Mediterrâneo, Oriente Médio e Sudeste da Ásia; no entanto, em alguns lugares específicos, como Papua Nova Guiné, alcançam até 80% da população. Já as formas mais graves ocorrem em regiões mais restritas, atingindo altas frequências apenas no sudeste da Ásia e em algumas regiões do Mediterrâneo (Figura 4) (19). Atualmente, porém, devido ao crescimento populacional, aos fluxos migratórios e à miscigenação racial, as talassemias α são encontradas em todos os continentes (27-28).

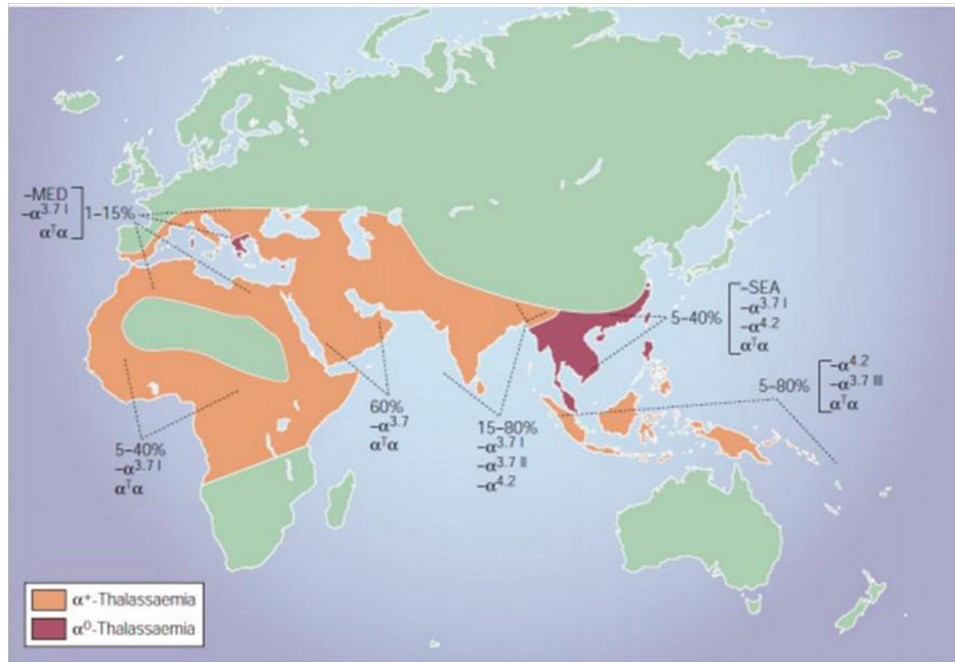


Figura 4. Distribuição mundial da talassemia α (Adaptado de WEATHERALL, 2001) (10).

As talassemias α são frequentemente causadas por deleções que envolvem um ou ambos os genes α (29). São classificadas em α^+ (alelo $-\alpha$) e α^0 (alelo $--$), que correspondem à redução parcial ou à supressão total da produção das cadeias α , respectivamente (7). Mais raramente, as talassemias α podem resultar de mutações de ponto ou pequenas deleções ou inserções (alelos α^T). A heterozigose, a homozigose ou a interação destes diferentes alelos resultam em um amplo espectro de manifestações clínicas e laboratoriais que se encontram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Genótipos e Aspectos Clínicos e Laboratoriais da Talassemia α

Tipos	Genótipos	Aspectos clínicos e laboratoriais
Talassemia α^+ Heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$ $(\alpha\alpha/\alpha^T\alpha)$	0-3% de Hb Bart's ao nascimento; alterações hematológicas mínimas ou ausentes no adulto.
Talassemia α^+ Homozigótica	$-\alpha/-\alpha$ $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$	5-10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia no adulto.

Talassemia α^0 Heterozigótica	--/ $\alpha\alpha$	5-10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Interação α^+/α^0	--/ $-\alpha$ (--/ $\alpha^T\alpha$)	25-50% de Hb Bart's ao nascimento; 5-30% de Hb H na vida adulta; Doença da Hb H.
Talassemia α^0 Homozigótica	--/--	Cerca de 80% de Hb Bart's; traços de Hb H; Hidropisia Fetal por Hb Bart's.

Adaptado de WENNING, KIMURA & SONATI, 2000 (30).

Até o momento, mais de 100 tipos de talassemia α foram identificadas, com fenótipos que variam de assintomáticos até formas mais graves que levam a óbito. A gravidade da doença reflete o número de genes α afetados, ocasionando diferentes fenótipos (27). Assim, a heterozigose da talassemia α^+ é associada com mínimas alterações hematológicas, enquanto que sua homozigose, bem como a heterozigose da talassemia α^0 , é caracterizada por moderada hipocromia e microcitose (31).

A Doença da Hb H ocorre quando há uma deficiência acentuada na produção de globinas α , já que apenas um gene α encontra-se funcional (--/ $-\alpha$). Desta forma, nos fetos, o excesso de cadeias γ forma a Hb Bart's (γ_4), que apresenta elevada afinidade pelo O_2 , não liberando-o eficientemente para os tecidos; já nos adultos, o excesso de cadeias β (β_4) forma a Hb H, um tetrâmero instável que precipita nas hemácias com o seu envelhecimento, ocasionando anemia hemolítica moderada ou grave, com icterícia e hepatoesplenomegalia (27,29,32,33).

A Hidropisia Fetal por Hb Bart's corresponde ao quadro mais grave de talassemia α , pois é associada com a ausência funcional dos quatro genes α (--/--). A quase totalidade de Hb Bart's leva a um quadro de hipóxia tecidual, com anemia grave, ascite e hepatoesplenomegalia, morte intra-uterina ou logo após o nascimento, exceto nos casos em que o tratamento, que consiste de transfusões sanguíneas intra-útero regulares seguidas do transplante de medula óssea após o nascimento, é administrado (1,29,31,34).

1.6 Talassemias α^+

As deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$ são as causas mais comuns da talassemia α^+ . Cada gene α situa-se dentro de uma região cromossômica duplicada de aproximadamente 4 kb de DNA. Estas regiões, homólogas, são divididas em três segmentos, denominados X, Y e Z. Recombinações entre as regiões Z, devidas a *crossing-over* desigual, resultam na perda de 3,7 kb de DNA (alelo $-\alpha^{3,7}$). Existem três subtipos da deleção $-\alpha^{3,7}$, dependendo do ponto exato em que ocorreu o *crossing-over*, dentro da região Z, resultando nas formas $-\alpha^{3,7I}$, $-\alpha^{3,7II}$ e $-\alpha^{3,7III}$. Da mesma maneira, recombinações entre as regiões X levam à deleção de 4,2 kb de DNA (alelo $-\alpha^{4,2}$). Como produto adicional do desalinhamento dos cromossomos, origina-se a triplicação dos genes α , designados $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$, respectivamente, como mostra a Figura 5 (1,5,29,31).

A variedade de recombinações que resultam nos alelos $-\alpha$ e $\alpha\alpha\alpha$ identificados na maioria das populações, sugere que recombinações entre as regiões homólogas X e Z são relativamente frequentes (5). Além das deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$, outras formas delecionais mais raras de talassemia α^+ foram descritas: $-\alpha^{3,5}$, presente em uma família indiana (35), $\alpha(\alpha^{5,3})$, observada em uma família italiana (36), e a $-\alpha^{2,7}$, descrita em um paciente chinês com Doença da Hb H (37).

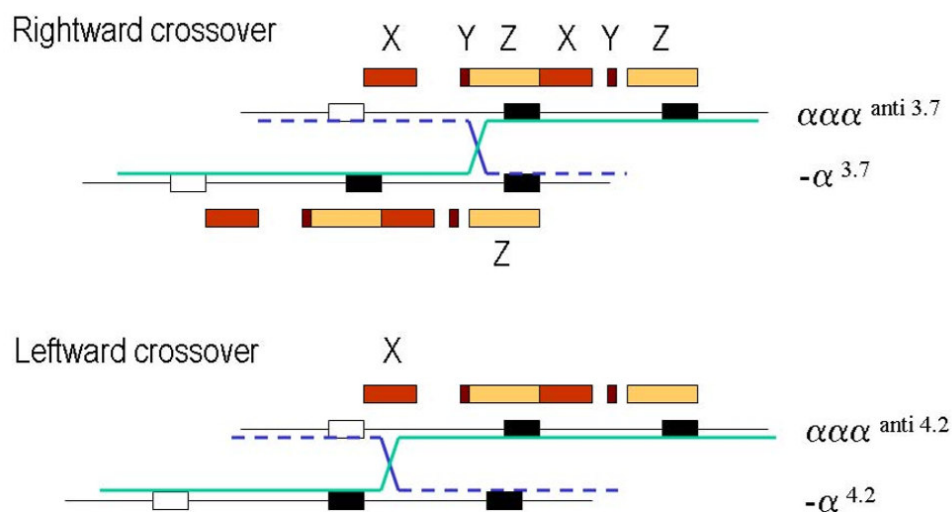


Figura 5. Representação esquemática do desalinhamento dos cromossomos homólogos na formação das deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$, respectivamente, assim como dos alelos $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$ (Adaptado de HARTEVELD e HIGGS, 2010) (23).

1.7 Talassemias α^0

As talassemias α^0 frequentemente resultam de eventos de recombinação não homóloga, muitas vezes envolvendo a família de sequência repetitiva *Alu*. Essas sequências ocorrem com frequência no genoma, constituindo no mínimo 10% do DNA humano, embora possam representar um percentual muito maior em determinadas regiões (20). Uma dessas regiões é a do *cluster* α , onde as sequências *Alu* compõem aproximadamente 25% de toda a sequência (16).

A maioria dessas deleções remove ambos os genes α , mas pode remover apenas um deles e parte do outro gene α que, no entanto, não se expressa; em alguns casos elas também removem os genes ζ , α e θ , podendo compreender de 100 a 250 kb de DNA. Mais raramente, existem deleções mais extensas que removem além do *cluster* α e dos genes a ele contíguos. Deleções acima de 900 kb tem sido observadas em pacientes com Síndrome do Retardo Mental Associado à Talassemia α (ATR-16 *syndrome* - *Alpha thalassemia retardation associated with chromosome 16*) (5,10,16,38).

Os tipos mais comuns de talassemia α^0 incluem $--^{MED}$ e $--^{SEA}$ que ocorrem com altas frequências na região do Mediterrâneo e no Sudeste Asiático, respectivamente (32). Menos frequentemente, a talassemia α^0 é causada por deleções que afetam a região do HS-40, deixando os genes α intactos, porém sem expressão. As alterações hematológicas desses pacientes não diferem daquelas dos heterozigotos da talassemia α^0 ($--/\alpha\alpha$). As formas mais comuns de talassemia α nas diversas populações encontram-se dispostas na Figura 6 (13,23,31).

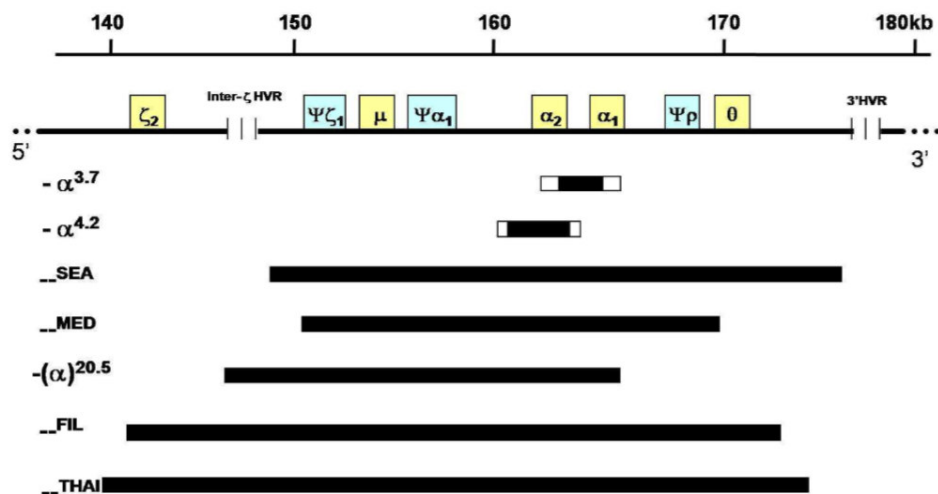


Figura 6. Esquema representando as sete deleções mais comuns responsáveis pelas talassemias α (Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2001) (17).

1.8 Talassemias α não deletacionais

Nas talassemias α não deletacionais há uma diminuição mais acentuada na síntese das globinas α , um fenótipo mais grave também é observado, se comparado a deleções que removem apenas um dos genes α . Isso poderia ser explicado pelo fato de que a maioria das mutações afeta o gene α_2 , que tem uma expressão quase três vezes maior que o gene α_1 . Além disso, quando o gene α_2 é deletado, o gene α_1 fica mais próximo do elemento regulatório e atinge um nível maior de expressão, o que não acontece quando o gene α_2 foi inativado por mutação de ponto, mas continua presente (38).

Mutações que afetam o processamento e/ou a tradução do RNA mensageiro (RNAm), ou a estabilidade das cadeias α , são os tipos mais comuns da talassemia α^+ . Elas podem ser ocasionadas por mutações nos sítios de poliadenilação (α_2^{AATAAG} , α_2^{AATGAA}), no códon de terminação, levando à formação de variantes alongadas como as Hbs *Constant Spring*, *Icaria* e *Seal Rock*, e por mutações em regiões codificantes dos genes α , levando a variantes estruturais instáveis, como as Hbs *Quong Sze*, *Suan Dok* e *Adana*, entre outras (23).

Em relação a Doença da Hb H, os fenótipos mais graves estão associados com a interação de alelos α^0 com as mutações não deletacionais que afetam o gene α_2 , incluindo $--/\alpha^{\text{Constant Spring}}\alpha$, $--/\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ e $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$ (27,33).

1.9 Diagnóstico molecular das talassemias α

A frequência da talassemia α no Brasil é elevada em indivíduos de origem africana (39-45); no entanto, é a Hbpatia ainda menos investigada em nosso meio (28).

Em 2001, Borges *et al.* investigaram a causa de microcitose e hipocromia em indivíduos adultos do Sudeste brasileiro, sem anemia e com níveis normais ou reduzidos de Hb A₂, encontrando prevalência de 49,9% de talassemia α ; sendo 42,8% heterozigotos e 5,3% homozigotos da deleção $-\alpha^{3,7}$, 1,5% heterozigotos da mutação $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$ e 0,3% heterozigotos da deleção $--^{\text{MED}}$ (46).

Comum no Sudeste Asiático, Oriente Médio e no Mediterrâneo (23), a Doença da Hb H é esporádica no Brasil, sendo os casos detectados geralmente causados pela associação da mutação $-\alpha^{3,7}$, causa mais comum de talassemia α nas populações, com as deleções $--^{\text{MED}}$ ou $-(\alpha)^{20,5}$, de origem mediterrânea, ou $--^{\text{SEA}}$, do Sudeste Asiático (47). Em 2011, Suemasu *et*

al. caracterizaram cinco casos de Doença da Hb H resultantes da combinação da deleção $-\alpha^{3,7}$ com deleções α^0 raras ou ainda desconhecidas (48).

O método atualmente mais empregado na identificação das talassemias α é o *Multiplex-gap-PCR*, que utiliza um conjunto de *primers* que flanqueiam as regiões correspondentes às sete deleções mais frequentes nas populações humanas ($-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20,5}$, $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{THAI}$) (49); entretanto, essa técnica é limitada às deleções já conhecidas, não permitindo a identificação de deleções novas ou raras (50). Em relação às mutações de ponto, as conhecidas podem ser detectadas por PCR seguida de análise com enzima de restrição, enquanto as demais serão identificadas por sequenciamento de DNA (51).

Em 2002, Schouten *et al.* (52) descreveram pela primeira vez a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que permite detectar variações no número de cópias de sequências de DNA. É uma técnica sensível, onde pequenas quantidades de DNA são suficientes e os equipamentos necessários, termocicladores e sequenciadores de DNA, já se encontram em muitos laboratórios. Ela foi comercializada pela empresa *MRC Holland* e é capaz de realizar análises semi-quantitativas de até 60 sequências de DNA baseada em uma única reação de *Multiplex-gap-PCR* (53).

Nos últimos anos, o MLPA se tornou uma técnica amplamente utilizada em vários laboratórios, na realização de pesquisas para a determinação das bases moleculares de diversas doenças, como vários tipos de câncer, distrofinopatias, distúrbios neuromusculares e neuropatias (54). Em 2005, Hartevelde *et al.* (55) desenvolveram sondas complementares às regiões dos *clusters* α e β , tornando a técnica aplicável à detecção das Hbpatias causadas por deleções.

O Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da FCM/Unicamp é uma referência brasileira na investigação das talassemias α . Nele, a triagem inicial das sete deleções mais comuns é feita através da técnica de *Multiplex-gap-PCR* (49). As deleções detectadas são confirmadas por reações específicas de *gap-PCR*, realizadas com diferentes pares de *primers* e em condições distintas daquelas usadas no *Multiplex*. Deleções novas ou raras, no entanto, não são detectadas (56).

Em 2011, Suemasu *et al.* (48) utilizaram o MLPA para caracterizar deleções α - talassêmicas de pacientes brasileiros cujas bases moleculares, até então, não haviam sido esclarecidas. Apesar do MLPA ser uma técnica muito útil no diagnóstico da talassemia α , o exato *breakpoint* das deleções, ou seja, a região entre a última sonda de MLPA presente e a primeira sonda deletada, permanece não determinado, já que a distância entre as sondas varia

de 100 pb até > 10 kb de DNA. Embora o conhecimento dessa região não seja essencial para demonstrar a presença do defeito genético, sua identificação é importante para esclarecer os mecanismos que levaram a estas deleções e para a elaboração de novos *gap*-PCRs para novas mutações, além de permitir um maior conhecimento sobre os genes e regiões regulatórias removidas do genoma dos pacientes (56).

A técnica de Hibridização Genômica Comparativa (aCGH) foi a primeira abordagem eficiente no mapeamento de todo o genoma e na investigação de variações no número de cópias (CNV) do DNA (57). A aCGH se apresenta como uma excelente opção para o mapeamento de genes envolvidos na origem de várias condições clínicas (58). Por meio da aCGH é possível investigar a presença de deleções e duplicações gênicas em alta resolução, comparando um DNA controle com um DNA teste marcados com fluorocromos diferentes (58,59).

Nos últimos anos, as aplicações da aCGH tem facilitado a pesquisa da identificação das bases moleculares de muitas doenças genéticas, como as talassemias. Desenvolvida inicialmente como uma ferramenta de investigação das alterações genômicas no câncer, tornou-se essencial no diagnóstico das CNVs e gradualmente vem sendo cada vez mais utilizada nos laboratórios de genética. A elevada resolução da técnica, aliada à reprodutibilidade, simplicidade e o mapeamento preciso são as vantagens mais significativas da aCGH sobre os métodos citogenéticos tradicionais (60,61).

O *Fine-tiling array* é um subtipo de aCGH que fornece alta resolução na investigação de *breakpoints*. Ele foi primeiramente utilizado para análises de *breakpoint* de deleções que causam neuroblastoma, e, mais recentemente, vem sendo aplicado na resolução de complexos rearranjos envolvendo os genes BRCA1, MECP2, GJB2, entre outros (56).

Em 2012, PHYLIPSEN *et al.* (61) desenvolveram um *Fine-tiling array* customizado, específico para os *clusters* α e β e para as áreas que flanqueiam esses *clusters*, tornando possível um delineamento específico desta região, já que a tecnologia permite detectar pequenos e grandes rearranjos. Além disso, as informações fornecidas pelo *Fine-tiling array* favorecem o desenho de *primers* para amplificação de pequenos fragmentos contendo as sequências de *breakpoint* que, posteriormente, podem ser analisadas pelo sequenciamento de DNA (51).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo caracterizar as deleções α -talassêmicas presentes em 11 pacientes (10 famílias), não relacionados, 10 deles brasileiros e um proveniente do Uruguai, cujos genótipos não puderam ser completamente determinados somente pela utilização do *Multiplex-gap-PCR*, utilizando os métodos de MLPA e *Fine-tiling array*.

3. MATERIAS E MÉTODOS

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 1) e realizado no Laboratório de Hemoglobinopatias do Departamento de Patologia Clínica da FCM/Unicamp.

Foram estudados 11 pacientes (P) e seus respectivos familiares, sempre que disponíveis. Oito pacientes (P1 a P8) foram aqui analisados apenas pelo MLPA, sendo sete brasileiros, provenientes das cidades de Atibaia (SP), Mococa (SP), Porto Alegre (RS), Holambra (SP), Rio de Janeiro (RJ), Promissão (SP) e Araraquara (SP), e um proveniente de Montevideú, Uruguai, encaminhado pelo Dr. Julio da Luz, do Laboratório de Genética Molecular Humana da *Universidad de la Republica del Uruguay* - UDELAR (Salto – Uruguai).

Os outros três pacientes (P9, P10 e P11) haviam sido inicialmente estudados, através de MLPA, por Suemasu *et al.*, em 2011 (48), e tiveram agora suas regiões de *breakpoints* mais refinadas pela técnica de *Fine-tiling array*. Eles são provenientes das cidades de São Paulo (SP), Santa Cruz do Capibaribe (PE) e Amparo (SP), respectivamente, sendo os dois primeiros duplos heterozigotos dos alelos α^0 e α^+ (Doença da Hb H), e o último heterozigoto da talassemia α^0 . Os dados hematológicos e moleculares dos pacientes aqui investigados estão apresentados na Tabela 2.

Os dados hematológicos dos pacientes foram determinados por contador eletrônico de células (*Sysmex XE 2100*, *Sysmex*, Japan). O perfil das Hbs e a quantificação de suas frações (Hb A₂, Hb F e, quando presentes, Hb H e Hb Bart's), foram realizadas por eletroforese em acetato de celulose, nos pHs alcalino e neutro, e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), de troca catiônica (*VARIANT™*; *Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, USA). A extração de DNA foi realizada a partir de leucócitos do sangue periférico, utilizando-se *kit* comercial (*QIAamp DNA Blood Mini Kit*, Qiagen, Germany). As sete deleções frequentemente encontradas nas populações humanas [$-\alpha^{3,7}$, $\alpha^{4,2}$, --MED, $-(\alpha)^{20,5}$, --SEA, --FIL, --THAI] foram triadas por *Multiplex-gap-PCR* (49); a presença da deleção $-\alpha^{3,7}$ foi confirmada por PCR específica (62). Também foram investigadas as mutações não deletoriais mais prevalentes (α^{Hph} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$, α^{TSaudi}), após amplificação seletiva dos genes α seguida de análise com as respectivas enzimas de restrição ou, no caso da TSaudi, de nested PCR específico para a mutação (63).

Tabela 2. Dados hematológicos e moleculares dos pacientes investigados.

Casos	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Idade/Gênero	3m/F	17/M	35/F	58/F	-/F	2m/F	31/M	2/M	14/F	30/M	23/F
GV (10 ⁶ /mm ³) VR: M:4,56,1/F:4,2-5,4	4,55	5,43	5,50	5,50	5,00	4,64	5,55	5,45	5,03	5,97	5,64
Hb (g/dL) VR: M: 14-18/F: 12-16	7,75	8,8	11,2	12,5	8,3	8,1	9,2	10,8	9	10,8	11,5
HTC (%) VR:M: 41-52/F:36-46	24,6	30,4	35,9	41,4	29,7	28,9	34,2	31,9	33,3	39,9	34,8
VCM (fl) VR: M: 81-99/F: 80-96	54,1	56	65,3	70,4	59,4	62,3	61,6	58,5	66,2	69,7	61,7
HCM (pg) VR: 27-32	17	16,2	20,4	22,4	16,6	17,5	16,6	19,4	17,9	18,1	20,4
RDW (%) VR:10-15	21,9	24,4	15,1	16,4	-	26	25,5	17,2	24,4	24,7	14,5
Perfil Hb	A ₂ ,F,A, Bart's, H	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A,H, Bart's	A ₂ ,A,H, Bart's	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A
Hb A ₂ (%) VR: 1,5- 3,5	23,70	1,6	2,6	2,5	0,8	1	1,5	Normal	1,6	1,5	2,6
Hb F (%) VR: <1	0,78	0,1	0,6	0,4	1,7	22,6	0,5	Normal	1,7	0,2	0,3
Hb H (%)	10 (Bart's+H)	3	-	-	7,6	18,9 (Bart's+H)	4,0	-	6,9	10,0	-
Testes de instabilidade*	Pos	-	Neg	Neg	-	Pos	Pos	Neg	Pos**	Pos	Neg***
Corpos de Heinz	-	Pos	Neg	Neg	-	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
Corpúsculos de inclusão de Hb H	-	Pos	Neg	Neg	-	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
Padrão Molecular****	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	αα/αα	αα/αα	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	αα/αα	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	-α ^{3.7} /α ^{3.7}	αα/αα

P: probando; M: masculino; F: feminino; m: meses; GV: glóbulos vermelhos; VR: valores de referência; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; RDW: *Red cell distribution width*; *Testes de instabilidade: n-Butanol, Isopropanol, Instabilidade Térmica; **Pos:Positivo; ***Neg: Negativo, ****Padrão Molecular: padrão apresentado no *Multiplex-gap*-PCR e/ou PCR específico.

3.1 MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

A técnica de MLPA foi descrita por Schouten *et al.* (52) em 2002 como um novo método para a quantificação relativa de mais de 40 sequências diferentes de DNA em uma única reação, utilizando apenas 20 ng de DNA. É utilizada para análises de CNVs em várias síndromes e doenças, já que é possível a detecção de deleções e duplicações de diversos genes (64).

O MLPA é baseado na amplificação das sondas que são hibridizadas ao alvo e a reação pode ser dividida em cinco etapas: desnaturação do DNA e hibridização das sondas, fase de ligação, amplificação por PCR, separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar e análise dos dados (54). Cada sonda comercial é composta de dois oligonucleotídeos (*Left Probe Oligonucleotide* - LPO e *Right Probe Oligonucleotide* - RPO), conforme ilustrado na Figura 7, que possuem uma sequência específica à região de interesse e se anelam ao DNA; além disso, possuem uma sequência homóloga aos *primers* universais no final de sua estrutura. A RPO possui uma sequência-coringa, com extensão diferente para cada sonda (21-30 nt), permitindo diferenciar os produtos de PCR que, assim, terão tamanhos diferentes e únicos ao final da reação (64).

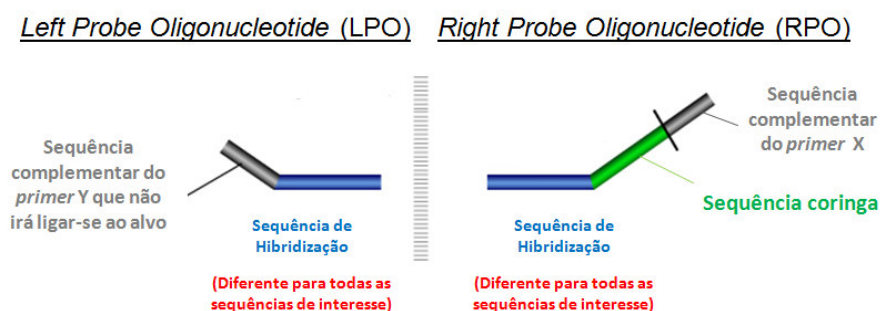


Figura 7. Representação esquemática das sondas comerciais de MLPA
(Adaptado de http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mlpa.html).

Na primeira fase, após a amostra de DNA do paciente ter sido desnaturada, ela é hibridizada a um conjunto de sondas específicas à região de interesse. Após a hibridização, as sondas (esquerda e direita) são unidas por uma *ligase* dependente de temperatura, formando um fragmento único que varia de 130-500 nt (fase de ligação). Em seguida, elas são amplificadas por PCR, utilizando-se um par de *primers* universais, que se anelam às sequências localizadas nas duas extremidades dos produtos de ligação.

Só haverá amplificação do par de sondas que estiver hibridizado à sequência de DNA do paciente e cujas sondas encontram-se ligadas uma à outra. Dessa forma, serão gerados produtos de amplificação (*amplicons*) e, como um dos *primers* é marcado com fluorescência, estes fragmentos podem ser visualizados na eletroforese capilar, onde há a separação dos mesmos por tamanho (53). A Figura 8 apresenta um esquema das etapas do MLPA.

Nas reações iniciais de MLPA foram utilizados os *kits* SALSA MLPA P140 B3/B4 HBA (*MRC Holland*, Amsterdam, Holanda), e posteriormente foi substituído pela versão mais recente, C1 HBA, apresentando melhorias nas sondas e na área de cobertura, sendo possível analisar cerca de 360 kb de DNA. Esse *kit* é composto por 45 sondas, sendo 11 controles internos e 34 sondas específicas a diferentes regiões do cromossomo 16 que geram produtos de amplificação entre 130 e 481 nt e abrangem todo o cluster α e a região do elemento regulatório (α -MRE). O *kit* contém também SALSA MLPA *Buffer*, *Probemix*, SALSA *Ligase-65*, *Ligase Buffer A*, *Ligase Buffer B*, SALSA PCR *Primer Mix*, e SALSA Polimerase. Todos os *kits* possuem dois tipos de controles internos, fragmentos Q que determinam se as quantidades de DNA utilizadas na reação foram suficientes e fragmentos D que indicam se houve completa desnaturação do DNA.

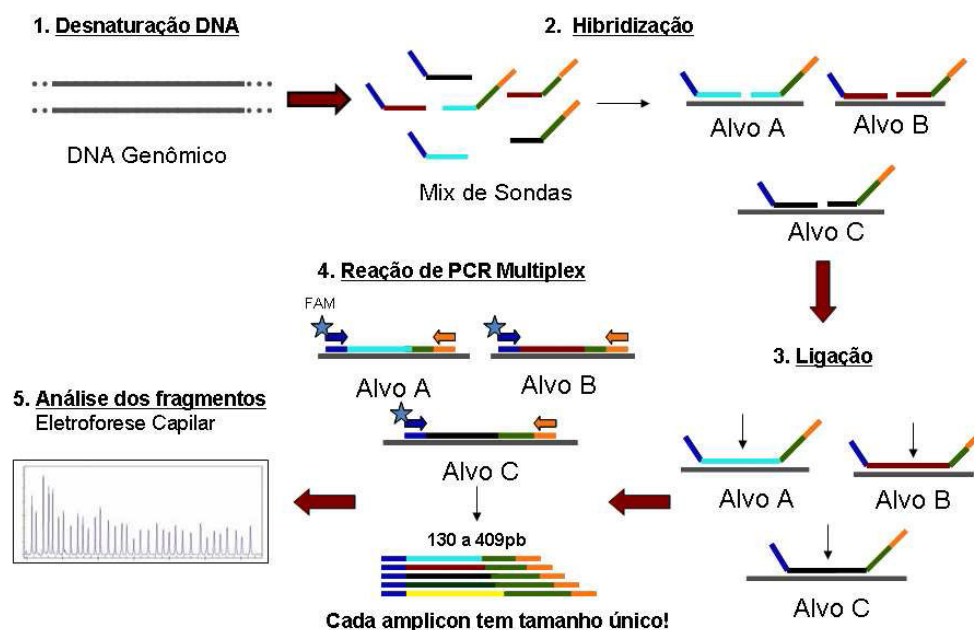


Figura 8. Representação esquemática das etapas adotadas no MLPA.

3.1.1 Etapas do MLPA

Os procedimentos da técnica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (*MRC Holland – General Protocol*). A reação de MLPA é dividida em 2 dias e o programa utilizado no termociclador está disposto na Figura 9.

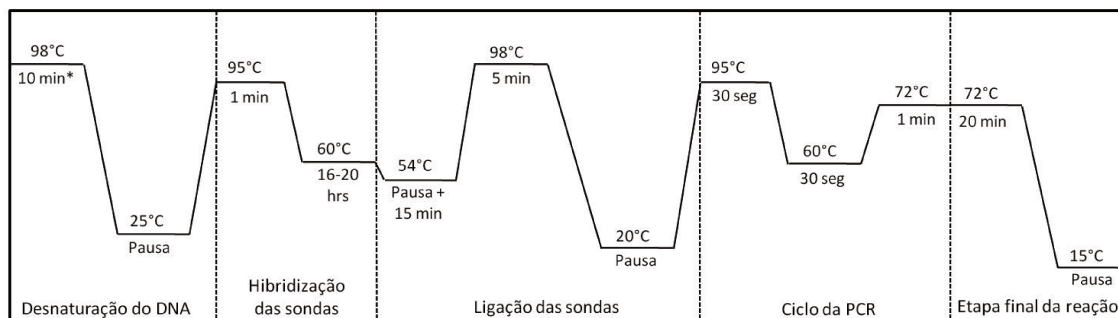


Figura 9. Programa “MLPA” utilizado no termociclador (*10 minutos: Protocolo do *kit* preconiza 5 minutos, mas como a região do braço curto do cromossomo 16 é rica em GC, foi realizada esta alteração na temperatura).

3.1.2 Desnaturalização do DNA e Hibridização das Sondas

No primeiro dia da reação, cada amostra de DNA foi diluída em TE (10 mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1 mM EDTA), na proporção de 50 ng ou 150 ng para 5 µl e foram colocadas em termociclador por 10 min a 98°C para desnaturalização do DNA.

Em seguida, a 25°C foram adicionados 1,5 µl do MLPA *buffer* e 1,5 µl do *probemix*. Após ressuspensão, as amostras foram mantidas a 95°C por 1 min e incubadas a 60°C durante 16 a 20 horas.

3.1.3 Reação de Ligação

No segundo dia da reação e à temperatura de 54°C, um *mix* contendo 25 µl de H₂O, 3 µl *Ligase Buffer A*, 3 µl *Ligase Buffer B* e 1 µl de SALSA *Ligase-65* foi adicionado. Após 15 min, aumentou-se a temperatura para 98°C, para inativação da enzima *Ligase-65*.

Nesta etapa, a 20°C, as amostras podem ser retiradas do termociclador.

3.1.4 Reação de PCR

Em temperatura ambiente, um *mix* contendo 7,5 µl de H₂O, 2 µl SALSA PCR *primer mix* e 0,5 µl SALSA Polimerase foi adicionado em cada amostra. Em

seguida, continuou-se o ciclo da PCR. Segundo o fabricante, os produtos desta amplificação podem ser mantidos a 4°C por 1 semana, e por períodos mais longos a -25°C/-15°C, sempre envoltos em papel alumínio devido à sensibilidade do marcador fluorescente do *primer*.

3.1.5 Separação dos Fragmentos Amplificados

Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA (*ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser, Applied Biosystems, USA*). Para preparação das amostras, foi colocado 0,7 µl do produto da PCR com 0,2 µl de LIZ GS 500 e 9 µl de formamida em placa de 96 *wells*.

Em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 86°C, resfriadas por 2 minutos a 4°C e colocadas no sequenciador, utilizando os seguintes parâmetros na corrida: *injection voltage* – 1,6 kV; *injection time* – 15 segundos; *run voltage* – 15 kV; *run time* – 1,800 segundos.

3.1.6 Análise dos Dados

Os resultados obtidos nas versões HBA B3 e B4 foram analisados pelo *software GeneMarker (SoftGenetics LLC genotyping software version 1.97 demo)*, onde foi realizada a análise comparativa dos fragmentos, avaliando possíveis alterações no número de cópias (deleções ou duplicações) nos alelos α das amostras. É um programa onde são adicionados os dados brutos da corrida.

O *software* realiza uma normalização intra-amostral, que corrige oscilações da reação. Essa normalização divide o valor dos sinais de cada sonda teste pela média dos valores dos sinais das demais sondas presentes em cada amostra. Após os valores serem pré-normalizados, eles foram divididos pela média dos sinais das sondas correspondentes no grupo controle. Esta é a normalização inter-amostral, a fim de comparar as amostras controles com as amostras testes. As diferenças relativas dos sinais desses controles com seus correspondentes nas amostras testes permitem detectar potenciais deleções e duplicações. Portanto, valores abaixo de 0,5 (variação de 0,3 – 0,7) correspondem às deleções, e acima de 1,5 (1,3 – 1,7) às duplicações. Valores normais encontram-se entre próximos a 1 (0,7 – 1,3).

O *software Coffalyser* foi utilizado para análise das reações feitas com a versão C1 HBA, ele utiliza o mesmo princípio que o *GeneMarker*, mas sua interface é

mais moderna e a apresentação dos resultados finais é mais detalhada, de qualquer forma, ambos os programas realizam o mesmo tipo de análise e podem ser utilizados.

3.2 FINE-TILING ARRAY

A aCGH é um método promissor na caracterização de rearranjos gênicos que, devido a sua plataforma inovadora, vem sendo adotado nos laboratórios clínicos. Já na área da pesquisa, a sua utilização tem acelerado o ritmo de descobertas na genética humana, aprofundando a compreensão de alterações genômicas em diversas doenças e promovendo o estudo de conceitos fundamentais relacionados aos mecanismos básicos do DNA (51,59).

O princípio da aCGH envolve a utilização de quantidades iguais de DNAs de um controle normal e do paciente, marcados com fluocromos diferentes, Cy5 e Cy3, respectivamente, que, serão hibridizados na lâmina de *array*; desta forma, a intensidade da fluorescência será proporcional ao número de cópias das sequências de DNA. Assim, duplicações são identificadas pela fluorescência aumentada, enquanto deleções resultam em fluorescência diminuída (Figura 10). Através do *Fine-tiling array* é possível detectar pequenos e grandes rearranjos (de aproximadamente 4 kb até 2 Mb) nos *clusters* dos genes α e β de globina (61). Nas talassemias, o *array* foi utilizado para mapear as posições de *breakpoint*, a fim de se desenhar *primers* para sequenciamento de DNA e determinação do exato *breakpoint* das deleções (51,58).

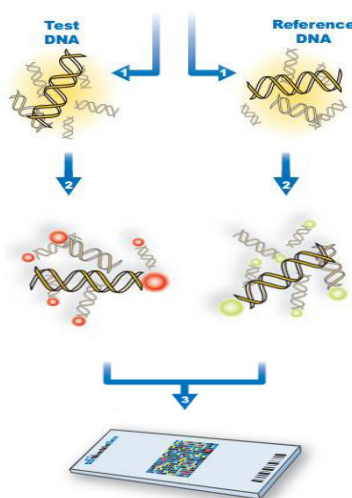


Figura 10. Representação esquemática da técnica de aCGH (Adaptado de Roche *NimbleGen*, <http://www.nimblegen.com>).

No *Laboratory for Diagnostic Genome Analysis, Leiden University Medical Center* – Leiden – Holanda, foi desenvolvida uma customização do *Fine-tiling array* (*Roche NimbleGen, Madison, WI*) de alta resolução, com sondas que englobam 2 Mb de DNA, a partir das regiões teloméricas dos braços curtos dos cromossomos 11 e 16, cobrindo os agrupamentos β e α , respectivamente, e as regiões ao seu redor. As posições das sondas estão de acordo com o *UCSC Genome Browser* (março/2006 – hg 18) (65).

Este *Fine-tiling array* customizado consiste em 12 *subarrays* com 135,000 sondas em cada um, conforme a Figura 11. Este modelo foi escolhido por ser o de maior eficiência, sendo possível analisar 12 amostras simultaneamente. Estas sondas possuem um tamanho entre 60-80 pb, indicando que há uma sobreposição entre elas, para que abranja toda a região de interesse.

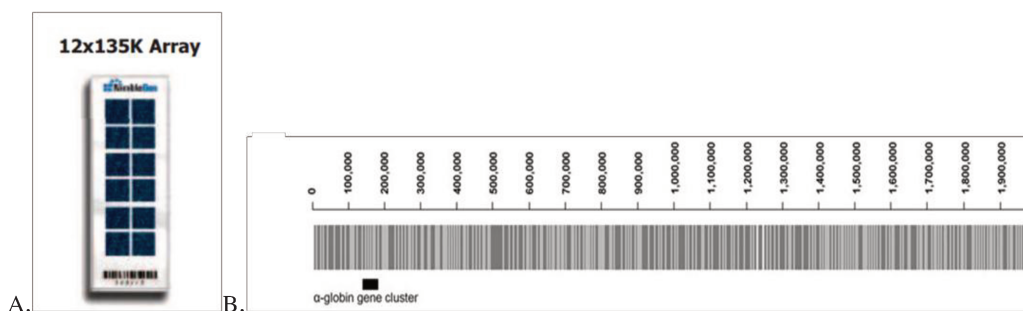


Figura 11. A. Formato do *array* utilizado. B. Representação esquemática da cobertura das sondas. As barras cinzas na vertical indicam a localização das sondas, áreas sem cobertura foram deixadas em branco. Adaptado de Philipsen *et al.*, 2012 (61).

3.2.1 Etapas do *Fine-tiling array*

As análises dos pacientes P9, P10 e P11 foram realizadas no *Laboratory for Diagnostic Genome Analysis, Leiden University Medical Center* – Leiden – Holanda, sob supervisão do Dr. Cornelis Harteveld, e seguiram as instruções do fabricante (*NimbleGen Arrays User's Guide: CGH Analysis v 4.0*).

3.2.2 Preparação das amostras

As amostras de DNA foram diluídas a 50 ng para 20 μ l e, em seguida, o DNA teste foi marcado com fluorocromo Cy3, enquanto a amostra controle foi marcada com Cy5; para isso foram utilizados 40 μ l de cada fluorocromo e 80 μ l de H₂O. As amostras foram então desnaturadas a 98°C por 10 minutos (min), em termociclador, e

colocadas no gelo por 2 min. Em seguida, foi adicionado um *mix* contendo 8 µl H₂O, 10 µl dNTP 10 mM e 2 µl de enzima *Klenow* 100 U 3' → 5' *exo* (*New England Biolabs*, Ipswich, MA) e as misturas foram incubadas a 37°C por 2 horas. Para parar a reação foram utilizados 21,5 µl de *Stop solution* (0,5 M EDTA).

Em seguida, adicionou-se 110 µl de isopropanol para precipitação das amostras, que foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente e em local protegido da luz e, então, centrifugadas por 10 min a 12,000g. O sobrenadante foi removido e os *pellets* marcados com o Cy3 ficaram cor-de-rosa e os marcados com o Cy5, azuis. Os *pellets* foram lavados com 500 µl de etanol gelado a 80% e centrifugados novamente a 12,000g por 2 min, e foram secos durante 5 min sob proteção da luz.

Os *pellets* foram então ressuspensos em 35 µl de H₂O, incubados entre 15-25°C por 5 min e quantificados em Espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*, Inc., Rockland, DE, USA) (concentração máxima de 3,700 ng/µl).

3.2.3 Hibridização das sondas

Inicialmente, o sistema de hibridização foi mantido a 42°C por 3 horas para estabilizar a temperatura. Em seguida, os *pellets* originados na etapa anterior foram ressuspensos com 3,3 µl de uma solução *tracking controls* para posteriormente as amostras serem rastreadas, ou seja, poder diferenciá-las. Em cada amostra foram adicionados 8,7 µl do seguinte *mix* de hibridização: 88,5 µl de *Hybridization Buffer*, 35,4 µl de *Hybridization Component A* e 3,6 µl de *Alignment Oligo*; posteriormente, as mesmas foram incubadas a 95°C por 5 min. Foram utilizados 8 µl de cada amostra na lâmina de *array*, que em seguida, foi colocada no sistema de hibridização, por 72 horas, a 42°C, coberta por um adesivo para evitar evaporação.

Após este período, a lâmina de *array* foi lavada em um *mix* contendo 22,5 mL de H₂O, 2,5 mL de *Wash Buffer* 10X e 2,5 µl de DDT 1M, aquecido a 42°C. Após esse processo, a lâmina de *array* foi embrulhada em papel alumínio e colocada dentro de tubo tipo *falcon* de 50 mL e centrifugada por 2 min a 3,000g.

3.2.4 Escaneamento do array

O escaneamento da lâmina de *array* foi feito no *microarray scanner* Agilent G2565BA (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA); após esse processo, cada quadrado

foi selecionado separadamente para posterior análise. Um exemplo da imagem obtida pode ser visualizado na Figura 12.

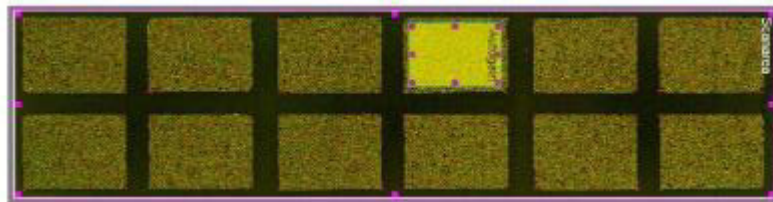


Figura 12. Imagem obtida após o escaneamento da lâmina de aCGH.

3.2.5 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada pela determinação da diferença média de sinal entre as amostras testes e as amostras de referência. Inicialmente, o *software NimbleScan* foi utilizado para pré-criar dados, ou seja, extrair a intensidade dos sinais dos dados das imagens escaneadas e identificar cada amostra devido ao uso dos *tracking controls*.

Posteriormente, esses dados foram exportados para o *software SignalMap* que calcula as diferenças de sinal em blocos de 100, 250 e 500 pares de bases (pb) ao longo da região de interesse.

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1

A NEW AND EXTENSIVE A⁰ DELETION IN A BRAZILIAN CHILD WITH HBH DISEASE

Natália de O. Mota¹, Elza M. Kimura¹, Roberta D. Ferreira¹, Dulcinéia M. Albuquerque², Daniela M. Ribeiro¹, Magnun N. N. Santos¹, Fernando F. Costa², Maria de F. Sonati¹

¹Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

²Hematology and Hemotherapy Center, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: Maria de Fátima Sonati, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas–UNICAMP, Campinas, Estado de São Paulo, CEP 13083-970, Brazil; e-mail: sonati@fcm.unicamp.br (preferred); sonati_mf@yahoo.com.br (alternative).

Abstract

Alpha-thalassemias are among the most common genetic diseases in the world and are characterized by impaired synthesis of the α -globin chains of hemoglobin. Deletions involving the α cluster on chromosome 16p13.3 are the main cause of this condition, and although the more common deletions can be detected by PCR, rare or new deletions require more elaborate techniques. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) has been used for this purpose and enabled a new, extensive α^0 deletion in trans with the $-\alpha^{3.7}$ deletion to be detected in a Brazilian patient with HbH disease ($--/-\alpha^{3.7}$). This deletion, which extends over 70 to ~105 kb of DNA and involves the α_2 and α_1 genes and contiguous LUC7L and ITFG3 genes, was named $--^{ATB}$ after the town where the affected family came from (Atibaia, in the state of São Paulo, in southeast Brazil). Molecular characterization of α -thalassemia deletions is essential for correct diagnosis of carriers of these deletions and genetic counselling so that new cases of HbH disease or Hb Bart's hydrops fetalis can be prevented.

Keywords: α -thalassemias, $--^{ATB}$ deletion, HbH disease, multiplex ligation-dependent probe amplification.

Introduction

Alpha-thalassemias are the commonest group of hereditary hemoglobin disorders in the world and are characterized by reduced or no synthesis of α -globin chains. The genes that code for the α -globins are duplicated ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) and located in the α -globin cluster (chromosome 16p13.3). Deletions involving this cluster are the most common cause of α -thalassemia and are classified as α^+ (one α gene removed) and α^0 (both α genes removed) according to whether production of the α chains is partially or totally suppressed, respectively [1,2]. The heterozygous state of α^+ -thalassemia is associated with minimal hematological changes, while the homozygous state of α^+ -thalassemia and heterozygous state of α^0 are characterized by moderate hypochromia and microcytosis [3]. The combination of an α^+ allele with an α^0 allele results in HbH disease ($\alpha/-$), which is characterized by mild or severe chronic hemolytic anemia accompanied by jaundice and hepatosplenomegaly with clinical features that vary according to the molecular basis of this form of thalassemia. In contrast, Hb Bart's

hydrops fetalis, which is the result of the functional absence of four α genes ($--/--$), leads to severe tissue hypoxia with intrauterine fetal death or death shortly after birth [2-5].

In Brazil, α -thalassemia is most common in Afro-descendants, and the $-\alpha^{3.7}$ deletion, which is found in 20 to 25 % of Brazilian Afro-descendants, is the most common deletion [6,7]. HbH disease, on the other hand, which is common in Southeast Asia, the Middle East and the Mediterranean [8], is more sporadic in Brazil and is usually caused by a combination of the $-\alpha^{3.7}$ mutation with the $--^{MED}$, $--^{SEA}$ or $-(\alpha)^{20.5}$ deletions [9]. More recently, in 2011, five new cases of HbH disease resulting from a combination of the $-\alpha^{3.7}$ mutation with rare or unknown α^0 deletions were characterized using multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) [10].

Using the same method, we describe here a new α^0 deletion in trans with the $-\alpha^{3.7}$ deletion which resulted in HbH disease in a three-month-old Brazilian girl of mixed ethnic origin (European and African). The girl was referred for investigation of microcytic and hypochromic anemia. Her parents and two sisters were also analyzed. Although they did not present with any clinical complaints, they had hematological changes suggestive of thalassemia. Hematological analysis of the proband and her two-year-old sister revealed HbH.

Material and Methods

This case study was part of a project approved by the Research Ethics Committee at the School of Medical Sciences, Unicamp, (CEP/FCM/Unicamp) under reference number 918/2007 dated February 18, 2007).

A Sysmex hematology analyzer (Sysmex XE2100, Sysmex, Japan) was used for cell counts and hematological indices, and electrophoresis in cellulose acetate in neutral and alkaline pHs and high-performance liquid chromatography (HPLC) (Variant™, Bio-Rad Laboratories, USA) were used in the hemoglobin analysis.

Genomic DNA from each member of the family was extracted from peripheral blood leukocytes using a commercial kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Germany). Screening for the seven most common α -thalassemic deletions [$-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $---^{MED}$, $(\alpha)^{20.5}$, $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{THAI}$] was performed by multiplex-PCR [11], and the $-\alpha^{3.7}$ deletion was confirmed by a deletion-specific PCR [12]; a search for the most common non-deletional mutations (α^{Hph} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{NcoI}$, α^{TSaudi}) was carried out after selected amplification of the α genes and was followed by analysis with the respective restriction

enzymes or, in the case of TSaudi, by a nested PCR specific for this mutation [13]. As the profile of the proband following multiplex-PCR corresponded to the hemizygous state for the $-\alpha^{3.7}$ deletion, the samples were analyzed by MLPA [14,15] using the SALSA MLPA P140 C1 HBA kit (MRC Holland, Holland), which allowed approximately 360 kb of DNA extending from the telomeric region of chromosome 16p to the DCR2 gene to be analyzed. Comparative analysis of the fragments was performed using the Coffalyser.Net software to evaluate possible changes in the number of copies of the α locus in the samples. The hematologic and molecular data for the family studied here are shown in Table 1.

Table 1. Hematologic data for the members of the family studied.

Family member	Proband (3 months)	Mother	Father	Sister (2 years old)	Sister (3 years old)
RBC (RV:M:4.5-6.1; F:4.2-5.4)	4.55	5.81	5.39	5.50	5.07
Hb (RV:M:14-18;F:12-16)	7.75	12.1	14.8	7.6	10.4
MCH (RV:27-32)	17	20.8	27.4	13.8	20.6
MCV (RV:80-99)	54.1	64.2	79.6	41.5	61.4
Hb A ₂ (%) (RV:1.6 – 4)	0.78	2.13	2.80	2.40	2.80
Hb F (%) (RV: < 2)	23.70	0.70	0.90	4.70	1
Hb profile	A ₂ , F, A, Bart's + H (10%)	A ₂ , A	A ₂ , A	A ₂ , A, H	A ₂ , A
α -Genotype	$-\alpha^{3.7}/--^{ATB}$	$\alpha\alpha/--^{ATB}$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	$-\alpha^{3.7}/--^{ATB}$	$\alpha\alpha/--^{ATB}$

RV: reference values RBC: red blood cells ($10^6/\text{mm}^3$); Hb: hemoglobin (g/dL); MCH: mean corpuscular hemoglobin (pg); MCV: mean corpuscular volume (fL).

Results

In addition to the $\alpha^{3.7}$ deletion, a 70 to ~105 kb deletion (positions 169843-239896, according to the UCSC Genome Browser, December 2013 assembly) [16]) involving the α_2 and α_1 genes and contiguous LUC7L and ITFG3 genes (Figure 1) was detected by MLPA. The 5' breakpoint region of the deletion lies between the $\psi\alpha_1$ and α_2 genes, while the 3' breakpoint region is between the ITFG3 and RGS11 genes.

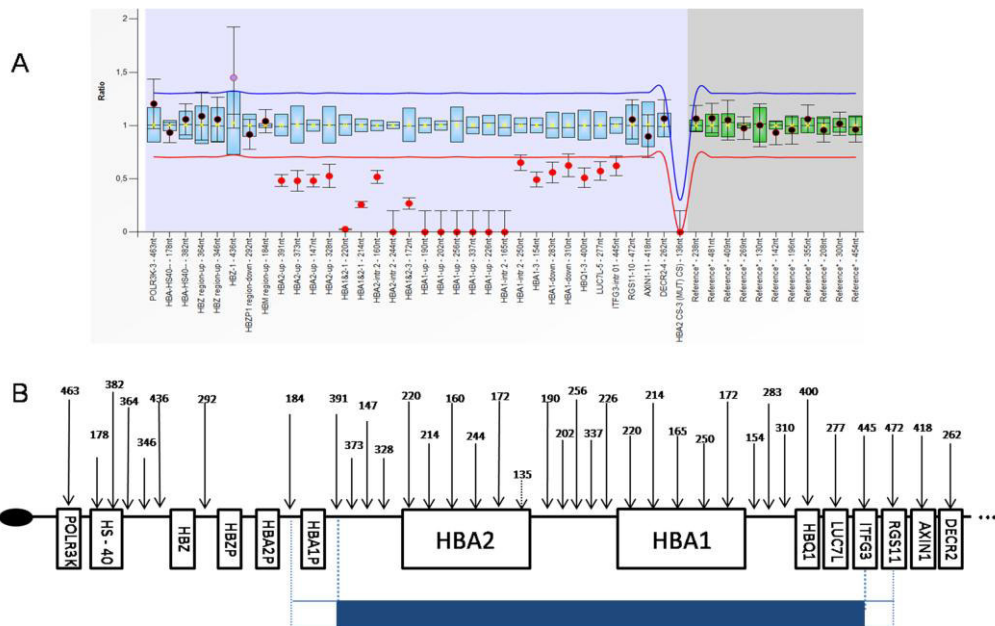


Figure 1. (A) Graph generated by the Coffalyser.Net software with the result for the proband. The x-axis represents the probes, and the y-axis the ratio of the proband intensity to the mean intensity of the reference samples. A ratio of 1 indicates the presence of both alleles, a ratio of 0.5 a loss of 1 allele and 0 the loss of that region in both alleles. (B) Schematic representation of chromosome 16p13.3. The oval represents the telomeric region, the arrows the locations of the probes and the boxes the genes. The blue line corresponds to the deleted fragment, the dotted lines denote the first and last deleted probe and the open regions show where the breakpoints may be.

To our knowledge, this deletion does not have any similarities in terms of its breakpoint regions with other deletions previously described in the literature. We therefore named it --^{ATB} after the city where the patient's family came from (Atibaia, in the state of São Paulo, in southeast Brazil).

Familial analysis revealed that while the patient's father was heterozygous for the $-\alpha^{3.7}$ deletion, her mother and the older of her two sisters, who was three years old at the time of the study, were heterozygous for the α^0 deletion and her other sister, who was two years old, also had HbH disease (Figure 2). In addition to the deletion, sequencing of the hybrid gene ($\alpha_2\alpha_1$) resulting from the $-\alpha^{3.7}$ deletion revealed a polymorphism (C>T) in the 220 probe-binding region in the proband, the younger of her two sisters and her father, causing this probe to have a different pattern from that expected in MLPA (Figure 3).

A.

150 T G G C C C C T C G G C C C C T T T T G G 180

↑

B.

150 T G G C C C C T C G G C C C C T T T T G G 180

↑

Discussion

Molecular characterization of the thalassemias is of vital importance not only for elucidating hematological changes in individuals with this condition and preventing inappropriate treatment being administered, but also for providing them with genetic counselling to prevent new cases of HbH disease and Hb Bart's hydrops fetalis. Couples who are heterozygous for α^0 deletions have a 25% chance of having a child with Hb Bart's hydrops fetalis, whereas if one of them is heterozygous for an α^+ allele while the

other is heterozygous for an α^0 allele, they have a 25% chance of having a child that is doubly heterozygous, i.e., that has HbH disease.

Characterization of deletions is also important because it allows the genotype-phenotype relationship to be inferred for the carrier; in addition, by defining the deletion breakpoints a better understanding of the mechanisms that cause these rearrangements can be gained and new strategies for diagnosing this and other pathologies caused by total or partial loss of chromosome segments can be developed.

New deletions, rare deletions and those that remove the major regulatory element of the α -globin cluster (α -MRE) cannot be detected by conventional methods. MLPA can detect unusual or unknown molecular defects, like that described here, and therefore provides valuable information to support investigations into gene deletions and duplications. However, it does not allow the exact deletion breakpoints to be determined because of the distance between the probes. Use of array comparative genomic hybridization (aCGH) followed by sequencing would allow breakpoints to be defined more accurately, but this technique is expensive and not yet widely available.

To our knowledge there are only two deletions with characteristics similar to those of the deletion described here reported in the literature: a deletion in a Filipino that starts in the same region as the $--^{ATB}$ deletion, downstream of the $\psi\alpha_1$ gene, but ends in the region of the θ gene [17], and the $--^{LOD}$ deletion, found in a child of Arabic origin, that removes all the α cluster, from the POLR3K gene to the ITFG3 gene [18].

Authors' contributions

All the authors took part in the work for this study and prepared, analyzed and reviewed the manuscript. All the authors approved the final version of this manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding any financial or personal relationships or any organizations that could inappropriately influence this article.

Acknowledgments

This study was carried out with financial support from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2014/00984-3) and the National Council for Scientific and

Technological Development (CNPq). N. O. Mota is the recipient of a grant from the Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) in the Brazilian Ministry of Education.

References

- [1] A.V. Hoffbrand, P.A.H. Moss, Fundamentos em Hematologia, sexta ed., Artmed, Porto Alegre, 2006.
- [2] R. Galanello, A. Cao, Alpha-thalassemia, Genetics in Medicine. 13 (2011) 83-88.
- [3] D.J. Weatherall, Beginnings: The molecular pathology of hemoglobin, in: D. Provan, J. Gribben (Eds.), Molecular Hematology, third ed., John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, pp. 1-18.
- [4] H.F. Bunn, B.G. Forget, Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects, first ed., W.B.Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1986.
- [5] M.F. Sonati, F.F. Costa, Defeitos hereditários das hemoglobinas: Talassemias alfa, in: A.C. Lopes, V.A. Neto, Tratado de Clínica Médica, Roca, São Paulo, 2006, pp. 1964-1969.
- [6] M.F. Sonati, F.F. Costa, Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population, Braz. J. Med. Biol. Res. 23 (1990) 395-6.
- [7] M.F. Sonati, S.B. Farah, A.S. Ramalho, F.F. Costa, High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil, Hemoglobin. 15 (1991) 309-11.
- [8] C.L. Harteveld, D.R. Higgs. α -thalassaemia, Orphanet Journal of Rare Diseases. 5 (2010) 13.
- [9] M.R. Wenning, E.M. Kimura, F.F. Costa, S.T.O. Saad, S. Gervásio, S.B. de Jorge, E. Borges, N.M. Silva, M.F. Sonati, α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population, Braz. J. Med. Biol. Res. 33 (2000) 1041-1045.
- [10] C.N. Suemasu, E.M. Kimura, D.M. Oliveira, M.A.C. Bezerra, A.S. Araújo, F.F. Costa, M.F. Sonati, Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population, Braz. J. Med. Biol. Res. 44 (2011) 16-22.
- [11] S.S. Chong, C.D. Boehm, G.R. Cutting, D.R. Higgs, Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of alpha-thalassemia, Clin Chem. 46 (2000) 1692-169.
- [12] C. Dodé, R. Krishnamoorthy, J. Lamb, J. Rochette, Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis, Br. J. Haematol. 83 (1993) 105-11.
- [13] A.C. Kattamis, C. Carnaschella, P. Sivera, S. Surrey, P. Fortina, Human α -thalassemia syndromes: detection of molecular defects, American Journal of Hematology. 53(1996) 81-91.
- [14] J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, F. Diepvens, G. Pals, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, Nucleic Acids Research. 30 (2002) e57.
- [15] C.L. Harteveld, A. Voskamp, M. Phylipsen, N. Akkermans, J.T. den Dunnen, S.J. White, P.C. Giordano PC, 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.* 42 (2005) 922-31.
- [16]UCSC Genome Browser. <http://genome.ucsc.edu/>. Accessed November 2, 2015.
- [17]A. Colosimo, V. Gatta, V. Guida, E. Leodori, E. Foglietta, S. Rinaldi, M.P. Cappabianca, A. Amato, L. Stuppia, B. Dallapiccola, Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements, *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 46 (2011) 139-144.
- [18]O. Gilad, O. Dgany, S. Noy-Lotan, T. Krasnov, S. Elitzur, S. Pissard, I. Kventsel, J. Yacobovich, H. Tamary, Characterization of two unique α -globin gene cluster deletions causing α -thalassemia in Israeli Arabs, *Hemoglobin*. 38 (2014) 319-24.

4.2 CAPÍTULO 2

DELEÇÕES ALFA-TALASSÊMICAS DETECTADAS EM CINCO PACIENTES BRASILEIROS POR *MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE* *AMPLIFICATION* (MLPA)

Mota, NO¹; Kimura, EM¹; Ferreira, RD¹; Pedroso, GA¹; Albuquerque, DM², Ribeiro, DM¹; Santos, MNN¹; Bittar, CM³; Costa, FF²; Sonati, MF¹

¹Laboratório de Hemoglobinopatias, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

²Centro de Hematologia e Hemoterapia, Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor Correspondente: Maria de Fátima Sonati, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, Estado de São Paulo, CEP 13083-970, Brasil; e-mail: sonati@fcm.unicamp.br (principal); sonati_mf@yahoo.com.br (alternativo).

Resumo

As talassemias são as hemoglobinopatias hereditárias mais comuns em todo o mundo, caracterizadas pela síntese reduzida/ausente das cadeias globínicas. As talassemias α resultam da deficiência de síntese de globinas alfa, sendo as deleções parciais/totais dos genes que as codificam (α_2 e α_1), localizados em 16p13.3, suas causas mais comuns – mais que 80% dos casos. O *Multiplex-gap-PCR* é o método mais utilizado na triagem das sete deleções mais comuns [$-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{THAI}$], mas não permite a identificação de deleções novas ou raras. O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) tem se mostrado uma ferramenta importante na caracterização de deleções e delimitação de suas extensões, já que possibilita a quantificação relativa, em número de cópias, de várias regiões genômicas em um único experimento. Esse método foi empregado na identificação das alterações moleculares responsáveis pela talassemia α delecional em cinco pacientes brasileiros, não relacionados, três deles com Doença da Hb H. As deleções encontradas variaram de 15 a 225 kb de DNA, removendo especificamente os genes α , todo o *cluster* α , ou apenas o α -Major Regulatory Element (α -MRE). Elas são raras e guardam similaridade com deleções previamente descritas em outras populações, porém somente a exata determinação de seus *breakpoints* pode definir se se tratam de deleções idênticas ou não. Esses resultados enfatizam a diversidade de alterações moleculares relacionadas às talassemias α em nossa população.

Palavras chave: Talassemias α , Doença da Hb H, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, População brasileira.

Introdução

As talassemias estão entre as doenças genéticas mais frequentemente encontradas nas populações e são causadas por mutações que afetam os genes de globina, reduzindo ou abolindo completamente a síntese de uma ou mais cadeias globínicas (BUNN & FORGET, 1986; WEATHERALL & CLEGG, 2001; HARTEVELD & HIGGS, 2010; GALANELLO & CAO, 2011). As talassemias α , relacionadas à deficiência de síntese das cadeias α da hemoglobina, são geralmente

causadas por deleções, que afetam integral ou parcialmente os genes α , duplicados (α_2 e α_1) e localizados no *cluster* α , em 16p13.3. Mais raramente, as talassemias α podem ser ocasionadas por deleções no elemento regulatório do cluster α (α -Major Regulatory Element, α -MRE) (HARTEVELD & HIGGS, 2010). A perda funcional de um gene α no genoma haplóide leva à formação do alelo α^+ ($-\alpha$), enquanto a perda dos dois genes α resulta no alelo α^0 ($--$) (BUNN & FORGET, 1986; WEATHERALL, 2001).

Os diferentes fenótipos das talassemias α refletem o número de genes afetados. Heterozigotos da talassemia α^+ ($-\alpha/\alpha$) apresentam alterações hematológicas mínimas (ou mesmo ausentes), enquanto os homozigotos dessa forma ($-\alpha/-\alpha$), bem como os heterozigotos do alelo α^0 ($--/\alpha$), revelam a presença de hemácias microcíticas e hipocrômicas. A associação do alelo α^0 com o alelo α^+ ($--/-\alpha$) resulta na Doença da Hb H, uma anemia hemolítica crônica, de intensidade moderada a grave, com icterícia e hepatoesplenomegalia e presença de diferentes percentuais de Hb H, tetrâmero instável de cadeias β (β_4), no sangue periférico. A homozigose do alelo α^0 ($--/--$) leva à Hidropisia Fetal por Hb Bart's, variante com afinidade muito elevada pelo O_2 que resulta em hipóxia tecidual, com anemia grave e morte intra-uterina ou logo após o nascimento caso um regime de transfusão sanguínea intra-útero, seguido de transplante de medula óssea após o nascimento, não venha a ser adotado (BUNN & FORGET, 1986; WEATHERALL & CLEGG, 2001; BORGNA-PIGNATTI & GALANELLO, 2009; HIGGS, 2009).

Estima-se que a talassemia α atinja cerca de 5% da população mundial (PIEL & WEATHERALL, 2014). No Brasil, a frequência da deleção $-\alpha^{3,7}$, causa mais comum de talassemia α nas populações, é elevada em indivíduos de origem africana, chegando a percentuais próximos a 30%, dependendo da região investigada (SONATI & COSTA, 1990; SONATI *et al.*, 1991; COUTO *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2005; ALCOFORADO *et al.*, 2012). A Doença da Hb H é esporádica, com poucos relatos no Brasil (SONATI *et al.*, 1992; WENNING *et al.*, 2000; WENNING *et al.*, 2002; KIMURA *et al.*, 2009; WENNING *et al.*, 2009) e é geralmente causada pela associação da mutação $-\alpha^{3,7}$ com as deleções $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20,5}$ e $--^{SEA}$, sendo estes os alelos α^0 mais frequentes nas populações de origem Mediterrânea (os dois primeiros) e do Sudeste Asiático. Outros dois alelos, $--^{FIL}$ e $--^{THAI}$, apresentam elevadas frequências nas populações das Filipinas e da Tailândia, respectivamente. A presença destas deleções, juntamente com a $-\alpha^{4,2}$, segunda causa mais frequente de talassemia α^+ , são, desde o ano

2000, facilmente diagnosticadas através do *Multiplex-gap-PCR* (CHONG *et al.*, 2000); essa técnica, no entanto, é limitada à triagem de deleções conhecidas. O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) (SCHOUTEN *et al.*, 2002) é um método sensível que permite detectar e caracterizar deleções ou duplicações, novas ou raras, de segmentos gênicos de diferentes extensões, e tem sido aplicado ao estudo das hemoglobinopatias delecionais desde 2005 (HARTEVELD *et al.*, 2005). Suemasu *et al.*, em 2011, utilizaram o MLPA para caracterizar as deleções α^0 de cinco pacientes brasileiros com Doença da H; nós também o empregamos para identificar as bases moleculares da talassemia α de outros cinco pacientes (quatro famílias), sendo três deles com Doença da Hb H e dois, heterozigotos de alelos α^0 .

Pacientes e Métodos

Este estudo caso fez parte de um projeto 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.

Cinco pacientes não relacionados com suspeita de talassemia α foram encaminhados ao nosso laboratório para investigação. Três deles tinham Doença da Hb H e apresentavam, no *Multiplex-gap-PCR*, padrão compatível com a homozigose da deleção $-\alpha^{3.7}$; os dois outros pacientes apresentavam hemácias microcíticas e hipocrômicas (VCM < 80 fl e HCM < 27 pg), um deles com anemia, mas ambos com status de ferro normal e sem alterações moleculares detectadas no *Multiplex-gap-PCR*.

Os índices hematológicos foram determinados através de contador eletrônico de células (Sysmex XE2100, Sysmex, Japan) e a avaliação e quantificação das hemoglobinas foi realizada por eletroforese em acetato de celulose, nos pHs alcalino e neutro, e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de troca catiônica (Variant™, Bio-Rad Laboratories, USA). A Hb H foi confirmada por testes de instabilidade da Hb e pesquisa de corpúsculos de inclusão de Hb H e corpos de Heinz (DACIE & LEWIS, 2006).

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico através de kit de extração comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Germany). As sete deleções mais comuns foram triadas pelo *Multiplex-gap-PCR* (CHONG *et al.*, 2000). As mutações não-delecionais mais comumente relacionadas à talassemia α

(α^{Hph} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$, α^{TSaudi}) também foram investigadas, por amplificação seletiva dos genes α , seguida de análise com as respectivas enzimas de restrição ou, no caso da TSaudi, de *nested* PCR específica para a presença da mutação (KATTAMIS *et al.*, 1996).

A deleção $-\alpha^{3.7}$, detectada inicialmente em “padrão de homozigose” nos três pacientes com Doença da Hb H, foi confirmada por PCR específico (DODÉ, *et al.*, 1993) e pelo MLPA (*kit* SALSA MLPA P140 C1 HBA, *MRC Holland*, Holanda), usado para avaliação de aproximadamente 360 kb de DNA, da região telomérica do cromossomo 16p até o gene DECR2. A análise comparativa dos fragmentos e a avaliação do número de cópias dos alelos α nas amostras foram realizadas através do *software Coffalyser*.

Dos cinco pacientes estudados, quatro tinham familiares disponíveis para análise. Os dados hematológicos e moleculares inicialmente encontrados estão dispostos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Dados hematológicos e moleculares dos pacientes P1, P2, P3, P4 e seus respectivos familiares.

Casos	P1	MP1	PP1	IP1	P2	MP2	PP2	IP2	P3	FP3	P4
Idade/Gênero	17/M	42/F	42/M	14/M	35/F	-/F	-/M	-/M	58/F	24/F	-/F
GV (10 ⁶ /mm ³) VR: M:4,56,1/F:4,2-5,4	5,43	4,79	6,61	4,94	5,50	5,72	3,94	5,64	5,50	5,60	5,00
Hb (g/dL) VR: M: 14-18/F: 12-16	8,8	12,4	13,5	12,3	11,2	11,8	13	11,7	12,5	11,8	8,3
HTC (%) VR:M: 41-52/F:36-46	30,4	38,4	44,2	38,4	35,9	39	39,7	37,6	41,4	36,6	29,7
VCM (fl) VR: M: 81-99/F: 80-96	56	80,2	66,9	77,7	65,3	68,2	100,8	66,7	70,4	65,4	59,4
HCM (pg) VR: 27-32	16,2	25,9	20,4	24,9	20,4	20,6	33	20,7	22,4	21,1	16,6
RDW (%) VR:10-15	24,4	14,5	16,1	12,9	15,1	17,3	14,2	14,5	16,4	14,7	-
Perfil Hb	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A,H, Bart's
Hb A ₂ (%) VR: 1,5- 3,5	1,6	2,9	2,4	2,8	2,6	2,4	2,6	2,7	2,5	-	0,8
Hb F (%) VR: <2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,6	0,7	0,3	0,6	0,4	-	1,7
Hb H (%)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,6
Testes de instabilidade*	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
Corpos de Heinz	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
Corpúsculos de Inclusão de Hb H	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
Genótipos	--/- $\alpha^{3,7}$	- $\alpha^{3,7}$ / $\alpha\alpha$	--/ $\alpha\alpha$	- $\alpha^{3,7}$ / $\alpha\alpha$	--/ $\alpha\alpha$	--/ $\alpha\alpha$	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	--/ $\alpha\alpha$	--/ $\alpha\alpha$	--/ $\alpha\alpha$	--/- $\alpha^{3,7}$

P: probando; M: masculino; F: feminino; m: meses; PP: pai do probando; MP: mãe do probando; IP: irmão/irmã do probando; GV: glóbulos vermelhos; VR: valores de referência; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; RDW: *Red cell distribution width*; *Testes de instabilidade: n-Butanol, Isopropanol, Instabilidade Térmica.

Tabela 2. Dados hematológicos e moleculares do paciente 5 e seus familiares.

Casos	P5	MP5	PP5	IP5	IP5	IP5	IP5	IP5	IP5
Idade/Gênero	2m/F	40/F	46/M	10/M	13/M	18/F	19/F	20/M	22/M
GV ($10^6/\text{mm}^3$) VR: M:4,56,1/F:4,2-5,4	4,64	5,41	5,51	5,26	5,97	5,34	5,47	5,33	5,49
Hb (g/dL) VR: M: 14-18/F: 12-16	8,1	14,3	12,8	8,9	9,9	11,3	11,4	16,2	14,5
HTC (%) VR:M: 41-52/F:36-46	28,9	44,3	39,9	32,5	35,6	36,8	36,5	47,5	45,9
VCM (fl) VR: M: 81-99/F: 80-96	62,3	81,9	72,4	61,8	59,6	68,9	66,7	89,1	83,6
HCM (pg) VR: 27-32	17,5	26,4	23,2	16,9	16,6	21,2	20,8	30,4	26,4
RDW (%) VR:10-15	26	13,9	15,2	24,6	21,4	14,9	14,9	12,8	13,3
Perfil Hb	A ₂ ,A,H, Bart's	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A,H	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A	A ₂ ,A
Hb A ₂ (%) VR: 1,5- 3,5	1,0	2,5	1,7	1,6	1,8	2,7	2,7	2,7	0,1
Hb F (%) VR: <2	22,6	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0	2,2
Hb H (%) (Bart's + H)	18,9	-	-	3,6	4,2	-	-	-	-
Testes de instabilidade*	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Corpos de Heinz	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Corpúsculos de Inclusão de Hb H	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Genótipos	--/- $\alpha^{3,7}$	- $\alpha^{3,7}$ /aa	--/aa	--/- $\alpha^{3,7}$	--/- $\alpha^{3,7}$	--/aa	--/aa	aa/aa	- $\alpha^{3,7}$ /aa

P: probando; M: masculino; F: feminino; m: meses; PP: pai do probando; MP: mãe do probando; IP: irmão/irmã do probando; GV: glóbulos vermelhos; VR: valores de referência; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; RDW: *Red cell distribution width*; *Testes de instabilidade: n-Butanol, Isopropanol, Instabilidade Térmica.

Resultados

Nos três casos com Doença da Hb H (P1, P4 e P5) foi confirmada a presença da deleção $-\alpha^{3.7}$ em associação com deleções α^0 , enquanto os dois outros casos (P2 e P3) os alelos α^0 encontravam-se combinados com alelos normais ($--/\alpha\alpha$). O P1 e o P3 apresentaram o mesmo padrão delecional no MLPA, envolvendo as sondas 318 a 283, com remoção que abrange desde o $\psi\zeta$ (pseudogene zeta) até a região *down-stream* do gene α_1 . Já no P2 foi encontrada uma deleção restrita à região do α -MRE, envolvendo as sondas 236 a 364, com permanência dos genes do *cluster* α , estruturalmente intactos. O P4 apresentou uma alteração entre as sondas 292 e 400, correspondente a uma deleção que também se estende desde o $\psi\zeta$ até a região *downstream* do gene α_1 , e o P5 uma deleção removendo desde o α -MRE até parte do gene RGS11, envolvendo as sondas 463 a 472. A representação esquemática das cinco deleções detectadas encontra-se na Figura 1, enquanto os heredogramas das quatro famílias estudadas encontram-se na Figura 2.

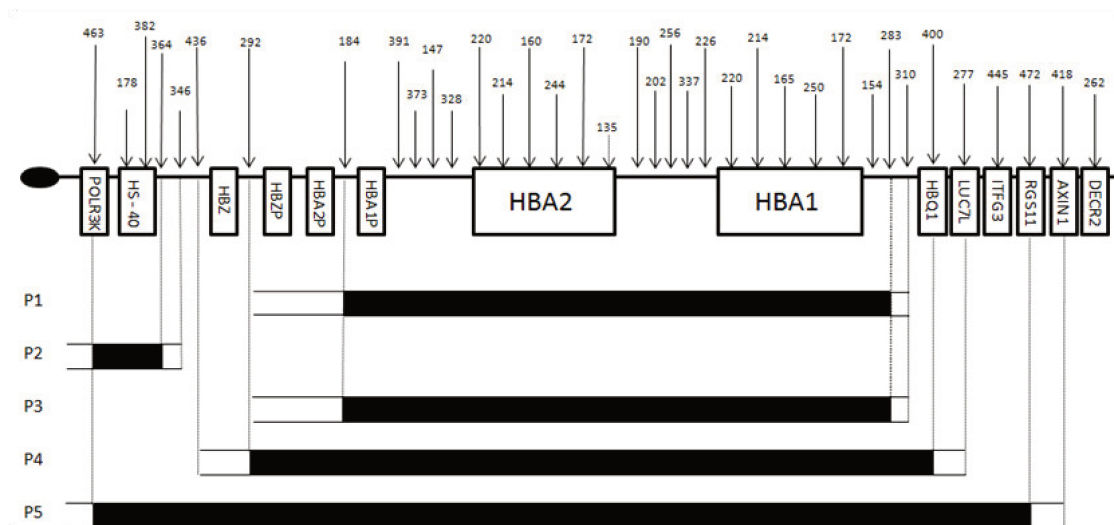


Figura 1. Representação esquemática do 16p13.3. A forma oval indica a região telomérica, as flechas representam as localizações das sondas, enquanto as caixas representam os genes. As barras pretas representam os fragmento deletados, as linhas pontilhadas marcam a primeira e a última sonda deletadas e as regiões em aberto marcam os locais onde possivelmente estão localizados os *breakpoints* (Adaptado de MRC-Holland, 2014).

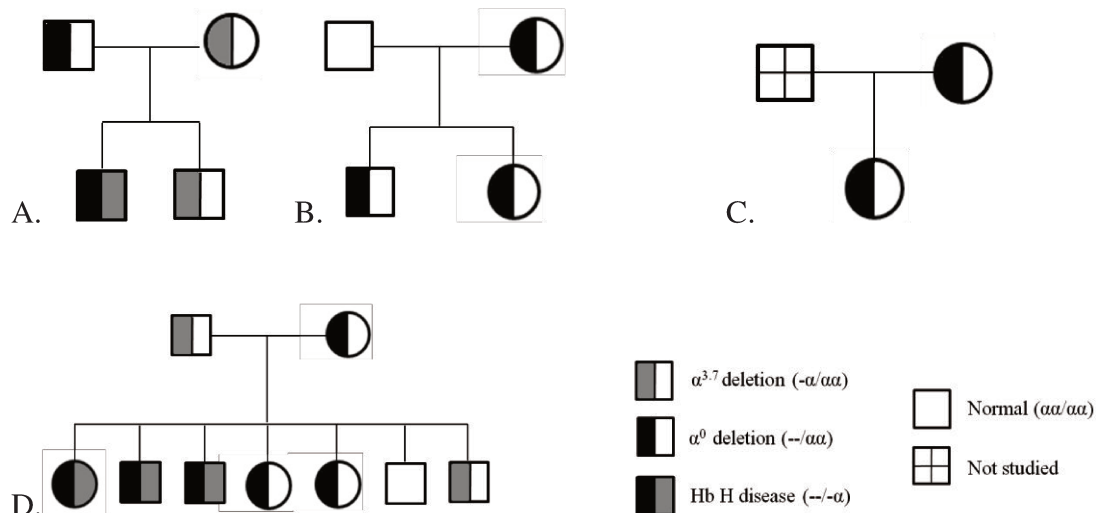


Figura 2. Heredogramas das famílias estudadas. A. O probando (P1) tem Doença da Hb H (deleções $\alpha^{3.7}$ e α^0), enquanto sua mãe e irmão possuem a deleção $\alpha^{3.7}$ e seu pai possui a deleção α^0 . B. O probando (P2), sua mãe e irmão possuem a deleção α^0 , enquanto seu pai não apresenta alterações. C. O P3 e sua filha são heterozigotas da deleção α^0 e a amostra do marido da paciente não estava disponível. D. O probando (P5) e dois irmãos possuem Doença da Hb H (deleções $\alpha^{3.7}$ e α^0), enquanto que sua mãe e duas irmãs possuem a deleção $\alpha^{3.7}$, seu pai e um irmão possuem a deleção α^0 e um irmão não apresenta alterações.

Discussão

O *Multiplex-gap-PCR* é o método mais utilizado na triagem da talassemia α , sendo capaz de identificar as deleções que mais comumente afetam as populações. Entretanto, há casos de pacientes com valores reduzidos de VCM e HCM, níveis normais ou reduzidos de Hb A₂ e Hb F e *status* de ferro normal que permanecem sem diagnóstico. Nestes é muito importante a investigação de deleções raras ou novas que afetem os genes α e/ou seu elemento regulatório. A associação dessas deleções com aquelas mais frequentes nas populações, como a deleção $-\alpha^{3.7}$, resulta em Doença da Hb H. Mesmo para os heterozigotos, o correto diagnóstico é de suma importância, visto que a microcitose e a hipocromia são frequentemente interpretadas como indicativas da deficiência de ferro (BORGES *et al.*, 2001) e tratadas, equivocadamente, com sulfato ferroso.

No presente estudo, o MLPA foi empregado para identificar as deleções α^0 de cinco pacientes brasileiros não relacionados, casos em que o *Multiplex-PCR* não foi capaz de definir o diagnóstico molecular. Os pacientes P1 e P3 parecem possuir a mesma deleção no MLPA, com a remoção de cerca de 15 kb de DNA envolvendo desde o $\psi\zeta$ (pseudogene zeta) até a região *downstream* do gene α_1 (posições 162735-177934 do USCS *Genome Browser*, Dezembro, 2013); esta deleção é similar àquela descrita por PHYLIPSEN *et al.*, 2010, em três indivíduos não relacionados, sendo um de origem desconhecida, um árabe e um indiano.

No entanto, como a região de *breakpoint* ainda não foi precisamente determinada, não é possível afirmar que se trate, de fato, da mesma deleção. Como são raras, e os pacientes não guardam parentesco entre si, a probabilidade de que os *breakpoints* sejam exatamente iguais é, por outro lado, bastante pequena.

O paciente P2 apresentou uma deleção de cerca de 97 kb que remove apenas a região do α -MRE (posições 46407-143677 do USCS *Genome Browser*, Dezembro, 2013); esta assemelha-se à deleção $(\alpha\alpha)^{MM}$, encontrada por ROMÃO *et al.*, em 1991, em uma criança da Ilha dos Açores, e também detectada em uma família brasileira (WENNING *et al.*, 2002). A mesma ponderação feita acima, porém, é aqui pertinente, podendo eventualmente tratar-se de uma deleção nova.

No paciente P4 foi detectada uma deleção de aproximadamente 22 kb (posições 159487-181215 do USCS *Genome Browser*, Dezembro, 2013), similar a uma deleção também descrita por PHYLIPSEN *et al.*, em 2010, em dois indivíduos não aparentados, um de origem desconhecida e o outro, indiano.

O paciente P5 possui uma deleção de cerca de 225 kb (posições 46407-271806 do USCS *Genome Browser*, Dezembro, 2013), que afeta todo o *cluster* α e o α -MRE, com extensão similar a uma das alterações moleculares descritas por Suemasu *et al.*, em 2011, em um paciente brasileiro.

Os resultados aqui apresentados enfatizam a importância do MLPA na caracterização e dimensionamento de deleções, tanto novas quanto raras, permitindo o conhecimento das bases moleculares da talassemia α quando os métodos convencionais não podem fazê-lo. A caracterização dessas alterações, além de permitir o correto diagnóstico e tratamento dos portadores, é também importante para fins de aconselhamento genético, pois possibilita que os casais conheçam o risco de vir a ter uma criança afetada para que possam tomar uma decisão reprodutiva informada. Ainda, o correto dimensionamento dessas deleções e o conhecimento dos demais genes ou elementos regulatórios nelas envolvidos podem contribuir sobremaneira para uma melhor compreensão sobre os mecanismos de recombinação gênica que ocorrem nessas regiões e sobre a função de genes sobre os quais ainda pouco se sabe.

Agradecimentos

Esse estudo foi realizado com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (2014/00984-3) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico -CNPq. Mota é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES do Ministério da Educação do Brasil.

Referências Bibliográficas

1. Adorno EV, Couto FD, Neto JPM, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública* vol.21 no.1 Rio de Janeiro Jan./Feb. 2005.
2. Alcoforado GHM, Bezerra CM, Lemos TMAM, Oliveira DM, Kimura EM, Costa FF, Sonati MF, Medeiros TMD. Prevalence of α -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 2012; 35, 3, 594-598.
3. Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34:759-762.
4. Borgna-Pignatti, C, Galanello R. Thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
5. Bunn HF, Forget BG. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. 1.ed. Philadelphia, London, Toronto: W.B.Saunders Company; 1986
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. Couto FD, Albuquerque ABL, Adorno V, Neto JPM, Abbehusen LF, Oliveira JLB, Reis MG, Gonçalves MS. α -thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Clin. Lab. Haem.* 2003, 25, 29–34
8. Dacie JV, Lewis SM. *Hematologia Prática*. 9a.ed., Artmed, Porto Alegre; 2006.p.571.
9. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of α -3.7 thalassaemia and alpha alphaalpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol*. 1993 Jan;83(1):105-11.
10. Galanello R, Cao A. Alpha-Thalassemia. *Genetics in Medicine*. 2011; 13, 2.
11. Hartevelde CL, Higgs DR. Review α -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010; 5:13.
12. Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, Giordano PC. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha-

- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*. 2005 Dec; 42(12):922-31.
13. Higgs, DR. α thalassemia. In. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of hemoglobin genetics pathophysiology and clinical management. 2 ed. Nova York: Cambridge, 2009.
 14. Kattamis AC, Carnaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P. Human α -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *American Journal of Hematology*. 1996; 53: 81-91.
 15. Kimura EM, Oliveira DM, Fertrin K, Pinheiro VR, Jorge SEDC, Costa FF, Sonati MF. Hb H disease resulting from the association of a α^0 -thalassemia allele [$-(\alpha)^{20.5}$] with an unstable α -globin variant [Hb Icaria]: First report on the occurrence in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* vol.32 no.4 São Paulo 2009.
 16. Phylipsen M, Prior JF, Lim E, Lingam N, Vogelaar IP, Giordano PC, Finlayson J, Harteveld CL. Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Blood Cells Mol Dis*. 2010; 44:146–151.
 17. Piel FB, Weatherall DJ. The Alpha Thalassemias. *The New England Journal of Medicine*. 2014; Pp 1908-1916.
 18. Romão L, Osório-Almeida L, Higgs DR, Lavinha J, Liebhaber SA. α -Thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the α -globin structural genes. *Blood* 1991;78:1589–1595.
 19. Schouten JP, Mc Elgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg, 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.
 20. Sonati MF, Costa FF. Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population. *Braz J Med Biol Res*. 1990; 23(5):395-6.
 21. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*. 1991; 15(4):309-11.
 22. Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZ, Tavella MH, Costa FF. HbH disease associated with the ($--^{MED}$) deletion in a Brazilian black woman. *Acta Haematol*. 1992;87(3):145-7.
 23. Suemasu CN, Kimura EM, Oliveira DM, Bezerra MAC, Araújo AS, Costa FF, Sonati MF. Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44 (1): 16-22.
 24. UCSC Genome Browser. <http://genome.ucsc.edu/>. Accessed November 2, 2015.

25. Weatherall, DJ. The thalassemias. In. Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. The Molecular Basis of Blood Diseases. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.
26. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes. 4. ed. 2001. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470696705>> Acesso em 07.11.2015.
27. Wenning MR, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervário S, Jorge SB, Borges E, Silva NM, Sonati MF. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. Brazilian Journal of Medicine and Biological Research. 2000; 33: 1041-1045.
28. Wenning MRSC, Harteveld CL, Giordano PC, Kimura EM, Saad STO, Costa FF, Sonati MF. Hemoglobin H disease resulting from the association of the - α 3.7 rightward deletion and the (aa)^{MM} deletion in a Brazilian patient. Eur J Haematol 2002; 69: 179–181.
29. Wenning MR, Mello MP, Andrade TG, Lanaro C, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF, Sonati MF. PIP4KIIA and beta-globin: transcripts differentially expressed in reticulocytes and associated with high levels of Hb H in two siblings with Hb H disease. Eur J Haematol. 2009 Nov;83(5):490-3.

4.3 CAPÍTULO 3

ASSOCIAÇÃO DAS DELEÇÕES - $\alpha^{3,7}$ E --^{MEDII} CAUSANDO DOENÇA DA HB H EM PACIENTE BRASILEIRO

Ferreira, RD¹; Mota, NO¹; Kimura, EM¹; Pedroso, GA¹; Sonati, MF¹

¹Laboratório de Hemoglobinopatias, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

Autor Correspondente: Maria de Fátima Sonati, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, Estado de São Paulo, CEP 13083-970, Brasil; e-mail: sonati@fcm.unicamp.br (principal); sonati_mf@yahoo.com.br (alternativo).

Introdução

A talassemia α é uma doença hereditária, de distribuição mundial, caracterizada pela síntese reduzida ou ausente das cadeias α da hemoglobina. Deleções envolvendo os genes responsáveis por essas cadeias, duplicados (α_2 e α_1) e localizados no *cluster* α (16p13.3), são as causas mais comuns da doença, respondendo por mais de 80% dos casos. A perda de um gene α funcional no genoma haplóide resulta na talassemia α^+ , que pode ocorrer em heterozigose ($-\alpha/\alpha$) ou em homozigose ($-\alpha/-\alpha$), enquanto o comprometimento dos dois genes α corresponde à talassemia α^0 , que também pode ocorrer em heterozigose ($--/\alpha$) ou em homozigose ($--/--$). Um quinto genótipo α -talassêmico resulta da combinação destes dois alelos, α^0 e α^+ ($-\alpha/--$). Enquanto os três primeiros genótipos estão associados a alterações hematológicas mínimas e o último resulta na Hidropisia Fetal por Hb Bart's, com morte intra-uterina ou logo após o nascimento, a dupla heterozigose α^0/α^+ ($-\alpha/--$) leva à Doença da Hb H, caracterizada pela formação de tetrâmeros instáveis de cadeias β (β_4) que levam à anemia hemolítica crônica, de intensidade moderada a grave, com microcitose, hipocromia, icterícia e hepatoesplenomegalia (BUNN & FORGET, 1986; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

São sete as deleções que mais comumente afetam as populações: $-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20,5}$, $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{THAI}$, sendo o método mais empregado em sua triagem o *Multiplex-gap-Polymerase chain reaction (Multiplex-gap-PCR)* (CHONG *et al.*, 2000); quando a base molecular da doença não é assim identificada, a utilização da técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)* permite a detecção e caracterização de deleções raras ou novas, dos genes α , do cluster inteiro e/ou do elemento regulatório α -MRE (*Major Regulatory Element*, ou HS-40), localizado a 40 kb de distância do gene ζ (BUNN & FORGET, 1986; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Descrevemos aqui o caso de um paciente brasileiro com Doença de Hb H causada pela combinação da deleção $-\alpha^{3,7}$, causa mais comum de talassemia α nas populações, com uma deleção α^0 rara identificada somente pelo MLPA.

Relato de Caso

Um paciente brasileiro, branco, de descendência italiana, do sexo masculino, com 31 anos de idade, proveniente de Araraquara–São Paulo, foi encaminhado ao nosso laboratório para investigação de anemia microcítica e hipocrômica. A análise hematológica foi realizada

através de contador eletrônico de células (*Sysmex XE5000*, *Sysmex*, Japan) e as hemoglobinas avaliadas através de eletroforese em acetato de celulose, em pHs alcalino e neutro, e de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de troca catiônica (*Variant II™*, *Bio-Rad Laboratories*, Hercules, California, USA). Além das frações de Hb A₂ e Hb A, foram também detectados 4% de Hb H. Os pais do paciente também foram analisados e, apesar da ausência de queixas clínicas, ambos apresentaram alterações hematológicas discretas, compatíveis com a presença de talassemia α .

A análise molecular inicial consistiu do *Multiplex-gap-PCR* (CHONG *et al.*, 2000), que revelou, na amostra do paciente, padrão compatível com homozigose da deleção $-\alpha^{3.7}$, resultado que não explicaria a Doença da Hb H. As amostras então foram submetidas ao MLPA utilizando-se o *kit* SALSA MLPA P140 C1 HBA (*MRC Holland*, Holanda) (SCHOUTEN *et al.*, 2002; HARTEVELD *et al.*, 2005), que permitiu a avaliação de aproximadamente 360 kb de DNA, da região telomérica de 16p até o gene *DECR2*. A análise comparativa dos fragmentos foi realizada pelo *software Coffalyser*, para identificação de possíveis alterações no número de cópias dos alelos α .

Além da $-\alpha^{3.7}$, o MLPA detectou uma extensa deleção, de cerca de 30 kb de DNA, removendo os genes ζ , $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 e α_1 (Figura 1A). Esta abrangência era compatível com duas deleções previamente descritas: a $--^{DUTCH}$, de origem holandesa (HARTEVELD *et al.*, 1997), e a $--^{MEDII}$, de origem mediterrânea, com incidência no sul da Itália, Grécia e Turquia (KUTLAR *et al.*, 1989; HARTEVELD & HIGGS, 2010). A distinção entre elas pode ser feita através de PCR específica (HARTEVELD *et al.*, 1997): o DNA do paciente foi inicialmente amplificado com *primers* distantes dos *breakpoints* das deleções, e o produto reamplificado em um *nested-PCR* com *primers* que flanqueiam os *breakpoints* de ambas. Os fragmentos formados na presença da deleção $--^{MEDII}$ são de aproximadamente 1,37 e 1,75 kb, enquanto na deleção $--^{DUTCH}$ são de 1,03 e 1,41 kb. Nossos resultados indicaram se tratar da deleção $--^{MEDII}$ (Figura 1B), detectada no paciente em combinação com a deleção $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/--^{MEDII}$), e em seu pai, em combinação com o alelo normal ($--^{MEDII}/\alpha\alpha$). A mãe do paciente era heterozigota da deleção $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). Os dados hematológicos e moleculares desta família encontram-se na Tabela 1.

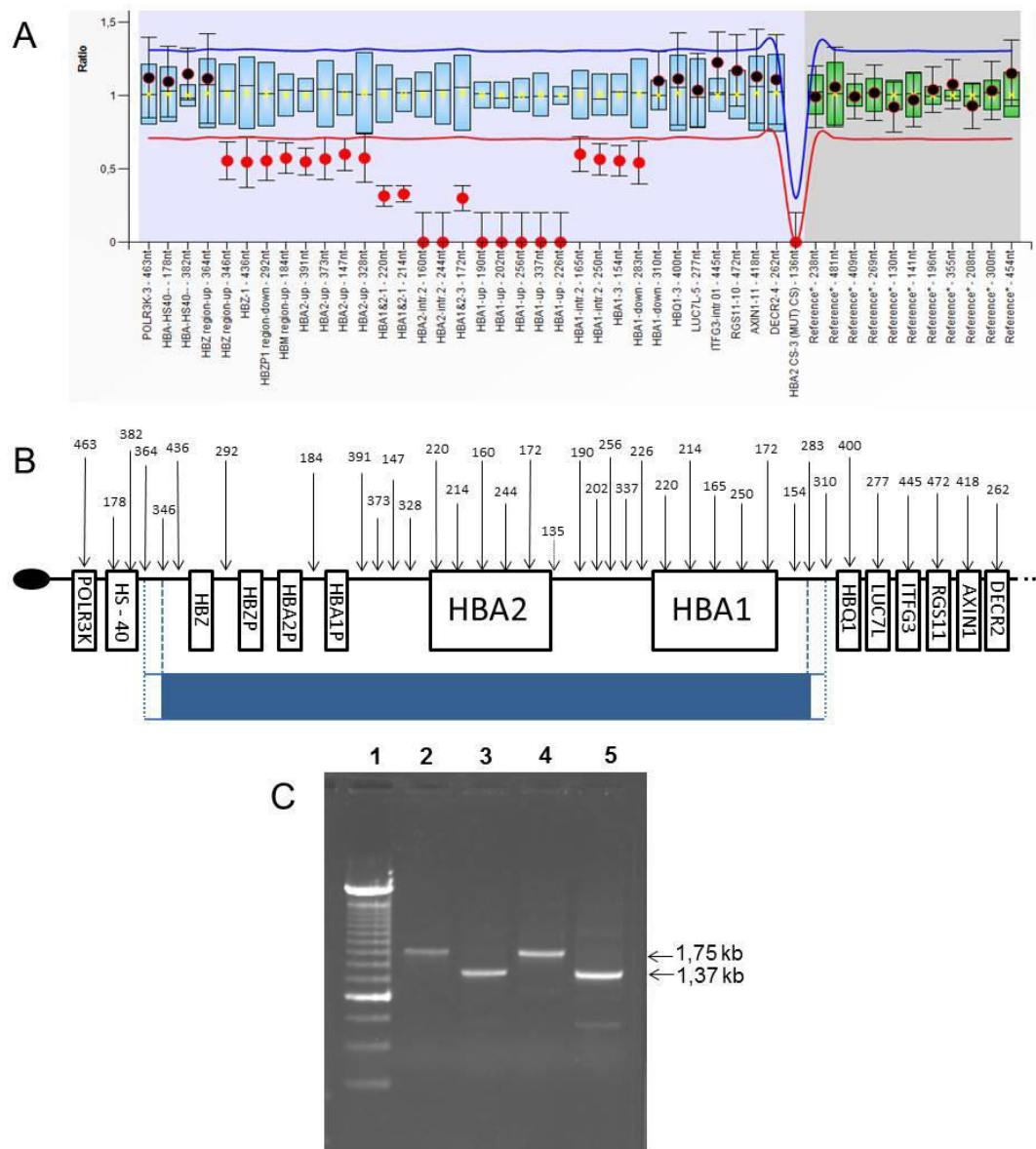


Figura 1. (A) Gráfico gerado pelo *software* *Coffalyser* com o resultado do paciente. No eixo X estão representadas as sondas. O eixo Y representa a razão entre a intensidade do sinal das sondas do probando dividido pela média dos controles normais utilizados. A razão 1 indica a presença de ambos os alelos, a razão 0,5 perda de um alelo e o 0 representa a perda daquela região em ambos os alelos. (B) Representação esquemática do 16p13.3. A forma oval indica a região telomérica, as flechas representam as localizações das sondas, enquanto as caixas representam os genes. A barra azul representa o fragmento deletado, as linhas pontilhadas marcam a primeira e a última sonda deletadas e as regiões em aberto marcam os locais onde possivelmente estão localizados os breakpoints (Adaptado de *MRC-Holland*, 2014). (C) Gel de agarose com a amplificação do *nested-PCR* descrito por HARTEVELD *et al*, 1997. As bandas que correspondem à --^{MEDII} são de 1,37 e 1,75 kb; já para a deleção --^{DUTCH} 1,03 e 1,41 kb. A amostra 1 é o marcador de peso molecular (*Ladder* 250 pb); as amostras 2 e 3 são do paciente e as 4 e 5 de seu pai.

Tabela 1. Dados hematológicos da família investigada.

Membros da Família	Paciente	Pai	Mãe
HM (VR:M:4,5-6,1;F:4,2-5,4)	5,55	6,39	4,74
Hb (VR:M:14-18;F:12-16)	9,2	13,8	12,5
Ht (%) (VR: M:41-52;F:36-46)	16,6	44,0	38,6
VCM (VR:80-99)	61,6	81,4	68,9
HCM (VR:27-32)	34,2	21,6	26,4
RDW (%) (VR:10-15)	25,5	14,5	15,3
Ret (%) (VR:0,5-2,5)	2,77	1,49	0,98
Perfil de Hbs	A ₂ , A, H	A ₂ , A	A ₂ , A
Hb A ₂ (%) (RV:1,6 – 4)	1,5	2,70	2,40
Hb F (%) (VR: < 2)	0,5	0,20	0,20
Hb H (%)	4,0%	-	-
Corpos de Heinz/ Corpúsculos de Hb H	Positivo	Negativo	Negativo
Genótipo α	$-\alpha^{3,7}/--^{MEDII}$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3,7}$	$\alpha\alpha/--^{MEDII}$

VR: Valores de referência; HM: Número de hemácias ($10^6/\text{mm}^3$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Ht: Hematócrito (%); VCM: Volume Corpuscular Médio (fl); HCM: Hemoglobina Corpuscular Média (pg); RDW: Anisocitose (%); Ret: Número de Reticulócitos (%);

Discussão

As talassemias α são comumente causadas por deleções. A mais comum delas é a $-\alpha^{3,7}$, que ocorre na população brasileira de afro-descendência com frequências que variam de 20 a 25% (SONATI *et al.*, 1990; SONATI *et al.*, 1991). A Doença de Hb H é esporádica no país, e é geralmente causada pela combinação da mutação $-\alpha^{3,7}$ com as deleções $--^{MED}$, $--^{SEA}$ ou $-(\alpha)^{20.5}$ (WENNING *et al.*, 2000). A utilização do método de MLPA, no entanto, vem possibilitando a detecção de deleções α^0 mais raras ou mesmo ainda não descritas, inclusive aquelas que afetam apenas o elemento regulatório. Na família aqui analisada, a Doença de Hb H foi resultante da combinação do alelo $-\alpha^{3,7}$ com a deleção $--^{MEDII}$, alteração esta pela primeira vez encontrada na população brasileira e na América Latina.

Aqui, a análise molecular pelo MLPA, confirmada pela análise familiar, foi importante para o esclarecimento diagnóstico. Com sua ajuda tem sido possível observar a grande diversidade de mutações que afetam os genes de globinas em nossa população.

Referências Bibliográficas

1. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. 1.ed. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company; 1986.
2. Harteveld CL, Higgs DR. Review α -thalassaemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010; 5:13.
3. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast Asian deletional determinants of alpha-thalassemia. ClinChem 2000; 46: 1692-169.
4. Schouten JP, Mc Elgunn CJ, Waaijer R, ZwijnenburgD, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation – dependent probe amplification. Nucleic Acids Research. 2002; 30(12): e57.
5. 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.
6. Harteveld KL, Losekoot M, Fodde R, Giordano PC, Bernini LF. The involvement of Alu repeats in recombination events at the α -globin gene cluster: characterization of two α^0 -thalassaemia deletion breakpoints. HumGenet. 1997; 99:528–534.
7. Kutlar F, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Gurgey A, Altay Ç, Efremov GD, *et al.* The levels of 7, and 8 chains in patients with Hb H disease. Human Genet. 1989. 82:179-186.
8. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. Hemoglobin. 1991; 15(4):309-11.
9. Sonati MF, Costa FF. Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population. Braz J MedBiol Res. 1990; 23(5):395-6.
10. Wenning MRSC, Kimura EM, Sonati MF. As Talassemias α - Diagnóstico Laboratorial e Molecular. NewsLab 2000; 40: 98-110.

4.4 CAPÍTULO 4

DELETIONAL ALPHA THALASSEMIA 5.2 DETECTED BY MULTIPLEX GAP PCR IN A URUGUAYAN FAMILY

Ana Soler¹, Magdalena Schellotto², Natalia de Oliveira Mota³, Roberta Dorta Ferreira³, Maria de Fatima Sonati³, Julio da Luz¹

¹ Laboratorio de Genética Molecular Humana. CENUR Litoral Norte-sede Salto. Universidad de la República. Salto, Uruguay.

² Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica. Centro Hospitalario Pereira Rosell. Montevideo, Uruguay.

³ Departamento de Patología Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Corresponding author: J. da Luz, Laboratorio de Genética Molecular Humana. CENUR Litoral Norte-sede Salto. Universidad de la República. Salto, Uruguay. General Rivera 1350 ZIP code 50000 Salto, Uruguay. Phone: (598) 47334816, Fax (598) 47322154. e-mail: jdal@fmed.edu.uy (preferred)/jdal@adinet.com.uy (alternative)

Abstract

In Uruguay, alpha thalassemia mutations were introduced predominantly by immigration of Mediterranean's Europeans populations and by slave trade of African populations. Here we report for the first time in Latin America, the presence of $-(\alpha)^{5.2}$ deletion in a Uruguayan family with Italian ancestry using a multiplex gap PCR previously described.

Key words: Hemoglobinopathies, Alpha thalassemia, Deletion, Uruguayan population, Multiplex PCR.

Alpha-thalassemia is a heterogeneous and common genetic disorder of the synthesis of haemoglobin. Alpha-thalassemias are due to a reduction (α^+) or complete suppression (α^0) of α -globin chain synthesis, caused mainly by deletions of one ($-\alpha$) or both ($--$) *HBA* genes. Although less frequent, non-deletional alpha-thalassemia caused by small deletions or point mutations contributes to the spectrum of alpha-thalassemia mutations (1,2).

Alpha-thalassemias occur in high frequencies in tropical and sub-tropical regions of Africa, in the Mediterranean basin and Southeast Asia, where malaria is or has been endemic or in populations that received people from these areas through immigration or slave trade in past centuries (3,4).

The Uruguayan population is composed mainly by the contribution of populations with European ancestry (Italians, Spaniards, Portuguese, Basques, etc) followed in lesser extent by populations with African ancestry (mainly of Bantu-speaking groups) and Native American ancestry. We previously observed, in a pediatric Uruguayan population an alpha thalassemia of 3.3%, with the $-\alpha^{3.7}$ deletion being practically the only mutation founded (5,6).

Here, we report for the first time in Latin America, the presence of $-(\alpha)^{5.2}$ deletion in a Uruguayan family with Italian ancestry using a multiplex gap PCR previously described (7).

The $-(\alpha)^{5.2}$ deletion was reported for the first time in 1980 in a Greek family and was characterized at sequence level in 1994. This deletion eliminates 5201 pb extending from 870 pb 5' of HBA2 gene to the position 591 into of IVS-II of HBA1 gene. The truncated HBA1 gene is not functional and presents a 27 pb duplication corresponding to IVS-2 from HBA1 or HBA2 gene (8,9).

The proband was a 2 years-old-boy who present anemia with hypochromia and microcytosis refractory to oral iron therapy and normal electrophoresis of Hb (Table 1). DNA

from the proband, their parents and maternal grandmother was extracted from venous peripheral blood by the salting out method and the presence of alpha thalassemia mutations was performed by multiplex gap PCR (7) and agarose gel electrophoresis.

Table 1. Hematological and genotypic data of the proband and members of the family under study.

Parameter	Proband	Mother	Father	Grandmother
Age (years)	2	38	38	70
Hb (g/dL)	10.60	13.60	14.80	14.00
RBC ($10^{12}/L$)	5.45	6.28	5.13	4.45
PCV (L/L)	0.32	0.41	0.44	0.39
MCV (fL)	58.50	65.20	85.30	88.70
MCH (pg)	19.40	21.70	28.80	31.60
MCHC (g/dL)	33.20	33.30	33.70	35.60
RDW (%)	17.20	19.10	12.00	16.20
Serum iron ($\mu\text{mol/L}$)	15.22	-	-	-
HBA (%)	97.1	-	-	-
HBA2 (%)	2.9	-	-	-
Alpha thal genotype	$\alpha\alpha/--^{5.2}$	$\alpha\alpha/--^{5.2}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

Hb: hemoglobin; RBC: red blood cell count; PCV: packed cell volume; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular Hb; MCHC: mean corpuscular Hb concentration.

The proband and his mother showed an extra band of approximately 700 pb that was not was observed in the father and in controls (Figure 1A). In order to identify which pair of primers was involved in the amplification of this extra band, we make several PCRs with different primers combinations. The amplification of this extra band was observed only with primers ($\alpha 2/3.7\text{-F}$ & $3.7/20.5\text{-R}$) that amplified the $-\alpha^{3.7}$ deletion (Figure 1B).

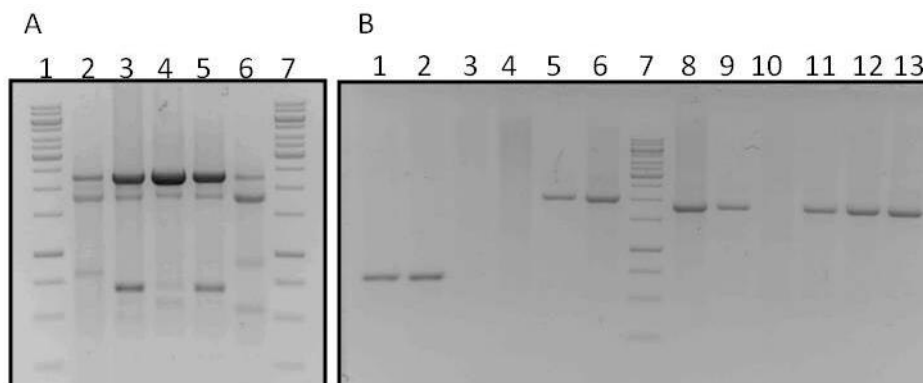


Figure 1. Analysis of α -globin deletions in the family under study. **A.** Multiplex gap PCR in members of family and external control samples. Lane 1 and 7: molecular weight marker (Thermo Scientific O'GeneRuler 1Kb plus DNA ladder); Lane 2: $--^{MED}/\alpha\alpha$; Lane 3: proband's mother ; Lane 4: proband's father ; Lane 5: proband; Lane 6: $--^{FIL}/\alpha\alpha$. **B.** PCR with primers for $-(\alpha)^{3.7}$ deletion (Lanes

1 to 6) and with primers for $\alpha 2$ gene (Lanes 8 to 13). Lane 1 & 13: proband; Lane 2 & 11: proband's mother; Lane 3 & 12: proband's father, Lane 4 & 8: control $\alpha\alpha/\alpha\alpha$; Lane 5 & 9: $-(\alpha)^{3.7}/\alpha\alpha$; Lane 6 & 10: $-(\alpha)^{3.7}/-(\alpha)^{3.7}$; Lane 7: molecular weight marker (Thermo Scientific O'GeneRuler 1Kb plus DNA ladder).

The extra band observed was purified from agarose gel and sequenced with forward and reverse primers ($\alpha 2/3.7$ -F and 3.7/20.5-R). The breakpoints observed and the duplication of 27 nucleotides separated by a tetranucleotide GGTT were the same as previously reported (8), confirming that this extra band represent the presence of the $-(\alpha)^{5.2}$ mutation (data not show).

For additional characterization, the family members were analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA: MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) with a commercial kit (SALSA MLPA kit P140 C1 HBA, MRC-Holland, The Netherlands). The mother and the proband showed a heterozygous deletion extending from 5' of HBA2 gene to the 3' of HBA1 gene (Figure 2 A and B) compatible with $-(\alpha)^{5.2}$ mutation. The higher intensity observed of probe 172 is probably due to the $-(\alpha)^{5.2}$ mutation delete only one of four sites recognized by this probe. This probe recognize a region located 3' of HBA2 and HBA1 genes. In individuals without deletion this probe recognizes the four sites, whereas in individuals heterozygous for $-(\alpha)^{5.2}$ deletion, in which one of the sites of HBA2 gene is deleted, its recognize only three of the sites.

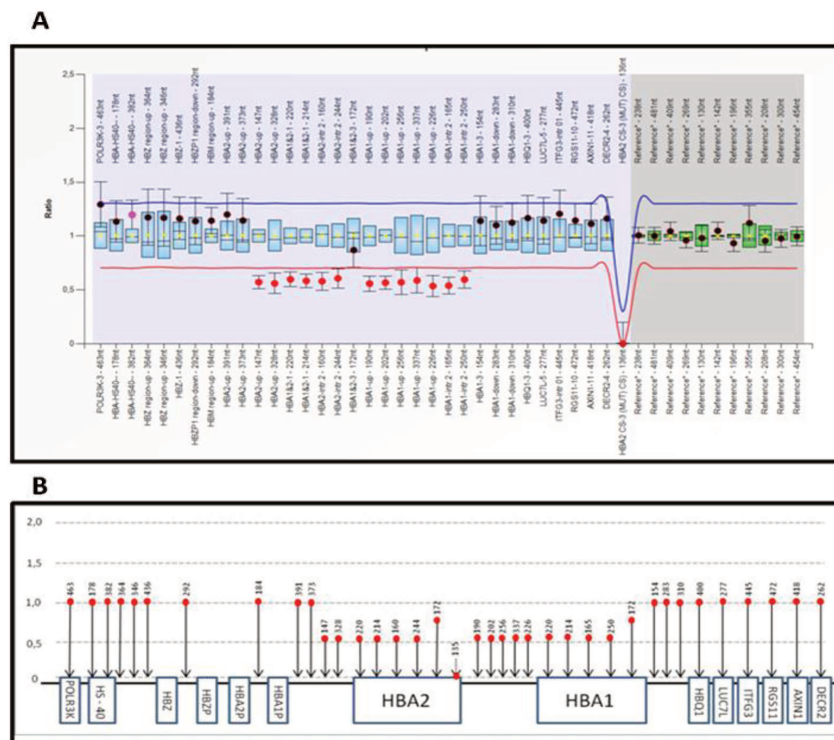


Figure 2. MLPA analysis of the proband. **A.** Schematic representation of relative probe intensity along of α -globin cluster. The upper threshold to deletion was set at 0.75 and the lower threshold for duplications was set at 1.25. **B.** Schematic representation of relative probe intensity over of genes of α -globin cluster and adjacent genes. Levels of intensities below 0.75 (indicative of deletions) extended from 5' to $\alpha 2$ gene to extreme 3' of $\alpha 1$ gene (red dots).

Interestingly, the $-(\alpha)^{5.2}$ deletion presents a duplication in the breakpoints as observed in $-^{\text{MED}}$ and $-^{\text{SA}}$ deletion (10, 11). However, the duplication observed in $-(\alpha)^{5.2}$ deletion is small (27 pb) and not derived of Alu sequences as observed in $-^{\text{SA}}$ deletion. Probably, this duplication was produced by a mechanism like replication slippage and/or reparation mechanism during recombination process.

The amplification of an extra band of 701 pb clearly different in size of expected bands amplified with the multiplex PCR gap previously described (7), indicate that this method is reliable to identification of $-(\alpha)^{5.2}$ mutation. Finally, is necessary to be careful when considering the presence of extra bands as nonspecific when we do multiplex gap PCR.

References

1. Foglietta E, Deidda G, Graziani B et al. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* 1996; 81:387-96
2. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR and Nagel RL. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, Cambridge. 2001
3. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM et al. A review of the molecular genetics of the human α -globin cluster. *Blood*. 1989; 73: 1081-104
4. Weatherall DJ and Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders : an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 704-12
5. Sans M, Salzano FM and Chakraborty R. Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol* 1997; 69:161-70.
6. da Luz J, Avila A, Icasuriaga S et al. Frequency and spectrum of hemoglobinopathy mutations in a paediatric population of Uruguay. *Genet Mol Biol* 2013; 36(3):316-22.
7. Tan AS, Quah T, Low P, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001; 98:250-251.
8. Pressley L, Higgs DR, Aldridge B et al. Characterization of a new α thalassemia 1 defect due to a partial deletion of the α -globin gene complex. *Nucleic Acids Res*. 1980; 8:4889.

9. Fortina P, Parrella T, Sartore M, et al. Interaction of a rare illegitimate recombination event and Poly A addition site mutation resulting in a severe form of α thalassemia. *Blood*. 1994; 81: 3356-3362.
10. Nicholls RD, Fischel-Ghodsian N, Higgs DR. Recombination at the human α -globin gene cluster: Sequence features and topological constraints. *Cell*. 1987: 369-78
11. Shaji RV, Eunice SE, Baidya S et al. Determination of the breakpoint and molecular diagnosis of a common α -thalassaemia-1 deletion in the Indian population. *British Journal of Haematology* 123: 942–947

4.5 CAPÍTULO 5

4.5.1 FINE-TILING ARRAY

O P9 possui Doença da Hb H pela associação da deleção $-\alpha^{3,7}$ com uma extensa deleção, identificada no MLPA em 2011 por Suemasu *et al.* (48), apresentando uma diminuição nos sinais das sondas 1 a 30H (com exceção da 28H), removendo pelo menos 451,5 kb de DNA (Figura 13), comprometendo desde a região telomérica do cromossomo 16 até regiões a jusante do cluster α . Nesse paciente, três sondas do MLPA apresentaram um padrão diferente do esperado, portanto essa deleção poderia estender-se até a posição 583,598 do UCSC *Genome Browser* (65). Houve uma redução nos sinais das sondas 29H e 30H, enquanto a sonda 28H apresentou sinal dentro da normalidade conforme destacado na figura abaixo. Esse resultado poderia ser consequência de uma dupla quebra nas posições delimitadas pelas sondas 28H e 30H, com conseqüente inversão e remoção deste fragmento, deixando a região específica a sonda 28H preservada.

O *Fine-tiling array* revelou que esta extensa deleção remove cerca de 470 kb, da região telomérica até a posição 469,499 do UCSC *Genome Browser* (65), com um fragmento de *breakpoint* de 3.625 pb, demilitado pelas flechas azuis, conforme demonstrado na Figura 14. Com a utilização dessa técnica, foi possível elucidar esse caso; provavelmente polimorfismos nas regiões de ligação das sondas 29H e 30H no MLPA, justificam o padrão apresentado.

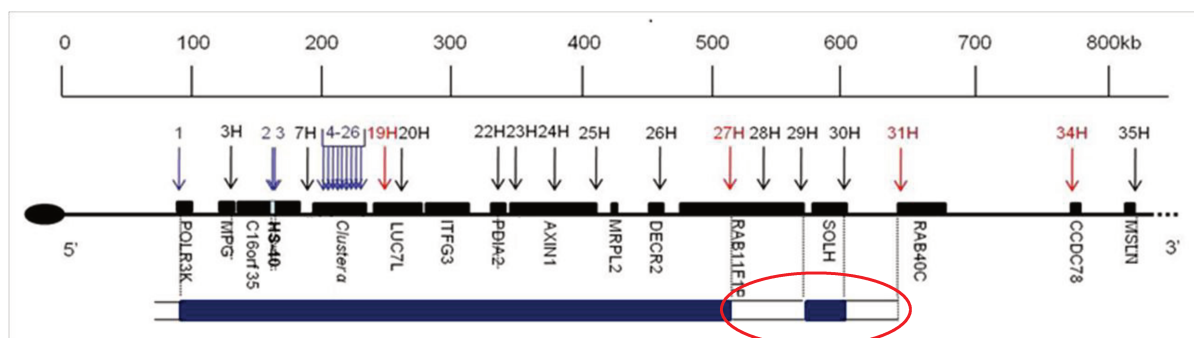


Figura 13. Resultado do MLPA do P9 identificado por Suemasu *et al.*, 2011 (48). Representação esquemática do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), abrangendo uma região de 800 kb contendo o *cluster alpha* e o HS-40. A barra azul representa o fragmento de DNA removido e as caixas brancas representam as possíveis regiões de *breakpoint*.

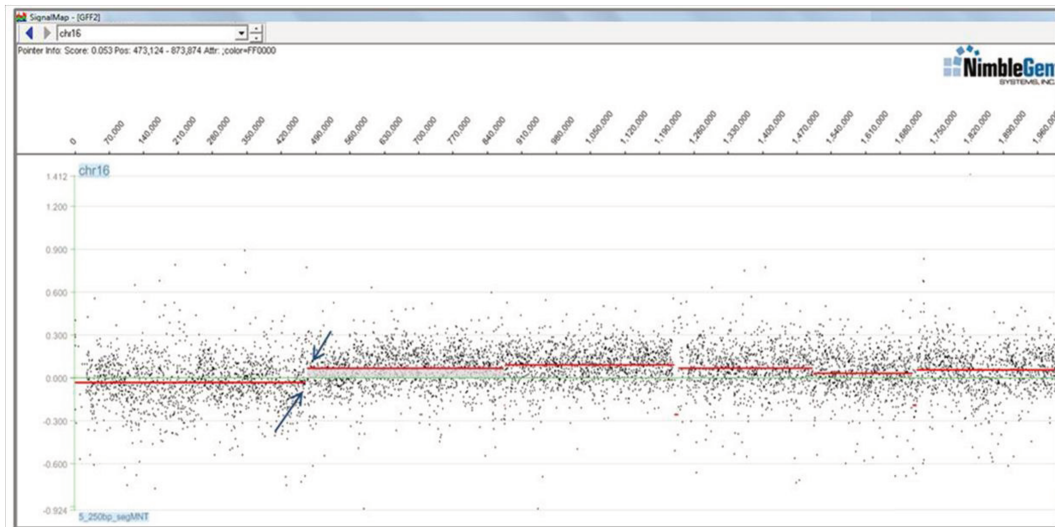


Figura 14. Gráfico do *Fine-tiling array* para o P9. A localização das sondas está no topo do gráfico, as linhas horizontais representam a média de sinal do paciente para a região de interesse. As flechas apontam a região do *breakpoint*.

O P10 apresenta a mesma associação que o P9, porém a deleção α^0 se revelou mais extensa no MLPA, com redução nos sinais das sondas 1 a 30H, conforme ilustrado na Figura 15, removendo cerca de 542,5 kb. O *Fine-tiling array* demonstrou que a deleção abrange aproximadamente 560 kb, da região telomérica até a posição 560,374 do UCSC *Genome Browser* (65) com um fragmento de *breakpoint* de 250 pb (Figura 16).

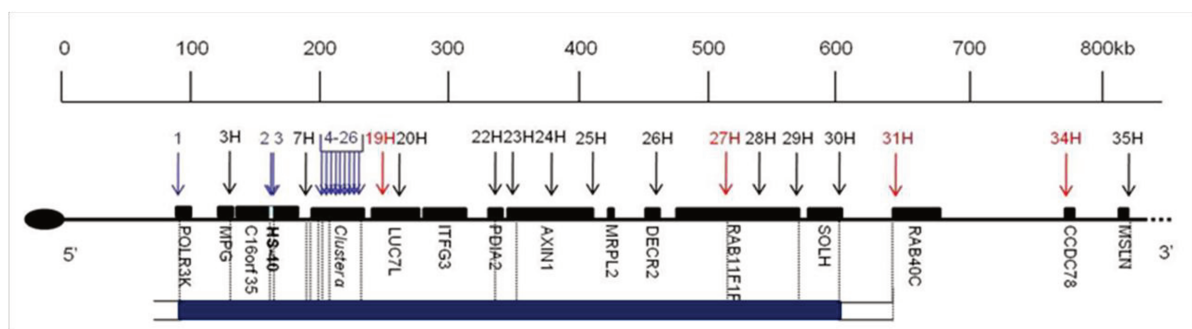


Figura 15. Resultado do MLPA do P10 identificado por Suemasu *et al.*, 2011 (48). Representação esquemática do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), abrangendo uma região de 800 kb contendo o *cluster alpha* e o HS-40. A barra azul representa o fragmento de DNA removido e as caixas brancas representam as possíveis regiões de *breakpoint*.

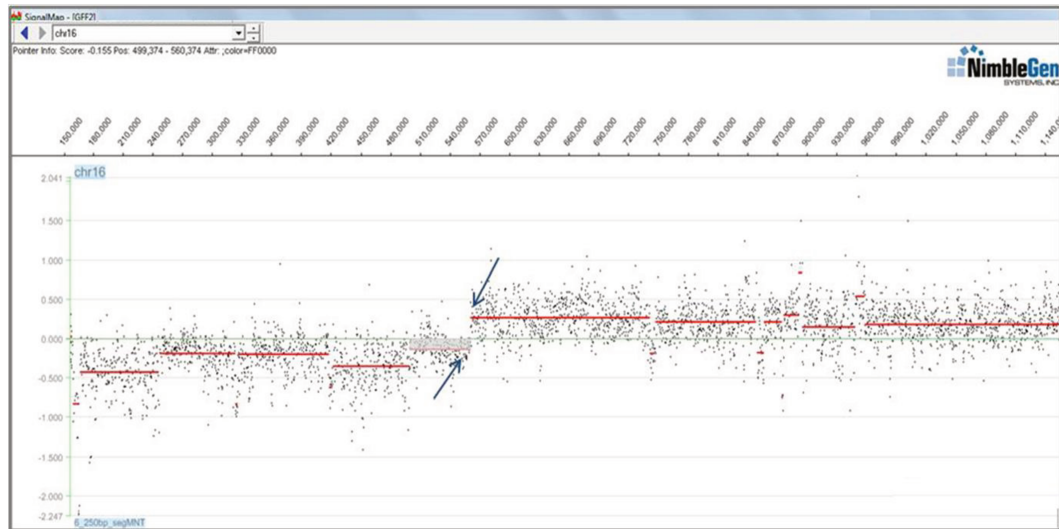


Figura 16. Gráfico do *Fine-tiling array*, para o P10. A localização das sondas está no topo do gráfico, as linhas horizontais representam a média de sinal do paciente para a região de interesse. As flechas apontam a região do *breakpoint*.

No P11, o MLPA demonstrou que a deleção α^0 é tão extensa que os sinais de todas as sondas disponíveis no MLPA (1 a 35H) estavam diminuídos até a posição 756,478 do UCSC *Genome Browser* (65), conforme demonstrado na Figura 17. Através do *Fine-tiling array* foi possível delimitar esta deleção e verificar que ela compromete aproximadamente 774 kb, se estendendo cerca de 17,5 kb além do que o MLPA pôde detectar, desde a região telomérica do cromossomo 16 até a posição 773,874 do UCSC *Genome Browser* (65), com um fragmento de *breakpoint* de 250 pb (Figura 18).

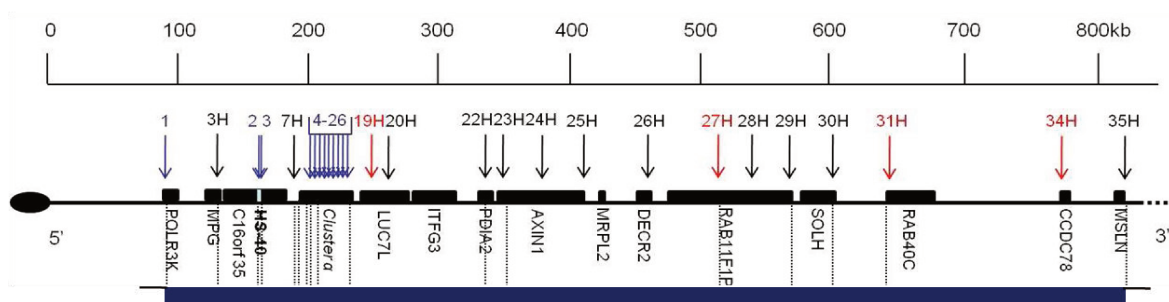


Figura 17. Resultado do MLPA do P11 identificado por Suemasu *et al.*, 2011 (48). Representação esquemática do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), abrangendo uma região de 800 kb contendo o *cluster* α e o HS-40. A barra azul representa o fragmento de DNA removido e as caixas brancas representam as possíveis regiões de *breakpoint*.

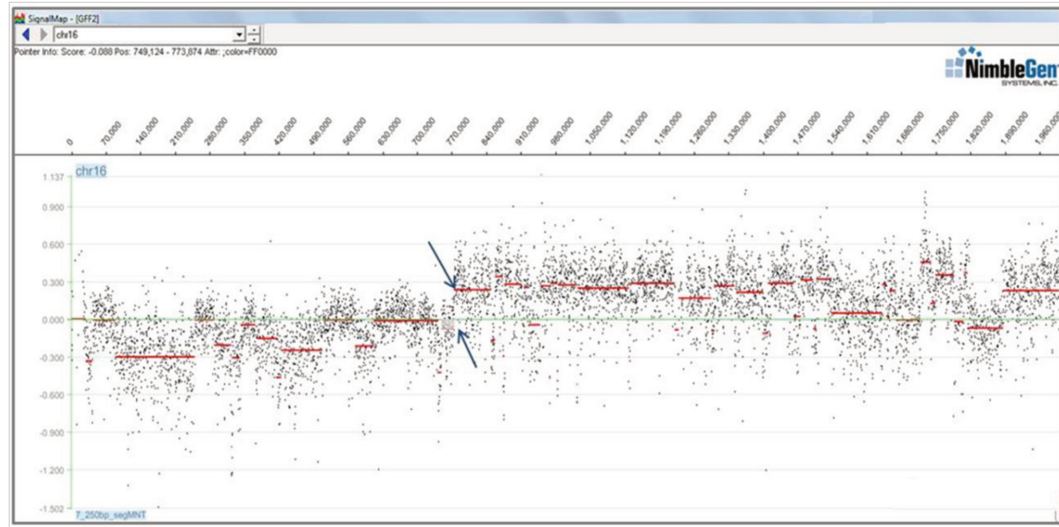


Figura 18. Gráfico do *Fine-tiling array*, para o P11. A localização das sondas está no topo do gráfico, as linhas horizontais representam a média de sinal do paciente para a região de interesse. As flechas apontam a região do *breakpoint*.

5. DISCUSSÃO

As talassemias integram um grupo de doenças genéticas caracterizadas pela redução da produção de um ou mais tipos de cadeias globínicas, estando entre as doenças monogênicas mais comuns em todo o mundo (5,8). As talassemias α são frequentemente causadas por deleções dos genes α , que correspondem a mais que 80% dos casos, ao contrário das talassemias β que, na maioria das vezes, resultam de mutações de ponto (8,56). O *Multiplex-gap-PCR* é o método mais utilizado na triagem das bases moleculares das talassemias α , sendo capaz de identificar as sete deleções mais comuns nas diferentes populações: $-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20,5}$, $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{THAI}$. Os demais casos são causados por mutações de ponto, que podem ser identificadas através de PCR, seguida de análise com enzima de restrição, ou pelo sequenciamento de DNA (56).

No entanto, mesmo com o uso do *Multiplex-gap-PCR* existem vários casos de pacientes com valores reduzidos de VCM e HCM, níveis normais de Hb A₂ e Hb F e *status* normal de ferro que continuam sem diagnóstico. Possivelmente, nestes casos, trata-se de deleções raras ou novas, que não podem ser detectadas pelos métodos rotineiros (66). Além da importância clínica deste diagnóstico, visto que microcitose e hipocromia são frequentemente interpretados como indicativos de deficiência de ferro (46), a determinação dos rearranjos que causam as talassemias α permite trazer relevantes conhecimentos sobre a função de outros genes presentes na mesma região cromossômica e é especialmente importante em áreas onde, devido ao grande fluxo migratório, as Hbpatias vêm se tornando um problema de saúde pública (49).

No presente trabalho, utilizamos o MLPA na identificação de deleções de oito pacientes não relacionados que até o presente momento estavam sem diagnóstico molecular completo. Em outros três, previamente analisados por essa técnica, pudemos refinar a região do *breakpoint*, utilizando o *Fine-tiling array*.

No Capítulo 1 foi possível demonstrar como o MLPA é eficiente na identificação de novas deleções. De nosso conhecimento, é a primeira vez que a deleção $--^{ATB}$ é relatada e, em associação com a deleção $\alpha^{3,7}$, ocasionou a Doença da Hb H no probando da família estudada e em uma de suas irmãs. Portanto, a detecção da deleção $--^{ATB}$, além de evidenciar a aplicabilidade do MLPA, permitiu elucidar as causas das alterações hematológicas presentes em seus portadores.

Já no Capítulo 2, foram identificados cinco pacientes com deleções raras ou desconhecidas que só puderam ser detectadas pelo MLPA, destacando, assim, a diversidade de alterações envolvidas nas talassemias α , desde deleções que removem ambos os genes α e os pseudogenes do *cluster*, uma deleção restrita a região do elemento regulatório (HS-40), até uma deleção mais extensa, que tem início na região telomérica, removendo todo o *cluster* α e os genes a ele contínuos. Ainda, foram estudadas as famílias de quatro desses pacientes, etapa importante no diagnóstico das Hbpatias, confirmando a origem materna/paterna dessas alterações.

O MLPA também é vantajoso na identificação de deleções já conhecidas. No Capítulo 3, foi descrita pela primeira vez a ocorrência da deleção --^{MEDII} na América Latina (Brasil), que em associação com a deleção $\alpha^{3,7}$, resultou em Doença da Hb H no probando da família analisada que possui descendência italiana. A deleção --^{MEDII} não é tão frequente como a deleção --^{MED}, com poucos relatos publicados, sendo descrita em indivíduos do Mediterrâneo, principalmente da Turquia, e, em muitos casos associada à outra mutação, causando Doença da Hb H (67-71). No MLPA, a deleção --^{MEDII} apresenta o mesmo padrão delecional da deleção --^{Dutch}, sendo necessária a realização de um *gap*-PCR para distinguir as duas formas que diferem em apenas 340 pb. Através do MLPA, conseguimos então refinar a investigação na busca por diferentes deleções.

No Capítulo 4, foi relatada, também pela primeira vez na América Latina (Uruguai), a deleção $-(\alpha)^{5,2}$, anteriormente detectada apenas em duas famílias, uma de origem grega e a outra italiana (72,73). O *Multiplex-gap*-PCR a detectou, mas indicou ser esta uma deleção diferente das sete mais comuns; com o MLPA, foi identificada a deleção $-(\alpha)^{5,2}$, tanto no probando, quanto em sua mãe.

As posições exatas dos *breakpoints* na maioria das deleções aqui determinadas permanecem ainda desconhecidas, devido à distância entre as sondas utilizadas no MLPA. Esta caracterização é importante para se compreender os mecanismos de vários rearranjos α -talassêmicos e para o desenho de *primers* específicos para *gap*-PCRs, que também podem ser utilizados em populações que possuem maior prevalência de um determinado tipo de deleção (56). Além disso, é possível diferenciar deleções que a princípio pareciam iguais, como dois casos aqui relatados no Capítulo 2, P1 e P3. Ainda, deleções até então consideradas raras podem ser mais comuns do que o presumido, já que a frequência dessas alterações na população pode estar subestimada em função das dificuldades técnicas para sua investigação.

A aCGH é uma ferramenta importante no refinamento de regiões de *breakpoint* de deleções novas ou raras. A customização do *Fine-tiling array* de alta resolução permite delimitar estas regiões graças as 135,000 sondas desenhadas cobrindo 2 Mb de DNA, a partir dos braços curtos dos cromossomos 16 e 11, especificamente para o diagnóstico das talassemias α e β , respectivamente. Além de melhor esclarecer as bases moleculares da talassemia α , permite inferir com mais propriedade sobre a relação genótipo-fenótipo dos portadores, tendo em vista se tratar de deleções que removem outros genes contínuos e elementos regulatórios presentes naquela região. É também uma forma de avaliar a função e a importância destes outros genes e elementos presentes no braço curto do cromossomo 16. Por meio desta tecnologia foi possível refinar as regiões de *breakpoint* de três diferentes e extensas deleções (Capítulo 5).

Em síntese, estes resultados demonstram a diversidade das alterações que afetam os genes das globinas α e destacam a necessidade e importância de se investigar, minuciosamente, as causas associadas às alterações hematológicas compatíveis com a presença de talassemia α . A caracterização das regiões de *breakpoint* das deleções α -talassêmicas é importante para uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos que causam essa Hbpatia e para o estabelecimento de estratégias diagnósticas mais simples, rápidas e de menor custo, particularmente em regiões onde a talassemia alfa atinge frequências elevadas. O MLPA representa, no momento, uma ferramenta importante para identificação de diferentes deleções e duplicações gênicas, solucionando diversos casos que a princípio encontravam-se sem diagnóstico definitivo; o *Fine-tiling array*, por sua vez, permite um maior refinamento das regiões de *breakpoint* das deleções inicialmente identificadas pelo MLPA.

6. CONCLUSÕES

- No presente estudo, o MLPA foi empregado para se determinar as bases moleculares da talassemia α em oito pacientes não relacionados cujo diagnóstico não pode ser realizado somente pelo *Multiplex-gap-PCR*, e o *Fine-tilling array* para o refinamento das regiões 3' dos *breakpoints* de três deleções α^0 previamente detectadas e caracterizadas pelo MLPA;
- Uma nova deleção α^0 foi detectada em uma família brasileira, denominada --^{ATB}, que remove entre 70 e 105 kb de DNA incluindo ambos os genes α e os genes contínuos LUC7L (LUC7 – *Like gene*) e ITFG3 (*Integrin Alpha FG-GAP Repeat Containing 3*);
- A deleção --^{MEDII} foi relatada pela primeira vez na América Latina (Brasil);
- A deleção $-(\alpha)^{5,2}$ também foi relatada pela primeira vez na América Latina (Uruguai);
- Estes resultados destacam a diversidade das alterações responsáveis pela talassemia α e ressaltam a importância da caracterização e dimensionamento de deleções novas e raras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, London, Toronto: W.B.Saunders Company; 1986.
- (2) Voet D, Voet JG. Bioquímica. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
- (3) Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haem. 2004 Jun; 26(3):159–176.
- (4) Forget BG, Hardison RC. The Normal Structure and Regulation of Human Globin Gene Clusters. In. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin - Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2009.
- (5) Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes [on-line]. 4. ed. 2001. [Acesso em 15 set. 2015]. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470696705>.
- (6) Steinberg MH, Benz EJ. Pathobiology of the Human Erythrocyte and Its Hemoglobins. In. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J. Hematology Basic Principles and Practice. 3. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1999.
- (7) Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em Hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
- (8) Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassemia. Lancet. 2012; 379:373-83.
- (9) Cao A, Moi P. Regulation of the globin genes. Pediatric Research. 2002; 51(4):415–421.
- (10) Weatherall DJ. The Thalassemias. In. Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. The Molecular Basis of Blood Diseases. 3. ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2001.

- (11) Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. Hemoglobin Switching. In. Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. The Molecular Basis of Blood Diseases. 3. ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2001.
- (12) Loukopoulos DL. Haemoglobinopathies. Nature Publishing Group. 2002.
- (13) Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. Genet Mol Res. 2008; 7(4):1045-53.
- (14) Ribeiro DM, Zaccariotto TR, Santos MNN, Costa FF, Sonati MF. Influence of the polymorphisms of the α -major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression. Braz J Med Biol Res. September 2009; 42(9):783-786.
- (15) Waye JS, Chui DHK. The α -globin gene cluster: genetics and disorders. Clin Invest Med. 2001;24(2):103-9.
- (16) Higgs DR. The Molecular Basis of α -Thalassaemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Jan 1;3(1):a011718.
- (17) Williams WJ, Beutler E, Erlev AJ, Lichtman MA. Hematology. 6. ed. New York: Mc Graw Hill Book Company; 2001.
- (18) Voon HPJ, Vadolas J. Controlling α -globin expression and its impact on thalassemia. Haematologica. 2008; 93(12):1868-76.
- (19) Williams TN, Weatherall DJ. World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Sep 1;2(9):a011692.
- (20) Thompson J, Thompson M. Genética médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

- (21) Sankaran VG, Lettre G, Orkin SH, Hirschhorn JN. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Dec;1214:47–56.
- (22) Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*. 2008; 84(4 Suppl):S40-51.
- (23) Harteveld CL, Higgs DR. Review α -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010;5:13.
- (24) Galanello R, Origa, R. Beta-Thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010 May; 5:11.
- (25) Porth C. *Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- (26) McCance KL, Huether SE. *Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013.
- (27) Piel FB, Weatherall DJ. The alpha thalassemias. *The New England Journal of Medicine*. 2014 Nov;371(20):1908-16.
- (28) Cançado RD. Talassemias alfa. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006; 28 (2): 81-87.
- (29) Galanello R, Cao A. Alpha-Thalassemia. *Genetics in Medicine*. 2011; 13:83-88.
- (30) Wenning MR, Kimura EM, Sonati MF. As talassemias α - Diagnóstico laboratorial e molecular. *NewsLab*. 2000; 40.
- (31) Weatherall DJ. *Beginnings: The Molecular Pathology of Hemoglobin*. In: Provan D, Gribben J. *Molecular Hematology*. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.

- (32) Higgs DR, Weatherall DJ. The alpha thalassaemias. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; (66):1154-1162.
- (33) Borgna-Pignatti C, Galanello R. Thalasseмии and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber D, Jr Means RT. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2009, v.I.
- (34) Sonati MF, Costa FF. Defeitos Hereditários das Hemoglobinas - Talassemias: Talassemias Alfa. In: Lopes AC, Neto VA. *Tratado de Clínica Médica*. 1. ed. São Paulo: Editora Roca LTDA; 2006, v. II.
- (35) Kulozik AE, Kar BC, Serjeant GR, Serjeant BE, Weatherall DJ. The molecular basis of alpha thalassemia in India. Its interaction with the sickle cell gene. *Blood*. 1988 Feb; 71(2):467-72.
- (36) Lacerra G, Fioretti G, De Angioletti M, Pagano L, Guarino E, de Bonis C, et al. (Alpha) alpha 5.3: a novel alpha(+)-thalassemia deletion with the breakpoints in the alpha 2-globin gene and in close proximity to an Alu family repeat between the psi alpha 2- and psi alpha 1-globin genes. *Blood*. 1991 Nov 15;78(10):2740-6.
- (37) Zhao JB, Zhao L, Fei YJ, Liu JC, Huisman TH. A novel alpha-thalassemia-2 (-2.7-kb) observed in a Chinese patient with Hb H disease. *Am J Hematol*. 1991 Nov;38(3):248-9.
- (38) Higgs DR. The Molecular Basis of α -Thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. *Disorders of Hemoglobin - Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. 2. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2009.
- (39) Costa FF, Tavella MH, Zago MA. Deletion type alpha-thalassemia among brazilian patients with sickle cell anemia. *Rev Bras Genética*. 1989; 12(3):605-11.
- (40) Sonati MF, Costa FF. Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population. *Braz J Med Biol Res*. 1990; 23(5):395-6.

- (41) Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*. 1991; 15(4):309-11.
- (42) Adorno EV, Couto FD, Neto JPM, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública* vol.21 no.1 Rio de Janeiro Jan./Feb. 2005.
- (43) Wagner, SC, Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Filippon L; Zaleski CF, et al. Prevalence of common α -thalassemia determinants in south Brazil: importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genet Mol Biol*. 2010; 33(4):641-645.
- (44) Alcoforado GHM, Bezerra CM, Lemos TMAM, Oliveira DM, Kimura EM, Costa FF, et al. Prevalence of α -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2012; 35(3):594-598.
- (45) Cardoso GL, Takanashi SYL, Guerreiro JF. Inherited hemoglobin disorders in an Afro-Amazonian community: Saracura. *Genet Mol Biol*. 2012 Jul-Sep; 35(3): 553–556.
- (46) Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34:759-762.
- (47) Wenning MR, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervário S, Jorge SB, et al. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*. 2000; 33: 1041-1045.
- (48) Suemasu CN, Kimura EM, Oliveira DM, Bezerra MAC, Araújo AS, Costa FF, Sonati MF. Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(1):16-22.
- (49) 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.

- (50) 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 MolDis*. 2010; 44:146–151.
- (51) Hartevelde, CL. State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *Int J Lab Hematol*. 2013 May; 36:1-12.
- (52) Schouten JP, Mc Celgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg, 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.
- (53) MRC Holland. MLPA General Protocol [on-line]. 2014. [Acesso em 20 set. 2015]. Disponível em https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_w12zCji-rCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo_xHPnTgc.
- (54) Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13(3):3245–3276.
- (55) Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*. 2005 Dec; 42(12):922-31.
- (56) Phylipsen M. Development of new technological applications for post- and prenatal diagnosis of the hemoglobinopathies [Tese – Doutorado]. Leiden (Holanda): Leiden University; 2013.
- (57) Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its application in câncer. *Nature Genetics*. 2005 June; 37.
- (58) Maluf SW, Riegel M. *Citogenética Humana*. Artmed; 2011.

- (59) Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2006; 8(5):528-33.
- (60) Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 2008; 13:760–70.
- (61) Phylipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar IP, Balak JR, Schaap RA, Ariyurek Y, et al. Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for α - and β -thalassemia rearrangements. *Hum Mutat*. 2012 Jan; 33(1):272-80.
- (62) C. Dodé, R. Krishnamoorthy, J. Lamb, J. Rochette, Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis, *Br. J. Haematol*. 83 (1993) 105-11.
- (63) Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P. Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol*. 1996; 53: 81-91.
- (64) 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 Dec; 80(23):9363-8.
- (65) Web site do UCSC Genome Browser (2006 – hg18): <http://genome.ucsc.edu/>.
- (66) Fallah MS, Mahdian R, Aleyasin SA, Jamali S, Nosaeid MH, Karimipour M, et al. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of unknown γ -globin gene deletions. *Blood Cells, Molecules and Disease*. 2010;45:58-64
- (67) Kutlar F, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Gurgey A, Altay C, Efremov GD, et al. The levels of zeta, gamma, and delta chains in patients with Hb H disease. *Hum Genet*. 1989 May;82(2):179-86.

- (68) Yüregir GT, Aksoy K, Cürük MA, Dikmen N, et al. Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional alpha-thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. *Br J Haematol*. 1992 Apr;80(4):527-32.
- (69) Baysal E, Kleanthous M, Bozkurt G, Kyrri A, Kalogirou E, Angastiniotis M, et al. Alpha-Thalassaemia in the population of Cyprus. *Br J Haematol*. 1995 Mar;89(3):496-9.
- (70) Cürük MA. Hb H (beta4) disease in Cukurova, Southern Turkey. *Hemoglobin*. 2007;31(2):265-71.
- (71) Medinger M, Saller E, Harteveld CL, Lehmann T, Graf L, Rovo A, et al. A rare case of coinheritance of Hemoglobin H disease and sickle cell trait combined with severe iron deficiency. *Hematol Rep*. 2011 Oct;3(3):e30.
- (72) Pressley L, Higgs DR, Aldridge B, Metaxatou-Mavromati A, Clegg JB, Weatherall DJ. Characterisation of a new alpha thalassemia 1 defect due to a partial deletion of the alpha globin gene complex. *Nucleic Acids Res*. 1980 Nov 11;8(21):4889-98.
- (73) Fortina P, Parrella T, Sartore M, Gottardi E, Gabutti V, Delgrosso K, et al. Interaction of rare illegitimate recombination event and a poly A addition site mutation resulting in a severe form of alpha thalassemia. *Blood*. 1994 June; 83(11):3356-62.

ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética Local

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

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 metodológica 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 deficiência das cadeias α da hemoglobina. Os genes responsáveis pela produção dessas cadeias estão localizados no cromossomo 16 (16p13.3), são duplicados ($\alpha 2$ e $\alpha 1$) (genótipo normal = $\alpha\alpha/\alpha\alpha$), e codificam cadeias α 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 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, a técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), recentemente desenvolvida, foi adequada ao diagnóstico de deleções envolvendo os genes da globina α 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 na 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.

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

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 incluídos 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 íntegra, 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)

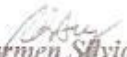
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa-etica/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.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2. Declaração de Submissão de Manuscritos

DECLARAÇÃO

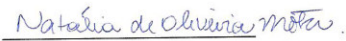
Eu, Natália de Oliveira Mota, RA 151821, declaro, para os devidos fins, que os quatro manuscritos presentes nesta dissertação não foram submetidos à publicação.

Campinas, 05 de Fevereiro de 2016.



Dra. Maria de Fatima Sonati

Prof^{da} Dr^a Maria de Fatima Sonati
Dept^o. Patologia Clínica
FCM/UNICAMP



Natália de Oliveira Mota