



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO *LOC1* ALFA GLOBÍNICO DE  
PACIENTES COM MICROCITOSE E HIPOCROMIA COM OU SEM ANEMIA**

**Aline Menezes Carlos**

Uberaba - MG  
Janeiro - 2018

**Aline Menezes Carlos**

**Caracterização genotípica do *loci* alfa globínico de pacientes com microcitose e hipocromia com ou sem anemia**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro área de concentração – Patologia Humana, como requisito parcial para obtenção de Título de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Helio Moraes de Souza.

Uberaba - MG  
Janeiro - 2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Carlos, Aline Menezes

C28c Caracterização genotípica do *loci* alfa globínico de doadores de sangue e pacientes com microcitose e hipocromia com ou sem anemia/ Aline Menezes Carlos. -- 2018.

97f.: il.; fig.; graf.; tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

1. Hemoglobinopatia. 2. Talassemia alfa. 3. Técnicas de diagnóstico molecular. 4. Reação em cadeia da polimerase multiplex. 5. Anemia. I. Souza, Helio Moraes de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.155.16

**ALINE MENEZES CARLOS****Caracterização genotípica do *loci* alfa globínico de pacientes com microcitose e hipocromia com ou sem anemia.**

Esta tese será submetida ao processo de avaliação da Comissão Examinadora para a obtenção do Título de:

**DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE-PATOLOGIA-HUMANA**

---

***Prof. Dr. Helio Moraes de Souza***

Professor Titular da Disciplina e Pesquisas de Hematologia e Hemoterapia da UFTM.

Comissão Examinadora:

---

***Prof. Dr. Helio Moraes de Souza***

- Orientador-

Professor Titular da Disciplina e Pesquisas de Hematologia e Hemoterapia da UFTM.

---

***Prof. Dr. André Rolim Belisário***

Pesquisador da Fundação Hemominas e pesquisador associado no núcleo de ações e pesquisa em apoio da faculdade de medicina - NUPAD

---

***Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum***

Professor da Faculdade FACERES e diretor clínico da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto

---

***Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins***

Professor Associado da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

---

***Prof. Dra. Renata M. Etchebehere***

Professora do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Uberaba, 25 de Janeiro de 2018.

# ***DEDICATÓRIA***

---

---

*Dedico este trabalho a meus pais Evandro e Aparecida, meu esposo Cleomar e ao meu filho Lucas, que são a os pilares e a razão da minha vida e que sempre me motivaram a ir atrás dos meus sonhos e nunca desistir...*

# ***AGRADECIMENTOS***

---

*Tenho tanta gente para agradecer que tenho muito medo de ser injusta com alguém. De todo modo, fica aqui a tentativa de agradecer a alguns, e que estes representem todos os outros. Como não poderia deixar de ser, agradeço inicialmente:*

*A Deus, que, pela Sua presença e força, me conduziu ao longo desta jornada, tornando possível a conclusão de mais uma etapa de minha vida.*

*Aos meus pais, Evandro e Aparecida, por sempre me proverem de ensinamentos para a vida e para todos os momentos difíceis, sem que, para isso, exigissem nada em troca. Pai, Mãe amo vocês.*

*Ao meu filho, Lucas, meu tesouro e minha força propulsora, minha maior realização, obrigada pela paciência e pela compreensão nos momentos de ausência.*

*Ao meu esposo, Cleomar, que representa minha segurança em todos os aspectos, que com muito carinho, ternura e inestimável amor soube ser paciente e compreensivo, sempre ao meu lado.*

*Ao meu irmão, Leandro, pelo carinho e dedicação, tanto nos momentos festivos quanto nos tumultuados. A tarefa de irmã mais velha que cuida, defende e apoia não me faz jus, pois esse mérito é seu. Lê, tenho muita admiração por você.*

*À toda minha família, pelo apoio tão querido em todos os momentos felizes, emocionantes e tristes. Aos meus queridos tios, tias, primos e primas, sem o apoio e carinho de vocês nada disso seria possível.*

*Meu especial agradecimento ao professor Dr. Helio Moraes de Souza, cujos conhecimentos iluminadores e entusiasmo contagiante, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado com sucesso. Obrigado pelo voto de confiança recebido e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.*

*Aos professores Dr. Paulo Juliano Martins e Dra. Sheila Soares, modelos de clareza e objetividade, sempre esclarecendo minhas dúvidas e auxiliando neste meu caminhar.*

*Aos professores Renata Margarida Etchebehere, André Rolim Belisário, Flávio Augusto Naoum e Paulo Roberto Juliano Martins, membros da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho.*

*À todos os meus amigos que me apoiaram, me corrigiram, me toleraram e me fizeram saber, antes de tudo, que a vida sem eles não teria graça alguma. Um muito obrigado às amigas, Márcia, Alexandra, Bruna, Fernanda, Loren, Stella pelo incentivo, amizade e bom humor que amenizaram momentos difíceis e divertiram momentos descontraídos.*

*Em especial agradeço à minha grande amiga/irmã Glaucia, que me proporcionou vivenciar uma amizade verdadeira, quem sempre me incentivou e ajudou sempre pronta a me ouvir. Não sei o que faria sem você.*

*A toda equipe da GENEAL pela parceria e apoio técnico no desenvolvimento deste projeto, em especial aos colaboradores Bruna e Warlei pelos ensinamentos e orientações no laboratório e ainda, pelo exemplo profissional.*

*À todos colaboradores e amigos do Hemocentro Regional de Uberaba, em especial Vânia e Ilcione do laboratório de hemoglobinopatias que participaram ativamente desse projeto, obrigado por me acolherem com tanta generosidade e me fazer sentir em casa. Foi uma alegria e um aprendizado diário estar com vocês. A vocês todo o meu carinho, admiração e respeito.*

*Ao corpo Docente e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que fazem com que me orgulhe tanto de mencionar o nome da instituição.*

*À todos os paciente e participantes, pela delicadeza e sensibilidade no compartilhamento deste meu aprendizado.*

*Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela bolsa concedida durante os anos do curso.*

*A FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) pelo recurso financeiro desprendido para realização da pesquisa.*

*À UFTM e à FUNDAÇÃO HEMOMINAS (Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais) pelo apoio e incentivo à pesquisa científica.*

*Aos demais pelas amizades conquistadas...*

*Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, gostaria de manifestar meus sinceros agradecimentos.*

*Muito Obrigada!!!*

*“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez”.*

*(George Bernard Shaw)*

## Resumo

**Introdução:** As talassemias, excluída a ferrodeficiência, são as principais causas de anemias microcíticas em todo mundo. A  $\alpha$ -talassemia, caracterizada por alterações genéticas que afetam o *cluster* de genes  $\alpha$ -globina no cromossomo 16p13.3, é uma das hemoglobinopatias mais amplamente difundidas em todo o mundo. Nas últimas décadas, diversas metodologias e abordagens para o diagnóstico dessas alterações têm sido criadas e aplicadas, como o MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) que vem ganhando destaque, permitindo a detecção de deleções e duplicações genômicas, conhecidas, novas ou raras de diferentes tamanhos. Neste trabalho buscamos elucidar as bases moleculares da anemia microcítica de indivíduos que não puderam ser definidas por outros métodos tradicionais. **Materiais e Métodos:** Oitenta e cinco pacientes com microcitose, sem ferrodeficiência, triados para  $\alpha$ -talassemia por meio do *Multiplex-gap-PCR*, foram investigados utilizando-se o MLPA. **Resultados:** Dos 85 pacientes analisados pelo MLPA, 32 (37,65%) apresentaram outras alterações moleculares afetando o *cluster*  $\alpha$ -globínico, que não haviam sido identificadas pela PCR. Destes, 13 (15,29%) pacientes que apresentaram genótipo normal no *Multiplex-gap-PCR*, quando analisados pela técnica de MLPA, foram identificadas as seguintes alterações: em 10 (11,76%) foram detectados somente os polimorfismos 3B (3 pacientes), 4A (3 pacientes), 4B (1 paciente), Africano 1 ( $\alpha^{212}$ ) (2 pacientes) e associação dos polimorfismos Africano 1 ( $\alpha^{212}$ ) e 3B (1 paciente); em dois (2,35%) uma deleção da região reguladora HS-40 e suas sequências adjacentes e em um (1,18%) uma extensa duplicação que envolveu desde a região POLR3K-3 até HBQ1-3. Este caso resultou num alelo com 4 genes  $\alpha$  expressos ( $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), abrangendo uma região com cerca de 140 *kilobases*. Além destes em outros 19 (22,35%) pacientes que no *Multiplex-gap-PCR* haviam sido detectada a deleção 3.7, tanto em heterozigose quanto homozigose, quando analisados pela técnica de MLPA, além desta deleção foram identificados em 14 (16,47%) a associação com os polimorfismos 3A (1 paciente), 3B (1 paciente), 4A (2 pacientes), 4B (5 pacientes), Africano 1 ( $\alpha^{212}$ ) (3 pacientes), além da combinação entre os polimorfismos 3B e 4B (1 paciente) e os polimorfismos 1B, 3B e Africano 1 ( $\alpha^{212}$ ) (1 paciente). Nos outros cinco (5,88%) foram observadas associações com outras formas delecionais. Das quais em dois (2,35%) foram detectadas uma deleção rara, de cerca de 67 *kilobases* de DNA, na região reguladora do gene  $\alpha$  (HS-40) e suas regiões adjacentes (POLR3K-3), um (1,18%) com uma extensa deleção que eliminou tanto os genes  $\alpha$  quanto a sua região regulatória do HS-40, com aproximadamente 70 *kilobases* de DNA, que de acordo com tamanho e os *breakpoints* aproximados, esta deve-se tratar de uma nova deleção  $\alpha^0$ . E outros dois (2,35%) associados à uma nova deleção  $\alpha^+$ , que eliminou tanto o gene zeta quanto os pseudogenes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , com aproximadamente 17.2 *kilobases* de DNA, que de acordo com tamanho e os *breakpoints* aproximados, esta deve-se tratar de uma nova deleção  $\alpha^+$ . **Conclusão:** A técnica MLPA nos permitiu esclarecer as bases moleculares das  $\alpha$ -tal de pacientes com microcitose de origem obscura que não haviam sido identificadas pelo *multiplex-PCR*, contribuindo com a conclusão diagnóstica.

**Palavras-chave:** Talassemias  $\alpha$ , Anemia microcítica, Diagnóstico molecular, Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação (MLPA), Doença da Hb H.

### *Abstract*

**Introduction:** The thalassemias, excluding iron deficiency, are the main causes of microcytic anemia worldwide. The  $\alpha$ -thalassemia, characterized by genetic alterations affecting the  $\alpha$ -globin gene cluster on chromosome 16p13.3, is one of the most widely disseminated hemoglobinopathies in the world. In the last few decades, several methodologies and approaches for the diagnosis these alterations have been developed and applied, such as MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), which allows for detection genomic deletions and duplications, known, new or rare of varying sizes. This work seeks to elucidate the molecular basis of cases of microcytic anemia that could not be defined by other traditional methods. **Material and Method:** Eighty-five patients with microcytosis without iron deficiency and screened for  $\alpha$ -thalassemia by multiplex-gap-PCR, were evaluated using MLPA. **Results:** Of the 85 patients analyzed by MLPA, 32 (37.65%) had other molecular alterations affecting the  $\alpha$ -globin cluster, which had not been identified by PCR. Of these, 13 (15.29%) patients who presented normal genotype in Multiplex-gap-PCR, when analyzed by the MLPA technique, the following molecular alterations were identified: in 10 (11.76%) only 3B (1 patient), 4A (3 patients), 4B (1 patient), African 1 ( $\alpha$ 212) (2 patients) polymorphisms and association of African 1 ( $\alpha$ 212) and 3B polymorphisms (1 patient); in two (2.35%) a deletion of the HS-40 regulatory region and its adjacent sequences and in one (1.18%) an extensive duplication involving from the POLR3K-3 region to HBQ1-3. This case resulted in an allele with four expressed  $\alpha$  genes ( $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), covering a genomic region of approximately 140 kilobases. In addition to this, in 19 (22.35%) patients that in the Multiplex-gap-PCR had been detected the deletion 3.7, both in heterozygosis and homozygous, when analyzed by the MLPA technique, beyond this deletion were identified in 14 (16.47%) the association with 3A (1 patient), 3B (1 patient), 4A (2 patients), 4B (5 patients), African 1 ( $\alpha$ 212) (3 patients) polymorphisms, and a combination between 3B and 4B (1 patient) polymorphisms and 1B, 3B and African 1 ( $\alpha$ 212) (1 patient) polymorphisms. In the other five (5.88%) associations with other deletions were observed. Of which in two (2.35%) a rare deletion of about 67 kilobases of DNA was detected, in the  $\alpha$ -gene regulatory region (HS-40) and its adjacent regions (POLR3K-3), one (1.18 %) with an extensive deletion that eliminated both  $\alpha$ -genes and their HS-40 regulatory region, with approximately 70 kilobases of DNA, which according to size and approximate breakpoints, this should be a new  $\alpha^0$  deletion. And another two (2.35%) associated with a new  $\alpha^+$  deletion, which eliminated both the zeta gene and the  $\alpha_2$  and  $\alpha_1$  pseudogenes, with approximately 17.2 kilobases of DNA, which according to size and approximate breakpoints, if it is a new  $\alpha^+$  deletion. **Conclusion:** The MLPA technique allowed us to clarify the molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia in patients with obscure microcytosis that had not been identified by multiplex PCR, thereby contributing to the diagnostic conclusion.

**Keywords:**  $\alpha$ -thalassemia, microcytic anemia, Molecular diagnosis, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), Hb H disease

*Lista de Figuras*

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Esquema representando a estrutura da hemoglobina.....   | 21 |
| <b>Figura 2</b> - Representação esquemática da síntese das diferentes cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento humano.....  | 23 |
| <b>Figura 3</b> - Localização do <i>cluster</i> do gene $\alpha$ -globínico no cromossomo 16 e do <i>cluster</i> $\beta$ -globínico no cromossomo 11.....               | 25 |
| <b>Figura 4</b> - Distribuição e prevalência mundial das talassemias $\alpha$ e $\beta$ .....   | 28 |
| <b>Figura 5</b> - Genótipos da talassemia alfa.....   | 29 |
| <b>Figura 6</b> - Representação esquemática do mecanismo pelo qual ocorrem as deleções mais comuns de $\alpha$ -talassemia.....   | 31 |
| <b>Figura 7</b> - Deleções de um gene $\alpha$ que da origem a talassemia $\alpha^+$ .....  | 32 |
| <b>Figura 8</b> - Esquema mostrando as principais deleções que envolvem o ambos os genes $\alpha$ dando origem as talassemias $\alpha^0$ .....                          | 33 |
| <b>Figura 9</b> - Esquema mostrando as principais deleções que envolvem o Elemento Regulatório Major da globina $\alpha$ ( $\alpha$ -MRE).....                          | 34 |
| <b>Figura 10</b> - Representação esquemática das sondas de MLPA.....  | 38 |
| <b>Figura 11</b> - Representação esquemática das etapas da reação de MLPA.....  | 39 |
| <b>Figura 12</b> – Programa utilizado no termociclador para a reação de MLPA para a amplificação dos fragmentos.....  | 47 |
| <b>Figura 13</b> - Representação esquemática da localização das sondas do kit SALSA MLPA probemix P140-C1 HBA.....  | 53 |
| <b>Figura 14</b> – Gráfico da validação dos ensaios de MLPA com o kit P140 C1-HBA para análise do gene $\alpha$ -globina. ....  | 54 |
| <b>Figura 15</b> – Esquema representando as deleções detectadas nos pacientes com deleção - $\alpha^{3.7}$ associados a uma nova deleção de talassemia $\alpha^+$ ..... | 59 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16</b> – Gráficos com os resultados do MLPA dos pacientes com deleção $-\alpha^{3,7}$ associados a uma nova deleção de talassemia $\alpha^+$ .....  | 59 |
| <b>Figura 17</b> – Esquema representando as deleções detectadas nas pacientes com fenótipo de doença da Hb H.....   | 61 |
| <b>Figura 18</b> – Gráficos com os resultados do MLPA dos pacientes com fenótipo de doença da Hb H. ....  | 62 |
| <b>Figura 19</b> – Esquema representando as deleções da região HS-40 no <i>cluster</i> $\alpha$ .....   | 63 |
| <b>Figura 20</b> – Gráficos com os resultados do MLPA dos pacientes com deleções da região HS-40 no gene $\alpha$ .....                                       | 64 |
| <b>Figura 21</b> – Esquema representando a duplicação do <i>cluster</i> $\alpha$ .....  | 65 |
| <b>Figura 22</b> – Gráfico com o resultado do MLPA do paciente com a duplicação do <i>cluster</i> $\alpha$ .....  | 66 |
| <b>Figura 23</b> - <i>Box-plot</i> mostrando a comparação dos valores de RBC, VCM, HCM e HbA <sub>2</sub> entre os diferentes genótipos de $\alpha$ -tal..... | 69 |

*Lista de tabelas*

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Dados moleculares e valores médios dos parâmetros hematológicos dos 85 pacientes investigados.....  | 51 |
| <b>Tabela 2</b> - Polimorfismos identificados no gene HBA1 e HBA2 da $\alpha$ -globina em 24 amostras da casuística estudada,.....  | 55 |
| <b>Tabela 3</b> - Dados moleculares e hematológicos dos 10 pacientes identificados com polimorfismos de nucleotídeos simples nos genes HBA da $\alpha$ -globina.....  | 56 |
| <b>Tabela 4</b> - Dados moleculares e valores médios dos parâmetros hematológicos dos 72 pacientes identificados com a deleção $-\alpha^{3.7}$ nos genes da $\alpha$ -globina.....                          | 57 |
| <b>Tabela 5</b> - Dados moleculares e hematológicos dos pacientes com a deleção $-\alpha^{3.7}$ associados a polimorfismos de nucleotídeos simples no gene $\alpha$ -globina.....                           | 58 |
| <b>Tabela 6</b> - Dados moleculares e hematológicos dos pacientes identificados com a deleção $-\alpha^{3.7}$ associados a uma nova deleção de talassemia $\alpha^+$ .....                                  | 60 |
| <b>Tabela 7</b> - Dados moleculares e hematológicos dos pacientes identificadas com fenótipo de doença da Hb H.....   | 63 |
| <b>Tabela 8</b> - Dados moleculares e hematológicos dos pacientes com deleção da região HS-40 do <i>cluster</i> $\alpha$ -globina.....  | 64 |
| <b>Tabela 9</b> - Dados molecular e hematológico do paciente com duplicação do <i>cluster</i> $\alpha$ -globina.....  | 66 |
| <b>Tabela 10</b> - Relação entre os genótipos $-\alpha/\alpha\alpha$ , $--/\alpha\alpha$ e $-\alpha/-\alpha$ com os parâmetros hematológicos dos 71 pacientes identificados com esse perfil genotípico..... | 68 |

*Lista de abreviações e siglas*

aCGH - array-Comparative Genome Hybridization - Híbridização Genômica Comparativa  
 ATR-16 syndrome - Alpha thalassemia retardation associated with chromosome 16 - Síndrome ATR-16 – Alfa talassemia associada ao retardo mental  
 CEP - Comitê de Ética em Pesquisa  
 CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
 Clusters - agrupamentos de genes  
 CNV - Copy Number Variation - Variação no número de cópias do DNA  
 DNA - Deoxyribonucleic acid - Ácido Desoxirribonucléico  
 DP - Desvio Padrão  
 EDTA - EthyleneDiamineTetrAcetic acid - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
 FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais  
 fL - fentolitros  
 g - gramas  
 g/dL - gramas por decilitro  
 gDNA – Genomic DNA - DNA genômico  
 Hb - hemoglobina  
 Hbs - hemoglobinas  
 Hb A - hemoglobina A  
 Hb A<sub>2</sub> - hemoglobina A<sub>2</sub>  
 Hb Bart's - Hemoglobina Bart's  
 Hb F - hemoglobina fetal  
 Hb H - hemoglobina H  
 HC - Hospital de Clínicas  
 HCM - Hemoglobina Corpuscular Média  
 HC-UFTM - Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
 HE - Hemácia  
 HRU - Hemocentro Regional de Uberaba  
 HS - DNase I hypersensitive sites - sítios hipersensíveis à DNase  
 HTC - Hematócrito  
 kb – kilobase (mil pares de base)  
 LCR - Locus control region - Região controladora do locus  
 LPO - Left Probe Oligonucleotide - Oligonucleótidos da sonda esquerda  
 Mb - megabases (Mil quilobases)  
 Máx - Máximo  
 MG - Minas Gerais  
 Mín - Mínimo  
 mL - mililitros  
 MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação  
 ng/dL - nanograma por decilitros

nt - Nucleotídeos

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase

pg - pictogramas

RDW - Red Cell Distribution Width - Distribuição do tamanho das células vermelhas

RNA - ribonucleic acid - ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms - Polimorfismos de nucleotídeos simples

RPO - Right Probe Oligonucleotide - Oligonucleótidos da sonda direita

TE - Solução composta por Tris e EDTA

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

v - volts

VCM - Volume corpuscular médio

VR - Valores de referência

*Lista de símbolos*

fl - fentolitros  
 L - litros  
 mL - mililitros  
 °C - graus Célcus  
 $\alpha$  - alfa  
 $\alpha$ -tal - alfa talassemia  
 $\alpha$ -MRE - Elemento Regulatório Maior dos genes  $\alpha$   
 $\beta$ -tal - beta talassemia  
 $\beta$  - beta  
 $\delta$  - delta  
 $\gamma$  - gama  
 $\sigma$  - sigma  
 $\varepsilon$  - épsilon  
 $\zeta$  - zeta  
 $\psi$  - pseudogene  
 $\theta$  - teta  
 $\mu$ L - microlitros  
 $O_2$  - oxigênio  
 $CO_2$  - dióxido de carbono  
 $\alpha_1$  - Gene alfa 1  
 $\alpha_2$  - Gene alfa 2  
 $\alpha^+$  - deleção de um gene alfa, em um alelo  
 $\alpha^0$  - deleção de dois genes alfa, em um alelo  
 $\alpha^T$  - mutação pontual, pequena deleções ou inserções em um alelo  
 $-\alpha^{2.7}$  - deleção de cerca de 2,7 kb  
 $-\alpha^{3.5}$  - Deleção de cerca de 3.5 kb  
 $-\alpha^{3.7}$  - Deleção de cerca de 3.7 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  
 $-(\alpha)^{20.5}$  - deleção de cerca de 20,5 kb  
 $\alpha\alpha^{\text{antia}3.7}$  e  $\alpha\alpha^{\text{antia}4.2}$  - Triplicação do gene alfa  
 $--^{\text{FIL}}$  - deleção de cerca de 30 kb  
 $--^{\text{MED}}$  - deleção de cerca de 18 kb  
 $--^{\text{SEA}}$  - deleção de cerca 20 kb  
 $--^{\text{THAI}}$  - deleção de cerca de 38 kb

## *SUMÁRIO*

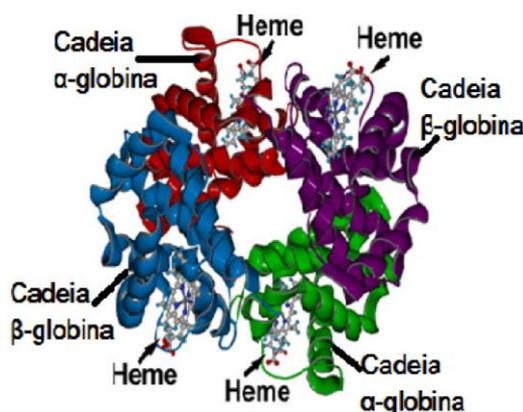
|  |       |
|--|-------|
| <b>RESUMO</b> .....  | xi    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | xii   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | xiii  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | xv    |
| <b>LISTA DE ABREVEAÇÕES E SIGLAS</b> .....                                   | xvi   |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....   | xviii |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 21    |
| 1.1. Hemoglobinas Humanas: estrutura, síntese e função.....                  | 21    |
| 1.1.2. Expressão dos genes $\alpha$ e $\beta$ da globina.....                | 23    |
| 1.2. Hemoglobinopatias.....  | 25    |
| 1.3. Talassemias.....  | 26    |
| 1.3.1. Talassemias Alfa.....   | 28    |
| 1.3.2. Talassemia Alfa: deleções do tipo $\alpha^+$ .....                    | 30    |
| 1.3.3. Talassemia Alfa: deleções do tipo $\alpha^0$ .....                    | 32    |
| 1.3.4. Talassemias alfas não deletoriais .....                               | 35    |
| 1.3.5. Diagnóstico molecular das talassemias alfa.....                       | 36    |
| 1.3.6. MLPA - <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> .....  | 37    |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....  | 41    |
| 2.1 HIPÓTESE.....  | 42    |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 43    |
| 3.1. Geral.....  | 43    |
| 3.2. Específicos.....  | 43    |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 44    |
| 4.1. Casuística.....   | 44    |
| 4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão para os sujeitos da pesquisa.....    | 45    |
| 4.2. Métodos.....  | 45    |
| 4.2.1. Obtenção das amostras.....  | 45    |
| 4.2.2. MLPA ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )..... | 46    |
| 4.2.2.1. Validação do Método de MLPA .....                                   | 46    |
| 4.2.2.2. Reações de MLPA - Procedimento experimental.....                    | 47    |
| 4.2.2.3. Desnaturação do DNA e reação de hibridização das sondas.....        | 47    |
| 4.2.2.4. Reação de Ligação.....  | 48    |
| 4.2.2.5. Reação de PCR.....  | 48    |
| 4.2.2.6. Separação dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar..... | 48    |
| 4.2.2.7. Análise dos dados.....  | 49    |
| 4.3. Financiamento.....  | 50    |

|   |    |
|---|----|
| <b>5. RESULTADOS</b> .....  | 51 |
| 5.1 Estudo molecular do gene $\alpha$ por <i>Multiplex gap</i> PCR.....   | 51 |
| 5.2 Padronização da técnica de MLPA e validação do kit P140-C1.....   | 52 |
| 5.3 Estudo molecular do gene $\alpha$ por MLPA.....   | 54 |
| 5.3.1 Pacientes identificados com polimorfismos de nucleotídeos simples nos genes HBA1 e HBA2.....                      | 55 |
| 5.3.2 Pacientes com a deleção $-\alpha^{3.7}$ .....   | 56 |
| 5.3.2.1 Pacientes com deleção $-\alpha^{3.7}$ associados a polimorfismos de nucleotídeos simples no gene $\alpha$ ..... | 57 |
| 5.3.2.2 Pacientes com deleção $-\alpha^{3.7}$ associados a uma nova deleção de talassemia $\alpha^+$ .....              | 58 |
| 5.3.3 Pacientes com fenótipo de doença da Hb H.....   | 60 |
| 5.3.4 Paciente com talassemia $\alpha^0$ combinado com alelos $\alpha$ normais.....                                     | 63 |
| 5.3.5 Paciente com duplicação do <i>cluster</i> $\alpha$ .....  | 65 |
| 5.3.6 Comparação do perfil hematológico dos pacientes com $\alpha$ -tal.....  | 66 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....   | 70 |
| <b>7. CONCLUSÃO</b> .....   | 81 |
| <b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....  | 82 |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 83 |
| <b>10. ANEXOS</b> .....   | 90 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hemoglobinas Humanas: estrutura, síntese e função

A hemoglobina (Hb) é a principal proteína presente nos eritrócitos responsável pelo transporte de oxigênio ( $O_2$ ) aos tecidos e dióxido de carbônico ( $CO_2$ ) aos pulmões (WAYE; ENG, 2013). Possui estrutura oligomérica composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas do tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo não alfa, denominadas de globinas. Estas subunidades polipeptídicas possuem um sítio onde se fixa à molécula do grupo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (heme) (Figura 1), que confere cor vermelha a proteína e detém a propriedade de receber ou liberar o  $O_2$  nos tecidos. O grupo heme é formado por uma parte orgânica, a protoporfirina e um átomo de ferro no estado ferroso [Fe (II)]. Para o bom desempenho de sua função, são necessários cerca de 300 milhões de moléculas de Hb por eritrócitos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; LORENZI, 2003).



**Figura 1** - Esquema representando a estrutura da hemoglobina. As cadeias do tipo alfa estão demonstradas nas cores vermelho e verde e as tipo beta em azul e roxo, ambos com o grupo heme inserido em sua subunidade formando o tetrâmero da Hb (Adaptado de: [www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials](http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials)).

A produção e a síntese de Hb estão sob o controle de dois grupos de genes distintos: os genes da  $\alpha$ -globina localizados no cromossomo 16, e os genes da  $\beta$ -globina no cromossomo 11. Existem quatro genes que codificam as cadeias  $\alpha$  e dois genes que codificam as cadeias  $\beta$ . Independente do número de genes responsáveis por controlar a produção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas são sintetizadas em quantidades exatamente iguais. Os diversos tipos de hemoglobinas produzidas em cada fase do desenvolvimento

humano (embrionário, fetal e pós-nascimento) surgem da combinação de diferentes cadeias globínicas (NAOUM, 1987; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

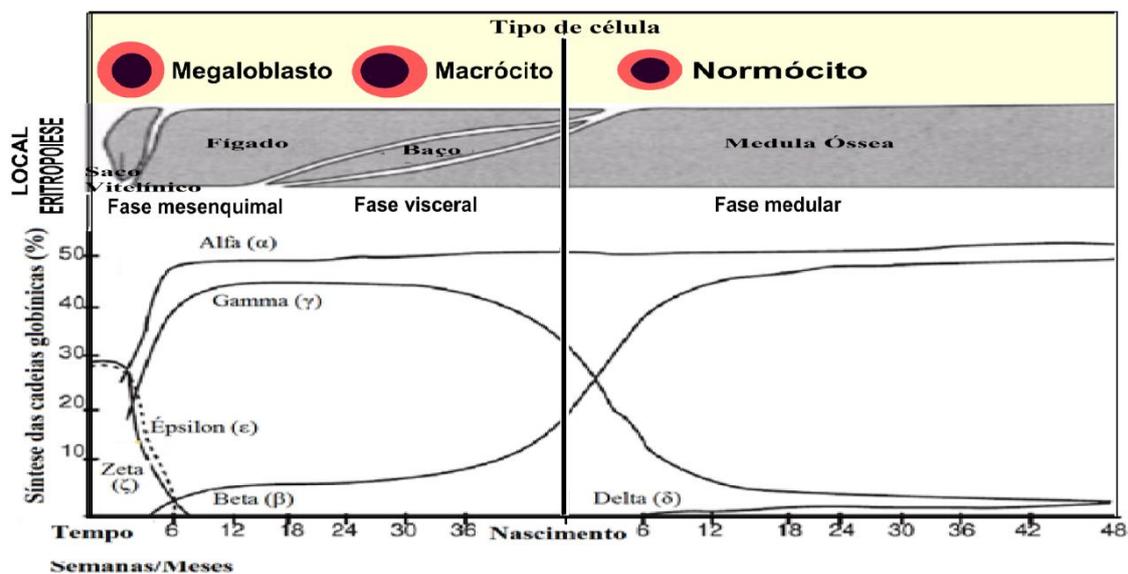
Durante o desenvolvimento embrionário, três Hb<sub>s</sub> diferentes são sintetizadas nos eritroblastos policromáticos e ortocromáticos: Gower-1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), formada pela combinação das cadeias zeta ( $\zeta$ ) e épsilon ( $\varepsilon$ ); Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) pela cadeia zeta ( $\zeta$ ) e gamma ( $\gamma$ ); Gower-2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) que surge quando as cadeias  $\alpha$  começam a ser sintetizadas e combinam com a cadeia épsilon ( $\varepsilon$ ) (WEATHERALL; CLEGG, 2001; HARTEVELD; HIGGS, 2010).

No decorrer do desenvolvimento, agora denominado de período fetal, predomina a produção da Hb fetal (Hb F), principal Hb durante os dois terços terminais da vida intrauterina, cuja composição é dada pela combinação das subunidades alfa e gama ( $\alpha_2\gamma_2$ ), diminuindo seus índices logo após o nascimento, sendo que em adultos saudáveis apenas traços são encontrados (<1%) (NAOUM, 1987; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

Por volta da 25<sup>a</sup> semana de gestação, inicia-se a produção das cadeias delta ( $\delta$ ) em pequenas quantidades, que lentamente vão aumentando seus índices e estabilizam por volta do sexto mês de vida. Estas cadeias ligam às cadeias  $\alpha$  originando a Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), que corresponde <3% da Hb em um adulto saudável (NAOUM, 1987; HARTEVELD; HIGGS, 2010).

Nos seis primeiros meses de vida, a cadeia  $\beta$  é expressa em poucas quantidades, porém a partir deste período ocorre uma mudança na síntese de cadeia  $\gamma$  que é substituída pela síntese de cadeia  $\beta$ , que se unem as cadeias  $\alpha$  originando a Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), que representa cerca de 96% do total das Hb<sub>s</sub> de um indivíduo adulto normal. Assim, as interações das diferentes subunidades de globinas determinam a capacidade da Hb de transportar O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sup>+</sup>, atendendo às condições fisiológicas (LEHNINGER, 1995; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A Figura 2 mostra a sucessão de diferentes hemoglobinas e a sua síntese em cadeias globínicas presentes no embrião, no feto (após a 12<sup>a</sup> semana) e no adulto. Após o nascimento, com a repressão da síntese da cadeia  $\gamma$  e aumento da síntese da cadeia  $\beta$ , ocorre a troca da Hb F pela Hb A, que se completa em média até o sexto mês de vida em indivíduos saudáveis.



**Figura 2** – Representação esquemática da síntese das diferentes cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento humano (Adaptado de Weatherall e Clegg, 2001).

### 1.1.2. Expressão dos genes $\alpha$ e $\beta$ da globina

Os genes  $\alpha$  e  $\beta$  da globina estão agrupados em cromossomos diferentes, no entanto apresentam o mesmo padrão de expressão no decorrer das fases do desenvolvimento e no processo de diferenciação dos eritrócitos. Esses genes estão dispostos da região 5' para 3' no DNA, o padrão de expressão gênica é temporalmente modificado e os genes das globinas são sequencialmente ativados a partir da região 5'. Ambos são constituídos por três éxons (I, II e III) intercalados por dois íntrons ou *Intervening Sequence* (IVS-1 e IVS-2) e transcritos de uma maneira coordenada, a fim de produzirem níveis equilibrados das cadeias globínicas (HIGGS, 1993; WEATHERALL, PROVAN, 2000; HUGHES *et al.*, 2005).

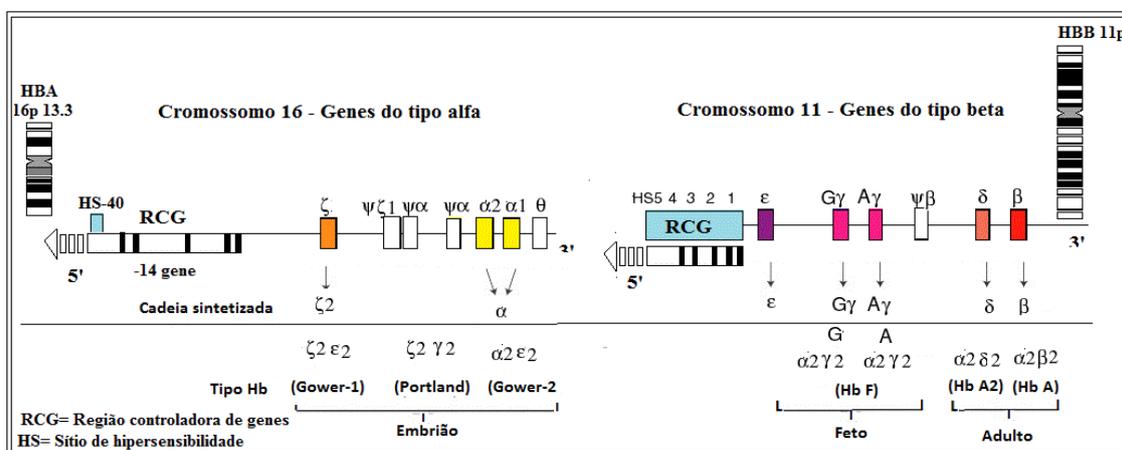
Os genes que codificam as cadeias do tipo  $\alpha$ , que são compostas por 141 aminoácidos, estão localizados no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3). Eles se alojam em um complexo denominado agrupamento gênico ou *cluster* globínico com cerca de 35 Kb de DNA, formado pelo gene zeta ( $\zeta$ ), expresso na fase embrionária, dois genes  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), que são expressos nas fases fetal e adulta e vários genes menores, sendo, três pseudogenes ( $\Psi\zeta_1$ ,  $\Psi\alpha_1$ ,  $\Psi\rho$ ) e dois genes inativos ( $\theta_1$  e  $\mu$ , conhecido também por  $\alpha^D$ ), arranjados na seguinte ordem: 5'- $\zeta$ - $\Psi\zeta$ - $\mu$ - $\Psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\Psi\rho$ - $\theta_1$ -3' (HIGGS, 1993; HUGHES *et al.*, 2005; LEWIS, 2006; VOON; VADOLAS, 2008).

Enquanto os que codificam o complexo das cadeias do tipo  $\beta$ , formadas por 146 aminoácidos, estão localizados no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) com um segmento maior que 60 Kb. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  possuem grande homologia sendo que 64 aminoácidos da cadeia polipeptídica estão em posições idênticas. Este complexo gênico é formado por cinco genes, 5'- $\epsilon$ -G $\gamma$ -A $\gamma$ - $\Psi$  $\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3' que, assim como no complexo gênico  $\alpha$ -globina, são sequencialmente expressos no decorrer do desenvolvimento. Apesar de compartilharem uma alta homologia com genes globínicos funcionais, os pseudogenes encontrados nos dois agrupamentos gênicos, não produzem uma proteína funcional, devido a mutações que causaram a perda da função do gene tornando-os inativos (WEATHERALL; CLEGG, 2001; LEVINGS; BUNGERT, 2002; WAYE; ENG, 2013).

A regulação da transcrição e expressão dos genes das globinas é controlada pela integração de sequências regulatórias *cis*-atuantes (como elementos promotores, acentuadores e silenciadores) reconhecidas por proteínas *trans*-atuantes, representadas pelos fatores de transcrição eritroides ou não eritroides, denominadas de região controladora de genes (RCG). A RCG contém locais de ligação de fatores eritroides específicos hipersensíveis à ação da enzima DNase I (HS), necessários para manter a estrutura da cromatina aberta, para que os fatores de transcrição possam ter acesso aos elementos reguladores que medeiam a expressão de cada gene no complexo globínico (HIGGS, 2013; WAYE; ENG, 2013).

Faz parte do *locus* regulatório da beta globina a região controladora do *locus* (LCR), localizada a cerca de 6 a 22 Kb à montante do gene  $\epsilon$ -globina, composta por cinco sítios hipersensíveis à DNase I (HS-1, HS-2, HS-3, HS-4, HS-5) já para os genes  $\alpha$  é o Elemento Regulatório Maior dos genes  $\alpha$  ( $\alpha$ -MRE) composto por quatro locais eritroides específicos, denominados HS-10, HS-33, HS-40, HS-48, localizados conforme a distância que se situam em relação ao gene  $\delta$ -globina. Sendo o HS-40 o principal elemento regulatório para expressão dos genes  $\alpha$ , atuando como potenciador da síntese deste gene. É constituído por um segmento de 200 a 300 pb, contendo distintas combinações de domínios conservados, onde ocorre a junção de proteínas que atuam no processo da transcrição gênica. Os importantes fatores transcricionais GATA-1, EKFL e NF-E2 participam ativamente nos processos de regulação da hematopoese e da expressão do *loci* da  $\alpha$  globina por exercer interação com a  $\alpha$ -LCR bem como das

suas regiões promotoras (HIGGS; BOWDEN, 2001; CAO; MOI, 2002; LEVINGS; BUNGERT, 2002; STAMATOYANNOPOULOS, 2005; RIBEIRO; SONATI, 2008; VOON; VADOLAS, 2008; SANKARAN *et al.*, 2010). A RCG é responsável por controlar todos os outros genes dos agrupamentos  $\alpha$  e  $\beta$ , que produzem moléculas de RNA polimerases específicas para cada gene do agrupamento de genes do tipo alfa ou do tipo beta. Essas moléculas de RNA polimerases fazem com que o DNA de cada gene se duplique e uma dessas cópias dê origem ao RNA mensageiro específico para cada gene. Todo esse processo ocorre nos eritroblastos, principalmente nos policromáticos e ortocromáticos, na medula óssea. As sínteses de globinas  $\alpha$  e  $\beta$  são simultâneas, bem como a do grupo heme (Figura 3) (CAO; GALANELLO, 2010; HIGGS, 2013).



**Figura 3** - Localização do *cluster* do gene  $\alpha$ -globínico no cromossomo 16 e do *cluster*  $\beta$ -globínico no cromossomo 11. As caixas coloridas representam genes funcionais. Os genes  $\gamma$  e  $\alpha$ -globínicos são duplicados; os dois genes  $\alpha$ -globínicos têm o mesmo produto, ao passo que os produtos dos dois genes  $\gamma$ -globínicos são um pouco diferentes (Adaptado de Cao e Galanello, 2010).

## 1.2. Hemoglobinopatias

As desordens da hemoglobina compreendem um grupo de distúrbios hereditários que afetam os genes responsáveis pela síntese das globinas, afetando cerca de 7% da população mundial (WEATHERALL; CLEGG, 2001). Normalmente, as cadeias de globinas são produzidas em quantidades iguais mantendo um equilíbrio entre as mesmas. Qualquer perturbação na síntese destas cadeias pode resultar em um desequilíbrio. Várias condições genéticas podem acarretar modificações na molécula de Hb e causar hemoglobinopatia, seja por uma mudança na estrutura de suas cadeias polipeptídicas ou uma falha na síntese de uma cadeia específica. Elas se dividem em dois grupos principais: síndromes talassêmicas e variantes estruturais da Hbs ou Hbs

anormais. Embora as hemoglobinopatias estruturais e as talassemias sejam dois grupos geneticamente diferentes, clinicamente compartilham algumas manifestações, tais como: anemia de grau variável, com hipocromia e microcitose dos eritrócitos e morbimortalidade considerável (NAOUM, 1987; LOBO *et al.*, 2003; LORENZZI, 2011; AIMIUWU *et al.*, 2013).

Pesquisas estimam que a cada ano milhares de crianças, cerca de 400 mil, nascem com algum distúrbio da hemoglobina (WEATHERALL; CLEGG, 2001). Apesar de sua distribuição global, segundo relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% das crianças afetadas nasce em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, indicando que as hemoglobinopatias são um problema de saúde pública (WEATHERALL, 2010; AIMIUWU, *et al.*, 2013).

No Brasil, as hemoglobinopatias mais prevalentes são a  $\alpha$ -tal, a anemia falciforme, hemoglobinopatia C e a  $\beta$ -tal (SALZANO; TONDO, 1982; ZAGO *et al.*, 1983; NAOUM, 1987). Elas estão difundidas na população de modo irregular, como resultado da grande diversidade étnica decorrente dos processos migratórios que ocorreram do século XVI até meados do século XX, os quais determinaram a composição étnica das diferentes regiões do país (ZAGO *et al.*, 1999; BONINI-DOMINGOS, 2004; LISOT; SILLA, 2004; CARLOS *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015). Atualmente mais de 1.771 mutações nos genes globínicos já foram identificadas (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>).

### 1.3. Talassemias

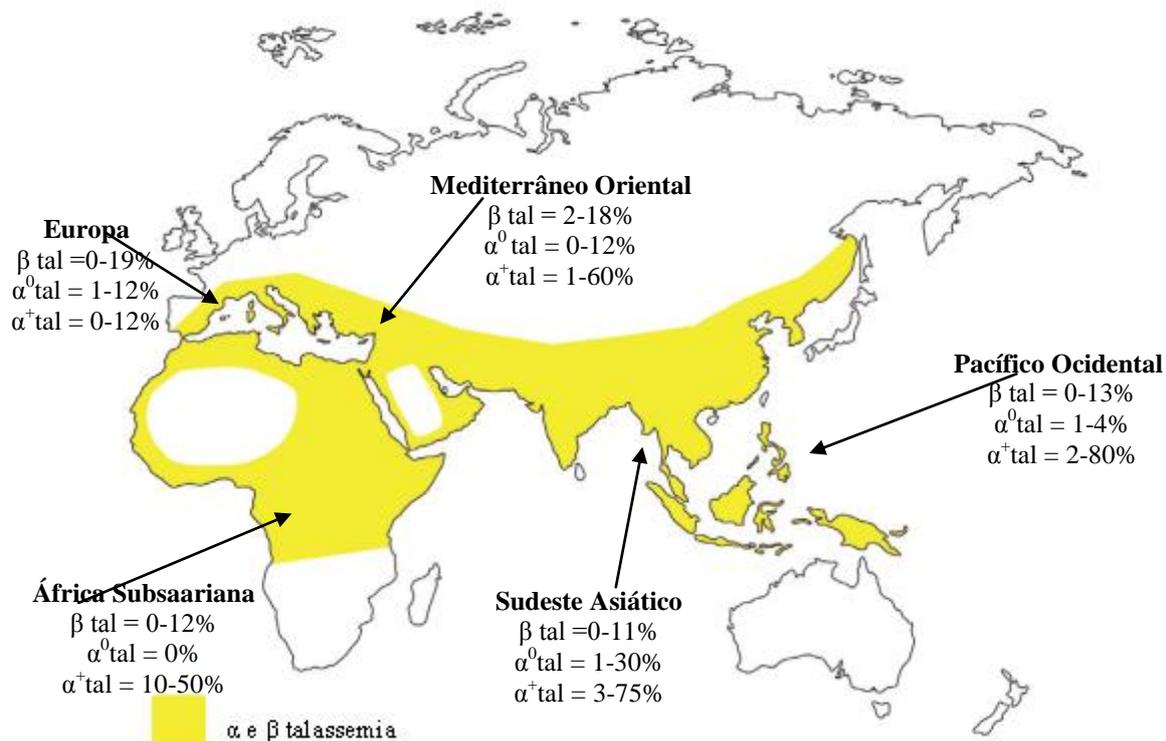
As talassemias são hemoglobinopatias quantitativas hereditárias autossômicas causadas por mutações nos genes que sintetizam principalmente as cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  da globina. A característica principal dessas desordens é a capacidade de interferir na síntese de uma ou mais cadeias globínicas, resultando na ausência ou redução do número de cadeias formadas (JOSHI; NICKERSON; MCMANUS, 2004; WEATHERALL, 2006), o que pode levar à uma hemoglobinizacão deficiente das hemácias, que por sua vez, resulta em eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, com dano em sua membrana celular e seus precursores eritroides (culminando com sua remoção precoce da circulação pelo sistema fagocitário), devido ao excesso das subunidades de

globina despareadas (FORGET; COHEN, 2005; WEATHERALL, 2008; KRAUSE *et al.*, 2012). Pode se evidenciar índice de anisocitose (RDW) normal ou pouco aumentado, reticulocitose e severidade clínica variável, indo desde casos mais leves e assintomáticos até a morte fetal ou neonatal, dependendo de quantos genes foram afetados e qual o tipo de mutação (VICHINSKY, 2013).

As talassemias são classificadas de acordo com o tipo de cadeia cuja produção está afetada em:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\delta\beta$  e  $\gamma\delta\beta$ . Este defeito de sínteses pode envolver qualquer cadeia de globina, no entanto, as talassemias  $\alpha$  e  $\beta$  são as que apresentam maior frequência e importância clínica (BUNN; FORGET, 1986; WEATHERALL, 2010; VICHINSKY, 2012).

Dados da OMS estima-se que cerca de 30% da população mundial seja portadora de alguma forma de talassemia, com pelo menos 50.000 crianças afetadas pelas formas graves a cada ano (MODELL; DARLISON, 2008; AIMIUWU *et al.*, 2013). Sendo as talassemias  $\alpha$  as mais prevalentes, identificada na maioria das populações estudadas (MODELL; DARLISON, 2008; HIGGS; ENGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012; CARLOS *et al.*, 2015).

Até o momento foram descritas mais de 300 mutações que causam talassemia  $\beta$  (o maior número são mutações pontuais) e mais de 150 que causam talassemia  $\alpha$ , a maior parte envolvendo deleções dentro do *cluster* da  $\alpha$ -globina. (VICHINSKY, 2013; HIGGS, 2013). Sua distribuição inclui as áreas que margeiam o mar Mediterrâneo, continente Africano, Oriente Médio, Índia e Sudeste Asiático como marcado em amarelo na Figura 4 (FORGET; COHEN, 2005; WEATHERALL; PROVAN, 2000; GALANELLO; CAO, 2011; WAYE; ENG, 2013). No entanto, as talassemias já são identificadas em todos os continentes, devido aos processos migratórios e à alta taxa de miscigenação, com relatos de incidência significativa em vários países como Canadá, Estados Unidos, México, Caribe, Jamaica, Venezuela, Argentina e Brasil (WEATHERALL; CLEGG, 2001; CANÇADO, 2006; CARLOS *et al.*, 2015).



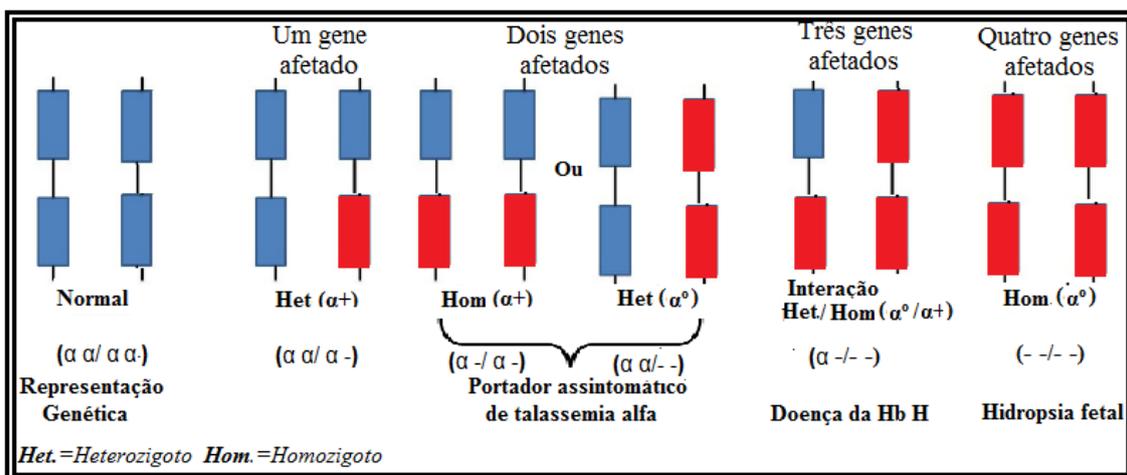
**Figura 4** - Distribuição e prevalência mundial das talassemias  $\alpha$  e  $\beta$  (Adaptada de Weatherall e Clegg, 2001).

### 1.3.1. Talassemias Alfa

A  $\alpha$ -tal constitui um grupo de alterações genéticas que estão entre as mais comuns no mundo, causadas pela deficiência da síntese de cadeias  $\alpha$  da Hb (OLIVEIRA; MENDIBURU; BONINI-DOMINGOS, 2006; HIGGS, 2013; WAYE; ENG, 2013). As  $\alpha$ -tal geralmente são causadas por deleções de um ou ambos os genes  $\alpha$  da globina ou eventualmente por pequenas mutações pontuais ou inserções (VICHINSKY, 2012; WAYE; ENG, 2013).

Uma vez que, em uma célula diploide normal existem quatro genes codificantes para as cadeias  $\alpha$ , dois em cada cromossomo 16 ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), as  $\alpha$ -tal podem ser classificadas em  $\alpha^+$ , quando a deleção envolve somente um gene do cromossomo (alelo  $-\alpha$ ) e  $\alpha^0$  quando ambos os genes  $\alpha$  do mesmo cromossomo são afetados (parcialmente ou completamente) caracterizando o estado homozigoto (alelo  $--$ ) (CANÇADO, 2006; SINGER, 2009).

A interação destes alelos pode resultar em diferentes formas com manifestações clínicas e alterações laboratoriais muito variadas, sendo que a gravidade clínica e hematológica é diretamente proporcional ao número de genes  $\alpha$  deletados. Conforme o número de genes afetados, os fenótipos observados são: portador silencioso, traço  $\alpha$  talassêmico, doença da Hb H e hidropsia fetal por Hb Bart's, respectivamente (NAOUM, 1987; OLIVEIRA; MENDIBURU; BONINI-DOMINGOS, 2006; HARTEVELD; HIGGS, 2010) (Figura 5).



**Figura 5** - Genótipos da talassemia alfa. As caixas azuis representam a presença do gene alfa e as vermelhas sua ausência (Adaptado de Weatherall e Provan, 2000).

O heterozigoto para o traço talassêmico  $\alpha^+$  ou portador silencioso ( $-\alpha/\alpha$ ) é assintomático, apresentando alterações laboratoriais mínimas ou ausentes. Já os homozigotos para o traço talassêmico  $\alpha^+$  ( $-\alpha/\alpha$ ) e heterozigotos para o traço talassêmico  $\alpha^0$  ( $-/\alpha$ ) apresentam um quadro de anemia leve com Hb entre 11,0 e 13,0 g/dL, hemácias microcíticas e hipocrômicas, VCM (volume corpuscular médio) entre 75 e 80fl, discreta anisopoiquilocitose e 5 a 10% de Hb Bart's ao nascimento (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

Interação das formas  $\alpha^0$  e  $\alpha^+$  ( $-/\alpha$ ) resulta na doença da Hb H. O quadro clínico e laboratorial é de anemia moderada com Hb entre 8,0 e 11,0 g/dL, microcitose com VCM entre 55 e 65 fl, hipocromia, poiquilocitose, presença de hemácias policromatófilas e de hemácias em alvo, icterícia e esplenomegalia e ao nascimento apresenta de 25 a 50% de Hb Bart's e 5 a 30% de Hb H na vida adulta (NAOUM, 1987; HARTEVELD; HIGGS, 2010).

A homozigose da talassemia  $\alpha^0$  ( $-/-$ ) ou hidropsia fetal é a forma mais grave da doença levando a morte intrauterina ou logo após o nascimento na maioria das vezes

(SONGDEJ; BADDS; HIGGS, 2017). Nesses, o esfregaço sanguíneo apresenta microcitose, hipocromia e anisopoiquilocitose intensas, além do elevado número de eritroblastos, e apresenta quase 100% de Hb Bart's na eletroforese de Hb (WEATHERALL; PROVAN, 2000; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

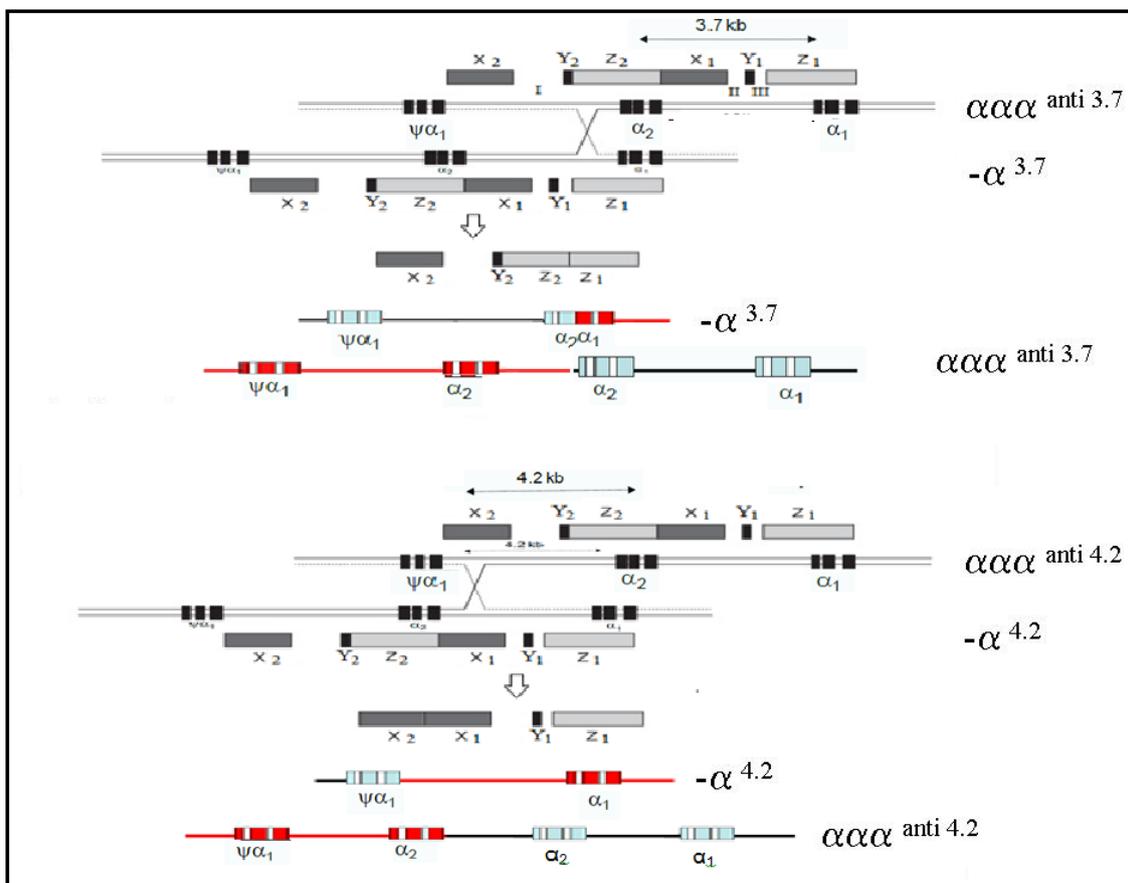
Portanto, na  $\alpha$ -tal as manifestações com importantes alterações clínicas e laboratoriais geralmente ocorrem na doença da Hb H e na síndrome da hidropsia fetal. Devido às alterações na síntese das globinas  $\alpha$ , as globinas  $\beta$  e  $\gamma$  que continuam sendo sintetizadas normalmente, sobram, pois deveriam se ligar as  $\alpha$  inexistentes, e dessa forma o excesso dessas cadeias forma tetrâmeros  $\beta^4$  e  $\gamma^4$ , originando a Hb H e Bart's, respectivamente (NAOUM, 1997). Essas hemoglobinas apresentam alta afinidade pelo oxigênio, tornando sua liberação para os tecidos e células muito lenta e difícil, levando à hipóxia tecidual. Por serem instáveis, as Hb H e Bart's se precipitam no interior dos eritrócitos formando corpos de inclusão que fazem com que estas células sejam retiradas da circulação precocemente, pelo baço e outros órgãos do sistema retículo endotelial, levando ao quadro de anemia hemolítica. Embora raramente aconteça o quadro clínico pode agravar e ocasionar hiperplasia com expansão medular e deformidades ósseas significativas (NAOUM, 1997; WEATHERALL; PROVAN, 2000; HARTEVELD; HIGGS, 2010).

### 1.3.2. Talassemia Alfa: deleções do tipo $\alpha^+$

As talassemia  $\alpha^+$  mais frequentes são as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ . Apesar de serem mais raras, podem ser ocasionadas por mutações pontuais ou deleções de um ou mais nucleotídeos (forma não delecional -  $\alpha^T$  ou  $\alpha\alpha^T$ ). Ambos os genes  $\alpha$  localiza-se dentro da mesma região cromossômica em um segmento genômico duplicado de mais ou menos 4 kb de DNA (WEATHERALL; CLEGG, 2001; STEINBERG *et al.*, 2009).

Esse segmento altamente homólogo é composto por três regiões denominadas X, Y e Z que estão separados por pequenas regiões não homólogas (I, II e III) (HIGGS, 2013). Essa alta homologia propicia o emparelhamento incorreto dos cromossomos na meiose com conseqüente alinhamento incorreto e deleção de genes  $\alpha$ , demonstrado na figura 6. Esse desalinhamento gênico e suas variações favorece o surgimento de novos alelos na população, como nos alelos deletados ( $-\alpha$ ) e os triplicados ( $\alpha\alpha\alpha$ ),

sugerindo que entre essas regiões as recombinações são bem comuns (BUNN; FORGET, 1986; HIGGS, 2013).



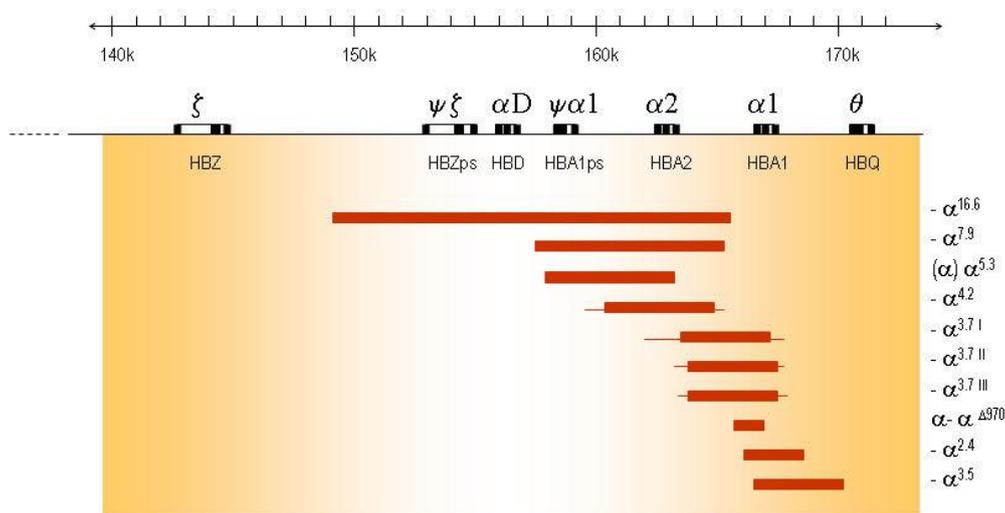
**Figura 6** - Representação esquemática do mecanismo pelo qual ocorrem as deleções mais comuns de α-talassemia, exemplificando os *crossing-over* desiguais entre as caixas Z originando os alelos  $-\alpha^{3.7}$  e  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ , e entre as caixas X dando origem aos alelos  $-\alpha^{4.2}$  e  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$  (Adaptada de Higgs, 2013).

A deleção  $-\alpha^{3.7}$  ocorre devido a remoção de 3,7 Kb de DNA, por causa de um alinhamento incorreto entre as regiões homólogas Z, formando um gene α híbrido (α<sub>1</sub>-α<sub>2</sub>) em uma das fitas do cromossomo meiótico e três genes α na fita complementar (Figura 6). Geralmente, o alelo com genes triplicados tendem a desaparecer nas divisões celulares subsequentes. Atualmente, três diferentes subtipos da deleção  $-\alpha^{3.7}$  foram descritas,  $-\alpha^{3.7\text{I}}$ ,  $-\alpha^{3.7\text{II}}$  e  $-\alpha^{3.7\text{III}}$ , de acordo com o ponto exato do *crossing-over* na região Z. O tipo I é mais prevalente nos africanos e americanos, enquanto o tipo III praticamente só ocorre em asiáticos (HIGGS *et al.*, 1989; HIGGS, 2009; BELISÁRIO, VIANA, 2011).

A segunda maior causa de talassemia α<sup>+</sup>, é a deleção  $-\alpha^{4.2}$  originada pela remoção de 4,2 Kb de DNA, devido a um alinhamento incorreto entre as regiões

homólogas X, com deleção do gene  $\alpha_2$  inteiro, restando somente o  $\alpha_1$  em uma fita e 3 genes  $\alpha$  na outra (Figura 6). Sendo mais prevalente em algumas populações do Sudeste Asiático (KATTAMIS *et al.*, 1996).

Além das deleções anteriormente mencionadas ( $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ ), outras deleções mais raras que causam talassemia  $\alpha^+$ , podendo envolver tanto o gene  $\alpha_1$  ( $-\alpha^{0.97}$ ,  $-\alpha^{2.4}$ ,  $-\alpha^{3.5}$ ,  $-\alpha^{18}$ ) (KULOZIK *et al.*, 1988; INDRAK *et al.* 1993; ENG *et al.*, 2005; POODT *et al.*, 2006) quanto o gene  $\alpha_2$  ( $-\alpha^{0.2}$ ,  $-\alpha^{2.7}$ ,  $-\alpha^{5.3}$ ,  $-\alpha^{6.3}$ ,  $-\alpha^{7.9}$ ,  $-\alpha^{16.6}$ ,  $-\alpha^{27.6}$ ,  $-\alpha^{28.5}$ ) (LACERRA *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1991; HARTEVELD *et al.*, 2003; RUGLESS *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2011; LAMBERT *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016a ; WANG *et al.*, 2016b) já foram descritas (Figura 7).



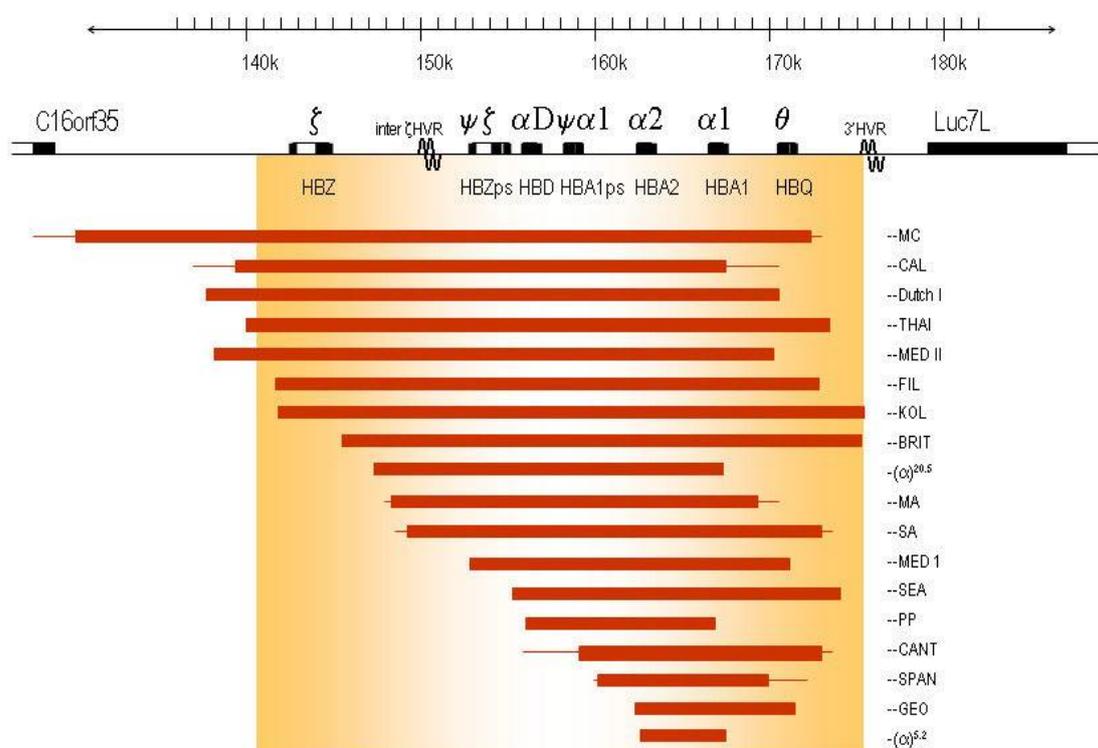
**Figura 7-** Deleções de um gene  $\alpha$  que dá origem a talassemia  $\alpha^+$ . A extensão da deleção é mostrada como barras, as linhas finas indicam regiões de incerteza dos pontos de interrupção (Harteveld e Higgs, 2010).

### 1.3.3. Talassemia Alfa: deleções do tipo $\alpha^0$

As talassemias  $\alpha^0$  resultam de grandes deleções que removem completamente ou parcialmente o *cluster*  $\alpha$  ou seu elemento regulatório (chamado de  $\alpha$ -MRE ou HS 40), afetando a expressão dos genes  $\alpha$ . A maioria dessas deleções ocorre devido a recombinações não homóloga (KATTAMIS *et al.*, 1996; HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013).

Sendo que a maior parte delas remove ambos os genes  $\alpha$  do mesmo cromossomo, das quais as duas mais comuns são a  $--^{MED}$ , uma deleção de 18 Kb de DNA, frequente na bacia do Mediterrâneo (HIGGS *et al.*, 1989; KATTAMIS *et al.*, 1996), e a  $--^{SEA}$ , uma

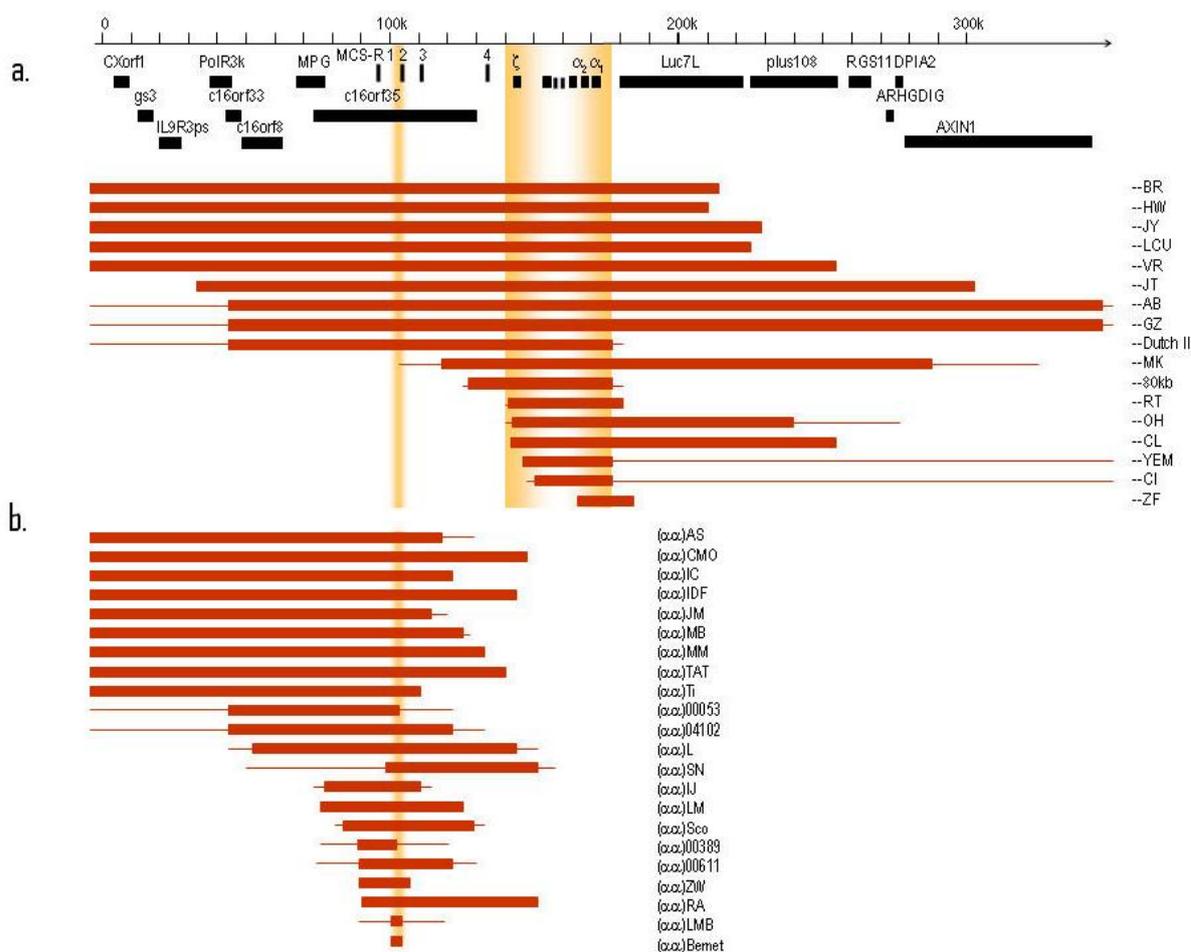
deleção de 20 kb que é a forma mais frequente de talassemia  $\alpha^0$  no Sudeste Asiático. Ainda nesta região, podem ser encontradas, de forma menos frequente, as deleções (--FIL) e (--THAI). Ambas comprometem uma região de aproximadamente 30 a 38 kb, removendo o gene  $\zeta_2$  e ambos os genes  $\alpha$  (ENG *et al.*, 2000). Além destas temos a deleção  $-(\alpha)^{20.5}$  que atinge aproximadamente 20.5 Kb de DNA, envolvendo todo gene  $\alpha_2$  e a região 5' do gene  $\alpha_1$ , deixando-os inativos, também encontrada com mais frequência na região Mediterrânea (HIGGS *et al.*, 1989; KATTAMIS *et al.*, 1996; HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013). As deleções que causam talassemias  $\alpha^0$  são apresentadas na Figura 8.



**Figura 8** - Esquema mostrando as principais deleções que envolvem ambos os genes  $\alpha$  dando origem as talassemias  $\alpha^0$  (Hartevelde e Higgs, 2010).

Porém, existem outras deleções que podem afetar a região reguladora do gene e causar talassemia  $\alpha^0$ , que situa-se entre 40 e 50 kb a montante do agrupamento de genes da  $\alpha$ -globina, deixando os genes  $\alpha$  intactos. Esta região, possui quatro sequências conservadas de múltiplas espécies (MCS), denominadas MCS-R1 a R4, equivalentes aos locais específicos e hipersensíveis a ação da DNase1, identificados como HS-48, HS-40, HS-33 e HS-10. Destas sequências, apenas a região HS-40 (MCS-R2) mostrou ser o principal elemento da expressão dos genes  $\alpha$  (HIGGS, 2009; HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013).

Até o momento, mais de 40 deleções envolvendo a região HS-40 foram descritas, que em geral, ocasionaram a deleção de 3,3 a 160 kb dessa região (site do *Globin Gene Server*<sup>1</sup>). Algumas podem compreender regiões de até 300 kb ou segmentos mais extensos, de até 2 Mb, observados em casos de Síndrome do Retardo Mental Associado à talassemia  $\alpha$  (síndrome de ATR-16) (HIGGS *et al.*, 2001; HIGGS, 2013). Nesses pacientes ocorre uma diminuição dos valores médios do volume corpuscular (VCM < 80fl) e da hemoglobina corpuscular (HCM < 25pg), quadro similar ao observado nos indivíduos que têm dois genes  $\alpha$  acometidos ( $-/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/-$ ) (HARTEVELD *et al.*, 2005; SONATI, COSTA, 2006; HIGGS, 2009; HIGGS, 2013). As formas conhecidas de talassemia  $\alpha^0$  que removem essa sequência, encontradas em diversas populações estão expostas na Figura 9.



**Figura 9** - Esquema mostrando as principais deleções que envolvem o Elemento Regulatório Maior da globina  $\alpha$  ( $\alpha$ -MRE). a). Grandes deleções envolvendo a região reguladora e ambos os genes  $\alpha$ . b). Deleções da região reguladora da  $\alpha$ -globina, deixando os genes  $\alpha$  intactos (Harteveld e Higgs, 2010).

<sup>1</sup> <http://globin.cse.psu.edu/>

### 1.3.4. Talassemias alfas não deletionais

As talassemias  $\alpha$  não deletionais ( $\alpha^T$ ), geralmente são causadas por mutações que acometem o processamento e/ou a tradução do RNAm ou a estabilidade das cadeias  $\alpha$ -globina. Elas podem ocorrer devido às mutações no sítio de poliadenilação ( $\alpha_2^{AATAAG}$ ,  $\alpha_2^{AATGAA}$  e  $\alpha_2^{AATA--}$ ), no códon de terminação levando a síntese de variantes de Hb alongadas (Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Koya Dora, Hb Seal Rock e Hb Paksé) e por mutações que causam variáveis estruturais altamente instáveis de cadeias  $\alpha$  (Hb Quong Sze, Hb Suan Dok, Hb Petah Tikvah, Hb Adana e Hb Aghia Sophia). As variantes não-deletionais são mais frequentes no Oriente Médio, Mediterrâneo e Sudeste Asiático (HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013).

Atualmente, mais 70 causas de talassemias  $\alpha$  não deletionais envolvendo tanto o gene  $\alpha_2$  ( $\alpha^T\alpha$ ) quanto o gene  $\alpha_1$  ( $\alpha\alpha^T$ ) foram descritas (ORIGA; MOI, 2018). Em geral, nas formas não deletionais ocorre uma redução mais severa na síntese de cadeia  $\alpha$ , com isso um quadro clínico-laboratorial mais acentuado também é observado nos indivíduos afetados, quando comparado com as formas deletionais (HARTEVELD; HIGGS, 2010). A maior parte das talassemias não deletionais são originadas por mutações envolvendo o gene  $\alpha_2$ , as alterações hematológicas, em geral, mais evidente pode ser compreendida devido ao fato de que a expressão desse gene  $\alpha_2$  é de quase três vezes maior que a do gene  $\alpha_1$ . Além disso, ao contrário de quando um gene  $\alpha$  é deletado, parece não haver aumento compensatório na expressão do outro gene  $\alpha$  funcional, quando um desses genes é inativado por uma mutação pontual (HIGGS, 2009).

No Brasil, as mutações de talassemia  $\alpha$  não deletionais, já relatadas até o momento, são a Hb *Constant Spring* ( $--/\alpha^{CS}$ ) causada por uma mutação no códon de terminação da cadeia, resultando na produção de uma subunidade da  $\alpha$  globina que se acumula no interior dos eritrócitos e a mutação  $\alpha^{HPH}\alpha$ , que ocorre devido a uma deleção de 5 nucleotídeos envolvendo o sítio doador de *splicing*<sup>2</sup> na região IVS-I do gene  $\alpha_2$ . A ocorrência concomitante dessas mutações com a deleção  $\alpha^0$ , por exemplo, pode levar a uma forma da doença da Hb H que é mais grave do que a doença da Hb H clássica ( $--/\alpha$ ) em decorrência das grandes deleções (KATTAMIS *et al.*, 1996; SONATI; COSTA, 2006; HIGGS, 2013; MOTA *et al.*, 2017).

---

<sup>2</sup> *Splicing* é um processo que remove os *introns* e junta os *exons* depois da transcrição do RNA (GRIFFITHS *et al.*, 2001).

### 1.3.5. Diagnóstico molecular das talassemias

A alfa talassemia é considerada uma das alterações de hemoglobina mais comum na população brasileira, chegando a atingir 20 a 25% da população afrodescendente (SONATI *et al.*, 1991). Em indivíduos com microcitose e hipocromia, a frequência aproximada é de 50%, conforme estudos brasileiros (BORGES *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2003; MELO REIS *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2010; MESQUITA *et al.*, 2010). O diagnóstico laboratorial precoce dessas doenças hereditárias, apesar de não possibilitar a cura, promove melhoria na qualidade e sobrevida dos pacientes, no entanto, ainda é uma hemoglobinopatia que tem sido pouco investigada em nosso meio (BONINI-DOMINGOS, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CANÇADO, 2006).

Atualmente testes moleculares são úteis para confirmar o diagnóstico (sobretudo em pacientes com microcitose e hipocromia com ou sem anemia), para o aconselhamento genético e em estudos populacionais. Isto evidencia a importância e a necessidade da utilização de metodologias, especialmente os métodos com base nas pesquisas de alterações no DNA, que fazem parte do arsenal diagnóstico moderno no cenário das doenças genéticas (WAGNER *et al.*, 2010; FERRAZ *et al.*, 2007).

Nos dias de hoje, as técnicas que utilizam PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são as mais utilizadas para a caracterização das talassemias, pois além de possibilitar a amplificação simultânea de vários fragmentos em uma única reação, como no método *multiplex*, é considerada rápida e econômica (CHONG *et al.*, 2000; WENNING *et al.*, 2000). Em 2000, Chong *et al.*, desenvolveram a metodologia de *Multiplex gap-PCR* no qual são empregados sete pares de iniciadores que flanqueiam as regiões correspondentes às deleções mais comuns ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--_{SEA}$ ,  $--_{MED}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $--_{FIL}$ ,  $--_{THAI}$ ), porém, sua aplicação é limitada apenas a detecção de alterações já definidas, sendo inadequada para a identificação de novas ou raras deleções.

Nos últimos anos, com os avanços das ferramentas de biologia, técnicas mais avançadas como MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), MAPH (*multiplex amplifiable probe hybridization*), CGH-array (*array-based comparative genomic hybridization*), permitem a detecção de deleções e duplicações genômicas, sendo, portanto, aplicáveis à caracterização das bases moleculares de diversas doenças,

como as talassemias, aumentando consequentemente o número de mutações conhecidas (STUPPIA *et al.*, 2012).

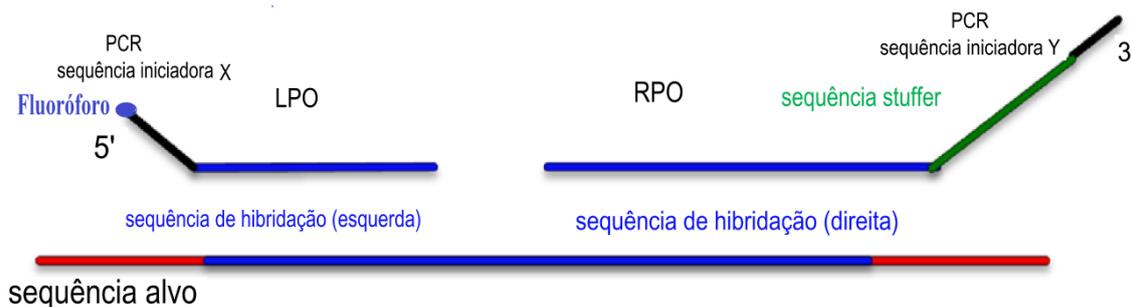
Schouten *et al.*, (2002) desenvolveram a metodologia de MLPA, uma técnica semiquantitativa utilizada para análises de sequências do DNA, considerada como um método rápido, de alta resolução, excelente especificidade e com ótima relação custo benefício quando comparado com a FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*) ou as plataformas de CGH-array. O MLPA tornou-se um método extensivamente utilizado em muitos laboratórios, para o diagnóstico molecular de várias doenças genéticas, como nos casos de investigação à predisposição ao câncer, distúrbios neuromusculares, deficiência intelectual e síndromes genéticas no feto (STUPPIA *et al.*, 2012). A investigação de hemoglobinopatias utilizando esta metodologia começou a ser utilizada em 2005 quando Harteveld *et al.*, desenvolveram sondas complementares à região dos *clusters*  $\alpha$  e  $\beta$ -globina.

#### **1.3.6. MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification***

Esta metodologia foi descrita por Schouten e colaboradores em 2002. É um método de *multiplex* de alto rendimento desenvolvido para analisar numa única reação baseada em PCR até 50 sequências de DNA. Têm aplicabilidade na detecção de alterações moleculares ao nível do DNA envolvendo as variações referentes ao número de cópias (CNVs) de uma determinada sequência genômica, com capacidade para identificar deleções e/ou duplicações de vários genes, além de mutações de pontuais, utilizando apenas 20 ng de DNA (SCHOUTEN *et al.*, 2002).

Até o momento, mais de 300 pares de sondas estão disponíveis comercialmente, específicas para uma grande variedade de alterações genéticas raras e comuns. A reação MLPA é baseada na hibridização de sondas a sequência alvo estudada, e que são amplificadas durante a reação através de oligonucleotídeos iniciadores comuns ao conjunto das sondas. Os fragmentos amplificados possuem tamanhos diferentes, que variam entre 100 nt e 500 nt de comprimento, e desta forma por meio de eletroforese capilar é possível separar e identificar esses fragmentos gerados. A sua identificação é possível devido à marcação das sondas MLPA com fluoróforo FAM na extremidade 5' (EIJK-VAN; OS; SCHOUTEN, 2011, STUPPIA *et al.*, 2012).

Cada sonda consiste em dois oligonucleotídeos (*Left Probe Oligonucleotide* - LPO e *Right Probe Oligonucleotide* - RPO) que contêm uma sequência específica (sequências de hibridação) que flanqueiam a região genômica de interesse; além disso, apresentam também uma sequência homóloga ao *primer* universal (sequências X e Y). As sondas também são marcadas com sequência-coringa (*stuffer*) de diferentes tamanhos (21-30 nt), o que permite diferenciar cada fragmento amplificado, assim ao final da reação terão produtos de PCR de tamanhos variados (Figura 10) (HIGGS, 2009).

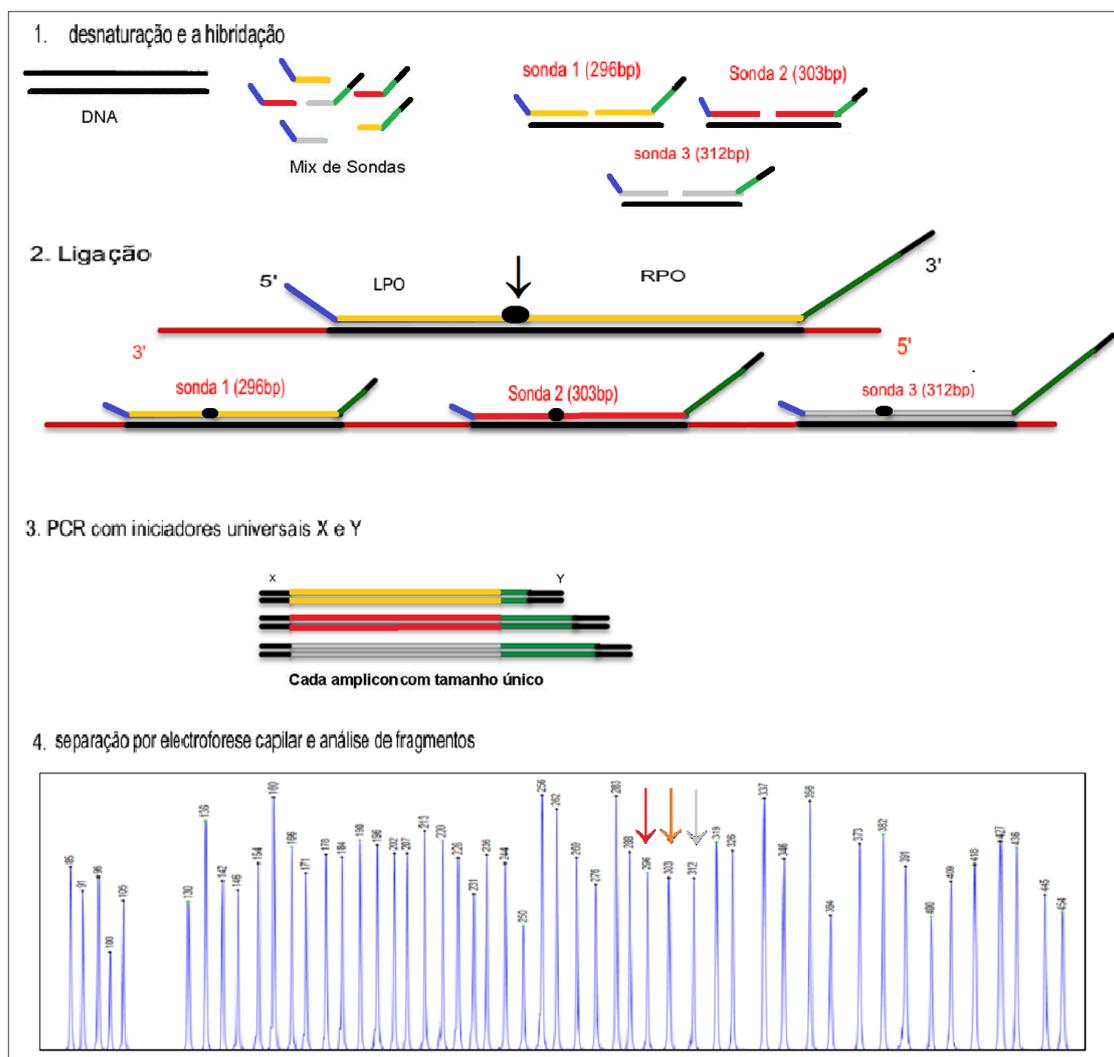


**Figura 10** - Representação esquemática das sondas de MLPA (Adaptada de Homig-Holzel e Savola, 2012).

A reação é constituída por quatro fases: desnaturação do DNA e hibridização das sondas, fase de ligação, amplificação por PCR, separação dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar e análise dos dados (EIJK-VAN; OS; SCHOUTEN, 2011, STUPPIA *et al.*, 2012).

Na primeira etapa, após a desnaturação do DNA ele é incubado com uma mistura de sondas específicas para a região a ser investigada. Após a hibridização sobre a sequência alvo, as duas sondas (LPO e RPO) são unidas por uma ligase termoestável gerando um único fragmento. Posteriormente, os produtos ligados são amplificados por PCR, utilizando-se um par de *primers* universais, que se anexam às sequências localizadas nas extremidades distais de cada sonda, somente as sondas ligadas uma à outra podem ser amplificadas exponencialmente por PCR. Conseqüentemente, serão gerados vários fragmentos (*amplicons*) e, como um dos *primers* é marcado com fluorescência, estes *amplicons* podem ser identificados na eletroforese capilar, onde são separados conforme o tamanho. Assim, o número relativo de fragmentos presentes depende da quantidade relativa das sequências alvo em cada amostra de DNA. Os resultados da área e altura dos picos de cada produto de amplificação gerado são utilizados na normalização dos dados e analisados a partir de softwares de genótipos, sendo o *Coffalyser* um dos mais utilizados. A interpretação dos resultados se dá por

meio da comparação dos tamanhos dos picos das amostras analisadas com os controles. Se os picos entre as amostras analisadas e os controles forem do mesmo tamanho, significa que é normal, ou seja, a amostra não possui nenhuma alteração. Se o pico da amostra apresentar uma diminuição de aproximadamente metade do tamanho do pico controle, então a amostra analisada apresenta uma deleção em heterozigose dessa sequência alvo. No entanto se o pico da amostra analisada for maior, então ela apresenta uma duplicação (EJK-VAN; OS; SCHOUTEN, 2011, STUPPIA *et al.*, 2012 ). A Figura 11 demonstra as etapas da reação do MLPA.



**Figura 11** - Representação esquemática das etapas da reação de MLPA (Adaptada de Homig-Holzel e Savola, 2012).

Nos últimos anos, a técnica de MLPA vem sendo utilizada para fins de diagnóstico das talassemias, com o intuito de aumentar a capacidade de identificação das diversas formas da doença, permitindo, na grande maioria dos casos, a detecção de deleções e duplicações que afetam a expressão e regulação dos genes da globina, não

identificados pela metodologia convencional (PHYLIPSEN *et al.*, 2010; COLOSIMO *et al.*, 2011; EIJK-VAN; OS; SCHOUTEN, 2011). Esta técnica permitiu descoberta de alterações até então desconhecidas, evidenciando a relevância do método. De um modo geral, vários trabalhos têm demonstrado que os desfechos encontrados nos ensaios de MLPA têm sido bastante fidedignos aos de demais técnicas (*Multiplex gap-PCR*, *q-Real Time PCR*, *CGH-array* e *FISH*) sugerido como método de escolha para esta abordagem (HIGGS, 2009; HARTEVELD; HIGGS, 2010; PHYLIPSEN *et al.*, 2010; COLOSIMO *et al.*, 2011; EIJK-VAN; OS; SCHOUTEN, 2011, STUPPIA *et al.*, 2012).

## 2. JUSTIFICATIVA

A anemia microcítica e hipocrômica representa um problema de saúde pública atingindo cerca de 30% da população mundial que corresponde a 1,62 bilhões de pessoas (BENOIST; MCLEAN; COGSWELL, 2008). Além disso, de acordo com dados da OMS (2008) aproximadamente 50% dos casos desta anemia são devido a deficiência de ferro, atingindo 70% nos países em desenvolvimento (BENOIST; MCLEAN; COGSWELL, 2008). No contexto das talassemias o conhecimento das bases moleculares de indivíduos portadores de microcitose e hipocromia e a sua prevalência na população apresenta-se vantajoso em termos de saúde pública, pois evita que os pacientes sejam submetidos a tratamentos desnecessários, através do diagnóstico precoce. Possibilita a orientação adequada das famílias acerca dos riscos relativos da doença, planejando medidas para diminuir o número de afetados com formas graves. Portanto, o diagnóstico laboratorial correto e preciso das diferentes etiologias das anemias é de extrema importância.

As talassemias constituem um grupo diversificado de anemias hemolíticas microcíticas, sendo estas uma condição genética frequente, caracterizadas principalmente por defeitos na síntese das cadeias de globínicas  $\alpha$  ou  $\beta$ , que resulta em  $\alpha$ -talassemia e  $\beta$ -talassemia, respectivamente. A alfa talassemia se deve principalmente a defeitos herdados nos genes que codificam as cadeias globínicas do tipo  $\alpha$ , atingindo de um a quatro destes genes. A  $\alpha$ -tal atinge cerca de 5% da população mundial (VICHINSKY, 2013). Na população brasileira é considerada uma das alterações de hemoglobina mais comum, chegando a atingir índices acima de 20% (WAGNER *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015) da população afrodescendente. Entretanto quando avaliada em indivíduos com microcitose e hipocromia, está frequência sobe para aproximadamente 50% (SONATI *et al.*, 1996; MELO REIS *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2010; CARLOS *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015). O diagnóstico das  $\alpha$  talassemias não é um procedimento simples, pois só pode ser confirmado com precisão através do uso de ferramentas de biologia molecular (FISH, CGH-array, *Time-Real* PCR e *Multiplex gap*-PCR). Dentre elas, a mais empregada é o *Multiplex gap*-PCR. Ultimamente, o uso de técnicas como o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MPLA), vem se apresentando como um instrumento promissor para a detecção de variantes envolvendo o número de cópias gênicas (deleções, inserções e

duplicações). Tais técnicas são aplicáveis à caracterização molecular de várias doenças, dentre elas as talassemias. Assim, a utilização de métodos que permitam o refinamento da investigação diagnóstica dessa condição tem sido o objetivo de numerosas pesquisas ao longo de décadas (COLOSIMO *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado alto desempenho dessa técnica no diagnóstico das talassemias e na elucidação dos casos envolvendo mutações raras e desconhecidas que ainda não foram diagnosticadas, referenciando o método como tendo uma maior resolução e especificidade (COLOSIMO *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2012; HIGGS, 2013; DE-LA-CRUZ-SALCEDO *et al.*, 2016). Assim, o presente estudo se propõe a contribuir para a conclusão diagnóstica de casos não esclarecidos e também para o aumento do conhecimento científico da alfa talassemia, uma vez que no Brasil já foram descritas novas formas de hemoglobinas variantes, tais como Hb Itapira, Hb Bom Jesus da Lapa, Hb Boa Esperança (JORGE *et al.*, 2007), Hb S-São Paulo (JORGE *et al.*, 2012), entre outras, e há significativa possibilidade de que novas variantes sejam identificadas pela técnica MLPA, dada a grande miscigenação de nossa população (PIMENTA *et al.*, 2006). Diante do exposto, seria oportuna a sua implantação no laboratório de pesquisas hematológicas do HC-UFTM, pois contribuirá para a precisão diagnóstica, para a escolha correta da abordagem terapêutica e para o rastreamento de algumas variantes de Hb que são clinicamente silenciosas.

## 2.1. HIPÓTESE

Considerando as limitações dos métodos de *Multiplex gap-PCR*, acreditamos que tecnologias como as baseadas em MLPA e *microarray* representam os métodos mais confiáveis e eficazes para a descoberta e validação de alterações envolvendo o número de cópias do DNA para o diagnóstico da  $\alpha$ -tal .

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Identificar e elucidar as causas de microcitose e hipocromia não ferropriva em amostras de indivíduos com ou sem anemia, com suspeita de talassemia  $\alpha$ , que não puderam ser caracterizados pela metodologia convencional (*Multiplex gap-PCR*).

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Padronizar e implantar, no setor de biologia molecular do laboratório de pesquisas hematológicas do HC-UFTM, a metodologia de MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) para a pesquisa de novas deleções e duplicações no agrupamento gênico da alfa globina;
2. Determinar o perfil molecular de casos atípicos ou raros de talassemia alfa cuja base molecular não pode ser detectada ou diagnosticada pela técnica da PCR *multiplex* utilizada no diagnóstico;
3. Elucidar as causas de microcitose e hipocromia não ferropriva em amostras de indivíduos com ou sem anemia, com suspeita de talassemia  $\alpha$ ;
4. Comparar os parâmetros hematológicos com os genótipos de talassemia  $\alpha$  identificados na casuística estudada.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Casuística

O presente estudo tratou-se de uma extensão vinculada ao meu projeto de mestrado que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e da Fundação Hemominas, com números de protocolos 1836, 2678 e 304, respectivamente, intitulado: “Incidência de alfa talassemia em recém-nascidos, doadores de sangue e crianças com anemia a esclarecer” (Anexos A, B e C). Trata-se de um estudo observacional transversal (analítico de abordagem quantitativa). Para a realização desta pesquisa, foram investigados 85 indivíduos adultos de ambos os sexos (62 do sexo feminino e 23 do masculino), com idades variando entre 18 e 72 anos, provenientes do Hemocentro Regional de Uberaba e do Ambulatório de Hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que fizeram parte do projeto de mestrado (acima mencionado) e apresentaram fenótipo hematológico compatível com  $\alpha$  talassemia [Volume Corpuscular Médio (VCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) com valores reduzidos e níveis séricos normais de cinética do ferro, ferritina, Hb A<sub>2</sub> e Hb F].

Dentre os 85 pacientes, em 13 a causa molecular da doença não foi detectada pelas técnicas disponíveis no laboratório (*Multiplex gap-PCR*), ou seja, as deleções mais frequentes ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $--^{MED}$ ,  $-\text{SEA}$ ,  $-\text{FIL}$ ,  $-\text{THAI}$ ) não foram identificadas.

Os outros 72 pacientes que haviam sido inicialmente identificados com  $\alpha$  talassemia, através do PCR, também foram analisados pelos ensaios de MLPA, visto que em 19 casos o genótipo identificado não era compatível com o fenótipo hematológico apresentado pelos pacientes e os demais (53 pacientes) foram analisados com o intuito de avaliar a viabilidade desta nova metodologia aplicada na análise do cluster de genes da  $\alpha$  globina.

Todos os integrantes que foram incluídos neste seguimento do projeto de mestrado, quando convidados a participar do estudo “Incidência de alfa talassemia em recém-nascidos, doadores de sangue e crianças com anemia a esclarecer”, foram informados sobre os objetivos da pesquisa e também no momento foi perguntado e questionado se concordavam ou discordavam que os pesquisadores, além do estudo para qual estavam sendo convidados a participar, poderiam armazenar uma amostra de seu material genético (DNA) para uso em futuras pesquisas com o objetivo de investigar

outras mutações genéticas da alfa talassemia e de outras hemoglobinopatias. Os participantes tiveram suas dúvidas esclarecidas, e foram informados que o uso futuro do material nunca seria ligado a nenhum de seus dados pessoais, e que o mesmo poderia negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros e ainda participar do projeto que estava sendo convidado e caso autorizasse o uso futuro de sua amostra, qualquer novo estudo utilizando o seu material genético seria preliminarmente submetido à nova avaliação e autorização do CEP.

Portanto, foram avaliados todos aqueles que haviam assinado o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, conforme a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, com o adendo acima referido, no qual lhes é garantido o acesso posterior aos resultados obtidos (Anexos D e E).

Nestes indivíduos foi feita a análise do *locus* do gene  $\alpha$ -globínico pelo método de MLPA, garantindo-lhes assim um mais diagnóstico mais seguro.

#### **4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos da pesquisa**

Foram incluídas todas as amostras de indivíduos que apresentaram microcitose e/ou hipocromia, estabelecidos pelos índices hematimétricos VCM e HCM com valores iguais ou inferiores a 85 fL e 27 pg, respectivamente, com anemia não ferropênica a esclarecer e níveis normais de Hb A<sub>2</sub> e Hb F que estavam em acompanhamento ambulatorial no HC-UFTM.

Foram excluídas da pesquisa as amostras de sangue dos participantes que não autorizaram a investigação da causa de sua anemia e/ou não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos D e E).

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Obtenção das amostras**

As 85 amostras de sangue, obtidas na primeira fase do estudo, foram colhidas por punção venosa em um tubo de 4mL contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para a realização dos testes moleculares para  $\alpha$ -tal e um tubo de 5 mL sem anticoagulante para a dosagem de ferritina. Os parâmetros hematológicos foram determinados no contador de células automático modelo Coulter T – 890 (Flórida

– USA). A determinação da ferritina sérica foi realizada através de ensaio imunométrico quimioluminescente em fase sólida (Roche®), por técnica automatizada, utilizando equipamento modelo Immulite Cobas®, cujos valores de normalidade são 10 a 280 ng/dL para mulheres e 29 a 300 ng/dL para homens. O perfil e a quantificação das frações das Hbs (Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> e Hb F) foram obtidos a partir de eletroforese em acetato celulose, em pH alcalino (8,4) (BARTLETT, 1963; MARENGO-ROWE, 1965; NAOUM, 1987).

Naquela ocasião, foi realizada a extração do DNA genômico (gDNA) dos leucócitos a partir do sangue total, empregando-se o *kit* QIAamp DNA mini *kit* (Qiagen®), de acordo com as especificações do fabricante e alicotado em dois tubos Eppendorf e congeladas até o processamento. Procedeu-se à amplificação dos fragmentos do DNA analisados por *Multiplex gap*-PCR, das deleções mais frequentes de alfa talassemia ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $--^{MED}$ ,  $-^{SEA}$ ,  $-^{FIL}$ ,  $-^{THAI}$ ), segundo Than e colaboradores (2001) (SOUZA, 2014, SOUZA *et al.*, 2015).

Todas as 85 amostras investigadas com suspeita e/ou diagnóstico de talassemia  $\alpha$  foram processadas pela técnica de MLPA.

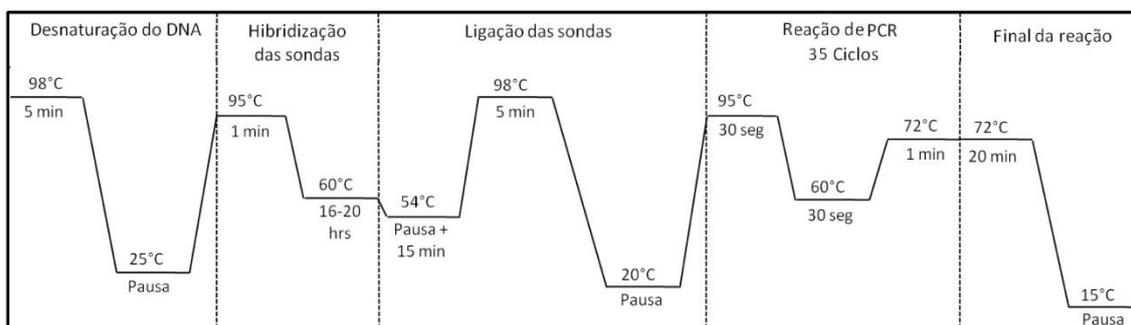
#### 4.2.2. MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

##### 4.2.2.1 Validação do Método de MLPA

Antes de iniciar as análises foi necessário padronizar e validar os ensaios de MLPA. Para isso, foi realizada a análise de fragmentos de DNA presentes em amostras (controles) cujos perfis genéticos já haviam sido determinados, por meio de outros métodos moleculares tais como *Multiplex gap*-PCR e PCR específicos. Foram utilizados controles positivos (com as deleções  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $--^{MED}$ ,  $-^{SEA}$ ,  $-^{FIL}$ ,  $--^{THAI}$ ) e negativos (sem alterações nos genes  $\alpha$ ), obtidos no estudo anterior (SOUZA *et al.*, 2015), cujas amostras foram armazenadas no Laboratório de Pesquisas Hematológicas do HRU. Estes controles foram submetidos aos ensaios de MLPA segundo recomendações do fabricante e após os resultados foram avaliados quanto à consistência e reprodutibilidade. Em seguida as 85 amostras foram submetidas aos ensaios de MLPA.

#### 4.2.2.2 Reações de MLPA - Procedimento experimental

Para a investigação molecular das amostras foi utilizado, o *kit* SALSA MLPA P140-C1 HBA que possibilita a investigação de alterações no gene  $\alpha$ -globina (Anexo F e G) (*MRC-Holland*<sup>®</sup>, Amsterdã, Holanda), composto por 45 sondas, sendo 11 controles internos e 34 sondas específicas a diferentes regiões do *cluster* do gene  $\alpha$ -globina. O *kit* dispõem de dois tipos de controles internos, denominados fragmentos Q e D, indicadores da qualidade das reações de MLPA. O primeiro estabelece se uma quantidade suficiente do DNA foi utilizada e o segundo se o DNA foi completamente desnaturado. E também de controles internos específicos aos cromossomos sexuais X e Y. As sondas presentes no *kit* de MLPA, bem como as sequências estão descritas no anexo G. O protocolo utilizado nas reações encontra-se de acordo com o descrito pelo fabricante do *kit* probemix (*MRC-Holland*<sup>®</sup>, Holanda). O experimento de MLPA foi realizado em dois dias e dividido em quatro etapas no termociclador, que podem ser visualizadas na figura 12.



**Figura 12-** Programa utilizado no termociclador para a reação de MLPA para a amplificação dos fragmentos.

#### 4.2.2.3. Desnaturação do DNA e reação de hibridização das sondas

No primeiro dia do experimento, cada amostra de DNA foi diluída em TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1 mM EDTA), na concentração de 50 – 250 ng (5 l) em microtubo e levados ao termociclador (*Applied Biosystems*<sup>®</sup> – *Veriti 96-Well Thermal Cycler*), em temperatura de 98 C, por 5 minutos (min.) para desnaturação do DNA. Em todos os ensaios de MLPA foram usados de 3 a 7 controles negativos (normais), sendo que as reações foram realizadas em duplicata para cada paciente.

Após este período, a reação foi resfriada para uma temperatura de 25 C, quando então foi adicionada ao DNA desnaturado uma mistura com as sondas e o tampão de

hibridação (1,5µl de SALSA *Probemix* e 1,5µl de *MLPA buffer*), para o processo de hibridação das sondas de MLPA ao DNA. Após homogeneização, as amostras foram incubadas durante 1 min. a 95°C, e em seguida mantidas por 16 a 20 horas a 60°C.

#### 4.2.2.4. Reação de Ligação

No segundo dia do experimento, a temperatura foi reduzida para 54°C e, logo após, foram adicionadas 32µl do *mix* de ligação em cada tubo. Este *mix* foi preparado com 25µl de água (H<sub>2</sub>O), 3µl de ligase-65 *buffer* A, 3µl de ligase-65 *buffer* B, e 1µl da enzima ligase-65. A reação de ligação foi mantida a 54°C, por 15 min., e em seguida a temperatura foi elevada a 98°C, por 5 min, para inativação da enzima ligase-65. Neste ponto, a 20°C, os tubos foram retirados do termociclador.

#### 4.2.2.5. Reação de PCR

Em temperatura ambiente (20°C), foi adicionada a cada amostra 10µl de um *mix*. Este *mix* foi preparado com 7,5 µl de H<sub>2</sub>O, 2 µl SALSA PCR *primer mix* e 0,5 µl SALSA Polimerase. Logo após, prosseguiu-se com os ciclos da reação de PCR, conforme o descrito na Figura 12. Conforme o fabricante, neste ponto, a reação pode ser armazenada a 4°C por até sete dias, e a -25°C/-15°C para maiores períodos de armazenamento. Devido a sensibilidade do marcador fluorescente do *primer*, os tubos foram mantidos protegidos da luz embrulhados em papel alumínio.

#### 4.2.2.6. Separação dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar

Após amplificação, os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA (3130XL Genetic Analyser, Abi Prism – Applied Biosystems<sup>®</sup>, USA), com filtros de fluorescência específicos para genotipagem e capilar de 50 centímetros. Para o preparo das amostras foram adicionados 0,7 µl da reação de PCR, 0,2 µl de marcador LIZ GS-500 (Applied Biosystems<sup>®</sup>) e 9 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA), em placa de 96 *wells*.

Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 86°C por 3 min., seguida do resfriamento a 4°C por 2 minutos, antes de serem levadas ao sequenciador. Para a

corrida os seguintes parâmetros foram empregados: *Sample Injection Voltage*: 1,6KV; *Sample Injection Time*: 15s; *Run Voltage*: 15KV; *Run Time*: 1,800s; *oven temperature*: 60°C; utilizando-se polímero POP-7(Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA). Os perfis dos fragmentos foram visualizados e interpretados pelo *software Coffalyser<sup>®</sup>* (MRC-Holand<sup>®</sup>).

#### 4.2.2.7. Análise dos Dados

Os resultados obtidos foram analisados pelo *software Coffalyser.Net<sup>3</sup>* (MRC-Holand<sup>®</sup>), no qual são realizadas análises quantitativa e qualitativa desses fragmentos, possibilitando determinar se houve alterações no número de cópias (deleções ou duplicações) do *cluster*  $\alpha$ -globina das amostras analisadas.

Neste *software* os dados gerados foram normalizados, com a finalidade de corrigir oscilações da reação. Esse procedimento é denominado de normalização intra-amostral, onde o valor da altura do pico de cada sonda é dividido pela soma dos picos de todas as sondas presentes em cada amostra. Em seguida, nesta segunda etapa denominada de normalização inter-amostral, os valores pré-normalizados são divididos pela média da altura dos picos das sondas correspondentes nas amostras controles, permitindo a comparação das amostras analisadas com as amostras controles. As diferenças relativas entre a altura dos picos das sondas nas amostras controles e nas analisadas possibilita identificar potenciais deleções e duplicações. A partir disso, são considerados normais valores de picos entre 0,7 e 1,3. Enquanto que, valores inferiores a 0,7 (variação entre 0,3 – 0,7) correspondem às deleções e acima de 1,3 (1,3 – 1,7) às duplicações.

Os resultados foram analisados a partir de análise descritiva tais como frequências absolutas e percentuais, média e desvio padrão.

Os dados relativos aos parâmetros hematológicos foram submetidos à análise estatística e, por conseguinte, verificou-se a normalidade das amostras através do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. As suposições de normalidade e homogeneidade não foram satisfeitas, portanto a comparação das variáveis de interesse entre os grupos foi realizado a partir do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn utilizando o programa

---

<sup>3</sup> Programa gratuito criado pela MRC-Holland para análise dos dados dos ensaios de MLPA, que os interpreta gerando gráficos e tabelas destas.

de estatística BioEstat<sup>®</sup> 5.3. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0.05$ .

### **4.3. Financiamento**

O material de laboratório utilizado no desenvolvimento do estudo, tais como, kits de extração de DNA, Kits para os ensaios de MLPA, reagentes para PCR, reagentes para sequenciamento, tubos e ponteiros, foram adquiridos com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) referente ao processo APQ-01136-13 no edital da Demanda Universal. A aluna de doutorado recebeu bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 5. Resultados

### 5.1 Estudo molecular do gene $\alpha$ por *Multiplex-gap-PCR*

Dos 85 indivíduos analisados pelo *Multiplex-gap-PCR*, 13 (15,29%) apresentaram o genótipo normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) e 72 (84,71%) apresentaram  $\alpha$ -tal, sendo 46 (54,12%) portadores a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigose, 25 (29,41%) em homozigose e um (1,18%) associado com a deleção  $-\alpha^{4.2}$  (Tabela 1).

**Tabela 1-** Dados moleculares e valores médios dos parâmetros hematológicos dos 85 pacientes investigados

| Genótipos<br><i>Multiplex-PCR</i> | No  | Sexo | RBC                                 | Hb (g/dL) | VCM (fL) | HCM (pg) | Hct (%) | RDW (%) | HbA <sub>2</sub> (%) | HbF (%) | FS (ng/mL) |
|-----------------------------------|-----|------|-------------------------------------|-----------|----------|----------|---------|---------|----------------------|---------|------------|
|                                   |     |      | (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> ) |           |          |          |         |         |                      |         |            |
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha$       | 5*  | M    | 4.48                                | 11.16     | 76.75    | 25.17    | 34.16   | 15.78   | 2.36                 | 1.40    | 93.00      |
|                                   | 8*  | F    | 4.78                                | 11.48     | 77.14    | 27.70    | 36.68   | 15.83   | 3.20                 | 0.60    | 45.80      |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$      | 13* | M    | 5.07                                | 11.90     | 74.62    | 23.51    | 37.92   | 16.03   | 2.57                 | 0.70    | 52.00      |
|                                   | 33* | F    | 4.61                                | 11.09     | 76.15    | 24.18    | 35.04   | 15.91   | 2.67                 | 1.50    | 52.00      |
| $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$     | 4*  | M    | 5.20                                | 10.95     | 68.00    | 21.02    | 35.80   | 14.95   | 2.47                 | 1.01    | 72.60      |
|                                   | 21* | F    | 5.09                                | 11.10     | 70.10    | 22.22    | 36.16   | 15.94   | 2.58                 | 1.03    | 47.40      |
| $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$     | 1   | M    | 4.50                                | 11.90     | 71.00    | 24.80    | 36.60   | 17.00   | 2.30                 | 0.70    | 81.50      |

\*valores médios; M: masculino; F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0/F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18/F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99/F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54/F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (F: 10-280 ng/mL/M:29-300 ng/mL).

Como nenhuma das sete deleções mais comuns de  $\alpha$ -tal pelo *Multiplex-gap-PCR* foi identificada nas amostras de 13 pacientes, nos quais foram excluídas outras causas de anemia microcítica e/ou hipocrômica, as mesmas foram analisadas pela técnica de MLPA. Posteriormente foi estendida essa avaliação para todas as outras 72 amostras que haviam sido identificadas com  $\alpha$ -tal, para uma análise mais detalhada dos genes HBA, com o objetivo de investigar outras possíveis alterações no *cluster*  $\alpha$ -globínico, uma vez que em 19 (22,35%) destas 72 o genótipo detectado não era condizente com o fenótipo apresentado. Com a aplicação do método de MLPA, foi possível identificar 32

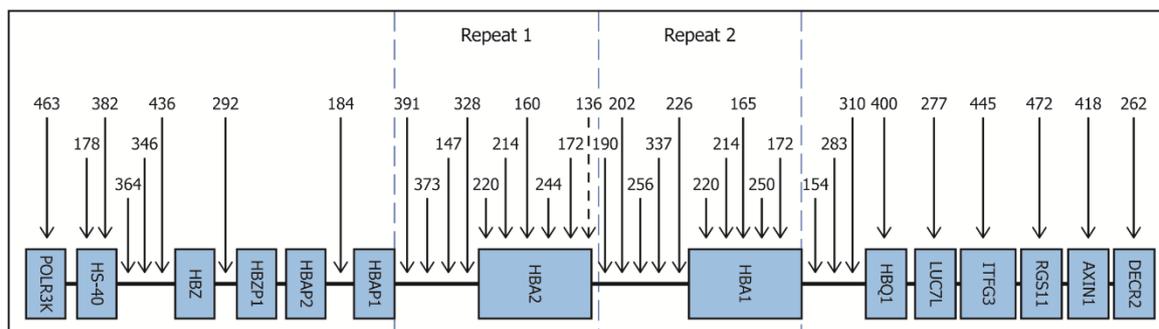
(37,65%) casos com diferentes alterações moleculares afetando o *cluster*  $\alpha$ -globínico, que não haviam sido identificadas pela *Multiplex-gap-PCR*, além de confirmar as alterações encontradas em outros 53 (62,35%) casos.

## 5.2 Padronização da técnica de MLPA e validação do kit P140-C1

Conforme as recomendações do fabricante, qualquer *kit* MLPA a ser utilizado inicialmente deve ser validado, avaliando amostras com alterações identificadas pelo *kit* e controles sem alterações (deleções/duplicações) nos genes analisados.

Dessa forma, para a implantação da metodologia de MLPA no setor de biologia molecular do Laboratório de Pesquisas Hematologia da UFTM, inicialmente foi realizado uma análise em amostras de indivíduos com perfil hematológico normal sem quaisquer alterações nos genes da  $\alpha$ -globina, para estabelecer e verificar a validade e a fidedignidade dos resultados deste novo método utilizado, e em amostras com genótipos talassêmicos já identificados por outros métodos, a fim de confirmar a eficiência da técnica em identificar alterações nos grupamento de genes  $\alpha$ .

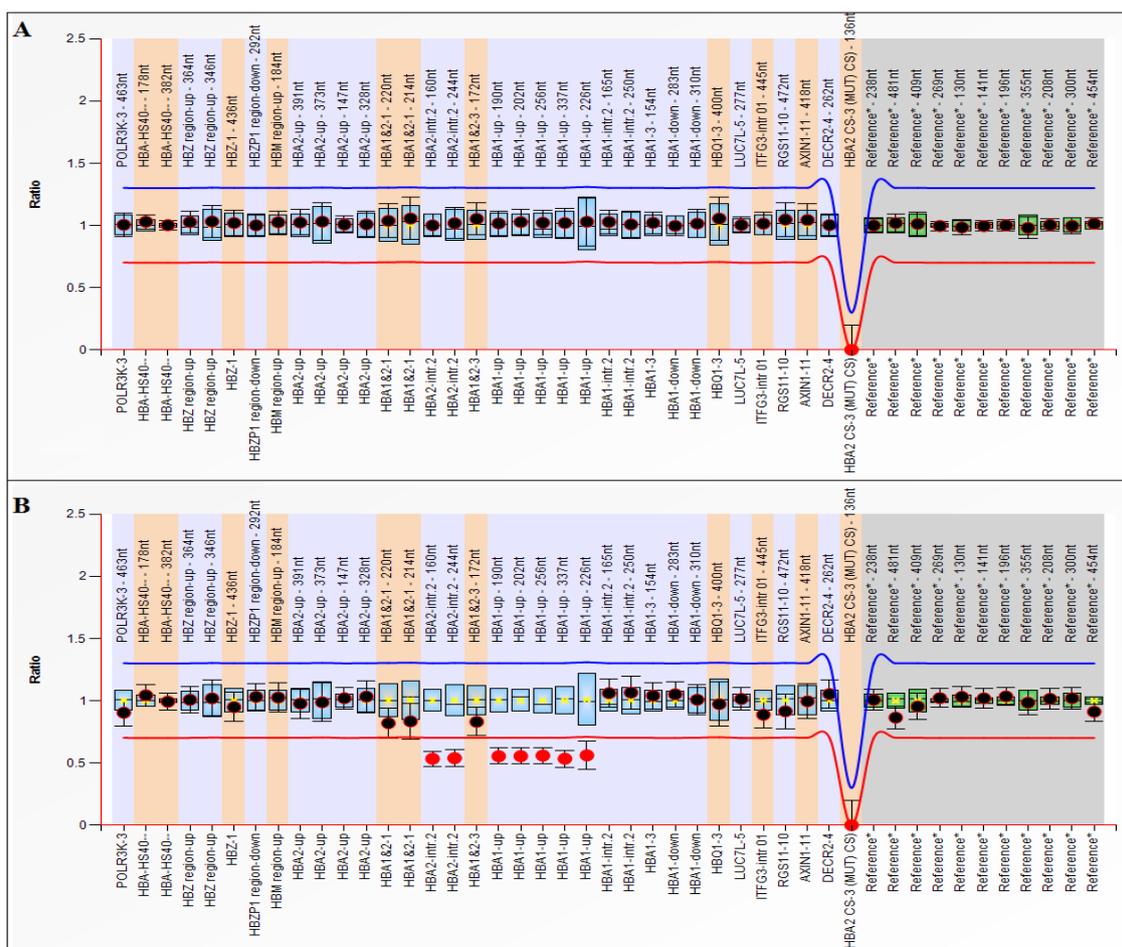
Em todos os ensaios de MLPA foram analisados os fragmentos amplificados com base nas sequências de 45 sondas, cujos tamanhos diferem entre 130 a 481 nt (Figura 13), específicas para o cluster da  $\alpha$ -globina, flanqueando desde a região telomérica do braço curto do cromossomo 16 até o gene *DECR2*. Deste modo, pode-se analisar todo o *cluster*  $\alpha$  em apenas um ensaio.



**Figura 13** - Representação esquemática da localização das sondas do kit SALSA MLPA *probemix* P140-C1 HBA, empregado na análise envolvendo desde a região telomérica do cromossomo 16p até o gene DECR2, avaliando cerca de 360 kb de DNA. Os números acima das setas representam o tamanho da amplificação (em nt) das respectivas sondas (MRC-Holland). A sonda 136 somente apresentará sinal de amplificação se a mutação que gera a Hb *Constant Spring* estiver presente.

**Fonte:** MRC-Holland®

Nas análises de ambos os controles (normais e positivos) investigados, os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando-se dentro da normalidade em todas as reações como demonstrado na figura 14. Para interpretação dos resultados a maioria das sondas de MLPA específicas para o gene HBA, são esperados: um número de cópias de 2 (dois) alelos quando considerado normal, 1 (um) quando apresentar deleção heterozigótica, 0 (zero) quando identificado deleção homozigótica, 3 (três) duplicação heterozigota, e 4 (quatro) triplicação heterozigótica ou duplicação homozigota, correspondendo as razões das sondas de 1; 0; 0,5; 1,5 e 2, respectivamente. Considerando-se isso, foram selecionados os controles normais (sem alterações) para a validação do *kit* P140-C1 HBA, que posteriormente foram usados no decorrer do estudo. Em cada ensaio de MLPA foram utilizados de três a sete controles sem alterações.



**Figura 14** - Gráfico da validação dos ensaios de MLPA com o kit P140 C1-HBA para análise do gene  $\alpha$ -globina. O gráfico mostra dois exemplos da análise final, gerado pelo software Coffalyser, mostrando o perfil de amplificação de (A) um controle normal com sinal de todas as sondas testadas e (B) um controle positivo para a deleção  $-\alpha^{3,7}$  em heterozigose com redução de 75% nos sinais das sondas 220, 214 e 172 localizadas no gene  $\alpha_2$  e de 50% das sondas 160 e 244 no gene  $\alpha_2$  e 190, 202, 256, 337 e 226 na região entre o gene  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ . Os pontos pretos exibem as razões das sondas e as barras os intervalos de confiança de 95%. As caixas verdes mostram o intervalo de confiança de 95% das amostras dos DNA de referência usado. As localizações das sondas são exibidas no eixo x e a razão dos resultados das sondas no eixo y. As linhas vermelhas e azuis em razão de 0,7 e 1,3 indicam os limites para deleção e duplicação, respectivamente.

**Fonte:** Dados gerados pela autora através do software Coffalyser.

### 5.3 Estudo molecular do gene $\alpha$ por MLPA

Ao serem analisadas por este método foram encontradas alterações nas 85 amostras. Os resultados desse experimento e a descrição das alterações identificadas são apresentados a seguir.

### 5.3.1 Pacientes identificados com polimorfismos de nucleotídeos simples nos genes HBA1 e HBA2

A técnica de MLPA identificou seis diferentes polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) nos genes  $\alpha$ , que estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Polimorfismos identificados no gene HBA1 e HBA2 da  $\alpha$ -globina em 24 amostras da casuística estudada

| Polimorfismos          | Localização no HGVS usando NG_000006.1 | SNP         | Gene | Nomenclatura HGVS  | Sondas referentes    |
|------------------------|--|-------------|------|--------------------|----------------------|
| Polimorfismo 1B        | g.34974C>T                             | rs376988236 | HBA2 | HBA2:c.*511C>T     | 391 e 190            |
| Polimorfismo 3A        | g.33103G>A                             | rs143196637 | HBA2 | HBA2:c.-673G>A     | 328 e 226            |
| Polimorfismo 3B        | g.36907A>G                             | rs3760045   | HBA1 | HBA1:c.-673A>G     | 328 e 226            |
| Polimorfismo 4A        | g.34247T>G                             | rs2362746   | HBA2 | HBA2:c.300+55T>G   | 160 e 165            |
| Polimorfismo 4B        | g.38051G>T                             | rs148228241 | HBA1 | HBA1:c.300+55T>G   | 160 e 165            |
| Polimorfismo Africano1 | g.[34247T>G; 34311delGinsCTCGGC CC]    | --          | HBA2 | Alelo $\alpha 212$ | 160 e 165 /244 e 250 |

-- não determinado

Estes polimorfismos foram identificados em 24 amostras (28,23%) da casuística estudada, sendo que em 10 (11,76%) que apresentaram o genótipo normal foram identificados apenas esses *SNPs* (Tabela 3) e em 14 (16,47%) amostras com a deleção -  $\alpha^{3.7}$  foram detectadas também associação desses polimorfismos mencionados, os quais serão descritos separadamente mais adiante e explicitados na Tabela 5.

Na tabela a seguir podem ser observados os níveis hematimétricos segundo os diferentes polimorfismos identificados nas amostras com genótipo normal no *Multiplex-gap-PCR* (Tabela 3).

**Tabela 3-** Dados moleculares e hematológicos dos 10 pacientes com genótipo normal no *Multiplex-PCR*, identificados com polimorfismos de nucleotídeos simples nos genes HBA da  $\alpha$ -globina

| $\alpha$ -genótipos  |  |    |           | RBC                                 | Hb     | VCM   | HCM   | Hct (%) | RDW   | HbA <sub>2</sub> | FS      |
|----------------------|--|----|-----------|-------------------------------------|--------|-------|-------|---------|-------|------------------|---------|
| <i>Multiplex-PCR</i> | MLPA   | N  |           | (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> ) | (g/dL) | (fL)  | (pg)  |         | (%)   | (%)              | (ng/mL) |
| <i>aa/aa</i>         | Polym3B  | 1  | M         | 4.38                                | 10.70  | 73.00 | 24.40 | 32.00   | 15.10 | 3.30             | 45.50   |
|                      |  | 2* | F         | 5.50                                | 12.25  | 69.50 | 22.45 | 39.05   | 16.40 | 2.50             | 55.75   |
|                      | Polym 4A                                       | 3* | F         | 4.04                                | 10.90  | 85.00 | 27.00 | 34.47   | 15.76 | 3.00             | 30.33   |
|                      | Polym 4B                                       | 1  | M         | 3.81                                | 10.70  | 80.00 | 31.40 | 34.90   | 18.00 | 2.30             | 740.9   |
|                      | Polym Africano 1 ( $\alpha^{212}$ )            | 1  | M         | 4.59                                | 9.50   | 67.00 | 20.70 | 30.80   | 18.00 | 2.20             | 45.6    |
|                      | Polym Africano 1 ( $\alpha^{212}$ ) + Polym 3B | 1  | F         | 4.76                                | 12.50  | 80.00 | 26.20 | 38.30   | 15.00 | 3.20             | 176.5   |
|                      | Polym Africano 1 ( $\alpha^{212}$ ) + Polym 3B | 1  | M         | 4.44                                | 10.90  | 74.77 | 24.77 | 32.90   | 14.00 | 2.00             | 37.70   |
|                      | <b>Total</b>                                   |    | <b>10</b> |                                     |        |       |       |         |       |                  |         |

\*valores médios dos parâmetros hematológicos; Poly: polimorfismo; M: masculino; F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0/F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18/F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99/F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54/F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (F: 10-280 ng/mL/M:29-300 ng/mL).

### 5.3.2 Pacientes com a deleção $-\alpha^{3.7}$

Das 72 amostras nas quais a  $\alpha$ -talassemia havia sido identificada pelo *Multiplex-gap-PCR*, 46 (54,12%) foram caracterizadas como heterozigotas para a deleção  $-\alpha^{3.7}$  ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), 25 (29,41%) como homozigotas ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) e uma (1,18%) apresentava uma dupla heterozigose ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ ) (Tabela 4). Em todas estas amostras as deleções 3.7 e a 4.2 foram confirmadas pela técnica de MLPA. Contudo, em 19 (22,35%) amostras além da deleção 3.7 foram identificadas outras alterações, das quais 14 (16,47%) foram identificadas a presença de polimorfismos e cinco (5,88%) associadas a outras raras ou novas deleções. Para uma melhor análise, estes resultados estão descritos separadamente na próxima secção.

**Tabela 4-** Dados moleculares e valores médios dos parâmetros hematológicos dos 72 pacientes identificados com a deleção 3.7 nos genes da  $\alpha$ -globina

| $\alpha$ -genótipos           |                               | N         | %          |   | RBC<br>(10 <sup>6</sup> /<br>mm <sup>3</sup> ) | Hb<br>(g/dL) | VCM<br>(fL) | HCM<br>(pg) | Hct (%) | RDW<br>(%) | HbA <sub>2</sub><br>(%) | FS<br>(ng/mL) |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------|------------|---|--|--------------|-------------|-------------|---------|------------|-------------------------|---------------|
| <i>Multiplex-PCR</i>          | <i>MLPA</i>                   |           |            |   |  |              |             |             |         |            |                         |               |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  | 13        | 18.06      | M | 5.07   | 11.90        | 74.62       | 23.51       | 37.92   | 16.03      | 2.57                    | 263.43        |
|                               |                               | 33        | 45.83      | F | 4.61   | 11.09        | 76.15       | 24.18       | 35.04   | 15.91      | 2.67                    | 59.38         |
| $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ | $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ | 4         | 5.55       | M | 5.20   | 10.95        | 68.00       | 21.02       | 35.80   | 14.95      | 2.47                    | 55.82         |
|                               |                               | 21        | 29.17      | F | 5.09   | 11.10        | 70.10       | 22.22       | 36.16   | 15.94      | 2.58                    | 117.47        |
| $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ | $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ | 1         | 1.39       | M | 4.50   | 11.90        | 71.00       | 24.80       | 36.60   | 17.00      | 2.30                    | 81.50         |
| <b>Total</b>                  |                               | <b>72</b> | <b>100</b> |   |  |              |             |             |         |            |                         |               |

M: masculino; F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0/F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18/F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99/F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54/F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (F: 10-280 ng/mL/M:29-300 ng/mL).

### 5.3.2.1 Pacientes com deleção $-\alpha^{3.7}$ associados a polimorfismos de nucleotídeos simples no gene $\alpha$

Como mencionado anteriormente, foi detectada em 14 (16,47%) amostras que apresentavam a deleção 3.7, tanto em heterozigose quanto em homozigose, a associação dos seguintes polimorfismos: 1B, 3A, 3B, 4A, 4B, e Africano1 ( $\alpha^{212}$ ) (Tabela 5). Em sete (8,24%) que apresentavam a deleção em heterozigose foram: um (1,18%) polimorfismo 3A, um (1,18%) 3B, dois (2,35%) 4B e três (3,53%) Africano1 ( $\alpha^{212}$ ). Também foi identificada a associação de mais de um polimorfismo em outras duas (2,35%) amostras com a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigose, sendo que em uma (1,18%) havia a presença dos polimorfismos 3B e 4B, e em outra (1,18%) os polimorfismos 1B, 3B e Africano1 ( $\alpha^{212}$ ). Quanto às cinco (5,88%) amostras que tinham a deleção em homozigose, foram identificados os polimorfismos 4A em duas (2,35%) e o 4B nas outras três (3,53%).

**Tabela 5-** Dados moleculares e hematológicos dos pacientes com deleção  $-\alpha^{3.7}$  associados a polimorfismos de nucleotídeos simples no gene  $\alpha$ -globina

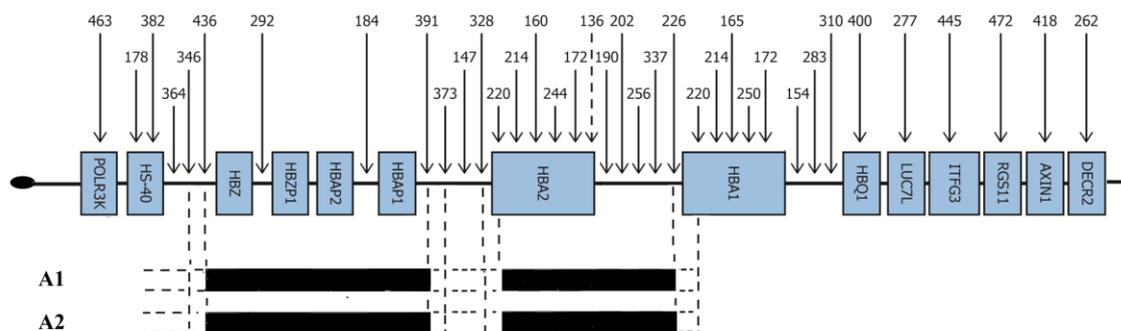
| $\alpha$ -genótipos           |  |   |   |                               |              |             |             |         |            |                         |               |
|-------------------------------|--|---|---|-------------------------------|--------------|-------------|-------------|---------|------------|-------------------------|---------------|
| <i>Multiplex-PCR</i>          | <i>MLPA</i>  | N   |   | RBC<br>( $10^9/\text{mm}^3$ ) | Hb<br>(g/dL) | VCM<br>(fL) | HCM<br>(pg) | Hct (%) | RDW<br>(%) | HbA <sub>2</sub><br>(%) | FS<br>(ng/mL) |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha +$<br><b>polym3A</b>                             | 1   | M | 6.68                          | 16.50        | 79.34       | 24.70       | 53.00   | 15.00      | 2.20                    | 65.50         |
|                               | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha +$<br><b>polym3B</b>                             | 1   | F | 4.34                          | 10.80        | 80.00       | 24.80       | 34.60   | 16.00      | 3.00                    | 42.90         |
|                               | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha +$<br><b>polym4B</b>                             | 2*  | F | 4.11                          | 10.50        | 80.00       | 25.55       | 33.20   | 15.95      | 2.50                    | 93.80         |
|                               | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha +$<br><b>polym3B +</b><br><b>polym4B</b>         | 1   | M | 4.81                          | 13.50        | 80.00       | 28.20       | 40.00   | 14.40      | 2.30                    | 144.50        |
|                               | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha +$<br><b>polym Africano 1</b> ( $\alpha^{212}$ ) | 1   | M | 4.36                          | 11.20        | 80.00       | 25.60       | 35.10   | 14.00      | 2.20                    | 54.90         |
|                               |  | 2*  | F | 4.34                          | 11.00        | 79.00       | 25.35       | 11.00   | 15.85      | 2.75                    | 57.45         |
|                               |  | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha +$<br><b>polym1B+polym</b><br><b>3B+polym</b><br><b>Africano 1</b> ( $\alpha^{212}$ ) | 1 | F                             | 3.99         | 10.70       | 79.80       | 26.68   | 32.00      | 13.00                   | 2.90          |
| $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ | $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$<br><b>+polym4A</b>                             | 2*  | F | 4.76                          | 11.50        | 67.50       | 22.70       | 34.75   | 15.75      | 2.60                    | 178.70        |
|                               | $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$<br><b>+polym4B</b>                             | 3*  | F | 4.79                          | 11.35        | 75.00       | 23.75       | 36.90   | 13.85      | 2.80                    | 85.43         |
|                               | <b>Total</b>   | <b>14</b>   |   |                               |              |             |             |         |            |                         |               |

\*valores médios dos parâmetros hematológicos; Poly: polimorfismo; M: masculino; F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0/F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18/F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99/F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54/F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (F: 10-280 ng/mL/M:29-300 ng/mL).

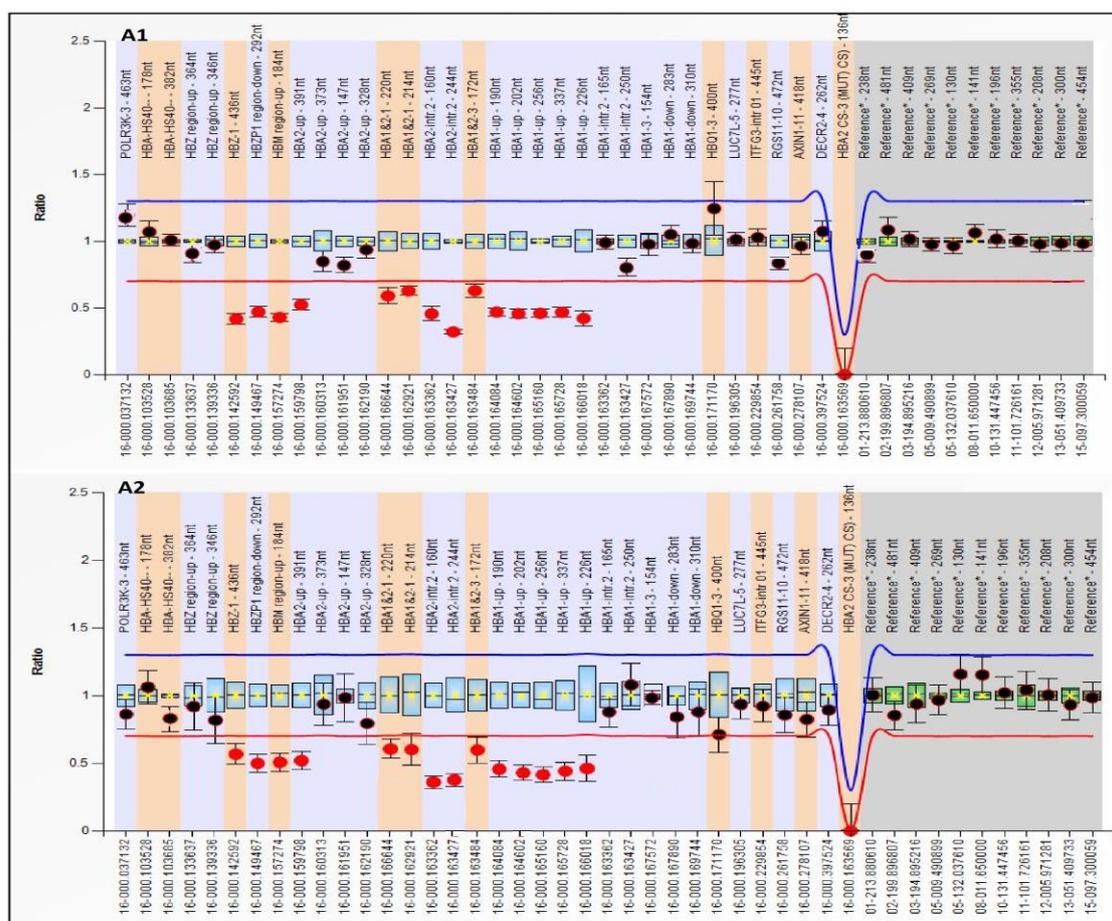
### 5.3.2.2 Pacientes com deleção $-\alpha^{3.7}$ associados a uma nova deleção de talassemia $\alpha^+$

A investigação molecular inicial por *Multiplex-gap-PCR*, mostrou, em duas (2,35%) amostras, um padrão compatível com heterozigose da deleção  $-\alpha^{3.7}$ . Ao serem analisadas pelo MLPA além da deleção  $-\alpha^{3.7}$ , foi detectada, tanto na primeira (amostra A1) quanto na segunda (A2) uma nova deleção de talassemia  $\alpha^+$  ainda não descrita na literatura, com aproximadamente 17.2 kb de DNA envolvendo as sondas 436 a 391, que remove um segmento contendo desde a região *up-stream* do gene  $\zeta$  (zeta) até a região *down-stream* do pseudogene  $\alpha 1$ , mas deixa intactos os genes duplicados  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  no cluster  $\alpha$  globínico. As Figuras 15 e 16 mostram a representação esquemática e gráfica

das duas deleções detectadas. Os dados hematológicos e moleculares desses pacientes encontram-se na Tabela 6.



**Figura 15.** Esquema representando as deleções detectadas nos pacientes com deleção  $-\alpha^{3.7}$  associados a uma nova deleção de talassemia  $\alpha^+$ . A região telomérica do cromossomo 16p13.3 está indicada pela forma oval, as setas mostram as localizações das respectivas sondas que compõem o *kit* P140-C1HBA, enquanto que as caixas em azul simbolizam os genes. As faixas pretas indicam os fragmentos deletados, os traços pontilhados estabelecem a primeira e a última sonda deletadas e as áreas em aberto demonstram as regiões nas quais provavelmente ocorreram os *breakpoints*. A= amostra (Adaptado de MRC-Holland, 2017).



**Figura 16.** Gráficos elaborados pelo *software* *Coffalyser* com os resultados do MLPA dos pacientes com deleção  $-\alpha^{3.7}$  associados a uma nova deleção de talassemia  $\alpha^+$ . O eixo X representa as posições das sondas no gene e as razões da intensidade do sinal das sondas no eixo y. A presença de ambos os alelos no gene é indicado pela razão 1, a razão 0.5 indica a perda de um alelo, já a perda de ambos os alelos é representado

pela razão 0. As amostras A1 e A2 mostram à deleção  $-\alpha^{3.7}$ , em um dos alelos, indicada pela diminuição de 25% das sondas 220, 214 e 172 e 50% das demais (160, 244, 190, 202, 256, 337 e 226), associada a uma deleção  $\alpha^+$  não identificada no outro que abrangue as sondas 436 a 391 com uma redução de 50% nos sinais das respectivas sondas. A= amostras

**Fonte:** Dados gerados pela autora através do software Coffalyser.

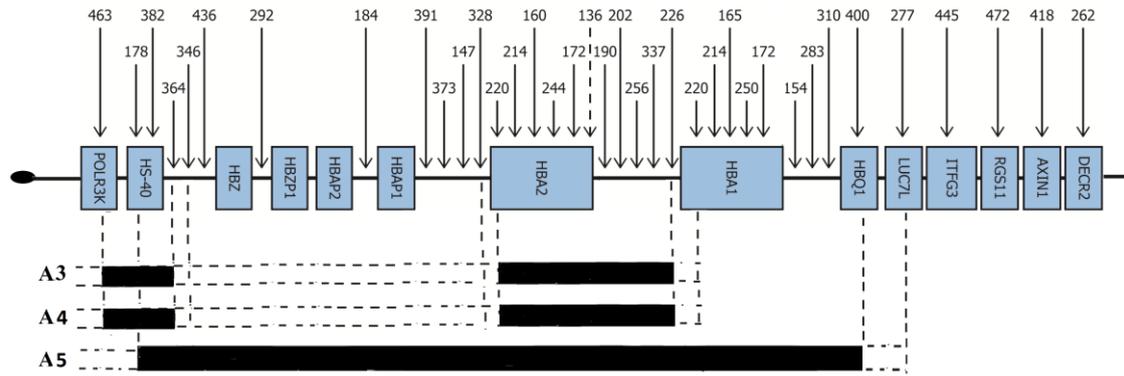
**Tabela 6-** Dados moleculares e hematológicos dos pacientes identificados com a deleção  $-\alpha^{3.7}$  associados a uma nova deleção de talassemia  $\alpha^+$

| <b><math>\alpha</math>-genótipos</b> |                                    |   | <b>RBC</b>                             | <b>Hb</b>     | <b>VCM</b>  | <b>HCM</b>  | <b>Hct (%)</b> | <b>RDW</b> | <b>HbA<sub>2</sub></b> | <b>HbF</b> | <b>FS</b>      |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|--|---------------|-------------|-------------|----------------|------------|------------------------|------------|----------------|
| <b>PCR</b>                           | <b>MLPA</b>                        |   | <b>(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | <b>(g/dL)</b> | <b>(fL)</b> | <b>(pg)</b> |                | <b>(%)</b> | <b>(%)</b>             | <b>(%)</b> | <b>(ng/mL)</b> |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$         | $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{17.2}$ | F | 4.94                                   | 12.20         | 76          | 24.60       | 37.60          | 15.60      | 2.1                    | 0.50       | 54.40          |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$         | $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{17.2}$ | M | 6.26                                   | 14.80         | 75          | 23.60       | 47.00          | 14.80      | 2.80                   | 6.26       | 14.80          |

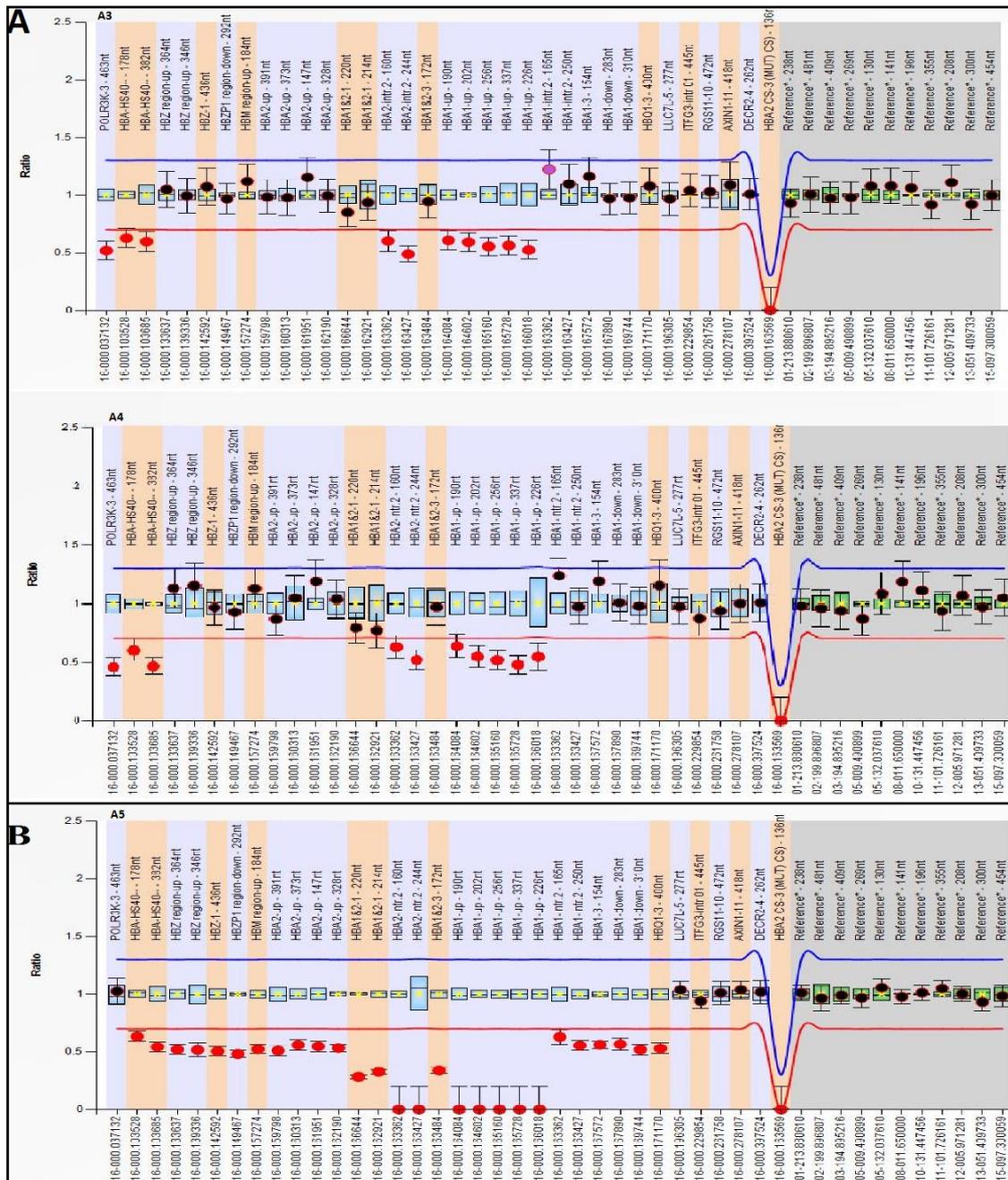
M: masculino; F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0/F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18/F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99/F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54/F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (F: 10-280 ng/mL/M:29-300 ng/mL).

### 5.3.3 Pacientes com fenótipo de doença da Hb H

A investigação molecular inicial por *Multiplex-gap-PCR*, mostrou, em três (3,53%) amostras, um padrão compatível com heterozigose da deleção  $-\alpha^{3.7}$  em duas (A3 e A4) e um padrão compatível com homozigose em uma (A5), resultado que não explicava o fenótipo de doença da Hb H observado nestes três casos. Ao serem analisadas pelo MLPA, além da deleção  $-\alpha^{3.7}$ , foi detectada na A3 e A4 uma deleção com aproximadamente de 67 kb de DNA envolvendo a região reguladora do gene  $\alpha$  (HS-40) e suas regiões adjacentes abrangendo as sondas 463 a 364 com diminuição de 50% nos seus sinais. Já na A5 foi detectada uma extensa deleção ainda não descrita na literatura, com aproximadamente 70 kb de DNA, que eliminou desde a região do HS-40 até parte do gene  $\theta$  (HBQ<sub>1</sub>), compreendendo as sondas 178 a 400. As Figuras 17 e 18 mostram a representação esquemática e gráfica das três deleções detectadas. Os dados hematológicos e moleculares desses pacientes encontram-se na Tabela 7.



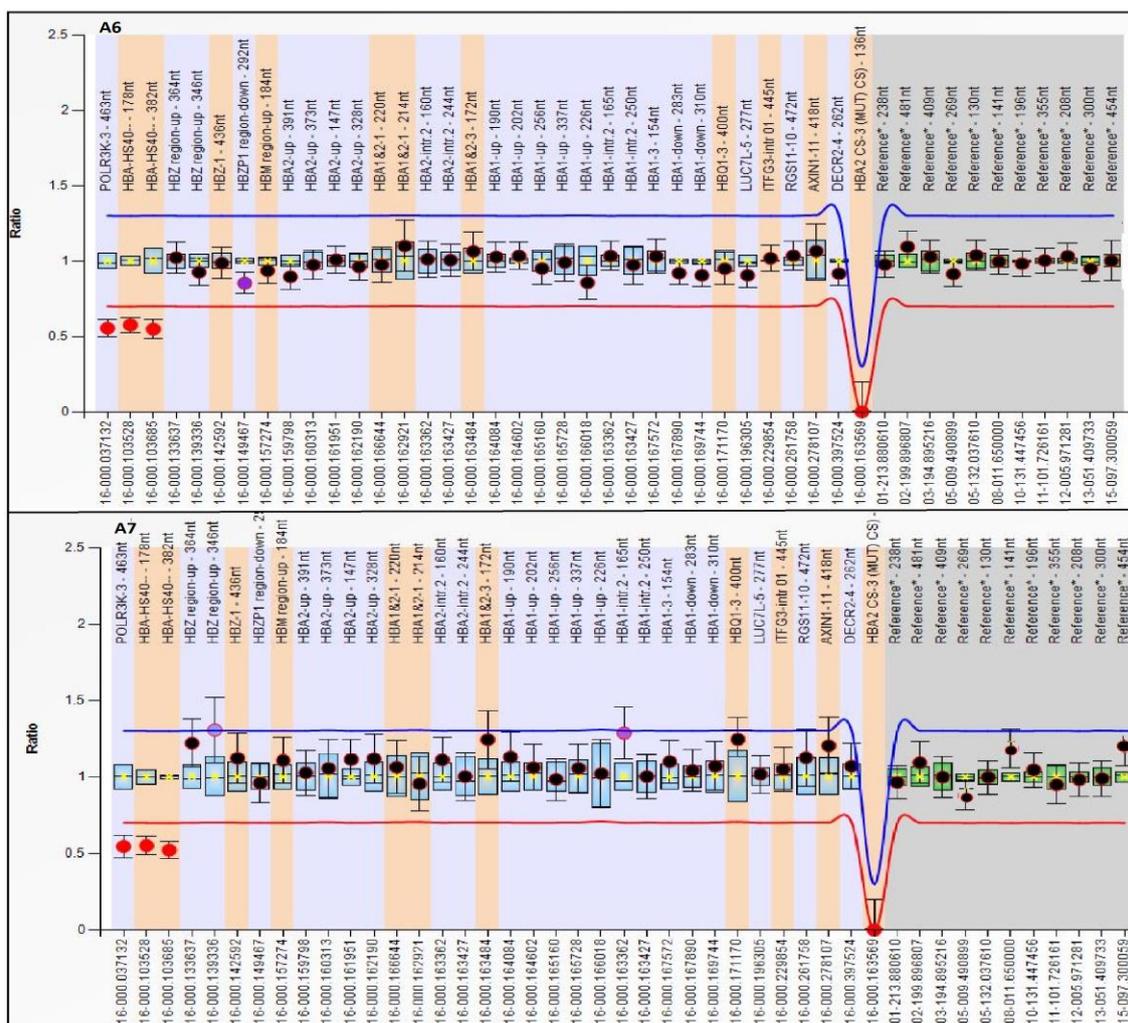
**Figura 17.** Esquema representando as deleções detectadas nas pacientes com fenótipo de doença da Hb H. A região telomérica do cromossomo 16p13.3 esta indicada pela forma oval, as setas mostram as localizações das respectivas sondas que compõem o *kit* P140-C1HBA, enquanto que as caixas em azul simbolizam os genes. As faixas preta indicam os fragmentos deletados, os traços pontilhados estabelecem a primeira e a última sonda deletadas e as áreas em aberto demonstram as regiões nas quais provavelmente ocorreram os *breakpoints*. A= amostra (Adaptado de *MRC-Holland*, 2017).



**Figura 18.** Gráficos elaborados pelo *software Coffalyser* com os resultados do MLPA dos pacientes. O eixo X representa as posições das sondas no gene e as razões da intensidade do sinal das sondas no eixo y. A presença de ambos os alelos no gene é indicado pela razão 1, a razão 0.5 indica a perda de um alelo, já a perda de ambos os alelos é representado pela razão 0. (A) Na A3 e A4 a deleção do HS-40 e suas regiões adjacentes são indicadas pela diminuição de 50% nos sinais sondas 463 a 364 em um alelo, enquanto que à deleção  $-\alpha^{3,7}$  é indicada pela diminuição de 25% das sondas 220, 214 e 172 e 50% das demais (160, 244, 190, 202, 256, 337 e 226) no outro, ambas em heterozigose. (B) A A5 mostra a deleção  $-\alpha^{3,7}$ , em um dos alelos, associada a uma deleção não identificada no outro, que abrangeu as sondas 178 a 400, com uma redução de 100% nos sinais das sondas 160, 244, 190, 202, 256, 337 e 226, de 50% para as sondas 178 a 328 e 165 a 400 e de 25% para as sondas 220, 214 e 172. A= amostra.

**Fonte:** Dados gerados pela autora através do *software Coffalyser*.





**Figura 20.** Gráficos elaborados pelo software *Coffalyser* com os resultados do MLPA dos pacientes com deleções da região HS-40. O eixo X representa as posições das sondas no gene e as razões da intensidade do sinal das sondas no eixo y. A presença de ambos os alelos no gene é indicada pela razão 1, a razão 0.5 indica a perda de um alelo, já a perda de ambos os alelos é representado pela razão 0. As mostras A6 e A7 apresentam a deleção do HS-40 e suas regiões adjacentes são indicadas pela diminuição de 50% nos sinais sondas 463 a 364 em um alelo. A= amostra.

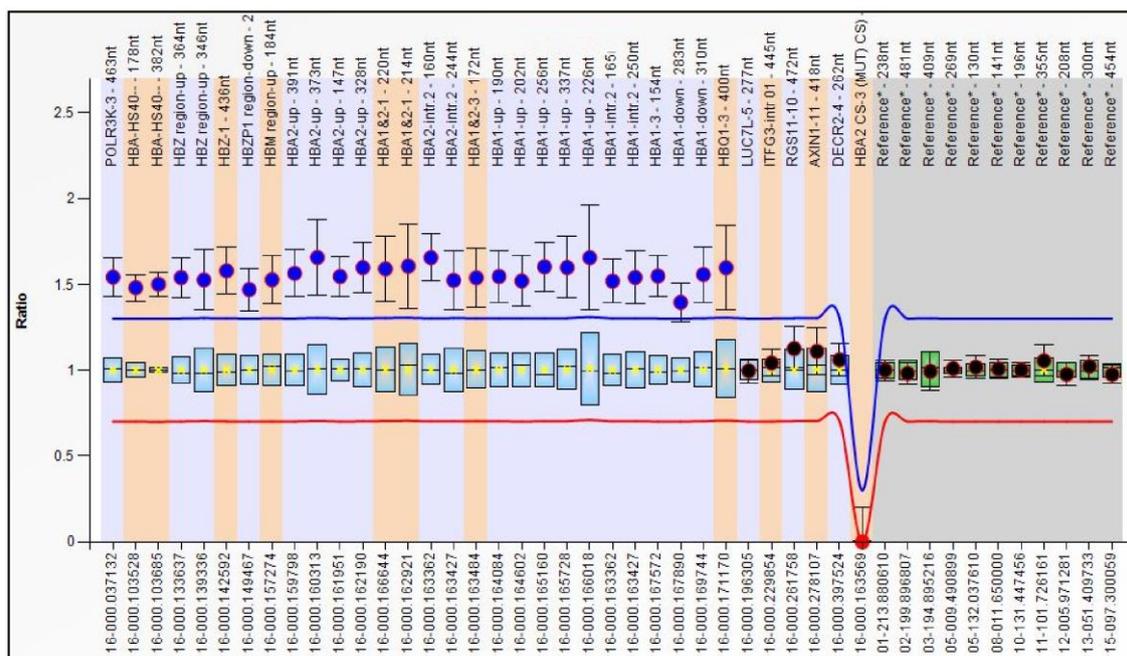
**Fonte:** Dados gerados pela autora através do software *Coffalyser*

**Tabela 8-** Dados moleculares e hematológicos dos pacientes com deleção da região HS-40 do *cluster*  $\alpha$ -globina

| $\alpha$ -genótipos         |   | RBC<br>( $10^9/\text{mm}^3$ ) | Hb<br>(g/dL) | VCM<br>(fL) | HCM<br>(pg) | Hct<br>(%) | RDW<br>(%) | HbA <sub>2</sub><br>(%) | HbF<br>(%) | FS<br>(ng/mL) |
|-----------------------------|---|-------------------------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------------------|------------|---------------|
| PCR                         | MLPA  |                               |              |             |             |            |            |                         |            |               |
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ | $\alpha\alpha^{\text{HS40}}/\alpha\alpha$ F | 5.61                          | 10.70        | 66          | 19.20       | 37         | 15.70      | 2.20                    | 0.50       | 263.50        |
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ | $\alpha\alpha^{\text{HS40}}/\alpha\alpha$ F | 5.40                          | 11.40        | 67          | 21.10       | 36         | 16.30      | 2.70                    | 0.60       | 63.40         |

F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (F: 10-280 ng/mL).





**Figura 22.** Gráfico gerado pelo software Coffalyser.Net com o resultado do MLPA da amostra com a duplicação do *cluster alpha*. O eixo x representa as sondas e o eixo y as razões das sondas da amostra analisada e a razão média das amostras de referência. Uma proporção de 1 indica a presença normal esperada de ambos os alelos, uma razão de 1,5 indica uma cópia de 1 alelo e 2 indica o aumento dessa região em ambos os alelos. A sequência duplicada possuindo aproximadamente 140.000 pares de bases é indicada pelas sondas 463 a 400.

**Fonte:** Dados gerados pela autora através do software Coffalyser

**Tabela 9-** Dados molecular e hematológico do paciente com duplicação do *cluster alpha*-globina

| $\alpha$ -genótipos         |                                   |                                      |                     |                    |                    |                |                   |                               |            |                   |       |
|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|
| <i>Multiplex-PCR</i>        | <i>MLPA</i>                       | <i>RBC</i><br>( $10^6/\text{mm}^3$ ) | <i>Hb</i><br>(g/dL) | <i>VCM</i><br>(fL) | <i>HCM</i><br>(pg) | <i>Hct</i> (%) | <i>RDW</i><br>(%) | <i>HbA<sub>2</sub></i><br>(%) | <i>HbF</i> | <i>FS</i> (ng/mL) |       |
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ | $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ | M                                    | 5.20                | 12.80              | 77                 | 24.60          | 40.20             | 13.80                         | 2          | 0.30              | 93.00 |

M: masculino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54); RDW: *Red cell distribution width* (VR: 10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); FS: Ferritina sérica (M:29-300 ng/mL).

### 5.3.6. Comparação do perfil hematológico dos pacientes com $\alpha$ -tal

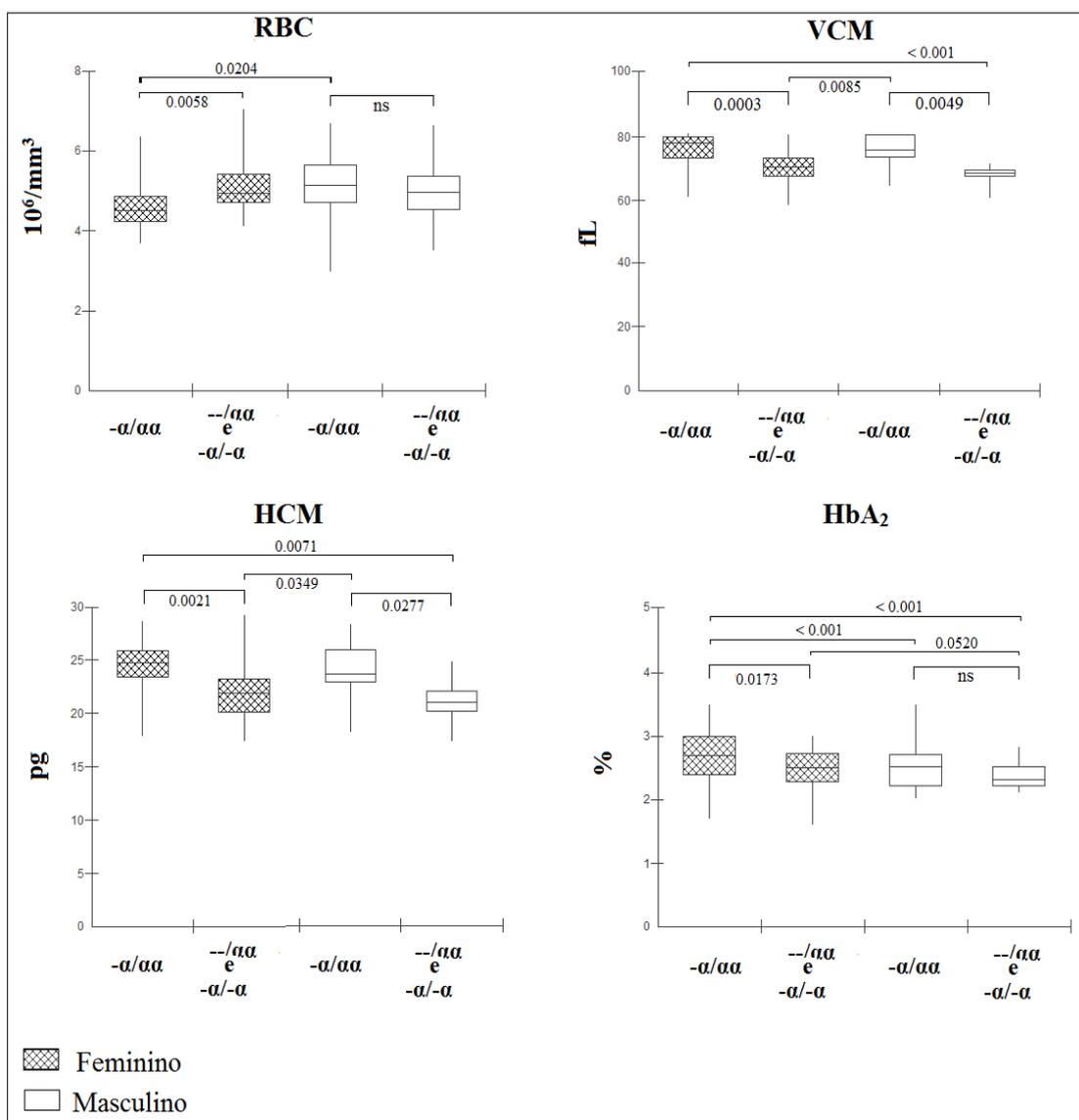
A partir dos resultados obtidos, os parâmetros hematológicos dos pacientes com talassemia  $\alpha$  foram correlacionados com os perfis genótipicos de  $\alpha^+$  ( $-\alpha/\alpha\alpha$  e  $-\alpha/-\alpha$ ) e  $\alpha^0$  ( $--/\alpha\alpha$ ). A Tabela 10 mostra os resultados dos parâmetros hematológicos dos pacientes que foram identificados com deleções nos genes  $\alpha$ . Os pacientes foram agrupados segundo o perfil genótipo e gênero, com o objetivo de verificar se havia diferenças

significativas nos valores destes parâmetros entre eles. As tendências desses parâmetros hematológicos analisados também estão representadas na Figura 23. Em relação à contagem das células vermelhas (RBC) foram observadas diferenças significativas entre os gêneros (feminino e masculino) para o genótipo  $-\alpha/\alpha$ , os homens apresentaram valores significativamente maiores do que as mulheres. Mas, para os pacientes que tinham deleção de duas cópias do gene HBA, as mulheres apresentaram valores significativamente maiores que os homens. Tanto para o VCM quanto para o HCM foram observadas diferenças significativas entre os grupos (feminino e masculino) para os genótipos  $-\alpha/-\alpha$ ,  $-\alpha/-\alpha$  e  $--/\alpha\alpha$ . Foi observado que naqueles que tinham duas cópias do gene HBA excluídas, os valores de VCM e HCM foram significativamente menores do que naqueles que tinham apenas uma única cópia do gene deletado. Ao analisar os valores de HbA<sub>2</sub>, nota-se que os resultados foram semelhantes aos observados para o VCM e o HCM para os genótipos  $-\alpha/\alpha$ ,  $-\alpha/-\alpha$  e  $--/\alpha\alpha$ , sendo, que naqueles que tinha duas cópias do gene HBA excluídas os valores de HbA<sub>2</sub> foram significativamente diminuídos. Já nos pacientes com uma única cópia do gene HBA excluído, foram observadas diferenças significativas apenas entre as mulheres. Não se observou diferença estatística significativa entre os valores de Hb, Hct e RDW para os genótipos analisados, embora naqueles que tinha duas cópias do gene excluído esses parâmetros foram ligeiramente mais baixos.

**Tabela 10-** Relação entre os genótipos  $-a/aa$ ,  $--/aa$  e  $-a/-a$  com os parâmetros hematológicos dos 71 pacientes identificados com esse perfil genotípico

| <b>Genótipo</b>                                |   |     | <b>RBC</b><br>( $10^9/\text{mm}^3$ ) | <b>Hb (g/dL)</b> | <b>VCM (fL)</b> | <b>HCM (pg)</b> | <b>Hct (%)</b> | <b>RDW (%)</b> | <b>HbA<sub>2</sub> (%)</b> |
|--|---|-----|--------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------------------|
| <b><math>-a/aa</math></b>                      | M | 9*  | 5.11 ± 0.99                          | 12.24 ± 2.54     | 75.31 ± 5.29    | 24.07 ± 2.88    | 38.81 ± 7.63   | 15.58 ± 2.20   | 1.67 ± 1.43                |
|  | F | 30* | 4.62 ± 0.60                          | 11.18 ± 1.30     | 76.44 ± 4.04    | 24.33 ± 2.69    | 35.26 ± 4.22   | 15.75 ± 1.72   | 2.18 ± 1.18                |
| <b><math>--/aa</math> e <math>-a/-a</math></b> | M | 7*  | 4.99 ± 1.04                          | 10.63 ± 2.10     | 67.16 ± 3.81    | 21.03 ± 2.50    | 34.65 ± 7.33   | 16.30 ± 2.51   | 1.98 ± 1.00                |
|  | F | 25* | 5.08 ± 0.63                          | 10.93 ± 1.18     | 69.57 ± 4.50    | 21.88 ± 2.59    | 35.88 ± 3.61   | 16.19 ± 2.53   | 1.41 ± 1.28                |
| <b>valor-p (ANOVA)</b>                         |   | 71  | **0.0191                             | 0.3909           | **0.0001        | **0.0032        | 0.4441         | 0.8349         | **0.0001                   |

\*valores médios dos parâmetros hematológicos; M: masculino; F: feminino; VR: valores de referência; RBC: contagem das células vermelhas (VR: M: 4,5-6,0/F:4,0-5,2); Hb: hemoglobina (VR: M: 14-18/F: 12-16); VCM: volume corpuscular médio (VR: M: 81-99/F: 80-96); HCM: hemoglobina corpuscular média (VR: 27-32); Hct: Hematócrito (VR: M: 42-54/F: 36-45%); RDW: *Red cell distribution width* (VR:10-15); HbA<sub>2</sub> (VR: 1,5-3,5%); HbF (VR: <2%); média ±desvio padrão para cada parâmetro.\*\*diferenças estatisticamente significante (p < 0.05). *Análise de Variância (ANOVA)* para comparação múltipla.



**Figura 23.** Box-plot mostrando a comparação dos valores de RBC, VCM, HCM e HbA<sub>2</sub> entre os diferentes genótipos de  $\alpha$ -tal. As extremidades de cada Box-plot correspondem ao primeiro e terceiro quartis, a linha central representa a mediana e as linhas verticais representam os valores mínimo e máximo. Análise comparativa estatística de RBC, VCM, HCM e HbA<sub>2</sub> das diferentes deleções foram feitas por Kruskal-Wallis e Dunn (BioEstat versão 5.3). Valores de significância:  $p < 0.05$ ; ns: não significativo. **Fonte:** Gráficos gerados pela autora através do programa de estatística BioEstat.

## 6. Discussão

Nos últimos anos o método *Multiplex-gap-PCR* têm sido o mais utilizado nos estudos genéticos das cadeias  $\alpha$  da globina, pois, além de possibilitar a amplificação simultânea de vários fragmentos em uma única reação, é considerado rápido e econômico (CHONG *et al.*, 2000; WENNING *et al.*, 2000). Esta técnica é muito usada na triagem molecular das sete deleções mais prevalentes da  $\alpha$ -tal ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--^{MED}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $--^{SEA}$ ,  $--^{FIL}$  e  $--^{THAI}$ ). As demais mutações podem ser investigadas por outras metodologias também baseadas em PCR ou ainda por meio do sequenciamento de DNA (HIGGS *et al.*, 2001). Ainda assim, em muitos casos, pacientes que cursam com fenótipo hematológico (VCM e/ou HCM diminuídos e níveis normais de *status* do ferro, ferritina, HbA<sub>2</sub> e HbF) semelhantes aos observados nos indivíduos que possuem mutações da  $\alpha$ -tal, permanecem sem diagnóstico (FALLAH *et al.*, 2010; SUEMASU *et al.*, 2011). Provavelmente, esses casos estão relacionados com mutações raras ou ainda desconhecidas, não diagnosticadas pelas metodologias usualmente utilizadas (COLOSIMO *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2012).

Assim, o desenvolvimento de ferramentas que permitam o refinamento da investigação diagnóstica dessa alteração tem sido alvo de diversos estudos ao longo de mais de uma década. Desde sua primeira descrição em 2002 por Schouten *et al.*, o MLPA, desenvolvido para pesquisar numa única reação baseada no PCR em até 50 sequências de DNA e para identificar variações no número de cópias (CNVs) de genes específicos, tornou-se uma técnica promissora para determinação e caracterização de deleções e/ou duplicações nos *clusters* dos genes  $\alpha$ -globina, sejam elas raras, novas ou conhecidas (HARTEVELD *et al.*, 2005, EIJK-VAN; OS; SCHOUTEN, 2011). Sua capacidade de investigar vários segmentos de DNA em uma única reação faz do MLPA

um método de alta resolução, excelente especificidade e com ótima relação custo-benefício quando comparado com as demais técnicas, como por exemplo, o *array*-CGH (STUPPIA *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, utilizamos a metodologia de MLPA, recentemente implementada no laboratório de biologia molecular e celular da Disciplina Hematologia e Hemoterapia da UFTM, para identificação e caracterização de deleções relacionadas à  $\alpha$ -tal em 13 pacientes que não tiveram o diagnóstico definido pelos métodos até então disponíveis em nosso laboratório (*Multiplex-gap*-PCR e PCR-específico). Para uma análise mais detalhada dos genes HBA, também aplicamos a técnica de MLPA em 72 pacientes que já haviam sido diagnosticados com  $\alpha$ -tal, em virtude de que em alguns casos o genótipo detectado não condizia com as alterações hematológicas apresentadas.

Com a aplicação dos ensaios de MLPA foi possível demonstrar, em 32/85 (37.65%) casos estudados, além das deleções já conhecidas ( $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ ), diferentes polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), deleções raras (deleção da região HS-40), desconhecidas (novas deleções) e ainda uma extensa duplicação envolvendo todo o agrupamento de genes  $\alpha$ .

Em relação aos polimorfismos nós identificamos seis SNPs (rs376988236 (g.34974C>T), rs143196637 (g.33103G>A), rs3760045 (g.36907A>G), rs2362746 (g.34247T>G - *HBA2*:c.300+55T>G), rs148228241 (g.38051G>T) e o alelo  $\alpha_{212}$  (g.[34247T> G; 34311delGinsCTCGGCC]) envolvendo os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  em 24 amostras; das quais em 14 além destes SNPs foram também detectadas a deleção  $-\alpha^{3.7}$ .

O agrupamento dos genes  $\alpha$  está localizado em regiões altamente homólogas e, devido a essa homologia, esta região cromossômica está propensa a eventos genéticos que causam deleções de diferentes tamanhos e polimorfismos estruturais, como esses

SNPs (que são variações nas sequências de nucleotídeos em segmentos homólogos de DNA) (WEATHERALL; CLEGG, 2001; HIGGS; WEATHERALL, 2009; HIGGS, 2009). Uma explicação complementar para tais eventos seria que no genoma humano há um elevado número de repetições Alu ( $3 \times 10^5$  cópias); no *cluster*  $\alpha$  e ao seu redor, as quais representam cerca de 25% de toda a sequência e que poderiam propiciar rearranjos mediados pela recombinação entre essas repetições durante a replicação do DNA, favorecendo assim o surgimento de deleções de diferentes tamanhos. Inclusive, uma análise minuciosa da sequência de DNA dos pontos de quebra de algumas deleções nos genes  $\alpha$  revelaram algumas particularidades interessantes como palíndromos, repetições diretas e regiões de fraca homologia. Segundo alguns autores, tais eventos também poderiam estar envolvidos no rearranjo do DNA (HIGGS, 2009; HIGGS, 2013; DE-LA-CRUZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

Nos pacientes que foram identificados somente com SNPs (rs3760045, rs2362746, rs148228241 e o alelo  $\alpha 212$ ), todos apresentavam fenótipos hematológicos compatíveis com o genótipo identificado (heterozigotos para  $\alpha^+$  talassemia). Referências bibliográficas e bancos de dados como o Ithant e o dbSNP no NCBI, indicam que estes SNPs são considerados polimorfismos neutros, não influenciando as alterações fenotípicas. Exceto para o alelo  $\alpha 212$  (polimorfismo africano), que foi relatado anteriormente em indivíduos que apresentaram microcitose leve e tinham descendência afro-americana (GU *et al.*, 1988), indiana, malaia e iraniana (LAW *et al.*, 2006), em frequências de 3,15%, 4,25%, 0,78% e 0,83%, respectivamente. Na América Latina este rearranjo ( $\alpha 212$ ) foi identificado pela primeira vez em 2012 em associação com a Hb Etobicoke (SILVA; SENDIM; VIANA, 2012), e mais tarde, em associação com uma mutação não deletional de  $\alpha$ -tal, em uma família cubana (SCHEPS; DE PAULA;

BITSMAN, 2013) e recentemente, em uma criança com associação com a Hb Bristol-Alesha no Brasil (PEDROSO *et al.*, 2017).

Em nossa população, identificamos essa variante em sete indivíduos de descendência predominantemente africana: quatro associados com a deleção  $-\alpha^{3.7}$  ( $\alpha^{212}\alpha/-\alpha^{3.7}$ ) e três indivíduos com parâmetros hematológicos sugestivos de  $\alpha$ -tal ( $\alpha^{212}\alpha/\alpha\alpha$ ).

O alelo híbrido  $\alpha^{212}$  é formado pela conversão entre os genes HBA2 e HBA1; fazendo com que o intron 2 típico do gene HBA1 seja também localizado no HBA2. Os genes HBA codificam sequências idênticas, mas que diferem, em apenas dois locais no intron 2: uma substituição T> G ( HBA2: T; HBA1: G) na posição 55 (HBA2:c.300+55T>G) e uma inserção de 8 nt, onde um único G ( HBA2) é substituído por 5'-CTCGGCCC-3' ( HBA1), na posição 119-126 (HBA2:c.301-4G> CTCGGCCC) (LAW *et al.*, 2006). Atualmente, não há um consenso sobre o mecanismo mutacional envolvido na origem deste alelo e o seu possível efeito em sua expressão ainda não foi definido (GU *et al.*, 1988; LAW *et al.*, 2006).

Em nosso estudo nós observamos alterações hematológicas em todos os pacientes identificados com SNPs neutros. Relatos na literatura sugerem que estes polimorfismos podem surgir devido a um duplo *crossover* ou conversão gênica entre os dois genes HBA2 e HBA1 de alelos normais desalinhados, sugerindo que a presença destes rearranjos possa está associadas e relacionadas com alterações de alguns parâmetros hematológicos, especialmente VCM e HCM (GU *et al.*, 1988; LAW *et al.*, 2006). No entanto, outros estudos devem ser realizados, para avaliar os seus verdadeiros efeitos sobre esses parâmetros hematológicos (SILVA; SENDIM; VIANA, 2012; SCHEPS; DE PAULA; BITSMAN, 2013; PEDROSO *et al.*, 2017).

Diante dessa situação, esses pacientes podem receber tratamentos inadequados ou desnecessários, tais como intervenções para deficiência de ferro, especialmente quando a anemia estiver presente. Daí a importância da caracterização e identificação correta desses casos (PIMENTA *et al.*, 2006; HIGGS, 2009; WAGNER *et al.*, 2010; STUPPIA *et al.*, 2012). Alguns estudos genéticos relatam que estas variações polimórficas podem não ter consequências fenotípicas, embora se saiba que anormalidades na estrutura genômica podem resultar em uma maior susceptibilidade a fenótipos relacionados à doença. A explicação para os efeitos fenotípicos observados seriam que, embora não altere o aminoácido, pode afetar a estrutura e estabilidade do RNA mensageiro e com isso reduzir a quantidade de produto proteico (KWOK; GU, 1999, GRIFFITHS *et al.*, 2001), o que justificaria a anemia microcítica hipocrômica, não podendo ser confundida por exemplo com outras condições como deficiência de ferro ou  $\beta$ -tal minor, já que esses indivíduos apresentaram níveis normais de *status* do ferro, ferritina e HbA<sub>2</sub>. No entanto, outras possibilidades também poderiam explicar estas alterações hematológicas, tais como inflamação crônica, anemia sideroblástica, envenenamento por chumbo e gravidez, além de outras alterações genéticas (HIGGS, BOWDEN, 2001; DE-LA-CRUZ-SALCEDO *et al.*, 2016), condições não identificadas nos pacientes do presente estudo.

Além desses casos, em 14 daqueles 32 pacientes foram observadas associações entre esses SNPs e a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , tanto em estado heterozigoto [ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  (09/14)] quanto homozigoto [ $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  (05/14)].

A deleção  $-\alpha^{3.7}$  é a forma mais comum de  $\alpha$ -tal observada mundialmente (HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013), podendo variar de 20 a 25 % na população afrodescendente no Brasil (SONATI *et al.*, 1991; SONATI; COSTA, 2006;

SOUZA *et al.*, 2015). Esta deleção é resultante do *crossing-over* desigual entre as sequências homólogas no cluster  $\alpha$ . Alguns trabalhos na literatura sugerem que nesses segmentos altamente homólogos o aparecimento de novos rearranjos pode ocorrer com mais frequência, aumentando as possibilidades para o surgimento de deleções e diferentes polimorfismos (KWOK; GU, 1999; WEATHERALL; CLEGG, 2001; HIGGS; ENGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012). Nossos resultados corroboraram com os descritos por esses estudos, apontando essa diversidade genotípica através dos diferentes tipos de SNPs e deleções encontradas.

Em dois casos que no *Multiplex-gap-PCR* apresentavam um padrão compatível com a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , em heterozigose, foi identificado que a deleção  $-\alpha^{3.7}$  estava associada a uma deleção que eliminou tanto o gene  $\zeta$  quanto os pseudogenes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , com aproximadamente 17.2 Kb de DNA. De acordo com tamanho e os *breakpoints* aproximados, está nova deleção  $\alpha^+$  identificada não é semelhante a nenhuma outra mutação já descrita na literatura, indicando a descoberta de uma nova forma de  $\alpha^+$  em nossa população. Em outros três casos que no *Multiplex-gap-PCR* apresentavam um padrão compatível com a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , em heterozigose em dois casos e em homozigose no outro, em dois deles foi detectado que a deleção  $-\alpha^{3.7}$  estava associada a uma deleção rara, de cerca de 67 kb de DNA, na região reguladora do gene  $\alpha$  (HS-40) e suas regiões adjacentes (POLR3K-3). Já no terceiro, a deleção  $-\alpha^{3.7}$  foi detectada associada a uma extensa deleção que eliminou tanto os genes  $\alpha$  quanto a sua região regulatória do HS-40, com aproximadamente 70Kb de DNA. De acordo com tamanho e os *breakpoints* aproximados, está nova deleção  $\alpha^0$  identificada, não é semelhante a nenhuma outra mutação já descrita na literatura, indicando a descoberta de uma nova forma de  $\alpha^0$  em nossa população. Ambos os pacientes que apresentavam a deleção da região HS-40 associada a deleção  $-\alpha^{3.7}$  cursavam com um quadro clínico e laboratorial de anemia

moderada com hemoglobina de 8,2 e 9,5 g/dL e microcitose com VCM de 67 e 58fl, respectivamente, hipocromia, poiquilocitose, presença de hemácias em alvo e níveis normais de cinética do ferro, ferritina e HbA<sub>2</sub>.

A maioria dos genótipos  $\alpha$ -talassêmicos derivam das interações entre as formas  $\alpha^+$  ( $-\alpha/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/-\alpha$ ) e  $\alpha^0$  ( $--/\alpha\alpha$ ) e, às vezes, combinações complexas envolvendo esses alelos podem surgir. Como discutido anteriormente, a forma  $\alpha^+$  mais comum e amplamente distribuída no mundo, resultante da deleção de um gene  $\alpha$ , é a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , tem sido relatada também como relativamente frequente em indivíduos brasileiros (SONATI *et al.*, 1991; ALCOFORADO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015). Quanto à talassemia  $\alpha^0$ , sua ocorrência limita-se, praticamente, às regiões do Mediterrâneo e do Sudeste Asiático, sendo a expressiva maioria dos casos relatados portadora das deleções  $--^{MED}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $--^{SEA}$ ,  $--^{FIL}$  e  $-\alpha^{THAI}$  (CANÇADO, 2006; HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013). São poucos os casos descritos na população brasileira da interação entre as formas  $\alpha^+$  e  $\alpha^0$ , resultante da deleção de três genes  $\alpha$  ( $-\alpha/--$ ), que dá origem à condição denominada de doença da HbH (SONATI *et al.*, 1991; WENNING *et al.*, 2002; SONATI; COSTA, 2006; SUEMASU *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2017). Em nosso estudo identificamos três casos com o fenótipo compatível com a doença da HbH, sendo que dois ocorreram devido à deleção de HS-40 e o outro à presença de uma nova deleção. Ambas as alterações se associadas a outras deleções  $\alpha^+$ , como o aqui observado, pode favorecer o aumento de casos de doença da HbH no Brasil ou ainda a forma letal da  $\alpha$ -tal ( $--/--$ ) se essa nova deleção  $\alpha^0$  estiver presente em homozigose. Esse fato reflete e demonstra a ampla mistura étnica da nossa população, assim como a alta probabilidade de combinações entre os diversos tipos de talassemia e também outras alterações de hemoglobinas, como a HbS e HbC, que são frequentes no país (NAOUM, 1997; LOBO *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2006;

SONATI; COSTA, 2006). Além disso, a detecção dos novos rearranjos que causam as  $\alpha$ -tal é muito importante, pois contribui para a expansão do conhecimento genético e epidemiológico dessas hemoglobinopatias, especialmente em países como o Brasil que possui grande miscigenação genética. Devido a sua complexidade e o seu variado espectro clínico, os órgãos de saúde, não só no nosso país, mas no mundo, consideram estas desordens uma relevante preocupação de saúde pública (BONINI-DOMINGOS, 2004; PIMENTA *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2010; STUPPIA *et al.*, 2012).

Além destes dois casos com genótipo discrepante com o fenótipo, identificamos dois pacientes, que pela PCR multiplex apresentava o genótipo  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ , com uma deleção restrita à região reguladora do *cluster*  $\alpha$  HS-40 e suas regiões adjacentes abrangendo um segmento de 67 Kb, que embora não afetem os genes  $\alpha$ , os deixam sem expressão. Os pacientes exibiam um quadro hematológico similar ao observado nos indivíduos que apresentam deleções de dois genes  $\alpha$ , com diminuição dos valores médios do VCM e do HCM.

Alguns estudos tem demonstrado que a região controladora, HS-40, é responsável por controlar a expressão de todos os genes do agrupamento  $\alpha$  (HIGGS, 2009; CAO; GALANELLO, 2010; HIGGS, 2013). Essa região possui atividade acentuadora (*enhancer*), aumentando a expressão dos genes  $\alpha$  e a sua remoção afeta locais específicos de ligação de vários elementos de transcrição (como GATA-1 e NF-E2) exercendo um efeito negativo na expressão desses genes (BUNN; FORGET, 1986; VOON; VADOLAS, 2008; HIGGS; WEATHERALL, 2009). A eliminação dessa região é responsável pelo fenótipo da talassemia  $\alpha^0$  e apesar de ser um evento raro, já é encontrado em diversas populações (HARTEVELD *et al.*, 2005; SONATI, COSTA, 2006; HIGGS, 2009; HARTEVELD, HIGGS, 2010; HIGGS, 2013; FERREIRA *et al.*, 2017). O primeiro relato na literatura desta deleção foi em 1990 por Hatton *et al.*, que

identificaram a eliminação desta sequência (HS-40) em um indivíduo com anemia microcítica hipocrômica, sem deficiência de ferro e com níveis normais de HbA<sub>2</sub> e HbF. Desde essa época mais de 40 deleções já foram descritas, com remoção de 3,3 a 160 kb dessa região (*Globin Gene Server*).

Além destas deleções, nós identificamos também um paciente com uma duplicação de todo o *cluster*  $\alpha$ , incluindo o elemento regulador HS-40, levando a um alelo com 4 genes  $\alpha$  expressos ( $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), abrangendo uma região com aproximadamente 140.000 Pb de extensão. Diferente dos outros casos analisados, em que o fenótipo talassêmico estava correlacionado com deleções no *cluster*  $\alpha$ , nesse paciente, a duplicação desta sequência e, provavelmente a síntese aumentada de cadeias  $\alpha$ , pode provocar o fenótipo talassêmico encontrado. Tal fenótipo (microcitose e hipocromia), também foi observado por outro autor que detectou estes dois parâmetros reduzidos em uma família Chinesa com duplicação ( $\alpha\alpha\alpha\alpha^{282}$ ) (HU *et al.*, 2016). Porém outros trabalhos relatam que estes parâmetros geralmente são normais em indivíduos heterozigotos para os genes  $\alpha$  em excesso (como na  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$  e na  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ ) (BUNN; FORGET, 1986; DALLAPICCOLA *et al.*, 2009; MOOSAVI *et al.*, 2011; HIGGS, 2013). Contudo, o efeito fenotípico desta duplicação sobre o VCM e o HCM não está claro, necessitando de investigações futuras para uma melhor definição, visto que em nosso estudo somente um indivíduo foi identificado com esta alteração.

Esses rearranjos que geram a duplicação de genes da  $\alpha$  globina geralmente são encontrados por acaso, a menos que, esse excesso de genes  $\alpha$ , seja herdado junto com uma alteração no gene  $\beta$ -globina. Nesta situação, os heterozigotos para  $\beta$ -tal geralmente apresentam um fenótipo de  $\beta$ -tal intermediária ou outra forma ainda mais grave, uma vez que os genes excedentes causam um desequilíbrio mais severo entre as cadeias  $\alpha/\beta$ -globina, quando comparado com aqueles que possuem apenas  $\beta$ -tal em heterozigose

(JIANG *et al.*, 2015). Ainda que bem menos frequente do que as grandes deleções, alguns trabalhos têm descrito casos de duplicações, triplicações e quadruplicações do *cluster*  $\alpha$ -globina e seus arredores (HARTEVELD *et al.*, 2005, DALLAPICCOLA *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2016).

Verificamos que os diferentes genótipos ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ,  $-\alpha/-\alpha$  e  $--/\alpha\alpha$ ) possuem perfis hematológicos distintos, o que pode auxiliar no diagnóstico. Assim como os dados citados na literatura, demonstramos que os indivíduos que possuem deleção de duas cópias do gene  $\alpha$  apresentavam uma elevação estatisticamente significativa na contagem das células vermelhas, bem como uma redução nos valores de VCM, HCM e HbA<sub>2</sub>, comparado com aqueles que têm deleção de apenas um gene  $\alpha$ . Não foi observada diferença estatística significativa entre os valores de Hb, Hct e RDW para os genótipos analisados, embora naqueles que tinham duas cópias do gene excluído, esses parâmetros foram ligeiramente mais baixos. Estes dados corroboram com a literatura que aponta que os indivíduos com dois genes  $\alpha$  afetados apresentam um quadro clínico de anemia leve com Hb entre 11,0 e 13,0 g/dL, discreta anisopoiquilocitose com microcitose e hipocromia mais evidente do que aqueles que têm o comprometimento de apenas um gene, os quais apresentam alterações hematológicas mínimas ou até mesmo ausentes em alguns casos (NAOUM, 1987; WEATHERALL; CLEGG, 2001; HARTEVELD; HIGGS, 2010; VICHINSKY, 2013).

O presente trabalho nos propiciou ampliar o conhecimento das bases moleculares da  $\alpha$ -tal em nossa população, além de demonstrar a diversidade destas alterações, permitindo a identificação de diferentes polimorfismos, raras e novas mutações, responsáveis pelo fenótipo talassêmico observado nos pacientes. Adicionalmente, nossos dados destacam também a relevância de analisar corretamente os casos que apresentam variações laboratoriais sugestivas de  $\alpha$ -tal. Algumas deleções

e duplicações gênicas como as encontradas nesse estudo são identificadas apenas por técnicas moleculares mais acuradas, sem as quais muitos casos permanecem sem diagnóstico. Portanto, a utilização do MLPA para solucionar esses casos foi de extrema importância na conclusão diagnóstica, possibilitando observar uma ampla variabilidade de alterações que acometem os genes  $\alpha$ -globina e assim comparar o fenótipo do paciente com o genótipo encontrado. Desta forma, mesmo quando todas as mutações conhecidas foram excluídas, especialmente, nos casos com diminuição dos valores de VCM e HCM, e níveis normais de HbA<sub>2</sub> e de cinética do ferro, o emprego desta nova metodologia é eficaz e indicado (COLOSIMO *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2012) pois, foram observados neste estudo raras e novas deleções e ainda uma duplicação envolvendo todo o *locus*  $\alpha$ . Além do mais, a identificação dessas alterações genéticas também permite o tratamento e aconselhamento genético adequados quando necessários.

## 7. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados na presente tese, concluímos que:

(1) A padronização da MLPA foi bem sucedida e satisfatória, tornando a MLPA uma técnica disponível em nosso laboratório, que poderá ser empregada como um método complementar ao *Multiplex-gap*-PCR e PCR-específico para elucidação de mutações envolvendo o *cluster*  $\alpha$ -globina.

(2) A aplicação desta metodologia nos permitiu identificar 15.3% dos pacientes com fenótipos de  $\alpha$ -tal não diagnosticados pelo *Multiplex-gap*-PCR e em 26.4% esclarecer discrepâncias fenotípicas do genótipo previamente identificado.

(3) No total, foram identificadas seis SNP's, sete deleções (quatro restritas ao elemento regulatório HS-40 e regiões adjacentes, três novas deleções: duas deleções  $\alpha^+$  envolvendo o gene  $\zeta$  e os pseudogenes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  e uma deleção  $\alpha$  com grande extensão) e uma duplicação envolvendo todo o *locus*  $\alpha$ , incluindo o elemento regulador HS-40, que só puderam ser identificadas pela técnica de MLPA.

(4) As alterações encontradas ao comparar os parâmetros hematológicos dos diferentes genótipos pode contribuir para o diagnóstico diferencial entre as formas  $-\alpha/\alpha\alpha$  e  $-\alpha/-\alpha$  ou  $--/\alpha\alpha$ . Indivíduos com deleção de dois genes alfa apresentam redução do VCM e HCM estatisticamente significativa quando comparado com os indivíduos com deleção de um gene alfa.

## 8. Perspectivas Futuras

Estudos futuros de nosso grupo de pesquisa darão continuidade ao presente trabalho, objetivando esclarecer alguns pontos ainda não elucidados e melhor caracterizar as novas mutações de talassemia alfa identificadas. Sendo assim, algumas das principais linhas são:

- Analisar e caracterizar os pontos de interrupção exatos desses novos alelos de talassemia alfa identificados pelo MLPA, utilizando o método de *Fine-tiling array* (subtipo de aCGH – Ensaio de Hibridização Genômica Comparativa) para investigação e mapeamento dos *breakpoints* desses novos rearranjos no *clusters*  $\alpha$ ;
- Verificar o mecanismo e o efeito do excesso de genes  $\alpha$  sobre o fenótipo hematológico, de indivíduos que apresentem somente essa alteração.

## 9. Referências Bibliográficas

1. AIMIUWU, E.; THOMAS, A.; ROHEEMUN, N.; KHAIRALLAH, T.; NACOUZI, N.A.; GEORGIU, A.; PAPADOPOULOU, C. A Guide for the Haemoglobinopathy Nurse. Thalassaemia International Federation. 2013; (16):1-128.
2. ALCOFORADO, G.H.M.; BEZERRA, C.M.; LEMOS, T.M.A.M.; OLIVEIRA, D.M.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F.; MEDEIROS, T.M.D. Prevalência de Talassemia  $\alpha$  (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) na população adulta do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Genetics and Molecular Biology* 2012; 35(3):594-8.
3. BARTLETT, R.C. Rapid cellulose acetate eletrophoresis. *Clin. Chem.* 1963;9(3):325-329.
4. BELISÁRIO, A.R.; VIANA, M.B. Alpha thalassemia effects on clinical and hematological manifestations of sickle cell disease: A systematic review. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2011; 21(3):3319-30.
5. BENOIST, B; MCLEAN, E; COGSWELL, M. Prevalência mundial de anemia 1993-2005: WHO Glob Database Anemia 2008; 440: 516.
6. BONINI-DOMINGOS, C.R. Talassemia no Brasil – Resultados de 20 anos de estudo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2004; 26 (4):288-89.
7. BORGES, E.; WENNING, M.R.; KIMURA, E.M., et al. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001; 34(6):759-62.
8. BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, W. B. Saunders Company. 1986.
9. CANÇADO, R.D. Talassemias  $\alpha$ . *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(2): 81-7.
10. CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine.* 2010; 12(2): 61-76. doi:10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed
11. CHONG, S.S.; BOEHM, C.D.; HIGGS, D.R.; CUTTING, G.R. Single -tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$  thalassemia. *Clin Chem.* 2000; 95: 360-2.
12. CAO, A.; MOI, P. Regulation of the Globin Genes. *Pediatric Research.* 2002; 51(4):415-21. doi:10.1203/00006450-200204000-00003.
13. CARLOS, A.M.; SOUZA, R.A.V.; SOUZA, B.M.B.; PEREIRA, G.A.; TOSTES-JÚNIOR, S.; MARTINS, P.R.J et al . Hemoglobinopathies in newborns in the southern region of the Triângulo Mineiro, Brazil. Cross-sectional study. *Sao Paulo Med. J.* 2015; 133 (5): 439-444.
14. COLOSIMO, A.; GATTA, V.; GUIDA, V.; LEODORI, E.; FOGLIETTA, E.; RINALDI, S.; CAPPABIANCA, M.P.; AMATO, A.; STUPPIA, L.; DALLAPICCOLA, B. Application of MLPA assay to characterize unsolved  $\alpha$ -globin gene rearrangements. *Blood. Cells Mol. Dis.* 2011;46:139-44.
15. DALLAPICCOLA B.; BERNARDINI L.; NOVELLI A.; MINGARELLI R. Expanding the phenotype of duplication of the Rubinstein-Taybi region on 16p13.3. *Am J Med Genet Part A.* 2009;149A: 2867-70.
16. DE-LA-CRUZ-SALCEDO, E.I.; IBARRA, B.; RIZO-DE-LA-TORRE, L.C.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, J.Y.; GONZÁLEZ-MERCADO, A.; HARTEVELD, C.L AND PEREA-DIAZ, F.J. Molecular analysis of complex cases of alpha- and beta-thalassemia in Mexican mestizo patients with microcytosis and

- hypochromia reveals two novel alpha(0)-thalassemia deletions --(Mex1) and --(Mex2). *Int J Lab Hematol.* 2016; 38:535-542.
17. EIJK-VAN OS, P.G.; SCHOUTEN J.P. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA<sup>®</sup>) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *PCR Mutation Detection Protocols, Methods Mol Biol.* second edition. Edited by: Theophilus BDM, Rapley R. Humana Press. 2011; 688:97-126.
  18. ENG, B.; PATTERSON, M.; BORYS, S.; CHUI, DHK.; WAYE, J.S. PCR-based diagnosis of the Filipino (--<sup>FIL</sup>) and Thai (--<sup>THAI</sup>) -Thalassemia-1 Deletions. *American Journal of Hematology.* 2000; 63:54-6.
  19. ENG, B.; WALSH, R.; WALKER, L.; PATTERSON, M.; WAYE, J.S. Characterization of a rare single alpha-globin gene deletion in a Chinese woman with Hb H disease., *Hemoglobin.* 2005; 29(4):297-9.
  20. FALLAH, M.S.; MAHDIAN, R.; ALEYASIN, S.A.; JAMALI, S.; NOSAEID, M.H.; KARIMIPOUR, M. et al. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of unknown  $\alpha$ -globin gene deletions. *Blood Cells, Molecules and Disease.* 2010;45:58-64.
  21. FERREIRA, R.D.; MOTA, N.O.; KIMURA, E.M.; PEDROSO, G.A.; SONATI, M.F. A combination of the  $-\alpha^{3.7}$  and --<sup>MEDII</sup> alleles causing hemoglobin H disease in a Brazilian patient. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 2017;39:80-3. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.12.001>.
  22. FERRAZ, M.H.C.; MURAO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 2007; 29 (3):218-222.
  23. FORGET, B.G.; COHEN, A.R. Thalassemia syndromes. In: HOFFMAN, R.; Jr., E.J.B.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, L.E.; McGLAVE, P. *Hematology: Basic Principles and Practice.* 4<sup>th</sup>. ed. Livingstone: Elsevier Churchill. 2005. p.557-589.
  24. GALANELLO, R.; CAO A. Alpha-thalassemia. *Genet Med.* 2011;13(2):83-8.
  25. GENE GLOBIN SERVER – Disponível em <http://globin.cse.psu.edu/>, acessado em 20 de julho de 2017.
  26. GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H. & LEWONTIN, R.C. *Genética Moderna.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 589 p.
  27. GU, Y-C; NAKATSUJI, T.; HUISMAN, T.H.J. Detection of a new hybrid  $\alpha 2$  globin gene among American blacks. *Hum Genet.* 1988;79(1):68-72
  28. HARTEVELD, C.L.; VAN DELFT, P.; WIJERMANS, P.W.; KAPPERS-KLUNNE, M.C.; WEEGENAAR, J.; LOSEKOOT, M.; GIORDANO, P.C. A novel 7.9 kb deletion causing alpha+-thalassaemia in two independent families of Indian origin., *British journal of haematology.* 2003;120(2): 364-6.
  29. HARTEVELD, C.L.; VOSKAMP, A.; PHYLIPSEN, M.; AKKERMANS, N.; DEN DUNNEN, J.T.; WHITE, S.J.; GIORDANO, P.C. 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; 42(12):922-31.
  30. HARTEVELD, C.L.; HIGGS, D.R.  $\alpha$ -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2010:1-21.
  31. HATTON, C.; WILKIE, A.O.M.; DRYSDALE, H.C.; WOOD, W.G.; VICKERS, M.A.; SHARPE, J.; AYYUB, H.; PRETORIUS, I.M.; BUCKLE, V.J.; HIGGS, D.R. Alpha thalassemia caused by a large (62kb) deletion upstream of the human globin gene cluster. *Blood.* 1990; 76: 221-7.

32. HIGGS, D.R.; VICKERS, M.A.; WILKIE, A.O.M.; PRETORIUS, I.M.; JARMAN, A.P.; WEATHERALL, D.J. A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Blood*. 1989;73(5):1081-1104.
33. HIGGS, D.R.  $\alpha$ -Thalassaemia. *Baillieres Clin. Haematol.* 1993;6:117-50.
34. HIGGS, D.R.; BOWDEN, D. K. Clinical and Laboratory features of  $\alpha$ -Thalassaemia Syndromes. In: STEINBERG.M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D. R; NAGEL, R.L. (Ed) *Disorders of Hemoglobin: Genetics. Pathophysiology and Clinical Management.* Cambridge University Press. 2001, p.431-469.
35. HIGGS, D.R.; WEATHERALL, D.J. The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(7):1154-62.
36. HIGGS, D.R. The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013; 3(1)a011718. doi:10.1101/cshperspect.a011718.
37. HIGGS, D.R. The molecular basis of alpha-thalassemia. *Disorders of Hemoglobin.* 2. edition. Edited by: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Cambridge University Press. 2009, p. 239-321.
38. HIGGS, D.R.; ENGEL, J.D.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. *Lancet.* 2012;379:373-83.
39. HOMIG-HOLZEL, C.; SAVOLA, S. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21(4):189-206.
40. HU, L.; SHANG, X.; YI, S.; CAI, R.; LI, Z.; LIU, C.; LIANG, Y.; CAI, D.; ZHANG, F.; XU, X. Two novel copy number variations involving the  $\alpha$ -globin gene cluster on chromosome 16 cause thalassemia in two Chinese families. *Mol Genet Genomics.* 2016;291(3):1443-50. doi: 10.1007/s00438-016-1193-0.
41. HUGHES, J.R.; CHENG, J.F.; VENTRESS, N.; PRABHAKAR, S. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 2005.
42. INDRAK, K.; GU, Y.C.; NOVOTNY, J.; HUISMAN, T.H. A new alpha-thalassaemia-2 deletion resulting in microcytosis and hypochromia and in vitro chain imbalance in the heterozygote. *Am. J. Hematol.* 1993;43(2):144-5.
43. JIANG, H.; LIU, S.; ZHANG, Y.L.; WAN, J.H.; LI, R.; LI, D.Z. Association of an  $\alpha$ -globin gene cluster duplication and heterozygous  $\beta$ -thalassaemia in a patient with a severe thalassaemia syndrome. *Hemoglobin.* 2015;39(2):102-6. doi: 10.3109/03630269.2015.1012678.
44. JORGE, S.E.; KIMURA, E.M. et al. Three new alpha-globin variants: Hb Itapira [ $\alpha$ 30(B11)Glu-->Val ( $\alpha$ 1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [ $\alpha$ 30(B11)Glu-->Ala ( $\alpha$ 1)] and Hb Boa Esperanca [ $\alpha$ 16(A14)Lys-->Thr ( $\alpha$ 2)]. *Hemoglobin.* 2007;31(2):151-7.
45. JORGE, S. E.; PETRUK, A.A.; KIMURA, E. M.; OLIVEIRA, D.M.; CAIRE, L.; SUEMASU, C.N., et al. Hb S-São Paulo: A new sickling hemoglobin with stable polymers and decreased oxygen affinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012;519(1):23-31.
46. JOSHI, D.D.; NICKERSON, H.J.; MCMANUS, M.J. Hydropsfetalis caused by homozygous  $\alpha$ - thalassaemia and RH antigen alloimmunization. *Clinical Medicine e Research.* 2004;2(4):228-32.
47. KATTAMIS, A.C.; CAMASCHELLA, C.; PIERA, S., SURREY, S.; FORTINA, P. Human  $\alpha$ -Thalassaemia syndromes: Detection of molecular defects. *American Journal of Hematology.* 1996;53(2):81-91.

48. KRAUSE, M.A.; DIAKITE S. A.; LOPERA-MESA, T.M.; AMARATUNGA C.; ARIE, T.; TRAORE, K.; DOUMBIA, S.; KONATE, D.; KEEFER, J. R.; DIAKITE, M.; FAIRHURST, R.M.  $\alpha$ -Thalassemia impairs the cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. PLoS One. 2012; 7(5) e37214. doi.org/10.1371/journal.pone.0037214
49. KULOZIK, A.E; KAR, B.C; SERJEANT, G.R; SERJEANT, B.E; WEATHERALL, D.J. The molecular basis of alpha thalassemia in India. Its interaction with the sickle cell gene., Blood. 1988;71(2):467-72.
50. KWOK, P.Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them?. Mol Med Today. 1999; 5(12):538-43.
51. LACERRA, G.; FIORETTI, G.; DE ANGIOLETTI, M.; PAGANO, L.; GUARINO, E.; DE BONIS, C.; VIOLA, A.; MAGLIONE, G.; SCARALLO, A.; DE ROSA, L. (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;78(10):2740-6.
52. LAMBERT, A.; WONG, A.Y.; KOMINAMI, Y.; SMITH, V.C.; REDDY, S.; WADSWORTH, L.D.; AU, N.H.; MACGILLIVRAY, R.T. Microdeletion of exon 3 in the HBA2 gene associated with mild  $\alpha$ -thalassemia trait., Hemoglobin. 2013;37(2):192-6.
53. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. (eds): Princípios de Bioquímica, 2<sup>a</sup>.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
54. LEVINGS, P.P.; BUNGERT, J. The human  $\beta$ -globin locus control region. European Journal of Biochemistry. 2002; 269:1589-99. doi:10.1046/j.1432-1327.2002.02797.x.
55. LEWIS, S.M.; BAIN, B.J.; BATES, I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. Porto Alegre: Artmed, 2006.
56. LISOT, C.L.A.; SILLA, L.M.R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. Cad. Saúde Pública. 2004;20(6):1595-1601.
57. LOBO, C.L.C et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am J Public Health. 2003;13:154-9.
58. LORENZI, T.F.; AMICO, E.D.; DANIEL, M.M.; SILVEIRA, P.A.; BUCCHERI, V. Manual de hematologia: propedêutica e clínica. 3<sup>rd</sup> ed. São Paulo: Medsi, 2003. p.193-288.
59. LORENZI, T.F. Atlas de hematologia: Clínica hematológica ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
60. MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. Journal of clinical pathology. 1965;18(6):790-792.
61. MELO-REIS, P.R.; NAOUM, P.C.; DINIZ-FILHO, J. A.F.; DIAS-PENNA K.G.B.; MESQUITA, M.M.; BALESTRA, F.A. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro. 2006;42(6):425-30.
62. MESQUITA, M. M. et al. Prevalência de talassemia alfa em população com microcitose e hipocromia. Estudos Goiânia. 2010;37(11/12): 881-92.
63. MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - Disponível em <http://www.mlpa.com>. acessado em 20 de julho de 2017.
64. MOOSAVI, S.; AMIRIAN, A.; ZARBAKSH, B.; KORDAFSHARI, A.; MIRZAHOSEINI, H.; ZEINALI, S.; KARIMIPOOR, M. The carrier frequency

- of  $\alpha$ -globin gene triplication in an Iranian population with normal or borderline hematological parameters. *Hemoglobin*. 2011;35:323–330.
65. MODELL, B; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 2008;86(6):480–487.
  66. MOTA, N.O.; KIMURA, E.M.; FERREIRA, R.D.; ALBUQUERQUE, D.M.; RIBEIRO, D.M.; SANTOS M.N.N.; COSTA F.F.; SONATI M.F. A novel  $\alpha^0$ -thalassemia deletion in a Brazilian child with Hb H disease [ $\alpha^0$ <sup>(Braz)</sup>]. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2017;39 (4):e106-e109.
  67. NAOUM, P.C. Diagnóstico das Hemoglobinopatias. São Paulo: Sarvier, 1987.
  68. NAOUM, P.C. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Pathol. Clin.* 1987;23:68-79.
  69. NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997.
  70. OLIVEIRA, G.L.V.; MENDIBURU, C.F.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Avaliação do perfil hematológico de portadores de talassemia alfa provenientes das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto. 2006;28(2):105-9.
  71. OLIVEIRA, M.R.A.A. Hematologia Básica: Fisiopatologia e Estudo Laboratorial. 3 ed. Ed. Luana. São Paulo, SP. 2003. p.:360.
  72. ORIGA R, MOI P. Alpha-Thalassemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*. University of Washington: Seattle (WA); 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1435/>
  73. PEDROSO, G.A.; KIMURA, E.M.; SANTOS, M.N.N.; ALBUQUERQUE, D.M.; FERRUZZI, J.L.H.; JORGE, S.E; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O.; SONATI, M.F. Coinheritance of Hb Bristol-Alesha [ $\beta$ 67(E11)Val $\rightarrow$ Met; HBB: c.202G>A] and the  $\alpha$ 212 Patchwork Allele in a Brazilian Child with Severe Congenital Hemolytic Anemia. *Hemoglobin*. 2017 May;41(3):203-208.
  74. PIMENTA, J.R.; ZUCCHERATO, L.W.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.; SOARES, R.P.; MOURA-NETO, R.S. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum. Hered.* 2006;62(4):190-5.
  75. PHYLIPSEN, M. et al, Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Blood Cells Mol. Dis.* 2010;44:146-51.
  76. POODT, J.; MARTENS, H.A.; WALSH, I.B.; FELIX-SCHOLLAART, B.; HERMANS, M.H. A newly identified deletion of 970 bp at the alpha-globin locus that removes the promoter region of the alpha1 gene., *Hemoglobin*. 2006;30(4):471-7.
  77. RIBEIRO, D.M.; SONATI, M.F. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. *Genet. Mol. Res.* 2008;7(4):1045-53.
  78. RUGLESS, M.J.; FISHER, C.A.; OLD, J.M.; SLOANE-STANLEY, J.; AYYUB, H.; HIGGS, D.R.; GARRICK, D. A large deletion in the human alpha-globin cluster caused by a replication error is associated with an unexpectedly mild phenotype., *Hum. Mol. Genet.* 2008;17(19):3084-93.
  79. SALZANO, F.M.; TONDO, C.V. Hemoglobin types in Brazilian populations. *Hemoglobin*. 1982;6:85-97.
  80. SANKARAN, V.G.; LETTRE, G.; ORKIN, S.H.; HIRSCHHORN, J.N. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010;1214:47-56. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05821.x., 2010.
  81. SCHEPS, K.G.; DE PAULA, S.M.; BITSMAN, A.R., *et al.* Coinheritance of a novel mutation on the *HBA1* gene: c.187delG (p.W62fsX66) [codon 62 (–G)

- (a1)] with the  $\alpha$ 212 patchwork allele and Hb S [b6(A3)Glu/Val, GAG>GTG; *HBB*: c.20A>T]. *Hemoglobin*. 2013;37(5):492–500.
82. SCHOUTEN, J.P et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002. 30:e57.
  83. SILVA, M.R.; SENDIN, S.M.; VIANA, M.B. Hb Etobicoke mutation in a hybrid HBA212 allele [HBA212 84 (F5) Ser>Arg;HBA212:c.255C>G]. *Ann Hematol.* 2012;91(12):1971–1974.
  84. SINGER, S.T. Variable Clinical Phenotypes of Thalassemia Syndromes. *The Scientific World Journal.* 2009;9:615-25.
  85. SONATI, M.F.; FARAH, S.B.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin.* 1991;15(4):309-11.
  86. SONATI, M.F.; COSTA, F.F. Talassemias  $\alpha$ . In: \_\_\_\_ - Tratado de Clínica Médica. Lopes AC. Ed Roca. 2006. p1.932-1.938.
  87. SONGDEJ, D.; BABBS, C.; HIGGS, D.R. An international registry of survivors with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *Blood.* 2017;129(10):1251-1259
  88. SOUZA, R.A.V.; CARLOS, A.M.; SOUZA, B.M.B.; RODRIGUES, C.V.; PEREIRA, G.A.; MORAES-SOUZA, H.  $\alpha$ -Thalassemia: Genotypic Profile Associated with Ethnicity and Hematological Differentiation of Iron Deficiency Anemia in the Region of Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Hemoglobin.* 2015;39(4): 264-269. doi: 10.3109/03630269.2015.1037890.
  89. SOUZA, R.A.V. Alfa talassemia: ocorrência, perfil molecular e hematológico e desempenho dos testes de rotina na região de Uberaba, MG. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, 2014.
  90. STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 2005;33(3):259-71.
  91. STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; WEATHERALL, D.J. Disorders of hemoglobin. Cambridge University Press, New York, 2009.
  92. 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. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:3245-76.
  93. SUEMASU, C.; KIMURA, E.; OLIVEIRA, D.; BEZERRA, M.; ARAÚJO, A.; COSTA, F.; SONATI, M. Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:16–22.
  94. TAN, S.C.A.; QUAH, T.C.; LOW, P.S.; CHONG, S.S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. *Blood.* 2001;98(1):250-1.
  95. VICHINSKY, E. Advances in the treatment of alpha-thalassemia. *Blood.* 2012;26(1):31-4.
  96. VICHINSKY, E.P. Clinical Manifestations of  $\alpha$ -Thalassemia. Cold Spring Harbor Laboratory. *Perspect Med.* 2013;3(5):1-10.
  97. VOON, H.P.J.; VADOLAS, J. Controlling  $\alpha$ -globin: a review of  $\alpha$ -globin expression and its impact on  $\beta$ -thalassemia. *Haematologica.* 2008;93:1868-76.
  98. WAGNER, S.C; DE CASTRO S.M.; GONZALEZ, T.P.; SANTIN, A.P.; FILIPPON, L.; ZALESKI, C.F.; AZEVEDO, L.A.; AMORIN, B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; HUTZ, M.H. Prevalence of common  $\alpha$ -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genetics and Molecular Biology.* 2010;33:641-5.

99. WAYE, J. S.; ENG, B. Diagnostic testing for  $\alpha$ -globin gene disorders in a heterogeneous North American population. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013;35:306–13.
100. WANG, X.Y.; LIN, M.X.; LIN, M. A novel 6.3 kb deletion and the Rare 27.6 kb Deletion Causing  $\alpha(+)$ -Thalassemia in two Chinese Patients., *Hemoglobin*. 2016;40(5):365-8.
101. WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A.B. Red cell I: inherited anaemias. *Lancet*. 2000;355:1169-75.
102. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. *The Thalassemia Syndromes*. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science, 2001.
103. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organ*. 2001;79(8):704-12.
104. WEATHERALL, D.J. Disorders of globin synthesis: The thalassemiias. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, V.; KAVSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. (Ed.). *Williams Hematology*, 7.ed. McGraw-Hill Medical, New York. 2006. p.633-666.
105. WEATHERALL, D. J. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*. 2008;7(8):592-9.
106. WEATHERALL, D. J. Thalassemia: the long road from the bedside through the laboratory to the community. *Nature medicine*. 2010;16(10):1112-15.
107. WEI, X.F.; SHANG, X.; HE, D.Q.; HUANG, J.W.; ZHANG, X.H.; XU, X.M. Molecular characterization of a novel 27.6-kb deletion causing  $\alpha(+)$  thalassemia in a Chinese family., *Ann. Hematol*. 2011;90(1):17-22.
108. WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O.; GERVÁSIO, S.; de JORGE, S.B. et al. alpha-globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2000;33(9):1041-5.
109. WENNING, M.R.; HARTEVELD, C.L.; GIORDANO, P.C.; KIMURA, E.M.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. Hemoglobin H disease resulting from the association of the  $-\alpha 3.7$  rightward deletion and the (alpha alpha) MM deletion in a Brazilian patient. *Eur J Haematol*. 2002; 69(3): 179-81.
110. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/OMS) Disponível em <http://www.who.int/en/>, acessado em 20 de julho de 2017.
111. YU, J.; XIE, J.; LUO, L.; LI, Z. An Alu element-mediated 28.5 kb  $\alpha$ -thalassemia deletion found in a Chinese family., *Hemoglobin*. 2014;38(6):427-30.
112. ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G.; BOTTURA, C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum. Hered*. 1983;33:125-9.
113. ZAGO, M.A.; SILVA JUNIOR, W.A.; FRANCO, R.F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. *Ciênc. cult*. 1999;51(3/4):226-34.
114. ZHAO, J.B.; ZHAO, L.; FEI, Y.J.; LIU, J.C.; HUISMAN, T.H. A novel alpha-thalassemia-2 (-2.7-kb) observed in a Chinese patient with Hb H disease., *American journal of hematology*. 1991;38(3):248-9.

## 10. Anexos

**ANEXO A**  
**Parecer do CEP - 1836**

3/3

  
**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP**  
**Parecer Consubstanciado**  
**PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS**

**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA EM RECÉM-NASCIDOS SADIOS, DOADORES DE SANGUE INAPTOS POR ANEMIA E CRIANÇAS COM ANEMIA A ESCLARECER  
**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** HELIO MORAES DE SOUZA  
**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM  
**DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM:** 14/12/2010  
**PROTOCOLO CEP/UFTM:** 1836

|                   |  |   |            |                     |
|-------------------|--|---|------------|---------------------|
| <b>Ponteiras</b>  | Ponteira tipo universal (pacote 1000 UI) 0-200uL                     | 1 | R\$ 7,15   | R\$ 7,15            |
|                   | Ponteira tipo universal (pacote 1000 UI) 200-1000uL                  | 1 | R\$ 15,65  | R\$ 15,65           |
| <b>Tubos seco</b> | Tubo 12x56mm tampa pressão interna não graduado 3mL (pacote 1000 UI) | 2 | R\$ 150,25 | R\$ 300,50          |
| <b>Total</b>      |  |   |            | <b>R\$ 2.833,30</b> |

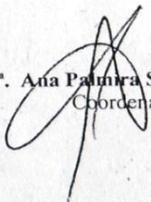
O custeio dos materiais de consumo será requerido a um órgão de fomento.

**12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR**  
O pesquisador não terá remuneração além da referente ao cargo de Professor Titular da UFTM.

**13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO**  
O consentimento livre e esclarecido será oferecido de forma escrita, a todos os sujeitos com suspeita diagnóstica de talassemia que queiram participar da pesquisa. A aluna será responsável pela obtenção do termo de consentimento livre esclarecido dos pacientes e, quando forem menores de 18 anos, o mesmo será obtido do responsável legal. O termo de consentimento livre esclarecido deverá constar de linguagem simples e acessível aos pacientes estudados, além de ser fundamental a prestação de esclarecimento por parte da aluna ao paciente ou responsável, a respeito do estudo.

**14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.**

**15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES**  
**PARECER DO CEP: APROVADO**  
 (O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).  
**DATA DA REUNIÃO: 01/04/2011**

  
**Prof. Ana Palmira Soares dos Santos**  
 Coordenadora

**ANEXO B**  
**Parecer do CEP - 2678**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar – Bairro Nossa Senhora da Abadia  
38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854  
E-mail: [cep@pesqpg.uftm.edu.br](mailto:cep@pesqpg.uftm.edu.br)

**IDENTIFICAÇÃO**

TÍTULO DO PROJETO: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO LOCI ALFA GLOBÍNICO DE DOADORES DE SANGUE COM MICROCITOSE E HIPOCROMIA SEM ANEMIA  
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: HÉLIO MORAES DE SOUZA  
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM  
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 17/5/2013  
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2678

**PARECER**

De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 24 de setembro de 2013.

Prof.<sup>a</sup> Ana Falmira Soares dos Santos  
Coordenadora do CEP/UFTM

ANEXO C  
Parecer do CEP - 304



COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2012

OFÍCIO: 01/2012

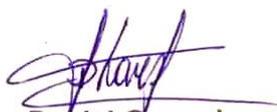
Registro CEP/HEMOMINAS: 304

Projeto de Pesquisa: Perfil Molecular da talassemia alfa em recém-nascidos e pacientes pediátricos atendidos pelo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba.

Prezado Senhor Pesquisador, Hélio Moraes

O pedido de adendo sobre armazenamento de amostras de DNA para pesquisas futuras relacionadas ao projeto de pesquisa acima identificado foi **aprovado** pelo CEP Hemominas, por não representar mudanças significativas na metodologia identificada no estudo.

Atenciosamente,



Daniel Gonçalves Chaves  
Coordenador do CEP Hemominas

## ANEXO D

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação Hemominas



Serviço de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARTICIPANTES DO GRUPO 1  
(Doadores de sangue)**

Título do Projeto:

**Prevalência e análise do perfil molecular da talassemia alfa em recém-nascidos saudáveis e pacientes com anemia a esclarecer, atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue inaptos por anemia do Hemocentro Regional de Uberaba.**

Você é portador de anemia e como já foi orientado pelo profissional que te atendeu aqui do Hemocentro, você será encaminhado ao clínico hematologista do Pronto Atendimento do Hemocentro Regional de Uberaba, para atendimento médico e realização de exames laboratoriais que esclareçam a causa de sua anemia.

Existem vários tipos de anemia cujas causas principais são por falta de nutrientes alimentares como o ferro ou de origem genética hereditária. Este último é causado por mutações (mudanças) na formação dos nossos genes e que são passadas durante a formação do feto pelos genes dos pais, como é o caso da anemia falciforme e a talassemia. Considerando que a talassemia alfa é um dos mais prevalentes tipos em nosso meio, mas que ainda tem o diagnóstico controverso, requerendo padronização de técnicas e utilização de exames mais sensíveis para sua confirmação que não são disponíveis na rotina, nós estamos convidando você a participar desta pesquisa.

Trata-se de um estudo com título “Prevalência e análise do perfil molecular da talassemia alfa em recém-nascidos saudáveis e pacientes pediátricos com anemia a esclarecer, atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue inaptos por anemia do Hemocentro Regional de Uberaba”.

O seu objetivo é determinar a prevalência da talassemia alfa e identificar os tipos de mutações mais comuns em pacientes e doadores de sangue atendidos pelo HRU e Ambulatório de Hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, tendo como justificativa, a importância de gerar dados regionais sobre o perfil hematológico e molecular da talassemia alfa na região, os quais poderão servir de auxílio no diagnóstico clínico dessa alteração.

Portanto nesta pesquisa, faremos exames que podem confirmar com certeza a presença desse tipo de anemia. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Caso você concorde em participar, nós aproveitaremos a amostra de sangue que você for colher para a realização dos exames de identificação da causa de sua anemia, não sendo necessário colher mais sangue. Além disso, você só terá que responder a algumas perguntas para preenchimento de uma ficha de identificação com seus dados pessoais (endereço, telefone, data de nascimento, cidade onde nasceu, origem racial) antecedentes de transfusão sanguínea, medicamentos usados, história de anemia na família e com espaço para colocar posteriormente os resultados dos exames laboratoriais que você realizará.

No que se refere à coleta do sangue necessário para o exame mencionado acima, esta será realizada pelo mesmo profissional que colherá seu sangue para a realização dos exames que serão solicitados pelo médico hematologista, aproveitando assim essa amostra para a realização dos exames laboratoriais dessa pesquisa. Durante esse processo de coleta não será acrescentado nenhum risco a você além daqueles que já fazem parte de uma coleta de sangue, como a formação de pequenos hematomas (manchas arroxeadas levemente doloridas no local da coleta) no caso de dificuldades encontradas em veias mais finas e sensíveis. Entretanto, isso não deverá preocupá-lo caso venha ocorrer, pois estes desaparecem dentro de poucos dias. Quanto ao preenchimento da ficha de identificação, pode-se afirmar que esse não trará a você também nenhum risco, pois não possui perguntas que possam constranger ou ferir sua integridade. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número. Quanto aos resultados dos exames realizados, quando apresentarem positividade para talassemia alfa, estes serão repassados para você pelo médico hematologista que lhe atenderá durante sua consulta de retorno.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto:

**Prevalência e análise do perfil molecular da talassemia alfa em recém-nascidos saudáveis e pacientes com anemia à esclarecer, atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue inaptos por anemia do Hemocentro Regional de Uberaba.**

Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

**Banco de amostras:** caso você autorize, o material genético (DNA) recolhido para este estudo poderá ser usado por pesquisadores da Fundação Hemominas e da UFTM em estudos com os mesmos objetivos: investigar mutações genéticas da talassemia alfa. Neste caso, a sua amostra será conservada sem prazo para descarte. Entretanto, o uso futuro deste material nunca será ligado a nenhum dado pessoal do participante. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros, e ainda participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da sua amostra, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação. Portanto, marque com um x no quadrado abaixo sua decisão.

- Aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.
- Não aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Uberaba, ...../...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Documento de Identidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura pesquisador orientador

**Telefone de contato dos pesquisadores:** (34) 3318-5560; (34) 3318-5510.

## ANEXO E



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Serviço de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação Hemominas

**MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARTICIPANTES DO GRUPO 2 (Pacientes do Ambulatório de Hematologia)**

Título do Projeto:

**Prevalência e análise do perfil molecular da talassemia alfa em recém-nascidos sadios e pacientes com anemia à esclarecer, atendidos pelo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue inaptos por anemia do Hemocentro Regional de Uberaba.**

Você é portador de anemia e como você já foi orientado pelo clínico hematologista do pronto atendimento do Hospital de Clínicas de Uberaba, deverá realizar exames laboratoriais que esclareçam a causa dessa anemia.

Existem vários tipos de anemia cujas causas principais são por falta de nutrientes alimentares como o ferro ou de origem genética hereditária. Este último é causado por mutações (mudanças) na formação dos nossos genes e que são passadas durante a formação do feto pelos genes dos pais, como é o caso da anemia falciforme e a talassemia. Considerando que a talassemia alfa é um dos mais prevalentes tipos em nosso meio, mas que ainda tem o diagnóstico controverso, requerendo padronização de técnicas e utilização de exames mais sensíveis para sua confirmação que não são disponíveis na rotina, nós estamos convidando você a participar desta pesquisa.

Trata-se de um estudo com título “Prevalência e análise do perfil molecular da talassemia alfa em recém-nascidos sadios e pacientes pediátricos com anemia à esclarecer, atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue inaptos por anemia do Hemocentro Regional de Uberaba”.

O seu objetivo é determinar a prevalência da talassemia alfa e identificar os tipos de mutações mais comuns em pacientes e doadores de sangue atendidos pelo Ambulatório de Hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, tendo como justificativa, a importância de gerar dados regionais sobre o perfil hematológico e molecular da talassemia alfa na região, os quais poderão servir de auxílio no diagnóstico clínico dessa alteração.

Portanto nesta pesquisa, faremos exames laboratoriais que pode confirmar com certeza a presença desse tipo de anemia. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação é importante. Caso você concorde participar, nós utilizaremos a mesma amostra de sangue colhida para realizar os exames para a identificação da causa de sua anemia. Ademais, você terá que responder algumas perguntas para preenchimento de uma ficha de identificação com os seus dados pessoais (endereço, telefone, data de nascimento, cidade onde nasceu, origem racial), antecedentes de transfusão sanguínea, medicamentos usados, história de anemia na família e com espaço para colocar posteriormente os resultados dos exames laboratoriais realizados.

No que se refere à coleta do sangue necessário para a pesquisa, esta será feita pelo mesmo profissional que colherá o sangue para a realização dos exames que serão solicitados pelo médico hematologista. Durante este processo não será acrescentado nenhum risco à você além daqueles que já fazem parte de uma coleta de sangue, como a formação de pequenos hematomas (manchas arroxeadas levemente doloridas no local da coleta) que ocorrem no caso de dificuldades durante a punção de veias mais finas e sensíveis. Entretanto, isso não deverá preocupá-lo caso venha ocorrer, pois estes desaparecem dentro de poucos dias. Quanto ao preenchimento da ficha de identificação, pode-se afirmar que esse também não trará a você nenhum risco, pois não possui perguntas que possam constranger ou ferir sua integridade. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número. Quanto aos resultados dos exames realizados, quando apresentarem positividade para talassemia alfa, este será repassado para você pelo médico hematologista que lhe atenderá durante sua consulta de retorno.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto:

**Prevalência e análise do perfil molecular da talassemia alfa em recém-nascidos sadios e pacientes com anemia à esclarecer, atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e doadores de sangue inaptos por anemia do Hemocentro Regional de Uberaba.**

Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento será realizado. A explicação que recebi esclarece os benefícios do estudo. Eu entendi que eu sou livre para interromper a minha participação na pesquisa a qualquer momento, sem justificar a decisão tomada e que isso não afetará o meu tratamento. Sei que o meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

**Banco de amostras:** caso você autorize, o material genético (DNA) recolhido para este estudo poderá ser usado por pesquisadores da Fundação Hemominas e da UFTM em estudos com os mesmos objetivos: investigar mutações genéticas da talassemia alfa. Neste caso, a sua amostra será conservada sem prazo para descarte. Entretanto, o uso futuro deste material nunca será ligado a nenhum dado pessoal do participante. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros, e ainda participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da sua amostra, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação. Portanto, marque com um x no quadrado abaixo sua decisão.

Aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Não aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Uberaba, ...../...../.....

---

Assinatura do voluntário

---

Documento de Identidade

---

Assinatura do pesquisador responsável

---

Assinatura do pesquisador orientador

**Telefone de contato dos pesquisadores:** (34) 3318-5560; (34) 3318-5510.

## ANEXO F

## Sondas presentes no kit SALSA MLPA probemix P140-C1 HBA

| Length (nt) | SALSA MLPA probe  | Chromosomal position <sup>(a)</sup> |                                    |
|-------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|
|             |   | reference                           | HBA cluster                        |
| 64-70-76-82 | Q-fragments (Only visible with <100 ng sample DNA)                              |                                     |                                    |
| 88-92-96    | D-fragments (Low signal of 88 or 96 fragment indicates incomplete denaturation) |                                     |                                    |
| 100         | X-fragment (X chromosome specific)  |                                     |                                    |
| 105         | Y-fragment (Y chromosome specific)  |                                     |                                    |
| 130         | Reference probe 00797-L13645 ¥  | 5q31                                |                                    |
| 136 § Ж     | <b>HBA2 probe</b> S0585-SP0043-L09493 ¥   |                                     | <b>Hb Constant Spring mutation</b> |
| 141         | Reference probe 07641-L07326 *  | 8p23                                |                                    |
| 147         | <b>HBA region probe</b> 18098-L22522 *  |                                     | 0.9 kb before HBA2                 |
| 154         | <b>HBA region probe</b> 08499-L23594 ¥  |                                     | 0.1 kb after HBA1                  |
| 160         | <b>HBA2 probe</b> 08498-L08422  |                                     | HBA2 intron 2                      |
| 165         | <b>HBA1 probe</b> 08498-L21607 *  |                                     | HBA1 intron 2                      |
| 172 »       | <b>HBA1 &amp; HBA2 probe</b> 15857-L21812 *                                     |                                     | <b>HBA1 + HBA2 exon 3</b>          |
| 178         | <b>HS-40 probe</b> 04799-L04797   |                                     | <b>HS-40</b>                       |
| 184         | <b>HBA region probe</b> 04637-L04018  |                                     | Between HBAP2 & HBAP1              |
| 190         | <b>HBA region probe</b> 18096-L22520 ¥  |                                     | 2.5 kb before HBA1                 |
| 196         | Reference probe 05846-L11214 *  | 10q26                               |                                    |
| 202         | <b>HBA region probe</b> 18880-L24428 *  |                                     | 2.0 kb before HBA1                 |
| 208         | Reference probe 11331-L12056 *  | 12p13                               |                                    |
| 214 »       | <b>HBA1 &amp; HBA2 probe</b> 18881-L06288 ¥                                     |                                     | <b>HBA1 + HBA2 exon 1</b>          |
| 220 »       | <b>HBA1 &amp; HBA2 probe</b> 18099-L22524 *                                     |                                     | <b>HBA1 + HBA2 exon 1</b>          |
| 226         | <b>HBA region probe</b> 18093-L22517 *  |                                     | 0.6 kb before HBA1                 |
| 238         | Reference probe 11435-L12163 *  | 1q41                                |                                    |
| 244         | <b>HBA2 probe</b> 04633-L23748 ¥  |                                     | HBA2 intron 2                      |
| 250         | <b>HBA1 probe</b> 04633-L23600 *  |                                     | HBA1 intron 2                      |
| 256         | <b>HBA region probe</b> 08494-L08417  |                                     | 1.5 kb before HBA1                 |
| 262 ⇐       | <b>DEC2 probe</b> 17613-L23601 *  |                                     | Centromeric of HBA region          |
| 269         | Reference probe 03075-L19996 ¥  | 5p15                                |                                    |
| 277 ⇐       | <b>LUC7L probe</b> 15859-L21960 *   |                                     | Centromeric of HBA region          |
| 283         | <b>HBA region probe</b> 04638-L23602 ¥  |                                     | 0.4 kb after HBA1                  |
| 292         | <b>HBA region probe</b> 04624-L04004  |                                     | Between HBZ & HBZP1                |
| 300         | Reference probe 03250-L02687 *  | 13q14                               |                                    |
| 310         | <b>HBA region probe</b> 04639-L04020  |                                     | 2.3 kb after HBA1                  |
| 328         | <b>HBA region probe</b> 18092-L22516 ¥  |                                     | 0.6 kb before HBA2                 |
| 337         | <b>HBA region probe</b> 14855-L23604 *  |                                     | 0.9 kb before HBA1                 |
| 346         | <b>HBA region probe</b> 04622-L04001  |                                     | 3.5 kb before HBZ                  |
| 355         | Reference probe 00547-L00116  | 11q22                               |                                    |
| 364         | <b>HBA region probe</b> 04926-L23886 ¥  |                                     | 9.2 kb before HBZ                  |
| 373         | <b>HBA region probe</b> 18090-L08415 ¥  |                                     | 2.5 kb before HBA2                 |
| 382         | <b>HS-40 probe</b> 04800-L04175   |                                     | <b>HS-40</b>                       |
| 391         | <b>HBA region probe</b> 18097-L22521 *  |                                     | 3.0 kb before HBA2                 |
| 400         | <b>HBQ1 probe</b> 19233-L25313 *  |                                     | HBQ1 exon 3                        |
| 409         | Reference probe 03272-L02709  | 3q29                                |                                    |
| 418 ⇐       | <b>AXIN1 probe</b> 17212-L13393 *   |                                     | Centromeric of HBA region          |
| 436 Ж       | <b>HBA region probe</b> 17214-SP0457-L20489 *                                   |                                     | 0.2 kb before HBZ                  |
| 445 ⇐       | <b>ITFG3 probe</b> 17227-L20554 *   |                                     | Centromeric of HBA region          |
| 454         | Reference probe 07607-L07292 *  | 15q26                               |                                    |
| 463 ⇐       | <b>POLR3K probe</b> 19236-L25316 *  |                                     | Telomeric of HBA region            |
| 472 ⇐       | <b>RGS11 probe</b> 18102-L20488 *   |                                     | Centromeric of HBA region          |
| 481         | Reference probe 15318-L17117 *  | 2q33                                |                                    |

(a) A numeração dos exons usado nesta descrição do produto P140-C1 HBA e na análise Coffalyser.Net é a numeração da sequência de referência do Genbank NG\_000006.1.

Para a explicação dos símbolos ver tabela abaixo.

## ANEXO G

## Sondas da região HBA arranjadas de acordo com a localização cromossômica

| Length (nt) | SALSA MLPA probe    | Gene / Exon <sup>(a)</sup>             | Ligation site <sup>(b)</sup> | Partial sequence <sup>(c)</sup> (24 nt adjacent to ligation site) | Distance to next probe |
|-------------|---------------------|--|------------------------------|---|------------------------|
|             |                     |  |                              | From p-telomere to POLR3K probe                                   | 37.2 kb                |
| 463 ↵       | 19236-L25316        | POLR3K gene                            |                              | ATATGCTCTGTG-TAAAGTCTTATT   | 66.4 kb                |
|             |                     |  | <b>AY327548.1</b>            |   |                        |
| 178         | 04799-L04797        | HS-40                                  | 61-62                        | CTGCCCAAGCCA-AGGGTGGAGGCA   | 0.2 kb                 |
| 382         | 04800-L04175        | HS-40                                  | 220-221                      | GGTACTGCTGAT-TACAACCTCTGG   | 30.0 kb                |
|             |                     |  | <b>NG_000006.1</b>           |   |                        |
| 364         | 04926-L23886        | 9.2 kb before HBZ                      | 4528-4529                    | GGCTGGGGCTCA-AACCAAGGCCA  | 5.7 kb                 |
| 346         | 04622-L04001        | 3.5 kb before HBZ                      | 10229-10230                  | CGCAGTCTAGA-AGGGAGTTCCTG  | 3.3 kb                 |
| 436 Ж       | 17214-SP0457-L20489 | 0.2 kb before HBZ                      | 13499-13498 & 13536-13535 R  | TTCCTCTCTGT-37 nt spanning oligo-AGTCTAGGAGAG                     | 6.9 kb                 |
| 292 ~       | 04624-L04004        | Between HBZ & HBZP1                    | 20361-20362                  | GTGGAGTAGGCT-TTGTGGGGA  | 7.8 kb                 |
| 184         | 04637-L04018        | Between HBAP2 & HBAP1                  | 28168-28169                  | AGTGGCCACAAT-TTGGCAGACAGA   | 2.5 kb                 |
|             |                     |  |                              |   |                        |
| 391 +       | 18097-L22521        | 3.0 kb before HBA2                     | 30717-30716 R                | AGGAAGGGTGA-GAATGAGAGAAA  | 0.5 kb                 |
| 373 +       | 18090-L08415        | 2.5 kb before HBA2                     | 31233-31232 R                | ATGTCCAGAAGA-AAAGCGGTGACA   | 1.6 kb                 |
| 147         | 18098-L22522        | 0.9 kb before HBA2                     | 32850-32849 R                | GATAAACAACT-TGGCTCTGGGTA  | 0.2 kb                 |
| 328 +       | 18092-L22516        | 0.6 kb before HBA2                     | 33103-33102 R                | CCGGAAGGAAC-AAACACCAGGAC  | 0.6 kb                 |
| 220 »       | 18099-L22524        | HBA1 + HBA2 exon 1                     | 33733-33732 R                | AAGAGTGCCGGG-CGCGAGCGCGC  | 0.1 kb                 |
| 214 »       | 18881-L06288        | HBA1 + HBA2 exon 1                     | 33824-33823 R                | CGCGCCGACCTT-ACCCAGGCGGC  | 0.4 kb                 |
| 160 +       | 08498-L08422        | HBA2 intron 2                          | 34247-34248                  | GCGCCTTCTCT-CAGGGCAGAGGA  | 0.1 kb                 |
| 244 +       | 04633-L23748        | HBA2 intron 2                          | 34311-34312                  | GGCCTGGGCC-CACTGACCCTCT   | 0.1 kb                 |
| 172 »       | 15857-L21812        | HBA1 + HBA2 exon 3                     | 34385-34384 R                | GCAGGGGTGAAC-TCGGCGGGGAGG   | 0.1 kb                 |
| 136 § Ж     | S0585-SP0043-L09493 | Hb Constant Spring mutation            | 34461-34462 & 34489-34490    | CCAAATACGTC-28 nt spanning oligo-TGCCCGCTGGGC                     | 0.5 kb                 |
|             |                     |  |                              |   |                        |
| 190 +       | 18096-L22520        | 2.5 kb before HBA1 (0.4 kb after HBA2) | 34974-34975                  | TTCTCTCATTCC-CACCCCTTCTG  | 0.5 kb                 |
| 202 +       | 18880-L24428        | 2.0 kb before HBA1                     | 35489-35490                  | GTCAGTCTTTC-CTTCTGGACATG  | 0.6 kb                 |
| 256         | 08494-L08417        | 1.5 kb before HBA1                     | 36050-36051                  | TTCTCTGCCAA-GGCAGCTTACCC  | 0.6 kb                 |
| 337         | 14855-L23604        | 0.9 kb before HBA1                     | 36629-36628 R                | CTGGAGCATTCA-ACCTCTCTGGG  | 0.3 kb                 |
| 226 +       | 18093-L22517        | 0.6 kb before HBA1                     | 36907-36908                  | TCTGGTGTITA-TTCCTTCCCGGT  | 0.6 kb                 |
| 220 »       | 18099-L22524        | HBA1 + HBA2 exon 1                     | 37537-37536 R                | AAGAGTGCCGGG-CGCGAGCGCGC  | 0.1 kb                 |
| 214 »       | 18881-L06288        | HBA1 + HBA2 exon 1                     | 37628-37627 R                | CGCGCCGACCTT-ACCCAGGCGGC  | 0.4 kb                 |
| 165 +       | 08498-L21607        | HBA1 intron 2                          | 38051-38052                  | GCGCCTTCTCG-CAGGGCAGAGGA  | 0.1 kb                 |
| 250 +       | 04633-L23600        | HBA1 intron 2                          | 38122-38123                  | GGCCTCGGCC-CACTGACCCTCT   | 0.1 kb                 |
| 172 »       | 15857-L21812        | HBA1 + HBA2 exon 3                     | 38196-38195 R                | GCAGGGGTGAAC-TCGGCGGGGAGG   | 0.3 kb                 |
|             |                     |  |                              |   |                        |
| 154         | 08499-L23594        | 0.1 kb after HBA1                      | 38459-38460                  | TGGGACACACAT-GGCTAGAACCTC   | 0.3 kb                 |
| 283         | 04638-L23602        | 0.4 kb after HBA1                      | 38785-38786                  | AAGTCCCACTCC-AGCATGGCTGCA   | 1.9 kb                 |
| 310         | 04639-L04020        | 2.3 kb after HBA1                      | 40637-40638                  | GTTCACTGCCCT-GAAGAAACCTT  | 1.4 kb                 |
| 400         | 19233-L25313        | HBQ1 exon 3                            | 42066-42067                  | TGCTCTCTCGAG-GTCAGGACGCGA   | 25.1 kb                |
| 277 ↵       | 15859-L21960        | LUC7L gene                             |                              | ATGTTCCAATGA-AACCAGTGGCAC   | 33.5 kb                |
| 445 ↵       | 17227-L20554        | ITFG3 gene                             |                              | GCTGTGATACTT-TTGCCTTTGTCA   | 31.9 kb                |
| 472 ↵       | 18102-L20488        | RGS11 gene                             |                              | GAACCTGAGGTT-CCGTGGAATATT   | 16.3 kb                |
| 418 ↵       | 17212-L13393        | AXIN1 gene                             |                              | GATCATCGCAA-AGTGGAGAAGGT  | 119.4 kb               |
| 262 ↵       | 17613-L23601        | DECR2 gene                             |                              | CAGAATCGACAT-TCTATTA  | ACTG                   |

(a) A numeração dos exons usado nesta descrição do produto P140-C1 HBA e na análise Coffalyser.Net é a numeração da sequência de referência do Genbank NG\_000006.1.

(b) Os locais de ligação das sondas MLPA de P140 HBA são indicadas de acordo com a sequência Refseq NG\_000006.1.

(c) Somente as sequências parciais das sondas são mostradas. As sequências completas das sondas estão disponíveis em [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com). Por favor, notifique-nos de quaisquer erros: [info@mlpa.com](mailto:info@mlpa.com).

Os dois blocos de sequência entre as linhas cinza são quase idênticos.

\* Novo na versão C1 (do lote C1-0114 em diante).

¥ Alterado na versão C1 (do lote C1-0114 em diante). Pequena mudança de comprimento, nenhuma alteração na sequência detectada.

§ Sonda específica de mutação. Esta sonda só gerará um sinal quando a mutação Hb Constant Spring (HBA2:c.427T>C, p.\*143Glnext\* 31) estiver presente.