Investigação de Deleções Talassêmicas Raras por Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Natália O. Mota, Roberta D. Ferreira*, Gisele A. Pedroso, Elza M. Kimura, Ana M. Soler, Julio Luz, Maria F. Sonati

Resumo

Talassemias são hemoglobinopatias hereditárias com distribuição mundial. Sua caracterização molecular permite a elucidação diagnóstica, o aconselhamento e o tratamento mais adequado dos portadores. O MLPA tem sido empregado para identificação e caracterização de deleções gênicas relacionadas a essa hemoglobinopatia. Neste trabalho foram caracterizadas oito deleções α -talassêmicas novas ou raras e uma deleção no agrupamento dos genes da globina β relacionada a uma forma muito rara de talassemia, a $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemia.

Palavras-chave:

Talassemia α , $\epsilon\gamma\delta\beta$ -Talassemia, MLPA.

Introdução / Objetivo

Talassemias são hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas pela síntese reduzida/ausente de cadeias globínicas. Na talassemia α , a deficiência de globinas α comumente resulta de deleções nos genes α_2 e/ou α_1 (16p13.3), enquanto na talassemia β , a deficiência de cadeias β é geralmente causada por mutações de ponto nos genes β (11p15.5). O objetivo deste trabalho foi caracterizar as bases moleculares das talassemias em nove indivíduos não relacionados (P), oito brasileiros e um uruguaio, sendo oito casos sugestivos de talassemia α e um de talassemia β .

Casuística

Tabela 1. Dados Hematológicos dos Pacientes.

Casos	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Idade/Gênero	3m/F	17/M	35/F	58/F	-/F	2m/F	37/M	2/M	1d/F
GV ($10^9/mm^3$) VR: M:4.5-6.1/F:4.2-6.4	4,55	5,43	5,50	5,50	5,00	4,64	55,5	5,45	4,25
Hb (g/dl) VR: M:14-18/F: 12-16	7,75	8,8	11,2	12,5	8,3	8,1	9,2	10,6	8,4
HCT (%) VR: M:41-52/F:36-46	-	30,4	35,9	41,4	29,7	28,9	16,6	-	30,4
VCM (fl) VR: M:81-99/F: 80-96	17,0	56	65,3	70,4	59,4	62,3	61,6	58,5	71,1
HCM (pg) VR: 27-32	54,1	16,2	20,4	22,4	16,6	17,5	34,2	19,40	19,8
RDW (%) VR: 10-15	-	24,4	15,1	16,4	-	26,0	25,5	17,2	29,0
Perfil Hb VR: 1.9-3.5	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	A ₂ A ₁ H ₂ Bart's	C (21,9%),F
Hb A₂ (%) VR: 1.9-3.5	0,78	1,6	2,6	2,5	0,8	1,0	1,5	2,9	-
Hb F (%) VR: <2	23,7	0,1	0,6	0,4	1,7	22,6	0,5	-	77,8
Hb H (%)	10,0	3,0	-	-	7,6	18,9 (Bart's + H)	4,0	-	-

Materiais e Métodos

A investigação e caracterização molecular foram realizadas através das técnicas de:

- Multiplex-gap-PCR:** Sete deleções α -talassêmicas mais comuns ($-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $-\alpha^{MED}$, $-(\alpha)^{20,5}$, $-\alpha^{SEA}$, $-\alpha^{FIL}$, $-\alpha^{THAI}$)
- Análise com enzimas de restrição: Mutações não delecionais (α^{Hph} , α^{NcoI} , α^{NcoI} , α^{TSaudi})
- Sequenciamento dos genes α e β
- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**, empregando os kits Salsa MLPA P102 C1 HBB e Salsa MLPA P140 C1 HBA (MRC Holland, Amsterdã, Holanda) para o *cluster* β e α respectivamente.

Resultados

Nos casos de talassemia α :

- P1, P2, P5, P6 e P7: Doença da Hb H - associação da deleção $-\alpha^{3,7}$ com deleção α^0 (genótipo $-\alpha^{3,7}/--$);
- P1 a P8: deleções α^0 variando de 15-225 kb de DNA;

No caso de talassemia β :

- P9: Heterozigose de deleção β^0 que remove entre 172 e 283 kb de DNA, resultando em $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemia.

Entre as nove deleções, sete são potencialmente novas, sendo exceções as deleções $-(\alpha)^{5,2}$ e $-\alpha^{MED}$, já descritas, porém pela primeira vez detectadas na América Latina.

Figura 1. Representação esquemática de 16p13.3 (A) e 11p15.5 (B). Forma oval: Região telomérica; Flechas: Localizações das sondas; Caixas: Disposição dos genes; Barras azuis: Fragmento deletado; Linhas pontilhadas: Primeira e a última sonda deletada (Adaptado de MRC-Holland, 2014).

Discussão e Conclusões

Estes resultados enfatizam a diversidade de alterações moleculares que afetam os genes de globinas e a relevância de sua caracterização, uma vez que as alterações hematológicas apresentadas pelos portadores podem levar a interpretações equivocadas e, eventualmente, a abordagens terapêuticas inadequadas. Destaca-se ainda a importância do método de MLPA na caracterização das talassemias delecionais.

Financiamento