



Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA)

Metodologia

Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA, do inglês: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) é um método de PCR multiplex utilizado para detectar números de cópias anormais de até 50 sequências genômicas diferentes de DNA ou RNA. Além disso, o MS-MLPA pode detectar alterações de metilação de DNA. É o método mais confiável e econômico para detectar deleções e duplicações conhecidas, e variações de número de cópias (CNVs, do inglês: *Copy Number Variations*) específicas. Como o array-CGH, o MLPA detecta variações de número de cópias e a interpretação dos resultados pode ser dificultada pela presença de variações do número de cópias comuns na população. As sondas ou kits de sondas utilizados foram selecionados e validados para reduzir a probabilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos.

As variações de número de cópia em regiões-alvo dos genes são identificadas por hibridação com sondas específicas. No MLPA, a sonda consiste em duas hemi-sondas que se ligam a regiões adjacentes na sequência-alvo. Após a ligação e subsequente amplificação por PCR, cada sonda MLPA distinta (específica para regiões-alvo distintas) gera um amplicon com um comprimento único. Os amplicons gerados são separados e quantificados por eletroforese capilar. Deleções em heterozigose dentro de sequências-alvo impedem a ligação eficiente da sonda e resultam em um pico com uma redução de 35-50% do produto de amplificação específico para o conjunto de sondas. Diferenças no número de cópias de vários éxons entre amostras de DNA do teste e do controle podem ser detectadas analisando os padrões de pico do MLPA.

Os conjuntos de sondas de Amplificação Multiplex de Sondas Dependentes de Ligação (MLPA) e reagentes da MCR-Holland são utilizados para a análise dos números de cópias de alvos específicos em comparação com amostras de controle conhecidas. Resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer devido a variantes raras na sequência das regiões-alvo detectadas por sondas MLPA. A sensibilidade analítica e a especificidade do método MLPA são ambas 99%. O MLPA não pode detectar alterações que estejam fora da sequência de destino das sondas e não detectará a maioria das inversões ou translocações. Mesmo quando o MLPA não detecta nenhuma anormalidade, permanece a possibilidade de que existam alterações biológicas nesse gene ou região cromossômica, mas que não foram detectadas. O teste MLPA não detecta mutações de ponto nos genes testados. No entanto, uma mutação de ponto ou polimorfismo podem ser detectados indiretamente, caso essa variação esteja localizada na sequência detectada por uma sonda. A presença do SNV resulta em redução da eficiência de ligação da sonda e redução da área do relativo pico. Portanto, as deleções de éxons únicos detectadas pelo MLPA devem ser sempre confirmadas por outros métodos como PCR multiplex ou sequenciamento.

Aplicações

- Pequenas deleções e rearranjos associados a regiões específicas, genes ou éxons
- Síndromes específicas de microdeleção
- Doenças causadas por defeitos de metilação (MS-MLPA)
- Dissomia Uniparental Específica (UPD)

Limitações

- Rearranjos cromossômicos equilibrados
- Deleções e duplicações teloméricas
- Deleções e duplicações que estão fora do alvo das sondas de MLPA utilizadas
- Mutações pontuais, pequenas inserções e deleções
- Sequência de repetições ou mutações no DNA mitocondrial