



MLPA TESTES MOLECULARES

GENÉTICA MOLECULAR

A Genética Humana do Hermes Pardini é um dos mais atualizados e completos centros de estudos de genética do país, realizando testes de diagnóstico molecular com eficiência operacional e excelência.



**HERMES
PARDINI**

MLPA

Genética Humana



CONFIABILIDADE

O recente avanço científico e tecnológico direcionado à genética do Hermes Pardini promoveu excepcional desenvolvimento no diagnóstico laboratorial de doenças de natureza hereditária e adquirida. As técnicas moleculares realizadas oferecem simplicidade, rapidez e confiabilidade na detecção de doenças e diagnósticos preventivos.



AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O conhecimento a respeito da predisposição genética a alterações e patologias diversas oferece ao médico alternativas diagnósticas para tratamento e prevenção. Buscando a prestação de serviços com qualidade, o Hermes Pardini proporciona apoio ao diagnóstico através da gama de testes que auxiliam na decisão clínica.



MENU DE EXAMES

O departamento de Genética Molecular oferece um amplo menu com, aproximadamente, 250 exames na área de genética molecular. Isso permite atender e superar as expectativas de nossos clientes no auxílio ao diagnóstico de desordens genéticas para melhoria de qualidade de vida dos indivíduos.



QUALIDADE

A busca pela melhoria contínua é sem dúvida a receita do sucesso para a qualidade de nossos serviços.

Participamos de programas para garantia da qualidade:

Programa de controle da qualidade interno, que apresenta rígidos critérios de liberação e dupla conferência obrigatória.

Programa de controle da qualidade externo, que inclui:

Teste de proficiência CAP: *Surveys & Anatomic Pathology Education Programs do College of American Pathologists*, realizado semestralmente.

Avaliação Externa Alternativa: Reanálise de amostra, Controle Interlaboratorial e Comparação de amostras realizadas semestralmente.



TECNOLOGIA E EFICIÊNCIA

A Genética Molecular possui em suas instalações, os mais modernos equipamentos e metodologias para o diagnóstico molecular: Sequenciadores automáticos, PCR Real Time e termocicladores de última geração. Isso permite a análise simultânea e eficiente de maior número de amostras, reduzindo o prazo de liberação de resultados.



PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

As metodologias empregadas para a realização dos exames genéticos são desenvolvidas por uma equipe altamente capacitada, formada por especialistas para desenvolvimento e pesquisa constantes de novos testes.



ASSESSORIA CIENTÍFICA

O Hermes Pardini conta com um corpo de profissionais altamente qualificados, incluindo médico Geneticista para assessoria técnica e científica, esclarecimento de dúvidas sobre os testes disponíveis e discussão de casos clínicos, resultados e indicações de exames laboratoriais.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR MLPA

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

A MLPA é uma técnica de biologia molecular, descrita em 2002 por Schouten et al., que permite identificar deleções e duplicações de regiões genômicas por meio de PCR (polymerase chain reaction) multiplex semi-quantitativo. Uma única reação é capaz de analisar cerca de 45 regiões genômicas.

QUAIS AS VANTAGENS DA MLPA?

- **Praticidade**
Essa técnica pode ser aplicada para detecção de deleção/duplicação em genes de diferentes doenças genéticas.
- **Eficiência**
MLPA é multiplex. Uma reação fornece informação para mais de 45 sequências alvo, simultaneamente.
- **Sensibilidade do teste**
Identifica o número de cópias dos genes analisados, que é de extrema relevância para o aconselhamento genético.

Atrofia Muscular Espinhal - SMA

É uma doença neuromuscular, autossômica recessiva e caracterizada por fraqueza muscular progressiva, devido à degeneração das células do corno anterior da medula espinhal e do tronco cerebral. Nos casos mais graves, o início dos sintomas ocorre antes dos 6 meses de vida e, habitualmente, evoluem para óbito.

Frequência	Tratamento	Diagnóstico
É considerada a segunda desordem autossômica recessiva fatal mais frequente, depois de fibrose cística, com 4 a 10 afetados em cada 100.000 nascidos vivos e cerca de 1.500 portadores em cada 100.000 nascidos vivos.	Apesar de não ter cura definitiva, existem tratamentos para as manifestações da doença e o diagnóstico precoce é importante para o acompanhamento e uma melhor eficiência da terapia de suporte.	Baseado na análise molecular dos genes SMN1 e SMN2 (se distinguem por um único nucleotídeo nos exons 7 e 8). A eletroneuromiografia e a biopsia de músculo ainda são utilizadas quando o teste genético para SMN1 não está disponível ou apresentou resultado normal e a suspeita diagnóstica permanece.

Há 02 eventos genéticos que podem culminar nas manifestações clínicas de SMA

Deleção Os testes genéticos que quantificam o número de cópias íntegras de SMN1 são recomendadas para a detecção de pacientes com SMA.

Conversão Os testes genéticos que quantificam o número de cópias íntegras de SMN2 são importantes para os indivíduos afetados por SMA, pois quanto maior o nº de cópias de SMN2, menor a gravidade dos sintomas.



Alfa-Talassemia

Condição hereditária em que ocorre deficiência ou ausência da síntese de alfa-globina, levando à hemácias hipocrômicas e microcíticas.

As diferentes manifestações clínicas de α -talassemia estão relacionados à mutações (inativação) de um, dois, três ou dos quatro genes alfa, que leva a redução parcial ou total da síntese de cadeias α :

Talassemia α^+ heterozigota: representada por $-\alpha/\alpha\alpha$, com deleção de um gene alfa. Também denominado de portador silencioso (assintomático).

Talassemia α^+ homozigota, representada por $-\alpha/-\alpha$ e a *Talassemia α^0 heterozigota*, representada por $--/\alpha\alpha$. Em geral, os pacientes são assintomáticos.

Talassemia α^+ / α^0 : representada por $--/-\alpha$, resulta na doença da hemoglobina H, caracterizada por anemia hemolítica, esplenomegalia e quantidade variável de Hb H.

Talassemia α^0 homozigota: representada por $--/--$, deleção dos 4 genes α , constituindo o fenótipo mais grave da doença. O feto apresenta hidropsia não-imune, anemia, insuficiência cardíaca e hepatoesplenomegalia. Geralmente, ocasiona óbito fetal ou no período neonatal.

Frequência

1 a 5 afetados em cada 10.000 nascidos vivos.

Tratamento

Ainda não existe cura. No entanto são utilizados alguns procedimentos com o intuito de amenizar as consequências derivadas do defeito. Entre os tratamentos utilizados estão: transfusão sanguínea, utilização de drogas quelantes de ferro, antibióticos e nos últimos casos o transplante de medula.

Diagnóstico

Basea-se na contagem de células vermelhas, eletroforese de Hemoglobina (% de hemoglobinas A2 e Fetal) e os índices hematológicos VCM e HCM e CHCM. O teste molecular é recomendado para portadores silenciosos da α -talassemia ou do traço α -talassêmico e para casos onde há presença de hemoglobinas ou proteínas com perfis de eletroforese ou do HPLC não conhecidos ou com baixa resolução, visto que a correta identificação das variantes de hemoglobina é essencial para o aconselhamento genético e/ou escolha da terapia.



Pela complexidade genética da SMA e da ALFA-TALASSEMIA, o diagnóstico molecular destas duas patologias teve grande avanço nos últimos anos devido ao desenvolvimento da técnica de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

Quantificar o número de cópias de SMN1

A quantificação de SMN1 possibilita a identificação de indivíduos afetados por SMA (deleção em homozigose do gene SMN1) e de indivíduos portadores de SMA (apenas uma cópia ativa de SMN1) que, embora assintomáticos, necessitam desse diagnóstico para o aconselhamento genético. Esta é uma grande vantagem da MLPA, pois a informação de heterozigose é de extrema relevância para o aconselhamento genético e para o estudo de risco de recorrência de SMA na família; principalmente, diante da frequência de indivíduos afetados (4 a 10 afetados em cada 100.000 nascidos vivos) e portadores de SMA (1.500 portadores em cada 100.000 nascidos vivos).

Quantificar o número de cópias de SMN2

A determinação do número de cópias de SMN2 auxilia na classificação clínica precoce do tipo de SMA.

Informar a extensão da deleção da região de SMN1

Sua avaliação abrange os genes BIRC1, SERF1A e GTF2H2, que são adjacentes ao gene SMN1 (FIGURA 1). Alguns estudos relacionam a extensão da deleção de SMN1 e BIRC1 com quadros mais graves de SMA, mas ainda há controvérsias.

Limitações

Não detecta mutações pontuais que ocorrem em 2 a 5% dos casos de SMA. Impossibilidade de avaliar a localização cromossômica dos alelos, ou seja, não se pode determinar se as duas cópias estão em cromossomos homólogos ou no mesmo cromossomo.

Quantificar o número de genes alfa-globínicos

Já que os carreadores talassemia α^+ , especialmente os carreadores $-\alpha^{3.7}$ e mutantes sem deleção do gene α^1 podem não ser detectados nos testes hematológicos normalmente empregados, para o aconselhamento genético, de forma muito simplificada, nos casos em que um dos parceiros já é afetado, os heterozigotos tem 25% de chance de possuírem um filho com HbH, e os homozigotos talassemia α^+ , o risco sobe para 50%.

Abrangência testada da região 16p13.3

Devido a possibilidade de fazer a reação multiplex, o MLPA pode testar diversas regiões na mesma reação e detectar os diversas alelos causadores da alfa-talassemia ($\alpha^{3.7}$, $\alpha^{4.2}$, SEA, MED1, $\alpha^{20.5}$, FIL, THAI, delHS-40, etc), inclusive algumas regiões não pesquisadas nos testes genéticos normalmente empregados, como a região HS40, que está envolvida na regulação dos genes alfa-globinas.

Limitações

Com exceção da mutação Constant-Spring, a técnica não detecta as mutações pontuais causadoras de alfa-talassemia.

Referências Bibliográficas

1. Oskoui M, Kaufmann P. Spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics*. 2008. Oct;5(4):499-506.
2. Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G, Wirth B. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 2001 Jul;9(7):484-91.
3. Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A. Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*. 2007 Aug;22(8):1027-49.

Autores: **Vanessa Oliveira**
Frederico Malta - Genética Molecular

Av. das Nações, 2.448 - Distrito Industrial - Vespasiano/MG
CEP: 33200-000 - Tel.: 31 3228.6200
atendimento@hermespardini.com.br
www.hermespardini.com.br

