

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**LUDMILA SERAFIM DE ABREU**

**Investigação de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos  
com deficiência intelectual idiopática**

**Ribeirão Preto**

**2014**

**LUDMILA SERAFIM DE ABREU**

**Investigação de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos  
com deficiência intelectual idiopática**

Tese de apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área de concentração: Genética.

**Orientador: Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto**

**Ribeirão Preto**

**2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Abreu, Ludmila Serafim.

Investigação de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos com deficiência intelectual idiopática / Ludmila Serafim de Abreu; orientador João Monteiro de Pina Neto. – Ribeirão Preto, 2014.

140 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética.) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Deficiência Intelectual idiopática.
2. Alterações Cromossômicas Crípticas.
3. MLPA. 4. *Array*-CGH.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ludmila Serafim de Abreu.

Título: Investigação de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos com deficiência intelectual idiopática.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**À minha família, com amor.**

## AGRADECIMENTOS

A *Deus* por me amparar em todos os momentos, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador *Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto*, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões feitas durante a orientação. Minha admiração profunda e sincera.

À *Rafaela Simões* e a *Lisandra Mesquita Batista* pela grande e fundamental colaboração para a realização deste trabalho.

Aos alunos e funcionários das APAEs de Altinópolis, Serrana e Limeira, que possibilitaram este estudo, em especial à *Daniela Candioto Vidal*, enfermeira da APAE de Limeira, pela assistência e disposição;

Ao *Dr. Prof. Wilson Araújo da Silva Júnior*, chefe do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto, e às técnicas *Adriana Marques* e *Greice Andreotti*, pela ajuda e suporte iniciais para realização desta pesquisa;

À *Profa. Dra. Margareth Castro*, chefe do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por disponibilizar equipamentos e apoio técnico fundamental durante a fase inicial deste trabalho, em especial ao técnico *Rogério Lenotti Zulliani*;

À *Profa. Dra. Márcia Pimental*, coordenadora do Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e a seus alunos *Mario Campos Júnior* e *Andressa Gonçalves* pela forma querida com que me receberam, pelos ensinamentos, auxílio e esclarecimentos durante a padronização e execução das técnicas de MLPA e qPCR, e também a *Milene Mulatinho* que me hospedou gentilmente durante os dias em que lá estive;

À *Profa. Dra. Mariluce Riegel*, pela colaboração e dedicação prestadas à realização dos ensaios de *array*-CGH, desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Molecular/Centro de Pesquisa Experimental Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS;

À **Profa. Nilce Rossi**, a seus alunos **Larissa Gomes da Silva**, **Máira Pompeu Martins**, **Pablo Rodrigo Sanches** e ao técnico **Mendelson Mazucato** pela assistência e atenção concedidas;

À **Yara Costa Netto Muniz**, **Juliana Massaro**, **Breno Melo**, **Leonardo Franchi** e **Cely Carvalhais**, por estarem ao meu lado durante esses anos em Ribeirão Preto... Obrigada pelos passeios, conversas, risadas e conselhos, e muito, muito obrigada pelo ombro amigo!

Aos **funcionários do Departamento de Genética** e do **Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto**, pela atenção e auxílios prestados. Em especial à **Susie Nalon**, **Silvia Consiglieri** e a **Márcia Delfino** pela paciência, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

Aos **amigos** e **colegas** pelo companheirismo e agradáveis momentos de convívio, especialmente a **Gislaine Rodrigues**, **Helder Freitas**, **Rômulo Moraes**, **Sarah Mello**, **Daniela Ribeiro** e **Camila Dias**, pela parceria, apoio e incentivo necessários no dia a dia.

À **Capes**, pelo auxílio financeiro recebido para o desenvolvimento desta tese.

À **minha tão amada família**, por tudo que representam na minha vida. Pelo amor que sempre me dedicaram, pela confiança depositada em mim, pelo apoio irrestrito e por serem meus maiores incentivadores. Por me ajudarem todos os dias a me construir como pessoa e a acreditar que eu posso. Amo-os incondicionalmente!

# Investigação de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos com deficiência intelectual idiopática

## RESUMO

Em todos os estudos etiológicos sobre a DI, as anomalias cromossômicas são fatores que contribuem significativamente para essa condição. Nos últimos anos, a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) tem permitido grandes avanços no campo da citogenética clínica, tornando possível o diagnóstico de reorganizações complexas muitas vezes não detectadas ao microscópio óptico, garantindo assim, um maior conhecimento das causas que podem originar a DI. O objetivo deste trabalho foi implantar a técnica de MLPA no Laboratório de Genética Humana e Médica - FMRP-USP e, através dessa metodologia, investigar a presença de alterações cromossômicas crípticas em 50 indivíduos com DI idiopática, provenientes das Associações de Pais e Amigos dos Deficientes (APAEs) das cidades de Altinópolis-SP, Limeira-SP e Serrana-SP, estabelecendo a frequência e os tipos dessas anomalias e correlacionando as alterações encontradas com o fenótipo clínico dos pacientes. Além disso, aplicar o método de *array*-CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) na amostra de indivíduos selecionados na APAE de Limeira-SP. Os resultados anômalos obtidos por ambas as técnicas foram validados por qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). A análise de 50 indivíduos com DI por MLPA (kits P036, P070 e P245) detectou duas ( $2/50=4\%$ ) alterações cromossômicas crípticas. Em seguida, a técnica de *array*-CGH foi realizada em 25 desses 50 indivíduos, identificando 13 ( $13/25=52\%$ ) desequilíbrios cromossômicos crípticos: 6 ( $6/25=24\%$ ) considerados patogênicos e 7 ( $7/25=28\%$ ) classificados como variações neutras ou de significado clínico indeterminado. Recomenda-se a realização de MLPA com kits para regiões subteloméricas em indivíduos com exame cariotípico normal que apresentam fenótipo sugestivo de cromossomopatia, enquanto o kit para síndromes de microdeleção é indicado para indivíduos com cariótipo normal que apresentam fenótipo específico de alguma síndrome de microdeleção comum. Já o *array*-CGH deve ser utilizado em indivíduos com DI associada à dismorfias que apresentaram exames de cariótipo e de MLPA normais, e que, após intensa investigação genético-clínica permaneceram sem diagnóstico. Portanto, é indicado o uso dos exames de MLPA e *array*-CGH na rede institucional de auxílio aos deficientes intelectuais, pois tais técnicas são capazes de detectar um número expressivo de anomalias cromossômicas crípticas consideradas clinicamente relevantes.

Palavras-chave: DI idiopática. Alteração cromossômica críptica. MLPA. *Array*-CGH.

# **Investigation of cryptic chromosomal abnormalities in individuals with idiopathic intellectual disability**

## **ABSTRACT**

In all etiologic studies of intellectual disability (ID), chromosomal abnormalities are factors that significantly contribute to this condition. In recent years, the technique of MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) has led to major advances in the field of clinical cytogenetics, enabling the diagnosis of complex reorganizations often not detected by optical microscopy, thus ensuring a greater understanding of the causes that can lead ID. The objective of this work was to implement the MLPA technique in the Laboratory of Human Genetics and Medical - FMRP-USP and through this methodology to investigate the presence of cryptic chromosomal abnormalities in 50 patients with idiopathic, from the Associação de Pais e Amigos dos Deficientes (APAEs) the of cities of Altinópolis-SP, Limeira-SP and Serrana-SP, establishing the frequency and types of these anomalies and correlating the alterations found with the clinical phenotype of the patients. Moreover, applying the method of array-CGH (Comparative Genomic Hybridization in array) in the sample of individuals selected in APAE of Limeira-SP. The anomalous results obtained by both techniques were validated by qPCR (quantitative polymerase chain reaction). The analysis of 50 patients with idiopathic ID by MLPA (kits P036, P070 and P245) detected two ( $2/50 = 4\%$ ) cryptic chromosomal alterations. Then, the technique of array-CGH was performed in 25 of these 50 subjects, identifying 13 ( $13/25 = 52\%$ ) cryptic chromosomal imbalances: 6 ( $6/25 = 24\%$ ) were considered pathogenic and 7 ( $7/25 = 28\%$ ) classified as neutral variations or of undetermined clinical significance. It is recommended to perform the technique of MLPA with kits for subtelomeric regions in individuals who, despite of the karyotype normal, have suggestive phenotype of change chromosomal, while the application of the kit for microdeletion syndromes is indicated in cases with normal karyotype which presenting phenotype specific of a microdeletion common syndrome. Whereas the array-CGH must be used in individuals with ID associated to dysmorphias that showed normal results of karyotype and MLPA and, after intensive research, clinical genetic remained undiagnosed. Therefore, the use of tests MLPA and array-CGH in the network institutional for the intellectually disabled is indicated, as these techniques are able to detect a significant number of cryptic chromosomal abnormalities considered clinically relevant.

**Key-words:** Idiopathic ID. Cryptic chromosomal alteration. MLPA. Array-CGH.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Visão geral da distribuição de várias causas etiológicas, agrupadas em categorias diagnósticas, identificadas no grupo de pacientes com DI (n = 670). A contribuição das técnicas de *array* foi calculada a partir dos 10% de aberrações detectadas por *array*-CGH de alta resolução, após a exclusão de pacientes com microalterações identificadas clinicamente ou por triagem subtelomérica. ACS, aneusomias cromossômicas segmentares (incluindo aquelas constatadas no primeiro e segundo cariótipo); Trissomias em mosaico, tecidos mosaicos não identificados em hemocultura. Equilibradas, alterações equilibradas *de novo* detectadas por cariótipo convencional ou FISH com sondas subteloméricas. Síndromes de microdeleção, síndromes clinicamente reconhecíveis diagnosticadas através da análise de FISH locus-específico (DiGeorge, Williams-Beuren, etc.). Monogênicas, doenças monogênicas decorrentes de mutações; Mendelianas, doenças não classificadas que apresentam evidências de herança mendeliana através da genealogia ou padrões de inativação do X. Síndromes, síndromes clinicamente reconhecidas sem etiologia conhecida. UDP, dissomia uniparental (Adaptado de Rauch et al., 2006)..... 23
- Figura 2** - Estruturas subteloméricas de *Homo sapiens*. Cromossomo A representando um modelo de organização subtelomérica proposto por Flint et al. (1997). Outras estruturas subteloméricas são exibidas nos cromossomos B, C e D. B1 e B2 representam cromossomos homólogos que diferem muito no conteúdo subtelomérico (Adaptado de Mefford; Trask, 2002) ..... 25
- Figura 3** - Subtelômeros e rearranjos cromossômicos. a) A extensa homologia entre subtelômeros de diferentes cromossomos, juntamente com grandes diferenças no conteúdo subtelomérico entre cromossomos homólogos podem levar à um *mispairing* de cromossomos durante a meiose. Sem recombinação ectópica, os gametas recebem um complemento equilibrado (1 ou 1' e 2 ou 2'). Na recombinação ectópica entre os blocos homólogos, como no bloco azul em A, os gametas recebem um complemento cromossômico equilibrado, entretanto variantes da sequência subtelomérica são transferidas entre diferentes cromossomos. Se um *crossover* ocorrer próximo a região subtelomérica, um complemento não equilibrado será transferido para três de quatro gametas. Aqui, o bloco azul medeia o pareamento homólogo, ocorrendo um *crossover* desigual em B através de dois elementos *Alu* incorporados em DNA de cópia-única cromossomo-específico. Em B, o *crossover* ocorre próximo ao gene *X* no cromossomo 1 e em um íntron do gene *Y* no cromossoma 2'. b) Os quatro resultados possíveis de um evento como esse são mostrados. Apenas gametas I apresentam complemento equilibrado intacto. Os outros três gametas possuem número anômalo de cópias do gene *X* e/ou cópia descontínua do gene *Y*, podendo resultar em fenótipo clínico. der, cromossomo derivado resultante de translocação ..... 26
- Figura 4** - SALSA MLPA P036-E1 Humam Telomere -3 probemix..... 45
- Figura 5** - SALSA MLPA P070-B2 Humam Telomere-5 probemix ..... 46
- Figura 6** - SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion-1 probemix..... 47

<b>Figura 7</b> - Software Coffalyser v8.0 exibindo os métodos de normalização utilizados para a análise dos resultados.....	<b>49</b>
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da técnica de <i>array</i> -CGH para identificação de variação do número de cópias de genes ou regiões genômicas. O DNA da amostra teste e do DNA controle são marcados diferencialmente por fluorescência e posteriormente hibridados a uma plataforma de DNA ( <i>arrays</i> ) contendo segmentos de DNA imobilizados. Predomínio da intensidade de fluorescência correspondente à amostra teste ou ao controle é indicativo de ganho ou perda de cópias de DNA, respectivamente, na região correspondente da amostra teste .....	<b>52</b>
<b>Figura 9</b> - Resultado de um PCR quantitativo em tempo real com as curvas de amplificação do gene <i>ALB</i> e do gene alvo a ser avaliado em um indivíduo controle (reações feitas em triplicata) mostrando a linha de <i>threshold</i> e ilustrando o modo em que os Cts e o $\Delta$ Ct são calculados .....	<b>54</b>
<b>Figura 10</b> - Concentração de oligonucleotídeos usada nos ensaios e os respectivos Cts atingidos. Em vermelho a concentrações escolhidas para o método. PCR do gene <i>ALB</i> em um indivíduo controle.....	<b>56</b>
<b>Figura 11</b> - Exame de MLPA do CP apresentando alterações nos padrões de amplificação das sondas 01736-L02051 e 01762-L08761 correspondentes ao gene <i>USP14</i> (duplicação 18p) e ao gene <i>RABL2B</i> (deleção 22q), respectivamente. Kit SALSA MLPA P036 E-1 .....	<b>59</b>
<b>Figura 12</b> - Controle positivo, cariótipo 46,XX,der(22) t(18;22)(p11.3;q13). Observam-se narinas antevertidas e filtro nasolabial longo e marcado.....	<b>60</b>
<b>Figura 13</b> - Exame de MLPA da paciente 14 apresentando uma alteração no padrão de amplificação da sonda FLJ20265 correspondente ao gene <i>PIGG</i> (deleção 4p). Kit SALSA MLPA P036 E-1 .....	<b>61</b>
<b>Figura 14</b> - Resultado de qPCR indicando a deleção do gene <i>PIGG</i> na paciente 14.....	<b>61</b>
<b>Figura 15</b> - Paciente 14 diagnosticada com Síndrome de Pitt-Rogers-Danks. Observa-se microcefalia, linha do cabelo frontal elevada, frontal alto, fâcies anormal, face triangular, hipoplasia de face média, sobrancelhas elevadas e arqueadas, hélix anormal e lábios finos...	<b>62</b>
<b>Figura 16</b> - Exame de MLPA da paciente 14 apresentando uma alteração no padrão de amplificação da sonda 06058-L05513 correspondente ao gene <i>WHSC1</i> (deleção 4p16.3). Kit SALSA MLPA P245-A2.....	<b>63</b>
<b>Figura 17</b> - Exame de MLPA do paciente 27 apresentando uma alteração no padrão de amplificação das sondas 01218-L06270, 05464-L10114, 01235-L00773 correspondente aos genes <i>CLDN</i> , <i>GP1BB</i> e <i>SNAP29</i> , respectivamente (duplicação 22q11.2). Kit SALSA MLPA P245-A2.....	<b>63</b>
<b>Figura 18</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH da paciente 26 com microdeleção del(17)(q12) de origem indeterminada.....	<b>65</b>
<b>Figura 19</b> - Resultado de qPCR indicando a deleção do gene <i>ACACA</i> na paciente 26.....	<b>65</b>

<b>Figura 20</b> - Paciente 26 com del(17)(q12) detectada por <i>array</i> -CGH. Observam-se sobrancelhas arqueadas, nariz longo, dentes mal implantados, sorriso constante, cúbito valgo leve, escoliose destro-convexa, dedos longos e prega de <i>Hockey Stick</i> .....	66
<b>Figura 21</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 27 com microduplicação dup(22)(q11.21) <i>de novo</i> .....	67
<b>Figura 22</b> - Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>TBX1</i> no paciente 27 .....	68
<b>Figura 23</b> - Paciente 27 com dup(22)(q11.21) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se face triangular, sobrancelhas arqueadas, frontal estreito, nariz com ponta bulbosa, narinas antevertidas com columela saliente, orelhas proeminentes e displásicas um pouco rodadas, presença de clinodactilia, prega flexão de transição, <i>pectus excavatum</i> com linha de hipopigmentação reta dividindo a região torácica central .....	68
<b>Figura 24</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 28 com microdeleção del(16)(p11.2) de herança materna.....	69
<b>Figura 25</b> - Resultado de qPCR indicando a deleção do gene <i>PRRT2</i> no paciente 28 e em sua mãe .....	70
<b>Figura 26</b> - Paciente 28 com del(16)(p11.2) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se estreitamento frontal do crânio, olhos fundos, narinas antevertidas e sobrepeso.....	70
<b>Figura 27</b> – Resultado de qPCR da paciente 31 indicando valor relativo de cópias do gene <i>BCAP31</i> normal.....	71
<b>Figura 28</b> – Paciente 31. Observa-se corpo esguio, microcefalia, assimetria de face, nariz com ponta bulbosa e narinas antevertidas, lábio superior fino, prognatismo e acentuada escoliose .....	72
<b>Figura 29</b> – Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 33 com microdeleção del(14)(q11.2) de herança materna.....	73
<b>Figura 30</b> - Resultado de qPCR indicando a deleção do gene <i>OR4K2</i> no paciente 33 .....	74
<b>Figura 31</b> – Paciente 33 com del(14)(q11.2) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se face triangular, rotação posterior das orelhas, filtro curto e bem marcado, lábio superior proeminente em arco de cúpido, lábio inferior grosso e evertido, prognatismo acentuado, pescoço curto, clinodactilia do 5º dedo e braquidactilia dos dedos da mão .....	74
<b>Figura 32</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH da paciente 35 com microdeleção del(7)(q33-q34) de origem indeterminada.....	76
<b>Figura 33</b> – Resultado de qPCR indicando a deleção do gene <i>PTN</i> na paciente 35 .....	76
<b>Figura 34</b> - Paciente 35 com del(7)(q33-q34) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se face grotesca, nariz proeminente com raiz alta e ponta bulbosa, filtro curto e marcado, boca grande com lábio superior fino, obesidade truncal com seios vastos, mãos com dedos longos e finos, afilamento das falanges distais e polegar com implantação alta.....	77

<b>Figura 35</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH da paciente 38 com microduplicação dup(X)(p11.2-p11.23) de origem indeterminada.....	<b>78</b>
<b>Figura 36</b> – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>ZNF81</i> na paciente 38 .....	<b>79</b>
<b>Figura 37</b> - Paciente 38 com dup(X)(p11.2-p11.23) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se macrocefalia, frontal proeminente, lábios finos, pescoço curto e sobrepeso .....	<b>79</b>
<b>Figura 38</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 39 com microduplicação dup(8)(p11.22) de origem indeterminada .....	<b>80</b>
<b>Figura 39</b> – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>ADAM5</i> no paciente 39 ....	<b>80</b>
<b>Figura 40</b> – Paciente 39 com dup(8)(p11.22) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se raiz nasal baixa e orelhas proeminentes .....	<b>81</b>
<b>Figura 41</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 41 com microduplicação dup(15)(q11.1-q11.2) de herança paterna.....	<b>82</b>
<b>Figura 42</b> – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>NBEAP1</i> no paciente 41 e no seu pai .....	<b>82</b>
<b>Figura 43</b> – Paciente 41 com dup(15)(q11.1-q11.2) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se orelha rodada e lábios salientes .....	<b>83</b>
<b>Figura 44</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 44 com microduplicação dup(15)(q11.1-q11.2) de origem indeterminada.....	<b>84</b>
<b>Figura 45</b> – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>NBEAP1</i> no paciente 44 ...	<b>84</b>
<b>Figura 46</b> – Paciente 44 com dup(15)(q11.1-q11.2) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se face alongada, orelhas proeminentes, narinas antevertidas e lábio superior fino.....	<b>85</b>
<b>Figura 47</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH da paciente 45 com microdeleção del(8)(p11.22) <i>de novo</i> ....	<b>86</b>
<b>Figura 48</b> - Resultado de qPCR da paciente 45 indicando valor relativo de cópias do gene <i>ZNF267</i> normal .....	<b>86</b>
<b>Figura 49</b> – Resultado de qPCR indicando a deleção do gene <i>ADAM5</i> na paciente 45.....	<b>87</b>
<b>Figura 50</b> – Paciente 45 com del(8)(p11.22) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se microcefalia e sobrepeso .....	<b>87</b>
<b>Figura 51</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 47 com microdeleção del(15)(q11.1-q11.2) de origem indeterminada .....	<b>89</b>
<b>Figura 52</b> - Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 47 com microduplicação dup(3)(p25.3) de herança materna.....	<b>89</b>
<b>Figura 53</b> – Resultade qPCR indicando a deleção do gene <i>NBEAP1</i> no paciente 47 .....	<b>90</b>

<b>Figura 54</b> - Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>ATP2B2</i> no paciente 47 e em sua mãe .....	<b>90</b>
<b>Figura 55</b> – Paciente 47 com del(15)(q11.1-q11.2) e dup(3)(p25.3) detectadas por array-CGH. Observa-se face levemente triangular, retração temporal, orelhas proeminentes e um pouco rodadas. Foto não atual .....	<b>91</b>
<b>Figura 56</b> – Perfil de <i>array</i> -CGH da paciente 48 com microduplicação dup(16)(p13.11-p12.3) de origem indeterminada.....	<b>92</b>
<b>Figura 57</b> – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>ABCC6</i> na paciente 48 .....	<b>92</b>
<b>Figura 58</b> – Paciente 48 com dup(16)(p13.11-p12.3) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se baixo peso, microcefalia, narinas antevertidas, filtro marcado, lábio superior delgado e em arco, prognatismo e aracnodactília .....	<b>93</b>
<b>Figura 59</b> – Perfil de <i>array</i> -CGH do paciente 50 com microduplicação dup(3)(p25.3) de herança materna.....	<b>94</b>
<b>Figura 60</b> – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene <i>ATP2B2</i> no paciente 50 e em sua mãe .....	<b>95</b>
<b>Figura 61</b> - Paciente 50 com dup(3)(p25.3) detectada por <i>array</i> -CGH. Observa-se implantação dos cabelos em tridente na nuca, retração temporal, sobrancelhas grossas, orelhas proeminentes e um pouco rodadas, pescoço curto, <i>pectus excavatum</i> e sobrepeso.....	<b>95</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - <i>Checklist</i> clínico aplicado em indivíduos com suspeita de alterações subteloméricas .....	<b>28</b>
<b>Tabela 2</b> - Indivíduos avaliados e selecionados em cada uma das três APAEs .....	<b>41</b>
<b>Tabela 3</b> - Pontuação apresentada por cada um dos 50 indivíduos provenientes das APAEs após a utilização do <i>checklist</i> de de Vries .....	<b>42</b>
<b>Tabela 4</b> - Sequência, localização e eficiência dos <i>primers</i> utilizados no presente estudo .....	<b>57</b>
<b>Tabela 5</b> – Resultados obtidos após a aplicação das técnicas de MLPA e <i>array</i> -CGH na amostra estudada.....	<b>113</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Aspectos gerais da DI .....	17
1.2 Etiologia .....	20
1.3 Alterações cromossômicas como determinantes da DI .....	21
1.4 Regiões Subteloméricas.....	24
1.5 DI e alterações cromossômicas subteloméricas crípticas .....	29
1.6 DI e síndromes de microdeleção/microduplicação comuns .....	34
1.7 <i>Array</i> -CGH e alterações cromossômicas crípticas .....	35
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Objetivos gerais .....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Seleção de casos com DI idiopática para investigação através de técnicas de citogenética molecular: critério de inclusão .....	40
4.2 Casuística.....	41
4.2.1 Extração de DNA.....	44
4.3 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA) .....	44
4.3.1 Protocolo da técnica MLPA .....	48
4.3.2 Análise dos dados de MLPA .....	49
4.4 Hibridação comparativas de genomas em <i>arrays</i> : <i>array</i> -CGH.....	50
4.4.1 Fragmentação e marcação do DNA genômico.....	50
4.4.2 Hibridação e lavagem .....	51
4.4.3 Análise dos dados – <i>array</i> -CGH .....	51
4.5 Confirmação dos achados obtidos através de PCR quantitativa em tempo real.....	53
4.5.1 Otimização da concentração de oligonucleotídeos.....	55
4.5.2 Teste de diluição do DNA .....	56
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
5.1 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> .....	58

5.1.1 Kits P036-E1 e P070-B2 .....	58
5.1.2 Kit P245-A2.....	62
5.2 <i>Array</i> -CGH.....	64
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
6.1 Alterações detectadas pela técnica de MLPA.....	96
6.2 Alterações detectadas pela técnica de <i>array</i> -CGH.....	97
6.3 Correlação Genótipo X Fenótipo.....	99
6.3.1 Microdeleção 4p16.3 – Paciente 14.....	99
6.3.2 Microdeleção 17q12 - Paciente 26 .....	100
6.3.3 Microduplicação 22q11.21 - Paciente 27 .....	102
6.3.4 Microdeleções 16p11.2 - Paciente 28.....	104
6.3.5 Microdeleção 14q11.2 - Paciente 33 .....	105
6.3.6 Deleção 7q33-q34 - Paciente 35.....	106
6.3.7 Microduplicação Xp11.3-p11.23 - Paciente 38.....	107
6.3.8 Microduplicação/Microdeleção 8p11.22 - Pacientes 39 e 45.....	108
6.3.9 Microduplicação/Microdeleção 15q11.1-q11.2 – Pacientes 41, 44 e 47 .....	109
6.3.10 Microduplicação 3p25.3 – Pacientes 47 e 50 .....	110
6.3.11 Microduplicação 16p13.11-p12.3 - Paciente 48.....	110
6.4 MLPA X <i>Array</i> -CGH.....	111
6.5 <i>Checklist</i> de de Vries .....	112
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da DI

A Deficiência Intelectual (DI) é uma condição com grandes efeitos sociais que acomete não apenas as pessoas afetadas, mas também a família e a sociedade como um grupo (KATZ; LAZCANO-PONCE, 2008). No decorrer dos anos o conceito de DI recebeu diversas definições e terminologias para caracterizá-la, tais como oligofrenia, retardo mental, atraso mental e deficiência mental (LYSAGHT et al., 2012).

De acordo com a décima revisão de *World Health Organization* (WHO): "Deficiência Intelectual é um distúrbio definido por um desenvolvimento mental incompleto ou reprimido, caracterizado principalmente pela deterioração das funções concretas em cada estágio do desenvolvimento e que contribuem para o nível global de inteligência, tais como as funções cognitivas, de linguagem, motoras e de socialização; nos pacientes a adaptação ao ambiente é sempre afetada. Em casos de DI os escores dos níveis de desenvolvimento intelectual devem ser determinados com base em todas as informações disponíveis, incluindo sinais clínicos, comportamento adaptativo do indivíduo no meio cultural e das constatações psicométricas" (WHO, 2007).

Por outro lado, a *American Association of Intellectual and Developmental Disabilities* (AAIDD) sugere que, além de um funcionamento intelectual significativamente abaixo da média, devem ser observadas também limitações concomitantes em duas ou mais áreas de habilidades adaptativas, incluindo: comunicação; cuidados pessoais; vida doméstica; aptidões sociais; autonomia; saúde e segurança; capacidades acadêmicas; momentos de lazer e trabalho; devendo a deficiência intelectual manifestar-se antes dos 18 anos de idade (AAIDD, 2010). Em síntese, a DI é caracterizada por evidentes limitações no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, esse último expresso como habilidades adaptativas conceituais, sociais e práticas. Portanto, de acordo com a AAIDD, para a avaliação da DI devem ser consideradas cinco dimensões: aptidão intelectual; nível de adaptação; participação, interação e funções sociais; e saúde e contexto social (SALVADOR-CARULLA et al., 2011). Essa definição está em conformidade não apenas com a *International Association for the Scientific Study of Intellectual Disability* (IASSID), mas também com a *World Health Organization's International Classification of Functioning, Disability and Health* (ICF) (LUCKASSON; REEVE, 2001).

A DI é clinicamente definida por três critérios: (a) quociente de inteligência (QI) abaixo de 70; (b) limitações em dois ou mais comportamentos adaptativos, tais como comunicação, cuidados pessoais, habilidades sociais, utilização dos recursos comunitários, autonomia, saúde e segurança, (c) e evidências de que as desordens mentais começaram antes dos 18 anos de idade (DSM-IV, 2000). A DI pode revelar-se nos primeiros anos de vida como um atraso do desenvolvimento global. Nesse caso, crianças menores de cinco anos que apresentam déficits do desenvolvimento e adaptação são diagnosticadas com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), devido a dificuldade em mensurar o QI nessa faixa etária (SHEVELL et al., 2003).

A DI não é considerada uma doença, mas um agrupamento de um grande e heterogêneo conjunto de distúrbios síndrômicos e não síndrômicos que possuem como característica comum o comprometimento das habilidades intelectuais (VAN BOKHOVEN, 2011). Dessa forma, faz-se uma distinção clássica entre DI síndrômica, em que os pacientes têm anomalias adicionais, como características dismórficas ou defeitos anatômicos, e DI não síndrômica, em que a DI é a única característica clínica. No entanto, é necessário um exame clínico dismorfológico especializado para diferenciá-las (VAN BOKHOVEN, 2011).

Uma das classificações da DI é feita com base no nível de comprometimento mental: QI 50-69 (DI leve), QI 35-49 (DI moderada), QI 20-34 (DI grave) e QI <20 (DI profunda), sendo que, 85% dos indivíduos com déficit de inteligência apresentam DI leve, 10% DI moderada, 4% possuem DI severa e 1% apresenta DI profunda (AAMR, 2002). Muitas vezes uma classificação mais simples é utilizada, em que a DI grave compreende todos os valores de QI abaixo de 50 e a DI leve inclui os valores entre 50-70. Indivíduos com um QI entre 70 e 85 são considerados como *limitrofes*. Inicialmente achava-se que a avaliação genético-clínica deveria ser realizada apenas nos casos de DI grave, no entanto, nos dias de hoje recomenda-se que essa avaliação ocorra em todos os indivíduos com DI independentemente do grau (VAN KARNEBEEK et al., 2005).

A classificação etiopatogênica, adotada por profissionais que estudam a etiologia e a patologia da DI, considera os elementos causais relacionados à deficiência cognitiva como (KATZ; LAZCANO-PONCE, 2008):

- 1- Fatores genéticos:
  - a) doenças cromossômicas;
  - b) monogênicas;
  - c) poligênicas;
  - d) mitocondriais.

### 3- Fatores adquiridos ou não genéticos:

a) congênitos;

b) pós-natais.

Dentro dos fatores adquiridos ou não genéticos existem os determinantes socioculturais. Estudos epidemiológicos apontam uma importante correlação entre pobreza e DI, devido, principalmente, a existência de uma relação entre pobreza e exposição a uma ampla gama de fatores ambientais e psicossociais. Desse modo, fatores ambientais e socioculturais são causas diretas do aumento desproporcional da incidência de DI nos países em desenvolvimento (VAN KARNEBEEK et al., 2005).

Entre as classificações a etiológica é a mais importante por ser considerada estratégica para um país saber quais as causas de DI em sua população e quais são suas frequências relativas, visando o estabelecimento de políticas públicas de prevenção primária. Essa classificação inclui (KATZ; LAZCANO-PONCE, 2008):

1- Causas ambientais: decorrentes de exposições inadequadas durante os períodos pré, peri e pós-natais, como encefalopatia hipóxico-isquêmica (sofrimento fetal crônico, trauma e anóxias de parto, etc.); prematuridade, principalmente as extremas; infecções congênitas (toxoplasmose, sífilis, citomegalovirose, rubéola); infecções pós-natais (meningites bacterianas); radiações intrauterinas; álcool e drogas na gestação; e uso de medicamentos teratogênicos.

#### 2- Causas genéticas, que podem ser:

2.1- Cromossômicas - alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais relacionadas à aneuploidias, completas ou parciais, ou as síndromes de microdeleções ou microduplicações cromossômicas.

2.2- Monogênicas - síndromes de etiologia ligada ao X ou autossômicas, que podem ser dominantes ou recessivas, relacionadas a DI.

3- Causas multifatoriais: doenças com predisposição genética e com recorrência familiar, mas com poucos casos distribuídos nos heredogramas, associadas a desencadeantes ambientais, como por exemplo, a deprivação de ácido fólico que pode causar defeitos de fechamento do tubo neural (anencefalias, meningomielocelos e encefalocelos isoladas).

4- Causas desconhecidas: casos de DI isolados na família e sem diagnóstico clínico e etiológico, cujos riscos de recorrência também são indefinidos.

5- Causas heterogêneas: casos de DI em que a patologia diagnosticada é de origem heterogênea e que na situação em questão não foi possível estabelecer qual das possíveis causas contribuiu para a determinação da DI.

A prevalência da DI é mundialmente estimada em cerca de 1 a 4% (WHO, 2007). Segundo a *Pan American Health Organization* (PAHO), nos países em desenvolvimento a frequência de deficiência cognitiva em crianças menores de 18 anos de idade é de aproximadamente 4,6% (PAHO, 2001), enquanto que a prevalência estimada em países desenvolvidos é de 0,5 a 2,5% (FREY; TEMPLE, 2008). Parece haver um consenso de que a frequência da DI seja maior nos países em desenvolvimento, uma vez que fatores etiológicos associados a esta condição são mais comuns nessas regiões (SOTELO, 2008; KATZ; LAZCANO-PONCE, 2008). Estudos sugerem ainda que a prevalência da DI nos países de baixa a média renda pode variar de 0,09 a 18,3% (MAULIK; DARMSTADT, 2007). Essa variação, no entanto, sofre interferências metodológicas, incluindo vieses na avaliação influenciada por questões culturais e ambientais (MERCADANTE et al., 2009). De acordo com o censo demográfico realizado no Brasil no ano 2000, pelo menos 2,8 milhões de pessoas (1,6% da população) eram afetadas por DI, que é certamente uma subestimativa, visto que a prevalência esperada nos países em desenvolvimento é três vezes maior (CHRISTOFOLINI et al., 2009).

## 1.2 Etiologia

Os determinantes ambientais apresentam um importante papel, já que contribuem principalmente para a prevalência da DI leve (PATEL et al., 2010). Por outro lado, as causas genéticas da DI são mais frequentes no grupo de DI grave e incluem alterações cromossômicas, tanto numéricas quanto estruturais, doenças genéticas e doenças monogênicas. Esses fatores genéticos representam até 65% das DI graves, embora esta percentagem varie amplamente em vários estudos (CHELLY et al., 2006; RAUCH et al., 2006; CHIURAZZI et al., 2008; PATEL et al., 2010). Considera-se que um diagnóstico genético ou metabólico possa ser alcançado em aproximadamente 50% a 65% dos pacientes com DI grave, em contraste com 20% nos casos de DI leve (VAN BANKHOVEN, 2011).

A distribuição das causas da DI varia de acordo com a severidade, a seleção dos casos, a verificação das fontes e a idade dos pacientes (RAYNHAM et al., 1996). Nos países desenvolvidos 30% das DI são decorrentes de fatores genéticos, enquanto 15% resultam de determinantes ambientais. No restante dos casos, entre 20 a 50%, a etiologia da DI é desconhecida (HOCHSTENBACH et al., 2009). Apesar da DI ser mais difícil de ser diagnosticada nos países em desenvolvimento, há vários elementos que sugerem uma maior prevalência dessa condição nesses territórios. Por exemplo, fatores etiológicos como

desnutrição, ausência de cuidado perinatal e exposição a agentes tóxicos e infecciosos, que são mais comuns nas nações em desenvolvimento, contribuindo para uma maior prevalência da DI nesses países (SOTELO, 2008; KATZ; LAZCANO-PONCE, 2008).

O alto índice de casos em que não é possível determinar a etiologia da DI limita tanto o diagnóstico etiológico como a eficiência do aconselhamento genético, impedindo a identificação de indivíduos portadores e o diagnóstico pré-natal em famílias com um ou mais membros afetados por essa condição (VERDÚ-PÉREZ et al., 2011). Em determinadas circunstâncias, após o nascimento de uma criança com DI, alguns familiares optam por evitar novas gestações, a menos que lhes seja assegurado um baixo risco de recorrência ou um minucioso exame pré-natal (RAUCH et al., 2006). Portanto, a determinação etiológica da DI se configura como um objetivo assistencial prioritário, do qual emana o estabelecimento do prognóstico, medidas terapêuticas globais, tanto específicas como inespecíficas, e o aconselhamento genético, considerado de grande importância para os familiares (ADEYINKA et al., 2005). Dependendo do diagnóstico etiológico, o risco de recorrência da DI geralmente varia entre o *background* a 50%, podendo raramente chegar a 75% ou mesmo a 100%. Independentemente da etiologia da DI, estima-se que o risco de recorrência dessa condição seja de 8,4% (VAN NARDEN BRAUN et al., 2005).

Segundo a WHO, a solução básica para reduzir a incidência de indivíduos com DI é atuar nas prevenções (WHO, 1981). Na prevenção primária são desenvolvidas ações para evitar o nascimento de uma criança com deficiência intelectual. Uma delas é o aconselhamento genético, definido como um processo de comunicação sobre os riscos de ocorrência ou recorrência familiar de doenças genéticas, que busca fornecer aos pacientes e seus familiares uma ampla compreensão das implicações relacionadas à doença genética em discussão. Já a prevenção secundária tem como objetivo o estabelecimento do diagnóstico precoce, devendo esse ocorrer antes que a deficiência seja manifestada clinicamente (diagnóstico intra-útero ou peri-natal). Por último, a prevenção terciária, que tem como finalidade limitar as consequências adversas da condição existente, e também, melhorar o nível funcional do indivíduo afetado.

### **1.3 Alterações cromossômicas como determinantes da DI**

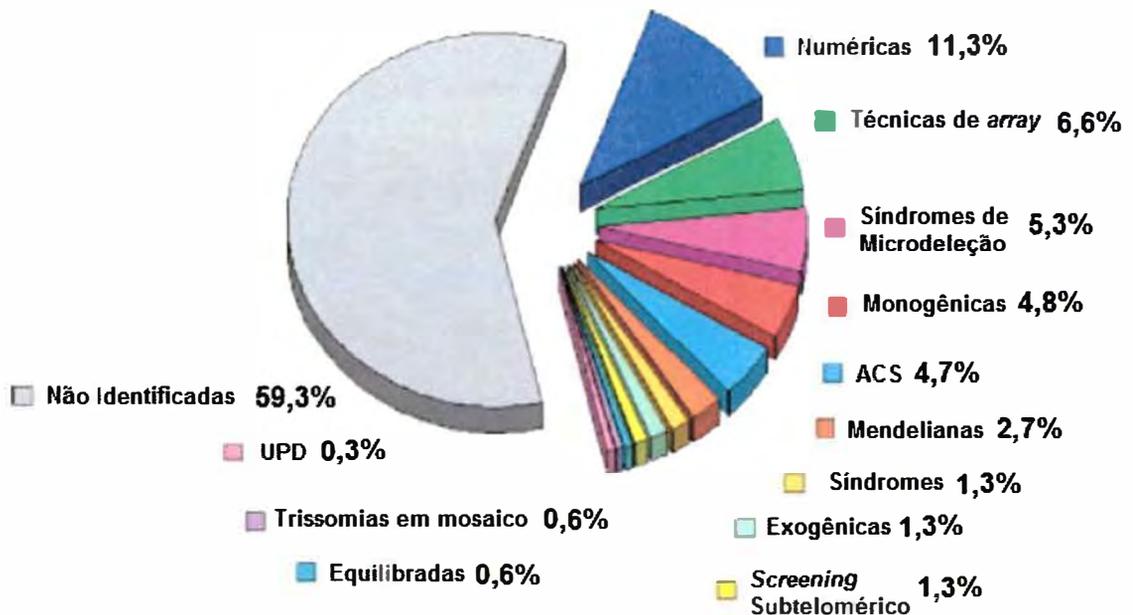
O desenvolvimento da citogenética humana data de 1956, quando Tjio e Levan (1956) comprovaram que o conjunto cromossômico diploide na espécie humana contém 46 cromossomos, apresentando pela primeira vez uma classificação dos cromossomos mitóticos

humanos. Contudo, os primeiros casos de anomalias cromossômicas humanas foram relatados por Lejeune et al. (1959) que revelaram uma associação definitiva de uma anomalia cromossômica com a síndrome de Down, referindo-se a trissomia do cromossomo 21, em seguida, Jacobs e Strong (1959) descreveram a síndrome de Klinefelter, Ford et al. (1959) propuseram a síndrome de Turner e Jacobs et al. (1959) definiram a síndrome do Triplo-X fêmea. Estabeleceu-se nessa época que, embora as síndromes de Klinefelter e Triplo-X ocorram em pessoas com intelecto normal, elas são proporcionalmente mais frequentes em indivíduos com DI, evidenciando a presença de genes no cromossomo X relacionados com a inteligência. Essas descobertas empolgaram os citogeneticistas de todo o mundo que começaram a selecionar indivíduos com doenças congênitas para a investigação de aberrações cromossômicas, contribuindo significativamente para a elucidação da etiologia de doenças humanas (BROWN, 1968).

Desde então, uma grande quantidade de estudos vinculando rearranjos cromossômicos não equilibrados a fenótipos clínicos de indivíduos com DI foram compilados (SCHINZEL, 2001), já que, além da DI, as desordens cromossômicas podem estar associadas, na maioria das vezes, a problemas no crescimento, a um grande número de anomalias menores, como dismorfias faciais e não faciais, e a outras malformações (GUITART-FEILIUBADALÓ et al., 2006).

Segundo Rauch et al. (2006), as anomalias cromossômicas são responsáveis por aproximadamente 29% dos casos de DI, sendo que 15,8% dessas alterações são microscopicamente visíveis e detectáveis no exame citogenético convencional, enquanto o restante corresponde a anomalias cromossômicas crípticas, incluindo síndromes de microdeleção (5,3%), desordens subteloméricas (1,3%) e alterações submicroscópicas detectadas por *array*-CGH (6,6%) (Figura 1). Infere-se que desequilíbrios cromossômicos sejam responsáveis por 30 a 40% dos casos de DI moderada a grave e 10 a 20% dos casos de DI leve (FLINT et al., 1995; KNIGHT et al., 1999).

No entanto, é difícil estabelecer a verdadeira estimativa da contribuição das alterações cromossômicas para a DI em razão da variabilidade nos parâmetros, tanto de seleção dos casos clínicos, quanto da sensibilidade das técnicas empregadas (HOCHSTENBACH et al., 2009).



**Figura 1** - Visão geral da distribuição de várias causas etiológicas, agrupadas em categorias diagnósticas, identificadas no grupo de pacientes com DI (n = 670). A contribuição das técnicas de *array* foi calculada a partir dos 10% de aberrações detectadas por *array*-CGH de alta resolução, após a exclusão de pacientes com microalterações identificadas clinicamente ou por triagem subtelomérica. ACS, aneussomias cromossômicas segmentares (incluindo aquelas constatadas no primeiro e segundo cariótipo); Trissomias em mosaico, tecidos mosaicos não identificados em hemocultura. Equilibradas, alterações equilibradas *de novo* detectadas por cariótipo convencional ou FISH com sondas subteloméricas. Síndromes de microdeleção, síndromes clinicamente reconhecíveis diagnosticadas através da análise de FISH locus-específico (DiGeorge, Williams-Beuren, etc.). Monogênicas, doenças monogênicas decorrentes de mutações; Mendelianas, doenças não classificadas que apresentam evidências de herança mendeliana através da genealogia ou padrões de inativação do X. Síndromes, síndromes clinicamente reconhecidas sem etiologia conhecida. UDP, dissomia uniparental (Adaptado de Rauch et al., 2006).

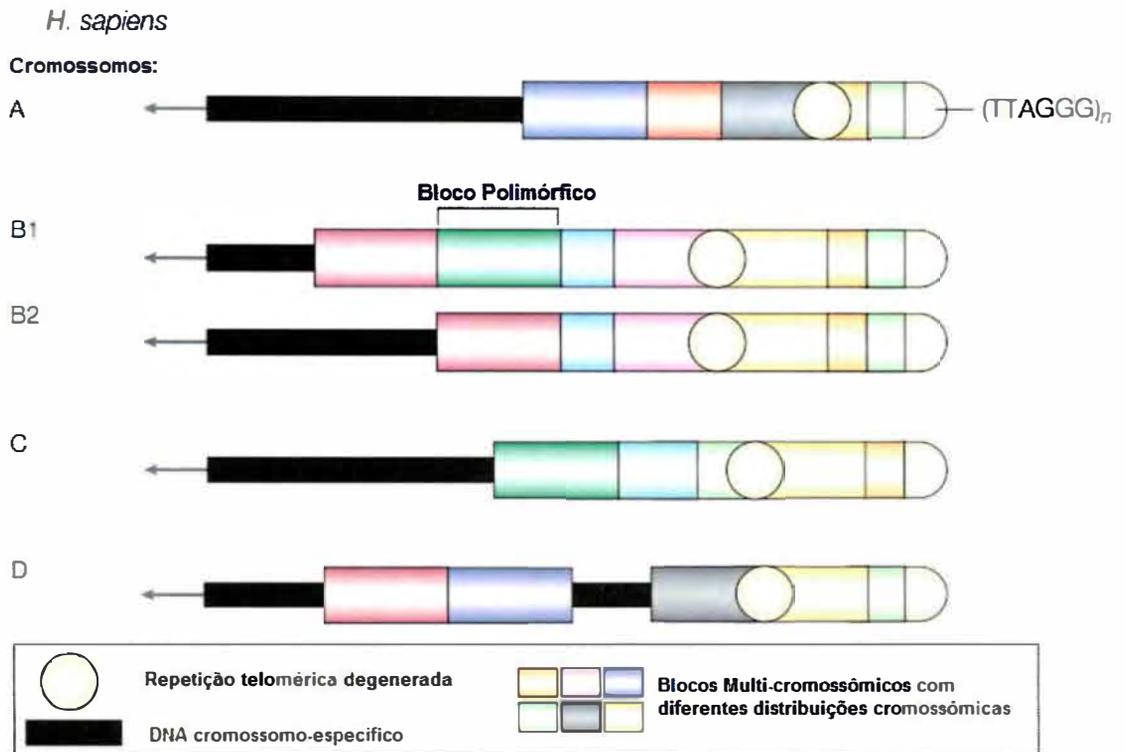
A identificação precoce de uma etiologia com base cromossômica é de grande importância tanto para o paciente como para seus familiares. Inicialmente, ela irá proporcionar opções de tratamento adequadas permitindo o rastreamento pré-sintomático de complicações que estão associados com a doença. Seguidamente, um prognóstico a curto e longo prazo pode ser inferido, possibilitando outras formas de assistência, além da educativa. Depois, é possível realizar uma avaliação do risco de recorrência no contexto do aconselhamento reprodutivo, podendo tornar disponível a identificação do portador, bem como o diagnóstico pré-natal. Posteriormente, a família pode ser encaminhada á serviços médicos e sociais adequados, além de grupos de apoio. Finalmente, o reconhecimento da etiologia evitará, não apenas gastos dispendiosos, mas também o consumo de tempo considerável com testes adicionais desnecessários (HOCHSTENBACH et al., 2009).

## 1.4 Regiões Subteloméricas

Os telômeros são constituídos por hexâmeros ricos em TG, (TTAGGG)<sub>n</sub>, repetido centenas a milhares de vezes. Próximo a essas repetições situam-se as regiões subteloméricas, formadas por famílias complexas de sequências de DNA repetitivo. A homologia entre as regiões subteloméricas de cromossomos não homólogos facilita a troca de material genético entre diferentes cromossomos durante a meiose, resultando assim, em rearranjos subteloméricos e, conseqüentemente, em um desequilíbrio na dosagem gênica de cada cromossomo envolvido (MEFFORD; TRASK 2002).

As regiões subteloméricas são definidas operacionalmente como a porção correspondente aos 500 kilobases (kb) de eucromatina terminais de cada braço cromossômico, uma vez que essa parte é conhecida por compreender quase todas as repetições subteloméricas previamente caracterizadas (MACINA et al., 1995). Os subtelômeros são constituídos por um mosaico de sequências parálogas compostas por repetições associadas aos telômeros (*Telomere-Associated Repeats* - TAR), repetições subteloméricas (Srpts) e duplicações segmentares ou *duplicons* subteloméricos, decorrentes de translocações recentes promovidas predominantemente por ligação de pontas não homólogas (*Non-homologous End-Joining* - NHEJ) (LINARDOPOULOU et al., 2005). *Duplicons* subteloméricos constituem 25% do segmento distal de 500 kb e 80% da sequência de 100 kb adjacente aos telômeros (AMBROSINI et al., 2007).

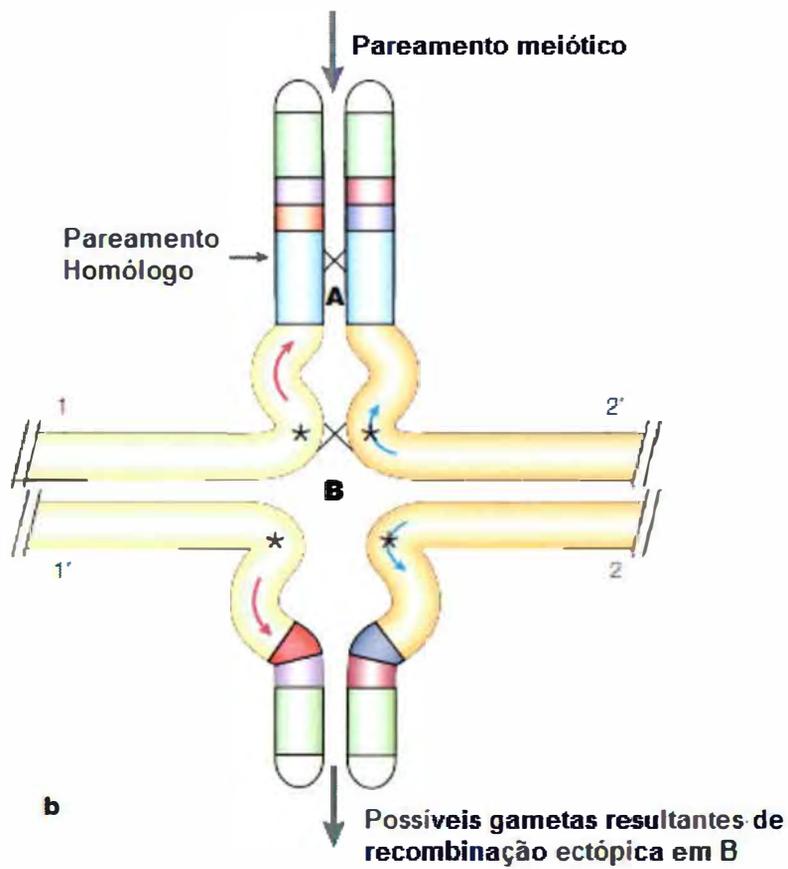
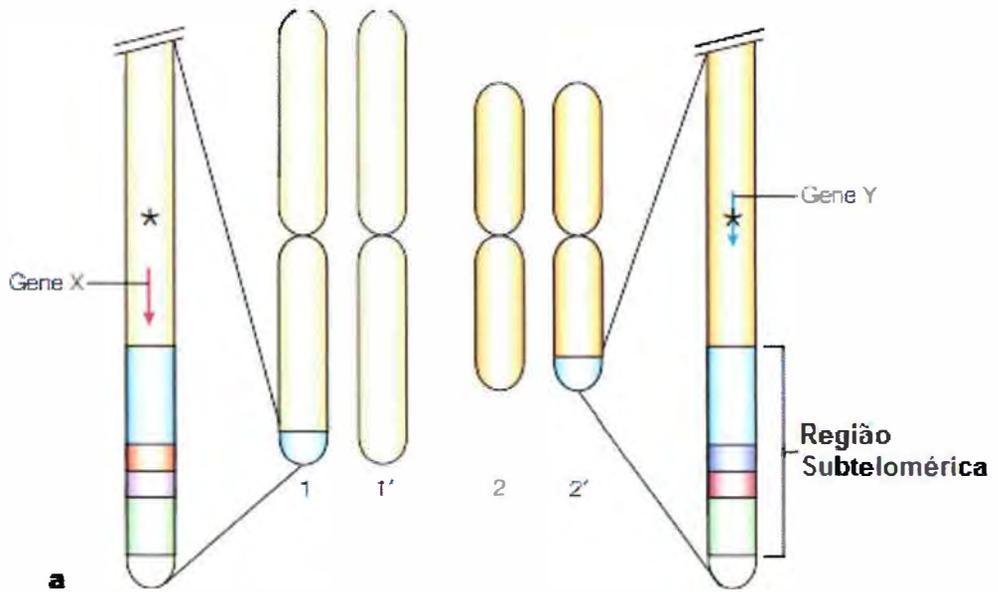
A arquitetura de cada subtelômero é determinada pelo conteúdo e organização das duplicações segmentares (AMBROSINI et al., 2007). Grandes variações nas regiões de DNA subtelomérico foram detectadas em muitos telômeros humanos. Os "menores" alelos podem diferenciar-se dos "maiores" alelos em centenas de kb, levando a enormes disparidades alélicas no conteúdo da sequência de DNA subtelomérico e, conseqüentemente, na separação de genes de cópia-única nas extensões terminais (TTAGGG)<sub>n</sub> (RIETHMAN et al., 2005). Segundo Linardopoulou et al. (2005), os subtelômeros alélicos podem variar enormemente devido ao conteúdo e disposição dos *duplicons*, enquanto subtelômeros não alélicos podem compartilhar até mais que 100 kb de contínua identidade de sequência (Figura 2).

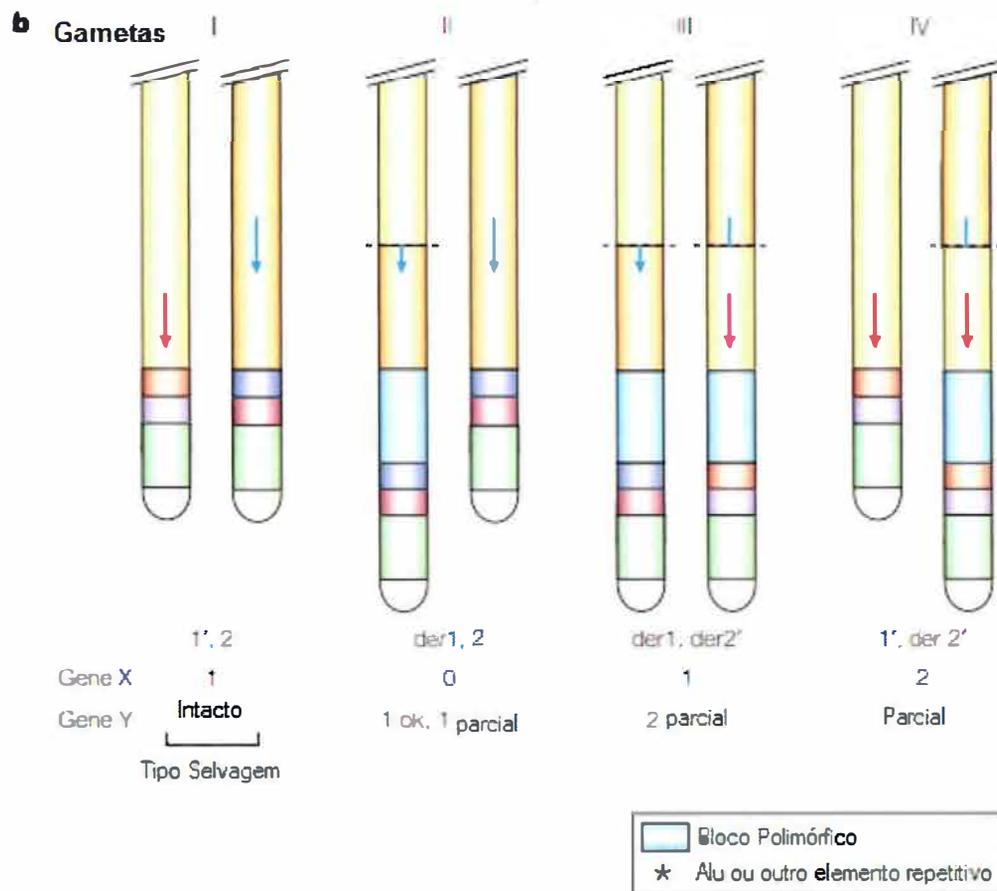


**Figura 2** - Estruturas subteloômicas de *Homo sapiens*. Cromossomo A representando um modelo de organização subteloômica proposto por Flint e al. (1997). Outras estruturas subteloômicas são exibidas nos cromossomos B, C e D. B1 e B2 representam cromossomos homólogos que diferem muito no conteúdo subteloômico (Adaptado de Mefford; Trask, 2002).

Essas grandes disparidades alélicas, vistas no conteúdo e na organização de sequências de DNA subteloômico, são postuladas a ter um impacto na dosagem de transcritos incorporados dentro das sequências repetidas, na transcrição de genes em regiões adjacentes ao DNA de cópia única e na estrutura da cromatina ao mediar funções teloméricas, incluindo estabilidade cromossômica (RIETHMAN et al., 2005).

A estrutura molecular e a alta frequência de recombinações das regiões teloméricas são fatores que predispõem a ocorrência de tais rearranjos (SACCONE et al., 1992; BROWN et al., 2001). Dessa forma, rearranjos envolvendo os telômeros podem originar graves consequências fenotípicas devido a alta concentração de genes nesses pontos, incluindo um grande número de genes candidatos relacionados a síndromes genéticas conhecidas (ALTHERR et al., 1991; KUWANO et al., 1991; SACCONE et al., 1992; KNIGHT; FLINT, 2000) (Figura 3).





**Figura 3** - Subtelômeros e rearranjos cromossômicos. a) A extensa homologia entre subtelômeros de diferentes cromossomos, juntamente com grandes diferenças no conteúdo subtelomérico entre cromossomos homólogos podem levar a um *mispairing* de cromossomos durante a meiose. Sem recombinação ectópica, os gametas recebem um complemento equilibrado (1 ou 1' e 2 ou 2'). Na recombinação ectópica entre os blocos homólogos, como no bloco azul em A, os gametas recebem um complemento cromossômico equilibrado, entretanto variantes da sequência subtelomérica são transferidas entre diferentes cromossomos. Se um *crossover* ocorrer próximo a região subtelomérica, um complemento não equilibrado será transferido para três de quatro gametas. Aqui, o bloco azul medeia o pareamento homólogo, ocorrendo um *crossover* desigual em B através de dois elementos *Alu* incorporados em DNA de cópia-única cromossomo-específico. Em B, o *crossover* ocorre próximo ao gene *X* no cromossomo 1 e em um íntron do gene *Y* no cromossoma 2'. b) Os quatro resultados possíveis de um evento como esse são mostrados. Apenas gametas I apresentam complemento equilibrado intacto. Os outros três gametas possuem número anômalo de cópias do gene *X* e/ou cópia descontínua do gene *Y*, podendo resultar em fenótipo clínico. der, cromossomo derivado resultante de translocação.

Uma série de trabalhos populacionais foi realizada com o propósito de estipular a real frequência de desordens cromossômicas subteloméricas na população de indivíduos com DI idiopática, principalmente nos casos associados à dismorfias. Entretanto, a inconsistência da seleção clínica revelou uma grande variação entre os resultados obtidos (ROSSI et al., 2001; FAN et al., 2001; JOYCE et al., 2001; RIEGEL et al., 2001), demonstrando assim, a importância de uma pré-seleção clínica eficaz, devido principalmente aos altos custos e a complexidade das técnicas utilizadas.

Em vista disso, de Vries et al. (2001) desenvolveram um *checklist* fundamentado nas características fenotípicas comuns observadas em indivíduos com DI e alterações subteloméricas, com o intuito de auxiliar na pré-seleção de casos suspeitos de terem tais anomalias. Os cinco itens listados pelos autores foram: 1) história familiar de DI; 2) déficit de crescimento intrauterino; 3) anomalias no crescimento pós-natal; 4) duas ou mais características dismórficas faciais; 5) uma ou mais características dismórficas não faciais e/ou anomalias congênitas. Segundo de Vries et al. (2001), para a inclusão de um indivíduo em uma triagem de alterações subteloméricas, o mesmo deve somar três ou mais pontos no *checklist* (Tabela 1).

**Tabela 1** - *Checklist* clínico aplicado em indivíduos com suspeita de alterações subteloméricas.

<b>Itens</b>	<b>Pontuação</b>
<b>1. História familiar de DI</b>	
Compatibilidade com Herança Mendeliana	1
Incompatibilidade com Herança Mendeliana (incluindo fenótipos discordantes)	2
<b>2. Déficit de crescimento intrauterino</b>	2
<b>3. Anomalias no crescimento pós-natal</b>	Máximo 2 pontos
Para cada um dos itens abaixo marque 1 ponto. Baixa estatura, Alta estatura, Microcefalia, Macrocefalia	
<b>4. Duas ou mais características faciais dismórficas</b>	2
Especialmente Hipertelorismo ocular, Anomalias nasais, Anomalias de orelhas	
<b>5. Uma ou mais dismorfias não faciais e anomalias congênitas</b>	Máximo 2 pontos
Para cada um dos itens abaixo marque 1 ponto. Especialmente Hipospádias e/ou criptorquidismo, Anomalias de mãos, Anomalias cardíacas	

Adaptado de de Vries et al. (2001). DI: Deficiência Intelectual

Os resultados encontrados pelos autores sugerem que o déficit de crescimento pré-natal e um histórico familiar de DI, juntamente com a presença de características fenotípicas sugestivas de cromossomopatia, são bons indicativos de alterações subtelo méricas e devem ser empregadas na seleção de pacientes com DI (DE VRIES et al., 2001). Embora de Vries et al. (2001) tenham desenvolvido o *checklist* com o objetivo de selecionar indivíduos com DI suspeitos de apresentarem anomalias subtelo méricas, os critérios mostraram-se aplicáveis também na triagem para análise de alterações cromossômicas crípticas, tanto subtelo méricas quanto intersticiais, através de técnicas de *microarray* (DE VRIES et al., 2003).

Atualmente, os principais desafios incluem a descoberta da verdadeira extensão e natureza das estruturas subtelo méricas e das variações no número de cópias (*Copy Number Variations*-CNVs) de segmentos genômicos, bem como o desenvolvimento de métodos para rastrear variações alélicas individuais no contexto de DNA genômico total (RIETHMAN, 2008).

### **1.5 DI e alterações cromossômicas subtelo méricas crípticas**

Por mais de 50 anos, o cariótipo através de bandamento G tem sido um método eficaz para detectar a presença de anomalias cromossômicas. Entretanto, essa técnica possui uma resolução limitada, sendo capaz de identificar alterações cromossômicas maiores que 5 a 10 megabases (Mb) de DNA em resoluções que variam de 400 a 550 bandas por conjunto haplóide (ISCN, 2005; KRIEK et al., 2007; HOCHSTENBACH et al., 2009). Portanto, a qualidade do exame citogenético é de fundamental importância, visto que, quanto mais criteriosa for a análise de um cromossomo, menor será a necessidade da utilização de outros testes moleculares para a detecção de anomalias cromossômicas (FLINT; KNIGHT, 2003; BONAGLIA et al., 2005).

Dependendo da indicação clínica, pequenas alterações cromossômicas localizadas em regiões específicas precisam ser melhores visualizadas, necessitando do emprego de um padrão de bandas mais alongado (CURRY et al., 1997; JACKSON, 2002). Para isso, utiliza-se o exame citogenético de alta resolução, considerado apto para identificar alterações cromossômicas maiores que 2 Mb de DNA com uma resolução de 650 a 850 bandas (JACKSON, 2002; ISCN, 2005). Muitas vezes, técnicas de citogenética molecular devem ser aplicadas juntamente com o exame cariotípico de alta resolução, visto que desequilíbrios cromossômicos com extensão de 1 a 2 Mb de DNA não são detectáveis por cariótipo, nem mesmo o de alta resolução (JACKSON, 2002).

Em 1992, Ledbetter (1992) especulou sobre a importância das alterações cromossômicas subteloméricas crípticas na etiologia das malformações congênitas múltiplas e da DI. Tal raciocínio foi fundamentado no reconhecimento de uma arquitetura genômica complexa dessas regiões que, associada a altas taxas de recombinação meiótica desses *loci* e a elevadas taxas de concentração gênica nas bandas distais, poderiam contribuir para a formação de desequilíbrios cromossômicos patogênicos.

Seguidamente, Wilkie (1993) publicou o primeiro estudo sobre anomalias subteloméricas crípticas em indivíduos com DI idiopática através de uma técnica em que polimorfismos presentes em regiões hipervariáveis do DNA, no caso, o número variável de repetições em *tandem* (VNTRs, *Variable Number of Tandem Repeats*), foram detectado por sondas. Dois anos depois, Flint et al. (1995) empregaram esse mesmo método para analisar 28 regiões subteloméricas de 99 indivíduos com DI. Após identificarem 03 alterações *de novo*, confirmadas por FISH, os autores sugeriram que anomalias subteloméricas são responsáveis por aproximadamente 6% dos casos de DI idiopática, tornando-as um importante meio para a caracterização das bases genéticas do neurodesenvolvimento.

Apesar dos trabalhos de Wilkie (1993) e Flint et al. (1995) demonstrarem que anomalias cromossômicas subteloméricas contribuem significativamente para a etiologia da DI, a metodologia utilizada apresentou-se muito complexa para ser empregada como rotina diagnóstica. Além disso, os dados em relação à frequência das alterações subteloméricas foram inconclusivos devido à baixa sensibilidade e especificidade do teste e pelo pequeno tamanho da amostra.

Em 1999, Knight et al. (1999) desenvolveram uma nova metodologia, que possibilitou a análise simultânea das regiões subteloméricas de cada cromossomo, utilizando um conjunto de sondas com cerca de 100% de sensibilidade e especificidade. Após a análise de 284 crianças com DI grave e 182 com DI leve, as frequências de anomalias subteloméricas encontradas foram 7,4% e 0,5%, respectivamente. Segundo os autores, o estudo de desequilíbrios subteloméricos crípticos em pacientes com DI idiopática é fundamental para a compreensão da patogênese dessa condição e para o manejo clínico dos indivíduos afetados.

Pouco tempo depois, Aderlid et al. (2002) empregaram FISH com sondas subteloméricas para investigar alterações crípticas em 111 indivíduos com DI idiopática e fenótipo altamente sugestivo de desordem cromossômica. Foram encontradas 09 (8,2%) anomalias subteloméricas, incluindo 05 deleções *de novo* e 04 translocações não equilibradas (uma *de novo* e 03 herdadas de pais com translocações equilibradas). Segundo os autores, a identificação de anomalias cromossômicas em indivíduos da mesma família é de grande

importância, principalmente no aconselhamento genético e nos exames pré-natais. Barocini et al. (2005) também utilizaram FISH para investigar anomalias subteloméricas em 219 pacientes com DI idiopática. Os autores encontraram 12 (5,5%) dessas alterações (06 deleções *de novo* e 06 translocações não equilibradas de origem indeterminada). A grande maioria dos indivíduos com alterações subteloméricas encontrada nesse estudo apresentou DI de grau moderado a grave (91,7%). Conforme Barocini et al. (2005), tais resultados mostram que a coleta de dados clínicos dos pacientes positivos pode ajudar a delinear o fenótipo relacionado a uma alteração subtelomérica específica, além de adaptar os cuidados de saúde às necessidades particulares desses pacientes.

Ainda assim, as características clínicas de um indivíduo, mesmo ele apresentando cariótipo normal, podem sugerir regiões específicas a serem investigadas por FISH através de sondas próprias para os *loci* de interesse (BOCIAN et al., 2004). Algumas síndromes genéticas, tais como síndrome de deleção 1p36 e síndrome de DiGeorge (deleção 22q11), são exemplos de síndromes que podem ser clinicamente reconhecidas devido a combinação de características clínicas faciais conhecidas como “*gestalt*” (DE VRIES et al., 2001). Em 2010, Bogdanowicz et al. (2010) investigaram 76 indivíduos com DI e características dismórficas, suspeitos de possuírem alterações subteloméricas. Após a realização do FISH, os autores identificaram 04 desequilíbrios subteloméricos (5,3%) clinicamente relevantes, incluindo 03 casos de deleção subtelomérica 1p36 e uma translocação não equilibrada *de novo* entre os cromossomos 19 e 22.

Apesar de FISH detectar anomalias subteloméricas em pacientes com DI e características dismórficas com frequência significativa de aproximadamente 6% (FLINT et al., 1995; BIESECKER, 2002), essa técnica é considerada por muitos autores como inadequada para a detecção de duplicações submicroscópicas sequenciais e deleção de pequenos éxons (DE VRIES et al., 2003). Para tal propósito, metodologias quantitativas mais sensíveis como MLPA, PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e *array*-CGH, têm demonstrado serem mais apropriadas (BOEHM et al., 2004; MADRIGAL et al., 2007; CHRISTOFOLINI et al., 2010). O uso dessas metodologias no estudo de regiões subteloméricas contribui fornecendo novos dados sobre a incidência de alterações subteloméricas na população em geral, assim como as relações dessas anomalias com a DI (MADRIGAL et al., 2007).

Em 2002, Schouten et al. (2002) descreveram um método para a quantificação relativa de 40 diferentes sequências de DNA utilizando apenas 20 nanogramas (ng) de DNA humano. Aplicações dessa técnica, denominada *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

(MLPA), demonstraram sua capacidade para identificar deleções e duplicações de éxons de genes humanos (*BRCA1*, *MSH2*, *MLH1*); trissomias; caracterização de aberrações cromossômicas em linhagens celulares e amostras de tumores; além de localizar mutações de polimorfismos de cópia única. No MLPA não são as amostras de ácido nucleico, mas sim, as sondas adicionadas a essas amostras que são amplificadas e quantificadas. A amplificação das sondas por PCR depende da presença da sequência-alvo dessa sonda na amostra. Cada sonda consiste de dois oligonucleotídeos que hibridam aos sítios adjacentes da sequência-alvo. Após a hibridação dessas sondas, as mesmas se ligam possibilitando uma posterior amplificação. Todas as sondas ligadas possuem sequências finais idênticas, o que permite uma amplificação simultânea por PCR utilizando apenas um par de *primer*. Devido a presença da sequência *stuffer* em um dos oligos que formam a sonda, é produzido um produto de amplificação de tamanho único, entre 130 a 480 pares de bases (pb). Após a separação por eletroforese em gel capilar, os produtos de amplificação podem ser analisados de acordo com a área ou altura do pico de cada produto de amplificação, refletindo assim o número de cópias relativas da sequência-alvo. Dessa forma, deleções e duplicações existentes nas sequências localizadas no final dos cromossomos podem ser facilmente identificadas (SCHOUTEN et al., 2002).

A capacidade diagnóstica do MLPA foi confirmada por Rooms et al. (2004) que aplicaram essa técnica para investigar a presença de anomalias subteloméricas em 75 indivíduos afetados por DI. Foram encontradas 04 (5,3%) deleções subteloméricas, todas confirmadas por FISH. Segundo os autores, esse estudo demonstrou que o MLPA é um método de investigação rápido e seguro, sendo adequado para uso no diagnóstico de rotina. Koolen et al. (2004) avaliaram 210 indivíduos com DI idiopática através de MLPA e FISH e encontraram 09 (4,3%) desequilíbrios subteloméricos clinicamente relevantes, incluindo 07 alterações *de novo* e duas duplicações herdadas de pais similarmente afetados. A técnica de FISH confirmou todas as deleções *de novo*, mas não foi capaz de identificar nenhuma das deleções herdadas, talvez porque essas alterações familiares podem apresentar pequenos polimorfismos genômicos incapazes de serem detectados pelas sondas utilizadas. Quanto às duplicações, três delas não foram detectadas por FISH, possivelmente por estarem localizadas muito próximas uma das outras no genoma. Segundo os autores, o MLPA é um método confiável para detectar alterações subteloméricas, além de revelar duplicações subteloméricas que algumas vezes não foram identificadas por FISH.

Com o objetivo de aumentar a taxa de detecção de diagnóstico de alterações subteloméricas crípticas introduzindo uma única técnica molecular, Stegmann et al. (2008) empregaram a técnica de MLPA em pacientes com DI idiopática, com ou sem anomalias

congênitas. A princípio, os 466 indivíduos foram examinados através de cariótipo e FISH, sendo detectadas 39 (8,3%) anomalias cromossômicas. Em seguida, com a adição dos kits de MLPA P036 e P070, foram encontradas mais 18 (3,9%) alterações, totalizando 57 desequilíbrios cromossômicos. Observa-se que a taxa de detecção de alterações cromossômicas passou de 8,3% (sem MLPA) para 12,2% (com MLPA), representando um aumento de 46%. Conforme os autores, a aplicação do exame de MLPA como rotina em laboratórios de citogenética, possibilita um aumento significativo na obtenção de diagnósticos. Também utilizando os kits de MLPA P036 e P070, Hila et al. (2009) analisaram 29 indivíduos com DI idiopática, sendo que 03 (10,3%) deles apresentaram alterações subteloméricas.

Em 2010, Madrigal et al. (2010) investigaram através da técnica de MLPA a presença de alterações subteloméricas crípticas em 300 indivíduos com DI idiopática. Os autores encontraram 14 (4,7%) anomalias clinicamente relevantes. Estudo semelhante foi realizado por Vérdu-Pérez et al. (2011) que analisaram 200 pacientes com DI/ADNPM idiopático utilizando os kits de MLPA P036 e P070 para regiões subteloméricas. Os autores detectaram 09 (4,5%) alterações subteloméricas patogênicas, 08 delas ocorreram *de novo* enquanto a outra resultou de uma translocação equilibrada em um dos pais. Mundhofir et al. (2013) analisaram 436 indivíduos com DI idiopática através da técnica de MLPA com os kits P036 e P070. Os autores identificaram alterações subteloméricas em 16 pacientes, representando 3,7% dos indivíduos estudados.

Recentemente, Medina et al. (2014) estudaram um grupo de 119 indivíduos com DI idiopática que, após serem submetidos a exames físicos completos e avaliações para descartar outras etiologias da DI, foram selecionados para a investigação de anomalias subteloméricas crípticas. Após o emprego da técnica de MLPA com os kits P036 e P070, os autores identificaram alterações subteloméricas fenotipicamente relevantes em 05 (4,2%) indivíduos.

Portanto, considera-se que a prevalência de alterações subteloméricas patogênicas em indivíduos com DI idiopática seja de aproximadamente 5% (KOOLEN et al., 2004). Entretanto, a frequência de alterações subteloméricas crípticas detectadas por MLPA em indivíduos com DI idiopática varia de 3,7% a 10,3% (HILA et al. 2009; MUNDHOFIR et al., 2013), sendo que essa disparidade pode ser atribuída a diferentes estratégias na seleção de pacientes e aos diferentes padrões de qualidade tanto da avaliação clínica pré-seleção como do cariótipo convencional (RAUCH et al., 2006).

Por fim, uma alteração cromossômica subtelomérica só deve ser determinada como causa da DI se ela estiver presente em outros pacientes com fenótipos semelhantes, quer

dentro da mesma família ou em casos não relacionados (DE VRIES et al., 2003; FLINT; KNIGHT, 2003). Isso porque, polimorfismos subteloméricos comuns (não patogênicos) com variação de comprimento de até 100 kb estão presentes em aproximadamente 1% da população (LEDBETTER; MARTIN, 2007). Dessa forma, tanto para o aconselhamento genético como para melhor entender como determinadas anomalias cromossômicas subteloméricas medeiam os efeitos fenotípicos, é muito importante relatar a detecção dessas alterações, mesmo quando elas são consideradas prováveis polimorfismos neutros (HENGSTSCHLÄGER et al., 2005).

### **1.6 DI e síndromes de microdeleção/microduplicação comuns**

A DI pode estar relacionada a uma proporção substancial de síndromes causadas por microdeleções/microduplicações de pequenos segmentos cromossômicos, sejam eles subteloméricos ou intersticiais. Semelhante as alterações subteloméricas, as anomalias cromossômicas intersticiais surgem da interação entre duplicações segmentares cromossomo-específicas, tornando determinadas regiões cromossômicas particularmente propensas a formação de rearranjos estruturais, e também através de recombinações homólogas não-alélicas desalinhasadas que podem causar desequilíbrios das sequências intervenientes (SHAW; LUPSKI, 2004).

Embora algumas das microdeleção/microduplicação resultem em um fenótipo específico, possibilitando assim um diagnóstico clínico, um número de portadores de síndromes bem conhecidas não é de fato diagnosticado, sendo necessária a aplicação de técnicas mais apuradas. Uma delas é o MLPA, capaz de detectar também microdeleções e/ou microduplicações cromossômicas intersticiais responsáveis por várias síndromes genéticas, como as síndromes de Prader Willi/Angelman, DiGeorge, Rubinstein-Taybi, Miller-Dieker e Smith-Magenis (SELLNER; TAYLOR, 2004; RUSU et al., 2007).

Com o objetivo de investigar alterações cromossômicas crípticas relacionadas a DI, Kirchoff et al. (2005) examinaram 258 indivíduos através da técnica de MLPA, utilizando primeiramente os kits P036 e P070 para regiões subteloméricas. Os autores identificaram 13 (5%) anomalias subteloméricas. Depois, Kirchoff et al. (2007) reanalisaram os 258 indivíduos utilizando os kits P023 e P064, específicos para síndromes de microdeleção comuns. Foram encontradas mais 15 (5,8%) alterações cromossômicas: 10 deleções, envolvendo as regiões 1p36, 5q35, 7q11, 17p11, 15q11 e 22q11; e 05 duplicações detectadas nas regiões 5q35, 7q11, 17p13, 17p11 e 22q11. Dessa forma, a associação de diferentes kits

de MLPA permitiu um aumento na taxa de detecção de alterações cromossômicas crípticas, que passou a ser 10,1%. Ahn et al. (2008) utilizaram dois kits de MLPA (um com sondas subtelo méricas e o outro com sondas para *loci* de síndromes de microdeleções comuns) para pesquisar a presença de anomalias cromossômicas crípticas em indivíduos com DI idiopática. Dos 403 pacientes analisados, 321 foram testados com ambos os kits, 75 apenas com o kit subtelo mérico e 07 com o kit para microdeleções. Foram encontradas 29 anomalias cromossômicas crípticas: 22 detectadas pelo kit para regiões subtelo méricas e 07 identificadas pelo kit de microdeleções comuns. De acordo com os autores, além de o MLPA ser um método relativamente rápido e barato, a associação de diferentes kits pode fornecer um maior número de diagnósticos.

Em um trabalho atual, Boggula et al. (2014) examinaram 203 indivíduos com DI por meio de quatro kits de MLPA, dois para regiões subtelo méricas (P036 e P070), um para síndromes de microdeleção (P245) e o outro para o cromossomo X (DI ligada ao X) (P106). A taxa de detecção total encontrada foi de 9,3% (19/203), sendo 14 (6,9%) alterações identificadas apenas pelo kit P245 e 5 (2,4%) anomalias detectadas somente pelos kits P036 e P070. Nenhuma alteração foi detectada com o kit P106. Os autores afirmam que o uso de kits com sondas para regiões subtelo méricas associados a kits para síndromes de microdeleção proporcionam um bom rendimento diagnóstico.

Embora o MLPA não seja capaz de analisar todo o genoma, como as técnicas de *microarrays*, ele é um importante método para a avaliação de casos com DI devido a sua relativa facilidade de uso e baixo custo (BOGGULA et al., 2014).

### **1.7 Array-CGH e alterações cromossômicas crípticas**

O *array-CGH* (*array-Comparative Genomic Hybridization*) é capaz de identificar ganhos e/ou perdas cromossômicas em todo o genoma, através da análise de relação semiquantitativa, comparando o DNA do paciente ao DNA referência simultaneamente hibridados às sondas imobilizadas na lâmina. Essa metodologia oferece uma rápida análise de todo o genoma em alta resolução, sendo que a informação fornecida está diretamente ligada ao mapa físico e genético do genoma humano (KOOLEN et al., 2004). Assim, o *array-CGH* é uma poderosa ferramenta para detectar desequilíbrios cromossômicos crípticos e é utilizado na investigação, ao longo de todo o genoma, de alterações cromossômicas em indivíduos com DI. O *array-CGH* é capaz de detectar alterações genômicas em até 25% dos pacientes com DI idiopática (HOCHSTENBACH et al., 2011).

Shaw-Smith et al. (2004) analisaram 50 indivíduos com DI idiopática através de *array*-CGH com resolução média de 1 Mb. A seleção dos pacientes foi realizada com base na presença de pelo menos um dos seguintes critérios: história familiar de DI, crescimento anormal, distúrbios comportamentais, convulsões, dismorfias, e evidência radiológica de anomalias no cérebro, tronco ou membros. Os autores identificaram 12 (24%) alterações submicroscópicas: 07 deleções (06 originadas *de novo* e uma herdada do pai normal) e 05 duplicações (uma de origem *de novo* e 04 herdadas de pais normais), detectando uma taxa de alterações cromossômicas crípticas clinicamente relevantes de 14,0%. Rosenberg et al. (2006) aplicaram a técnica de *array*-CGH, com resolução aproximada de 1 Mb, em 81 indivíduos com DI idiopática associada a dismorfias faciais e outras anomalias congênitas. Alterações genômicas foram encontradas em 20 (25%) pacientes, 13 (16%) deles com desequilíbrios cromossômicos provavelmente relacionados às suas características clínicas. O significado clínico das 07 alterações remanescentes não pôde ser determinado. Segundo os autores, a capacidade limitada para diferenciar entre CNVs herdadas que causam fenótipos anômalos e variantes raras não relacionadas à alterações clínicas constitui uma barreira no uso do *array*-CGH para orientar o aconselhamento genético.

A técnica de *array*-CGH com resolução aproximada de 1 MB também foi empregada para investigar 41 indivíduos com DI idiopática e fenótipo altamente sugestivos de desordens de origem cromossômica. Todos os pacientes realizaram exame citogenético clássico, 30 foram analisados por FISH para investigar anomalias subteloméricas e 11 foram examinados por SKY, porém, nenhuma alteração cromossômica foi identificada. O exame de *array*-CGH revelou 04 (9,8%) deleções intersticiais *de novo*. De acordo com os autores, o *array*-CGH é uma importante ferramenta para o estudo de desequilíbrios cromossômicos crípticos, pois, além de aumentar significativamente a taxa de detecção de alterações genômicas em indivíduos com DI, é possível identificar genes envolvidos na DI, contribuindo com o conhecimento do genoma humano através da correlação genótipo/fenótipo (SCHOUMANS et al., 2005).

No estudo de Stoeva et al. (2008), foram comparados três métodos utilizados na detecção de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos com DI idiopática. As frequências de desequilíbrios cromossômicos identificados através de FISH subtelomérico, MLPA e *array*-CGH foram: 15,8% (3/19); 10,6% (5/47); e 30,4% (7/23), respectivamente. As 07 alterações detectadas por *array*-CGH foram consideradas patogênicas. Os autores sugerem que o *array*-CGH é uma técnica confiável e com maior rendimento diagnóstico. Siggberg et al. (2010) analisaram 150 indivíduos com DI idiopática através da técnica de *array*-CGH com

plataforma de oligonucleotídeos de alta resolução (43 kilobases). Alterações cromossômicas crípticas consideradas clinicamente relevantes foram encontradas em 28 pacientes, apresentando uma taxa de detecção de 18,6%. Iourov et al. (2012) utilizaram uma plataforma de *array*-CGH com resolução de 0,3 a 1 Mb para investigar a presença de desequilíbrios cromossômicos crípticos em 54 indivíduos com DI idiopática altamente selecionados de acordo com critério clínico e molecular e dados citogenéticos. CNVs clinicamente relevantes foram identificadas em 15 (28%) pacientes, totalizando 26 anomalias genômicas patogênicas. Segundo os autores, é provável que a alta prevalência de alterações genômicas encontrada seja resultado do criterioso processo de seleção realizado pelos pesquisadores.

A evolução dos modelos de *microarrays* permite cada vez mais uma melhor resolução, possibilitando assim, um aumento no rendimento diagnóstico genético-clínico através do *array*-CGH. Inicialmente, os *arrays* eram constituídos por clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) e sondas para regiões específicas, ou por clones com cerca de 1 Mb de intervalo cobrindo todo o genoma, estabelecendo um diagnóstico genético-clínico em 7 a 11% dos indivíduos com DI e cariótipo normal (ARADHYA;CHERRY, 2007). Logo, versões subsequentes de *microarrays* incluíram sondas adicionais “*backbone*”, permitindo a detecção de desequilíbrios genômicos patogênicos além das regiões bem conhecidas. Em seguida, um rápido aumento na disponibilidade de *arrays* com densidade suficiente para permitir a detecção de variações no número de cópias de aproximadamente 100 kilobases (kb) elevou o rendimento diagnóstico para 11% a 15%, com base em estudos de pacientes com DI que apresentaram cariótipo normal (MILLER et al., 2010).

Quanto maior a resolução da plataforma de *array*-CGH, maior a detecção de anomalias genômicas e melhor delineamento desses desequilíbrios. Entretanto, com o aumento da resolução dos *arrays* mais dados são gerados, tornando a interpretação dos resultados cada vez mais desafiadora (SIGGBERG et al., 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando a DI como um problema de saúde pública, ligado ao planejamento familiar, e que o avanço científico permite estabelecer o diagnóstico clínico e etiológico na maioria dos casos de DI, está sendo realizado um trabalho de estudo da etiologia dessa condição em nossa região. Este estudo inclui as APAEs das cidades de Altinópolis, Serrana e Limeira, todas localizadas no Estado de São Paulo. Após ampla avaliação clínico-genética, de exames complementares e de métodos laboratoriais clássicos de genética, tais como citogenética e erros inatos do metabolismo, neste projeto específico estão sendo introduzidas neste estudo as novas técnicas de citogenética molecular, MLPA e *array*-CGH, com o intuito de pesquisar a etiologia cromossômica da DI em indivíduos frequentadores dessas APAEs.

Técnicas citogenéticas mais apuradas devem ser utilizadas para estudar indivíduos com DI idiopática, que apresentam determinadas indicações específicas (fenótipo sugestivo de cromossomopatia com cariótipo normal), devendo ser parte fundamental na investigação das possíveis causas dessa condição devido à acentuada frequência de alterações cromossômicas crípticas observadas nesses casos. Após a análise dos resultados, será possível elucidar a origem da DI e também ajudar a delinear o fenótipo associado à alteração críptica específica, colaborando com o entendimento de genes associados a essa condição.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

- Esclarecer as causas da DI idiopática dos pacientes através de modernas técnicas de citogenética molecular;
- Estabelecer a frequência de alterações cromossômicas crípticas em uma amostra de paciente com DI idiopática;
- Descrever as características clínicas e laboratoriais dos casos anômalos detectados.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar, através de MLPA e *array*-CGH, a presença de anomalias cromossômicas crípticas em indivíduos com DI idiopática, e confirmar a existência de tais alterações por qPCR;
- Determinar as frequências das alterações encontradas pela técnica de MLPA e de *array*-CGH, evidenciando a importância da aplicação desses métodos no estudo da DI idiopática;
- Implantar a técnica de MLPA no Laboratório de Genética Médica e Humana – FMRP-USP para ser oferecida como exame de rotina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A triagem dos indivíduos que participaram dessa pesquisa foi realizada nas APAEs das cidades de Altinópolis-SP, Limeira-SP e Serrana.

Nas APAEs de Altinópolis-SP e Serrana-SP, a médica geneticista Dra. Lisandra Mesquita Batista e o Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto realizaram uma pesquisa nomeada "**Estudo genético-clínico de deficientes mentais institucionalizados**", em que avaliaram 200 indivíduos afetados por DI.

Na APAE de Limeira - SP, os médicos geneticistas Dr. Charles Marques Lourenço, Dra. Rafaela Simões e o Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto realizaram a avaliação genético-clínica de 400 indivíduos afetados por DI.

### 4.1 Seleção de casos com DI idiopática para investigação através de técnicas de citogenética molecular: critério de inclusão

Os indivíduos com DI frequentadores das APAEs de Altinópolis-SP, Limeira-SP e Serrana-SP foram examinados por médicos geneticistas através de protocolo genético-clínico, que inclui história clínica e familiar, heredograma, história gestacional (exposição a teratógenos ou infecções), exame clínico-genético, exame neurológico e exames complementares, tais como, exames de neuroimagem, cariótipo e testes laboratoriais para erros inatos do metabolismo. Após esta intensa avaliação clínica e laboratorial, os casos de DI que permaneceram sem diagnóstico etiológico e que preencheram os critérios para suspeita de alterações cromossômicas crípticas foram selecionados e incluídos na amostra para a investigação dessas desordens através da técnica de MLPA e/ou *array*-CGH.

Enquadram-se nos critérios para exame de MLPA:

- Indivíduos com DI que, após completa investigação anteriormente mencionada, permaneceram com etiologia desconhecida, e que possuem fenótipo sugestivo de desordens de origem cromossômica;
- ou que revelaram características clínicas associadas a síndrome de microdeleção já descritas.

Enquanto que, para análise através de *array*-CGH, foi possível a avaliação dos indivíduos provenientes da APAE de Limeira, por ser o grupo homogêneo maior para a obtenção de frequências dessas anomalias.

O estudo incluiu apenas indivíduos que aceitaram participar da pesquisa e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo) aprovado pelo Comitê de Ética dessa instituição, de acordo com o Processo HCRP 12460/2010. Os exames de MLPA foram inicialmente realizados no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, com supervisão da Profa. Dra. Margareth Castro, sendo posteriormente realizados no Laboratório de Genética Humana e Médica, perante supervisão do Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto (FMRP-USP), assim como os exames de PCR quantitativo em tempo real. Os ensaios de *array*-CGH foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Molecular/Centro de Pesquisa Experimental Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS, com supervisão da Profa. Dra. Mariluce Riegel.

#### 4.2 Casuística

A avaliação genético-clínica compreendeu 600 pacientes com DI, sendo que:

- na APAE de Altinópolis a análise genético-clínica realizada pela Dra. Lisandra Mesquita Batista e pelo Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto abrangeu 107 indivíduos, sendo 15 deles selecionados para este estudo;
- na APAE de Serrana-SP, após cumprir o exame genético-clínico em 93 pacientes, a Dra. Lisandra Mesquita Batista e o Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto elegeram para esta pesquisa 10 indivíduos;
- na APAE de Limeira-SP os médicos Dr. Charles Marques Lourenço, Dra. Rafaela Simões e o Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto realizaram a avaliação genético-clínica em 400 indivíduos, designando para este estudo 25 pacientes (Tabela 2).

**Tabela 2** - Indivíduos avaliados e selecionados em cada uma das três APAEs.

APAEs	Avaliados	Selecionados
Altinópolis	107	15
Serrana	93	10
Limeira	400	25
Total	600	50

Todos os 50 indivíduos selecionados para este estudo apresentaram pelo menos um dos critérios clínicos descritos no *checklist* de de Vries et al. (2001) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Pontuação apresentada por cada um dos 50 indivíduos provenientes das APAEs após a utilização do *checklist* de de Vries.

Identificação	HF		ACIU	ACPN			≥ 2 DF	DNF/AC	Total	
	CHM	IHM		BE	AE	Macrocefalia				Microcefalia
1				+			+	++	+	5
2	+							+		2
3									++	2
4								++	++	4
5									++	2
6								+		1
7	+							+		2
8								+	++	4
9								+	+	2
10								++	++	4
11								++	++	4
12								++	++	4
13								+	++	4
14			++	+				+	++	6
15					+	+		++	++	6
16								+	++	4
17								+	+	2
18	+		++					++	+	6
19	+								+	2
20	+								+	2
21				+				+	+	4
22		+						+	++	4
23		+						+		3
24		++	++					+	+	6
25		+		+				+	++	6

Identificação	HF		ACIU	ACPN			Microcefalia	≥ 2 DF	DNF/AC	Total
	CHM	IHM		BE	AE	Macrocefalia				
26		++						++	++	6
27		++			+			++	++	7
28		++						++	+	5
29		++				+		++	+	6
30	+							++	+	4
31			++	+			+	++	++	8
32		++						++		4
33		++			+			++	++	7
34	+			+			+	++	+	6
35		++	++	+				++	+	8
36	+							++		3
37		++						++		4
38		++				+		++		5
39	+						+	++		4
40		++		+				++		5
41	+							++	++	5
42		++		+				++		5
43		++						++		4
44	+							++		3
45		++					+		+	4
46		++					+	++	+	6
47	+			+				++		4
48		++		+			+		++	6
49	+			+				++	+	5
50	+		++					++	+	6

HF=Histórico Familiar de DI; CHM=Compatível com Herança Mendeliana; IHM= Incompatível com Herança Mendeliana; ACIU=Atraso no Crescimento Intrauterino; ACPN=Atraso no Crescimento Pós-Natal; BE=Baixa Estatura; AE=Alta Estatura; DF=Dismorfias Faciais; DNF=Dismorfias Não Faciais; AC= Anomalias Congênitas.

### 4.2.1 Extração de DNA

Foram coletados de cada indivíduo, aproximadamente 03 mL de sangue periférico através de punção venosa com seringa e agulha descartáveis, não expondo os pacientes a qualquer risco à saúde. Após a coleta, as amostras de sangue foram armazenadas em tubos contendo EDTA 5% que foram conservados em recipiente com gelo até ser transportado ao laboratório.

Para a extração do DNA utilizou-se o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Primeiro, foi feita a transferência de 03 mL de sangue para tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, realizou-se a lise das membranas celulares através da adição e homogeneização de 09 mL da solução de lise celular. Depois, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugados em velocidade 2.000 X g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Logo, foram adicionados e homogeneizados 03 mL de solução de lise nuclear, sendo acrescentado 01 mL da solução de precipitação de proteínas. Após vortexar por 20 segundos, o material foi novamente centrifugado em velocidade 2.000 X g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon 50 mL, ao qual foram acrescentados 15 mL de isopropanol para a precipitação do DNA na solução.

Após esse procedimento, o DNA foi retirado, colocado em tubo de eppendorf e seco à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspenso em 250 µl de água destilada. A concentração e a qualidade do DNA extraído foram estimadas por espectrofotometria (260 nm). Os produtos obtidos apresentaram concentração média de 150ng/µl. Em seguida, as amostras de DNA diluídas em água foram estocadas em freezer a -20° C de temperatura.

### 4.3 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

As reações de MLPA foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante (MCR-Holland®, Amsterdam, Netherlands), com pequenas modificações. Para este estudo foram utilizados o kit SALSA MLPA P036-E1 HUMAN TELOMERE-3 (Figura 4) e o kit SALSA MLPA P070-B2 HUMAN TELOMERE-5 (Figura 5), sendo que ambos incluem um conjunto de sondas específicas para a amplificação de *loci* selecionados nas regiões subteloméricas de todos os cromossomos humanos, exceto para os cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 que efetivamente não apresentam o braço curto. Nestes

casos, o fabricante incluiu, tanto no kit P036 quanto no P070, conjuntos de sondas para *loci* adjacentes ao centrômero no braço longo dos cromossomos acrocêntricos.

Comprimento (nt)	Posição Cromossômica	Gene detectado	Sonda	NC36 kg18
130 §	1p	TNFRSF4	02269-L01761	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3p	CHL1	01721-L01329	08-000.34
151	4p	PIGG (FL120265)	02005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6p	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXQ25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RICBA (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 +	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24
227 +	14q-cen	CCNB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.06
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
288 +	21q-cen	RBM11	01739-L01311	21-014.51
289 +	22q-cen	BTD	01740-L01310	22-016.61
298	Xq/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52
307	1q	SH3BP1 (KIAA1720)	02392-L02149	01-247.08
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18
322	3q	BDM1	02013-L02052	03-198.76
330 §	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60
346	6q	PSPB1	01746-L01304	06-170.69
355	7q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60
361	8q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83
379	10q	PACX (PAO)	09142-L09953	10-135.05
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-133.60
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82
411	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00
418	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.65
441	18q	C18orf22 (FLJ21172)	01758-L01292	18-075.90
450	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75
458	20q	OPRL1	02688-L02154	20-062.19
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78

Figura 4 - SALSA MLPA P036-E1 Humam Telomere -3 probemix.

Comprimento (nt)	Posição Cromossômica	Gene detectado	Sonda	NCBI64kg13
132	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	04064-L03605	01-247.08
139	2q	ATG4B (=APG4B)	02781-L03168	02-242.25
145	3q	KIAA0226	02690-L02842	03-198.88
152	4q	FRG1	02691-L02843	04-191.10
160	5q	GNB2L1	02790-L02832	05-180.60
166	6q	TBP	02694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	02793-L03167	07-158.63
179	8q	RECQL4	02695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	02792-L02846	09-139.78
193	10q	ECHS1	02696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B (=KIAA1030)	02697-L02848	11-133.29
211	12q	ZNF10	02686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	02698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	02699-L02890	14-104.99
233	15q	TM2D3 (=FLJ22604)	02701-L02851	15-100.01
241	16q	GAS8 (=GAS11)	02702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	02703-L008169	17-077.87
258	18q	CTOP1	02704-L03607	18-075.58
265	19q	BC-2	02705-L02853	19-063.76
274	20q	UCCL1 (=FLJ20517)	02706-L00642	20-062.05
281	21q	S100B	02587-L02854	21-046.85
290	22q	ARSA	02707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7 (=SYBL1)	02708-L02855	X-154.82
306	1p	TNFRSF18	02270-L01762	01-001.13
315	2p	ACP1	02709-L02856	02-000.27
323	3p	CHL1	02896-L02363	03-000.34
329 *	4p	PIGG	14440-L16146	04-000.51
337	5p	CCDC127 (=LOC133957)	02791-L02783	05-000.26
346	6p	IRF4	04077-L03462	06-000.34
355	7p	UNC84A	02780-L02857	07-000.84
362	8p	FBNO2S	02715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8 (=FLJ00026)	02716-L00688	09-000.38
379 ¥	10p	ZMYND11 (=BS69)	05180-L16343	10-000.22
387	11p	BET1L	02784-L02226	11-000.20
393	12p	JARID1A (=RBBP2)	02787-L02228	12-000.29
402 +	"13p"	PSPC1	02717-L03608	13-019.25
409 +	"14p"	ADPRTL2	02718-L00732	14-019.90
418 +	"15p"	NDN	04026-L01542	15-021.48
427	16p	DECR2	02720-L00648	16-000.40
436	17p	RPH3AL	04081-L03465	17-000.18
444	18p	THOC1	02789-L02231	18-000.20
450	19p	PPAP2C	03501-L02880	19-000.23
459	20p	ZCCHC3 (=FLJ22115)	02723-L00641	20-000.23
466 +	"21p"	STCH	02724-L00334	21-014.68
478 + ¥	"22p"	IL17RA	02725-L16344	22-015.96
484 ¥	X/Yp (PAR1)	SHOX	03714-L16345	X/Y-000.52

**Figura 5 - SALSA MLPA P070-B2 Humam Telomere-5 probemix.**

Utilizou-se também o kit SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion Syndromes-1 (Figura 6), que investiga simultaneamente a presença de vinte uma síndromes de microdeleção já descritas: 1p36, 2p16, 3q29, 4p16.3 (Wolf-Hirschhorn), 5p15 (Cri du Chat), 5q35.3 (Sotos), 7q11.23 (Williams), 8q24.12 (Langer-Giedion), 9q22.3, 10p15.1 (DiGeorge 2), 15q12 (Prader-Willi/Angelman), 15q24, 11p13 (WAGR), 16p13.3 (Rubinstein-Taybi), 17p11.2 (Smith-Magenis), 17p13.3 (Miller-Dieker), 17q11.2 (Síndrome de Microdeleção NF1), 17q21.31, 22q11.21 (DiGeorge), 22q13 (Phelan-McDermid), duplicação

Xq28/MECP2/RETT. Os *loci* alvos desses kits representam genes funcionais conhecidos ou sequências codificadoras de proteínas já descritas. Os kits foram previamente validados no laboratório, através da análise de pacientes já diagnosticados com alterações cromossômicas submicroscópicas.

Comprimento (nt)	Sonda	Posição Cromossômica	Síndrome
130	TNFRSF4 Probe 2269-L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 Probe 7632-L07317	10p	DiGeorge region 2 (10p)
142	PAFAH1B1 Probe 4120-L03532	17p13.3	Miller-Dieker region
148	MECP2 Probe 9310-L09999	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
153	NSD1 Probe 2595-L08077	5q35.3	Sotos syndrome
160	UBE3A Probe 4620-L00863	15q12	Prader-Willi / Angelman
166	GABRD Probe 4690-L07966	10p36.33	10p36 deletion syndrome
172	CREBBP Probe 3087-L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi syndrome
178	GNB1 Probe 2890-L07968	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184	MECP2 Probe 9311-L10002	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
190 *	SEMA7A Probe 8380-L10003	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
196	CLDN5 Probe 1218-L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202	MECP2 Probe 3409-L02797	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
208	GP1BB Probe 5464-L10114	22q11.21	DiGeorge syndrome
214	NDN Probe 6282-L01542	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
220	PAX6 Probe 3253-L02690	11p13	Wagrer syndrome
226	MAPT Probe 7856-L08385	17q21.31	"17q21 microdeletion"
232	LETM1 Probe 4190-L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
238	PAFAH1B1 Probe 1443-L08394	17p13.3	Miller-Dieker region
246	SNRPN Probe 2026-L10004	15q12	Prader-Willi / Angelman
254 †	SHANK3 Probe 10181-L11409	22q13.33	22q13 / Phelan-McDermid
260	NF1 Probe 3778-L11180	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
267	FANCL Probe 6386-L11411	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"
274	LRRC48 Probe 1452-L00936	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283 ±	CRR9 Probe 1126-L06684	5p15.3	Cri du Chat syndrome
292	SNRPN Probe 1318-L07970	15q12	Prader-Willi / Angelman
297	DMD Probe 1412-L01059	Xp21.2	Chromosome X control probe
304	LLGL1 Probe 1453-L08499	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
310	ELN Probe 1333-L00876	7q11.23	Williams syndrome
319	TGFBR1 Probe 4652-L04036	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
326	CYP11A1 Probe 6811-L06406	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
335	NF1 Probe 2508-L02620	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
341	MAPT Probe 7857-L08501	17q21.31	"17q21 microdeletion"
349	Hs.538604 Probe 1232-L07388	10p15.1	DiGeorge region 2 (10p)
355	DLG1 Probe 8395-L08249	3q29	"3q29 deletion syndrome"
364	ELN Probe 1336-L00878	7q11.23	Williams syndrome
373	SNAP29 Probe 1235-L00773	22q11.21	DiGeorge syndrome
382†	SHANK3 Probe 10182-L11174	22q13.33	22q13 / Phelan-McDermid
391	LIMK1 Probe 1337-L02333	7q11.23	Williams syndrome
401	TRPS1 Probe 3081-L07411	8q24.12	Langier-Giedion syndrome
409	TGFBR1 Probe 4653-L10006	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
418	DLG1 Probe 8401-L08255	3q29	"3q29 deletion syndrome"
427	EIF3S3 Probe 1108-L00679	8q24.11	Langier-Giedion syndrome
436	TERT Probe 3761-L02477	5p15.33	Cri du Chat syndrome
445	WHSC1 Probe 6058-L05513	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
454	NSD1 Probe 2600-L02071	5q35.3	Sotos syndrome
466 †	RAI1 Probe 9440-L11412	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
474	CRHR1 Probe 7859-L07620	17q21.31	"17q21 microdeletion"
484	REL Probe 9860-L10628	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"

Figura 6 - SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion-1 probemix.

### 4.3.1 Protocolo da técnica MLPA

Primeiramente as amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de aproximadamente 20 ng/μl de TE (10 mM Tris HCl pH 8.2 + 0.1 mM EDTA). Em seguida 100ng/5μl de DNA foram pipetados em tubos de eppendorf de 200 μl devidamente identificados, sendo esses colocados em termociclador por 40 minutos a 98° C para a desnaturação das amostras. Enquanto isso foi preparado um master mix de hibridação contendo para cada amostra: 1,5 μl de tampão MLPA e 1,5 μl de probemix contendo sondas específicas de acordo com o kit. Após a desnaturação, as amostras foram resfriadas a 25° C, e em seguida adicionaram-se 03 μl do master mix de hibridação em cada tubo, sendo esses inicialmente incubados a 95° C por 01 minuto e, em seguida, a 60° C por 16 horas.

Posteriormente, foi realizada a segunda etapa da reação de MLPA através da ligação das sondas, sendo preparado o master mix ligase contendo, para cada amostra, 03 μl de tampão A ligase-65, 3 μl de tampão B ligase-65, 25 μl de água destilada e 01 μl de ligase-65. O termociclador foi pausado a temperatura de 54° C, sendo adicionado a cada tubo 32 μl do master mix ligase, homogeneizando com o auxílio da pipeta. Em seguida, as amostras foram incubadas a 54° C por 15 minutos e depois a 98° C durante 5 minutos, sendo mantidas a 20° C.

Os produtos obtidos na etapa de ligação foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) através do master mix polimerase, produzido pela adição de 02 μl de SALSA PCR primer mix, que contém um conjunto de *primers* marcados com 6-FAM, mais 0,5 μl de SALSA Polimerase e 7,5 μl de água destilada para cada amostra. Logo, acrescentou-se 10 μl desse mix em cada um dos tubos presentes no termociclador a temperatura de 20° C. Seguiu-se a programação do termociclador com 35 ciclos, sendo as amostras aquecidas a 95° C por 30 segundos, resfriadas a 60° C por 30 segundos e depois reaquecidas a 72° C por 60 segundos. Por fim, os tubos foram incubados a 72° C por 20 minutos e, em seguida, mantidos a 15° C.

Para a eletroforese capilar, preparou-se primeiramente o mix de injeção, sendo adicionado a cada amostra 0,2 μl de size standard 500 LIZ e 9,4 μl de formamida. Após homogeneização do mix, foi distribuído, em cada poço da placa de sequenciamento, 9,6 μl do mix de injeção. Em seguida, o produto de amplificação de cada amostra foi distribuído em duplicata ao longo da placa em volumes correspondentes a 0,5 μl e 1,0 μl. Depois, as amostras contidas na placa foram desnaturadas a 98° C por 5 minutos e rapidamente resfriadas a 4° C e então colocadas no sequenciador ABI 3130 para apropriada separação dos fragmentos.

Cada reação de MLPA foi realizada com no mínimo 20 pacientes, sendo 05 DNAs controle. A cada sete pacientes adicionados, uma amostra controle também foi adicionada à reação. Os casos que apresentaram qualquer alteração foram novamente testados para a confirmação do resultado.

### 4.3.2 Análise dos dados de MLPA

Os produtos de amplificação fluorescentes foram subsequentemente separados e analisados por eletroforese capilar utilizando o sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em seguida, foi realizada a análise dos padrões de picos identificados nos eletroferogramas utilizando o software GeneMapper v3.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para avaliar a qualidade do experimento de MLPA. Posteriormente, os dados considerados apropriados para a análise foram então normalizados através do software Coffalyser v8.0 (Figura 7).

sample name	2897 (1 0) USP - 2011-12-09_C09 *GMsTXT bt	2898 (0 5) USP - 2011-12-08_F05*GMsTXT M
Analysis Date	09/12/2011 19:30	09/12/2011 19:31
normalisation method	User Defined	User Defined
Average / Median	Median on Normalisation Factor	Median on Normalisation Factor
Nr Probe Signals	46	45
Nr Control Probe Signals	44	44
Ligation Probe Found?	YES	YES
Male / Female?	Male	Male
PFMC (pearson) nr probes	0.46	0.46
MAD all nr probes	0.06 44	0.05 44
DNA concentration ok?	OK	OK
DD OK? (88)	OK	OK
DD OK? (96)	OK	OK

Gene	Chr probe	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio	Ratio	Ratio
TNFRSF4 probe 2269-L01761	01p	130	01-001.1 TNFRSF4	1			
KIAA1720 probe 2392-L02149	01q	306	01-247.1 KIAA1720	2			
ACP1 probe 2274-L05750	02p	137	02-000.3 ACP1	3			
CAPN10 probe 1742-L01308	02q	314	02-241.3 CAPN10	4			
CHL1 probe 1721-L01329	03p	144	03-000.3 CHL1	5			

**Figura 7** - Software Coffalyser v8.0 exibindo os métodos de normalização utilizados para a análise dos resultados.

Resumidamente, a normalização acontece em duas etapas, sendo que na primeira é determinada a intensidade fluorescente de cada pico de uma amostra (intranormalização) onde é feita a divisão da altura de cada pico pela altura mediana dos picos dentro da amostra, depois esses valores relativos são comparados aos das outras amostras (internormalização),

sendo os valores normalizados de cada pico divididos pelos valores medianos correspondentes de todas as amostras. A análise, portanto, resulta em uma intensidade de sinal 1.0 para um alelo não afetado ou selvagem, enquanto que, deleções e duplicações heterozigotas são identificadas com intensidade de sinal de 0,7 ou 1,3, respectivamente. Dessa forma, intensidade de sinal (resultante da razão de cada sonda, + ou - o desvio padrão referente à mesma) maiores que 0,70 e menores que 1,3 serão considerados normais:

**Intensidade de sinal normal:  $0,70 < \text{Razão} \pm \sigma < 1,30$**

Sempre que sinais irregulares foram detectados, a reação de MLPA foi repetida.

#### **4.4 Hibridação comparativas de genomas em *arrays*: *array*-CGH**

A análise de *array*-CGH foi realizada utilizando a plataforma Human Genome High-Definition CGH Microarray 8x60K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), composta por oligonucleotídeos de 60 pb, representando cerca de 61.000 sequências humanas codificadoras e não-codificadoras. Para as reações de marcação, hibridação e lavagem das lâminas foi utilizado o Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), conforme recomendações do fabricante.

##### **4.4.1 Fragmentação e marcação do DNA genômico**

As amostras de DNA extraídas a partir do sangue periférico foram submetidas a fragmentação e marcação seguindo o protocolo padrão do método ULS (Universal Labeling System) recomendado pela Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), o qual é baseado na marcação não enzimática por fluorescência diferencial entre as amostras de DNA genômico normal (DNA referência) e o DNA do indivíduo a ser estudado (DNA teste). A amostra referência utilizada foi o DNA genômico universal (Promega Corp., Madison, WI, USA), feminino ou masculino, de acordo com o sexo da amostra teste.

Para a obtenção de fragmentos com tamanho aproximado de 300 kb, primeiramente foi necessário deixar as amostras de DNA genômico, tanto o DNA referência quanto o DNA teste, em uma concentração de 200 ng de DNA em um volume de 12  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 95°C, por 03 a 10 minutos, e em seguida mantidas em gelo durante 03 minutos.

Na etapa de marcação, o DNA genômico fragmentado foi adicionado a uma reação contendo 0,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura estéril, 0,5  $\mu\text{L}$  de ULS-Cy3 (amostra teste) ou ULS-Cy5 (amostra referência) e 1  $\mu\text{L}$  de 10 X Labeling Solution. As reações foram incubadas a 85°C durante 30 minutos e depois colocadas em gelo. As amostras foram então purificadas utilizando os filtros Agilent KREApure columns, conforme instruções do fabricante. A seguir, as amostras de DNA purificadas foram quantificadas no espectrofotômetro para verificar a eficiência de marcação por fluorescência, segundo parâmetros indicados pela Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

#### 4.4.2 Hibridação e lavagem

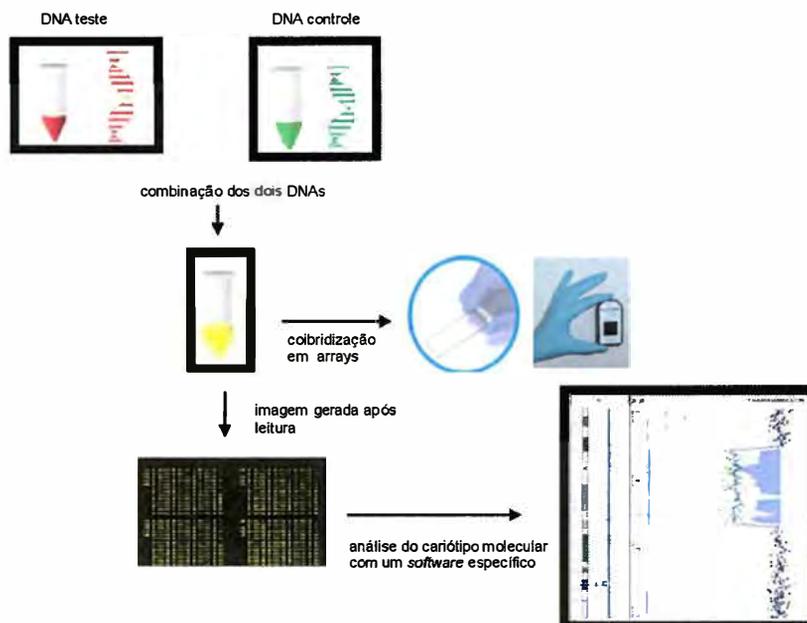
Amostras de DNA marcadas e purificadas que apresentaram eficiência de marcação entre 1,5 a 3% foram então submetidas às reações de hibridação empregando-se reagentes presentes no Agilent Oligo *array*-CGH Hybridization Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) conforme especificações do fabricante.

Amostras de DNA teste e referência que apresentaram eficiência de marcação e concentração final semelhantes foram misturadas e adicionadas a reação de hibridação contendo 5  $\mu\text{L}$  de Human Cot-1DNA 1,0mg/mL (Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de Agilent 100 X Blocking Agent e 55  $\mu\text{L}$  de tampão Agilent 2 X Hi-RPM Hybridization Buffer. Em seguida, as amostras foram denaturadas a 95°C durante 03 minutos e incubadas a 37°C por 30 minutos. Ao final da incubação foram adicionados 27  $\mu\text{L}$  de Agilent CGH Block, utilizado para minimizar efeitos de *background* no processo de hibridação. Posteriormente, 40  $\mu\text{L}$  da reação de hibridação foram aplicados na lâmina de *microarray* que em seguida foram incubadas em estufa de hibridação a 65°C em uma velocidade de 20rpm durante 18 horas. Após esse período, as lâminas foram lavadas em Oligo *array*-CGH Wash Buffer 1 a temperatura ambiente por 05 minutos, depois em Oligo *array*-CGH Wash Buffer 2 a 37°C por 01 minuto, em seguida em acetonitrila a temperatura ambiente durante 10 segundos e finalmente em Stabilization and Drying Solution a temperatura ambiente por 30 segundos.

#### 4.4.3 Análise dos dados – *array*-CGH

As lâminas foram digitalizadas através do SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), utilizando-se o software Scan Control v8.1. Os dados foram normalizados e extraídos através do software Feature Extraction v10.1.1.1. Em seguida,

realizou-se a análise dos resultados pelo software DNA Analytics v4.0, posteriormente substituído pelo software Agilent Cytogenomics v2.7.8.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Para a detecção das alterações genômicas empregou-se o algoritmo estatístico ADM-2, que identifica regiões genômicas com diferenças no número de cópias fundamentada no  $\log_2$  ratio dos sinais de fluorescência emitidas pelas sondas das amostras de DNA teste e referência. Esse algoritmo procura por intervalos em que a média dos  $\log_2$  ratio dos sinais medidos em uma dada região excedem um específico *threshold* (DE SMITH et al., 2007) (Figura 8). Nesta pesquisa foi utilizado o *threshold* de 6.0., sendo que, apenas os resultados que apresentaram no mínimo três sondas consecutivas com razão  $\log_2$  ratio adulteradas, foram considerados como variação no número de cópias de determinado segmento genômico. Para eliminar grandes alterações com baixos valores de  $\log_2$  ratio aplicou-se o algoritmo de correção Fuzzy Zero. Os bancos de dados públicos *University of California Santa Cruz Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>), *DECIPHER* (<http://decipher.sanger.ac.uk>), *Database of Genomic Variants* (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>) e o *International Standards for Cytogenomic Arrays* (<http://www.iccg.org/>) foram utilizados para classificar e interpretar as CNVs identificadas, tanto as CNVs neutras como as CNVs consideradas patogênicas.



**Figura 8** - Representação esquemática da técnica de *array*-CGH para identificação de variação do número de cópias de genes ou regiões genômicas. O DNA da amostra teste e do DNA controle são marcados diferencialmente por fluorescência e posteriormente hibridados a uma plataforma de DNA (*arrays*) contendo segmentos de DNA imobilizados. Predomínio da intensidade de fluorescência correspondente à amostra teste ou ao controle é indicativo de ganho ou perda de cópias de DNA, respectivamente, na região correspondente da amostra teste.

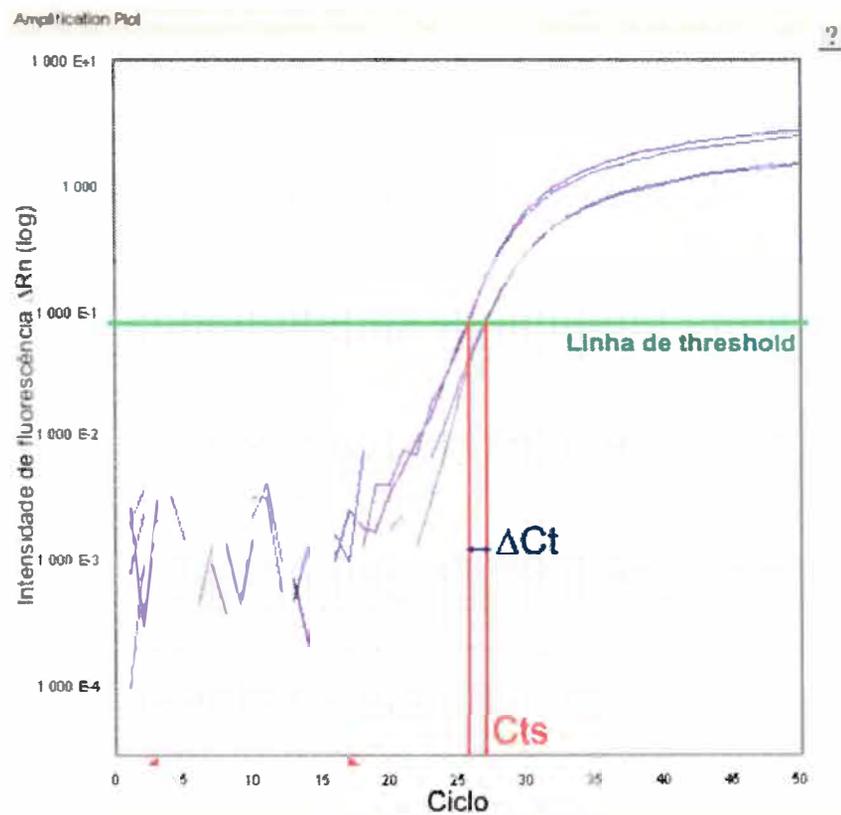
Após a avaliação visual realizada pelos softwares DNA Analytics v4.0 e Agilent Cytogenomics v2.7.8.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), foram excluídas da análise as regiões genômicas alteradas que apresentaram associação com mais de três CNVs já descritas. A listagem dos genes de interesse referidos no presente estudo obedeceu às regras de nomenclatura do “HUGO (The Human Genome Organization) Gene Nomenclature Committee (HGNC)”.

#### 4.5 Confirmação dos achados obtidos através de PCR quantitativa em tempo real

Para a validação dos resultados obtidos através das técnicas de MLPA e *array*-CGH, utilizamos a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), capaz de investigar a presença de microdeleções e microduplicações em determinado local do genoma do indivíduo. Empregando-se *primers* construídos dentro de regiões de sequência única, a qPCR permite a produção de um mapa de alta resolução de qualquer região de interesse, oferecendo uma medida quantitativa do número de cópias de DNA além de uma caracterização mais precisa dos *breakpoints* cromossômicos. Esse método proporciona maior flexibilidade e adaptabilidade, tornando-o mais apropriado para uso em um grande número de laboratórios. O método descrito neste trabalho foi adaptado para o diagnóstico molecular de qualquer região cromossômica suspeita de possuir deleção ou duplicação genômica. Os *primers* e *amplicons* foram desenhados através do software Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) com base nos seguintes critérios: comprimento do *primer*: 18-24 nucleotídeos; comprimento do *amplicon*: 100-150 pb; temperatura de *melting* do *primer*: 58°-60°C (com diferença máxima de temperatura entre *primers*: 1°C); nenhuma corrida com mais de três Gs consecutivos; %GC dos *primers*: 40-60%; %GC do *amplicon*: 40-60%; temperatura de *melting* do *amplicon*: 75°- 85°C; nenhum GC clamp na terminação 3' do *primer* (ex. GG, CC, CG ou GC); evitar mais de 3 Gs ou Cs nas últimas cinco bases da terminação 3' do *primer* (DORAK, 2006).

A detecção e a quantificação de alterações gênicas na região estudada, resultando na deleção ou duplicação de segmentos cromossômicos, foram feitos por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real. Nesta técnica, a amplificação por PCR de uma região do genoma é acompanhada em tempo real através da adição de SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que é um composto que se intercala a dupla fita de DNA e emite fluorescência. Durante a PCR, o crescimento da emissão de fluorescência devido ao aumento na quantidade de DNA de dupla fita é monitorado em tempo real por um detector de

fluorescência situado no termociclador. A comparação das curvas de amplificação detectadas pelo equipamento é utilizada na quantificação relativa do número de cópias gênicas nas amostras. Esta comparação é feita utilizando os valores do Ct (*cycle threshold*). O Ct é o número de ciclos que uma reação leva para atingir uma determinada quantidade de fluorescência emitida (chamada linha de *threshold*). Neste estudo, a linha de *threshold* foi posicionada na fase de crescimento exponencial das reações em todos os experimentos (Figura 9).



**Figura 9** - Resultado de um PCR quantitativo em tempo real com as curvas de amplificação do gene *ALB* e do gene alvo a ser avaliado em um indivíduo controle (reações feitas em triplicata) mostrando a linha de *threshold* e ilustrando o modo em que os Cts e o  $\Delta$ Ct são calculados.

Uma segunda reação, utilizando o gene *ALB* como controle interno com número de cópias conhecido e invariável, é feita como controle interno para que variações na concentração inicial de DNA utilizado na reação não comprometam os resultados. Desta forma, variações nas concentrações de DNA vão influenciar da mesma maneira o resultado do gene alvo a ser avaliado e do controle interno, não alterando a correlação de um com o outro. Com isso, a diferença entre os Cts calculados para o controle interno e para o gene alvo gera

um valor ( $\Delta Ct$ ) que pode ser comparado efetivamente com outras amostras de outros indivíduos. Este procedimento é conhecido como método  $\Delta\Delta Ct$  (PONCHEL et al., 2003).

Visto que, em uma PCR em fase exponencial, a concentração de DNA é duplicada a cada ciclo, formando uma função exponencial de base 2, um valor de  $\Delta\Delta Ct$  igual a 1 representa uma diferença de duas vezes o número de cópias gênicas de um indivíduo em relação ao outro. Portanto, a relação do número de cópias de um determinado gene em um indivíduo em comparação ao número de cópias deste mesmo gene em outro indivíduo pode ser calculada pela fórmula:

$$\text{Número relativo de cópias} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

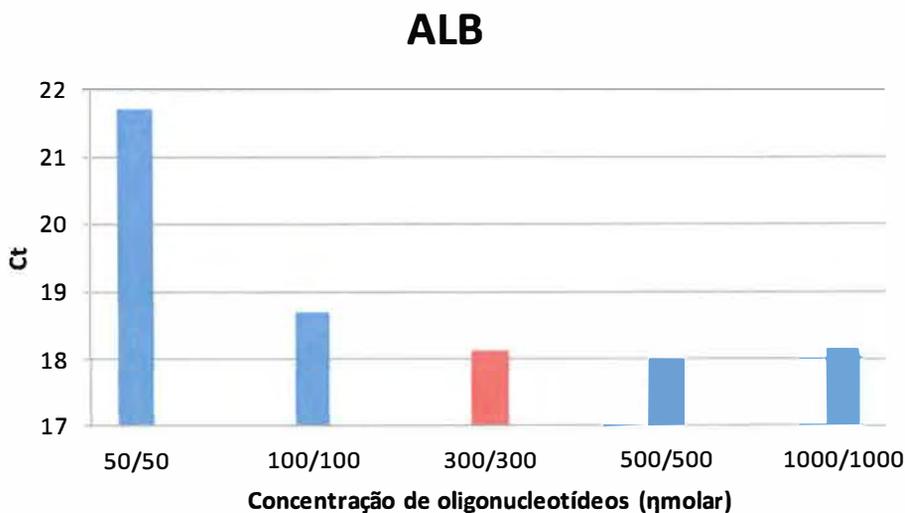
#### 4.5.1 Otimização da concentração de oligonucleotídeos

Para que a dosagem gênica possa ser calculada com precisão através do método  $\Delta\Delta Ct$  é necessário a otimização de vários fatores. Considerando que o meio de detecção usado foi o SYBR Green, que se intercala com DNA de dupla fita em um processo independente da sequência, a sensibilidade deste método pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos e pela inespecificidade dos mesmos. A formação de produtos inespecíficos na reação pode ser detectada através de uma curva de dissociação (curva de *melting*). Neste procedimento os produtos da PCR são aquecidos lentamente e a perda de sinal fluorescente causada pela desnaturação da dupla fita é acompanhada em tempo real. Esta perda de sinal se concentrará em uma determinada temperatura única se a reação tiver produzido um único produto. Se a desnaturação acontecer como eventos múltiplos em temperaturas variadas significam que *amplicons* de diferentes sequências estão presentes naquele produto, consequência de amplificação inespecífica. Portanto, a otimização da concentração dos oligonucleotídeos é essencial. Na dosagem do número de cópias dos genes estudados, utilizamos oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse e, como controle interno, oligonucleotídeos específicos para o gene *ALB* (MEINS et al., 2005).

As reações foram feitas em triplicata utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com as proporções sugeridas pelo fabricante. Para uma reação com volume final de 25  $\mu\text{L}$  foram adicionados 12,5  $\mu\text{L}$  de Master Mix 2 X, 6,5  $\mu\text{L}$  de oligonucleotídeos (cuja concentração varia dependendo da reação), 1,0  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA (aproximadamente 100  $\text{ng}$ ) e 5,0  $\mu\text{L}$  de água milliQ. As reações foram colocadas no sistema de qPCR 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) sendo

submetidas à ciclagem padrão do equipamento para reações com SYBR Green com curva de dissociação. Os Cts foram calculados pelo software do próprio equipamento SDS v2.3. Os resultados foram transferidos para uma planilha de Excel (MICROSOFT) onde foram analisados.

As concentrações ótimas de oligonucleotídeos para um ensaio de PCR quantitativo em tempo real foram as que apresentaram a maior performance reacional possível e ausência de amplificação inespecífica. No entanto, a escolha das concentrações dos oligonucleotídeos do ensaio limita-se a um desempenho reacional similar ou, se possível, idêntica entre o alvo e seu controle interno. Foram testadas experimentalmente as concentrações de 50, 100, 300, 500 e 1000  $\eta$ molar em uma reação com uma amostra de DNA controle, sendo então escolhidas as concentrações de oligonucleotídeos para as reações realizadas, tanto com o gene *ALB*, como para os genes de interesse. Foram preferidas as concentrações de oligonucleotídeos de 300  $\eta$ molar para todas as reações (Figura 10).



**Figura 10** - Concentração de oligonucleotídeos usada nos ensaios e os respectivos Cts atingidos. Em vermelho a concentrações escolhidas para o método. PCR do gene *ALB* em um indivíduo controle.

#### 4.5.2 Teste de diluição do DNA

Para uma quantificação precisa é necessário verificar se a eficiência da PCR independe da concentração inicial de DNA no ensaio. Cada par de oligonucleotídeos foi testado em reações contendo concentrações de DNA variadas. Foram utilizadas diluições de 1, 2, 4, 10,

100 e 1000 vezes da amostra de DNA controle, correspondendo a concentrações de DNA de aproximadamente 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 1 ng e 0,1 ng.

Os resultados do teste de diluição de DNA foram transferidos para uma planilha no Excel (MICROSOFT) gerando um gráfico do log do fator de diluição versus o Ct. O crescimento linear nos Cts em relação ao log das diluições aponta que a reação mantém a sua eficiência em variadas concentrações de DNA. Obtendo a equação da reta ( $y = ax + b$ ) é possível calcular a eficiência da reação através da fórmula:

$$\text{Eficiência da reação} = 10^{(-1/a)} - 1$$

As reações para os genes estudados devem apresentar eficiências similares e próximas à eficiência máxima.

Para este estudo foram fabricados 15 pares de *primers*. Pela análise dos testes de otimização da concentração de oligonucleotídeos foi preferida a concentração de 300 ηmolar para todas as reações. Quanto ao teste de diluição do DNA, todos os pares de *primers* mantiveram sua eficiência em diferentes concentrações de DNA (Tabela 4):

**Tabela 4** - Sequência, localização e eficiência dos *primers* utilizados no presente estudo.

<i>Primers</i>	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 3'-5'</i>	Posição (hg19/NBCI)	Eficiência
<i>ABCC6</i>	GTGCAGTCCTCGAACTGTGT	GCTGAGGAAGACGAAGATCC	chr16:16,232,260-16,232,367	0,9941
<i>ACACA</i>	AGGCTCAGTGAGGAAGTCGT	GTGCTGTGTGGGAGGTGTAG	chr17:35,381,476-35,381,577	0,9923
<i>ACPI</i>	GAAGGAAGAGGACAGCGAAA	AGACCAGTGTGGCATGTGTG	chr2:262,387-262,523	0,9932
<i>ADAM5</i>	CTCCAGGTCCACCTCAATCT	TCTGAGGCATCTGTIGGAAG	chr8:39,307,441-39,307,557	0,9961
<i>ALB</i>	TGGTCATTGAACTCCAGAGC	ATGCCGCTCTGTCACAATAC	chr4:74,279,251-74,279,355	0,9962
<i>ATP2B2</i>	AGATCTGAGGAGGCGTTCAT	CCAGGTCGCTACCACCTATT	chr3:10,392,505-10,392,616	0,9959
<i>BCAP31</i>	CTGCTTTACTAGGCGCTACG	TTCTAGCTCCACCCCTCTTT	chrX:152,979,957-152,980,057	0,9942
<i>NBEAP1</i>	GGTCCTIGTTGTCTTTCAGC	CAGAGGCAAGTGAGTCTGGA	chr15:20,871,163-20,871,275	0,9996
<i>OR4K2</i>	TGATGGTGCAGTGCTAGTGA	CATCTACAGCCTGGTCTCCA	chr14:20,269,502-20,269,608	0,9889
<i>PIGG</i>	AAAGATTGCATGGGAAGTGG	ACTGCCTGAGAACCTTGGAG	chr4:514,875-514,964	0,9955
<i>PRRT2</i>	CGGCCTTGTTTACAGCTTCT	ATTAGTGCAGGGAGGTTGGA	chr16:29,826,084-29,826,188	0,9947
<i>PTN</i>	TGCTCTIGGTAGTICTTIGG	CCACTCTCACAGGCACTCTT	chr7:136,912,940-136,913,054	0,9972
<i>TBX1</i>	GGATCTGGGCTAGTGCTCTC	ACTGCAGTTGGGTCCTCAG	chr22:20,227,278-20,227,393	0,9942
<i>ZNF267</i>	GACAACCTCTCACCTCCAT	AACTGCCACACCCTCTAAG	chr16:31,881,307-31,881,414	0,9953
<i>ZNF81</i>	TCAGCCGGGGTTGATAGTT	GATCCATCACTGGCCACAC	chrX:47,696,328-47,696,445	0,9955

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

Neste estudo, foi avaliada a capacidade de uma combinação de kits de MLPA para investigar a presença de alterações cromossômicas submicroscópicas em indivíduos com DI idiopática, incluindo os kits P036-E1 e P070-B2, aptos para detectar alterações subteloméricas em todos os cromossomos humanos, e o kit P245-A2, que investiga a presença de vinte e uma síndromes de microdeleção associadas a DI.

Nos casos de alterações cromossômicas submicroscópicas detectadas pelo método de MLPA, empregou-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizando SYBR Green, procedimento capaz de confirmar os resultados de MLPA por meio da quantificação e dosagem do número de cópias gênicas.

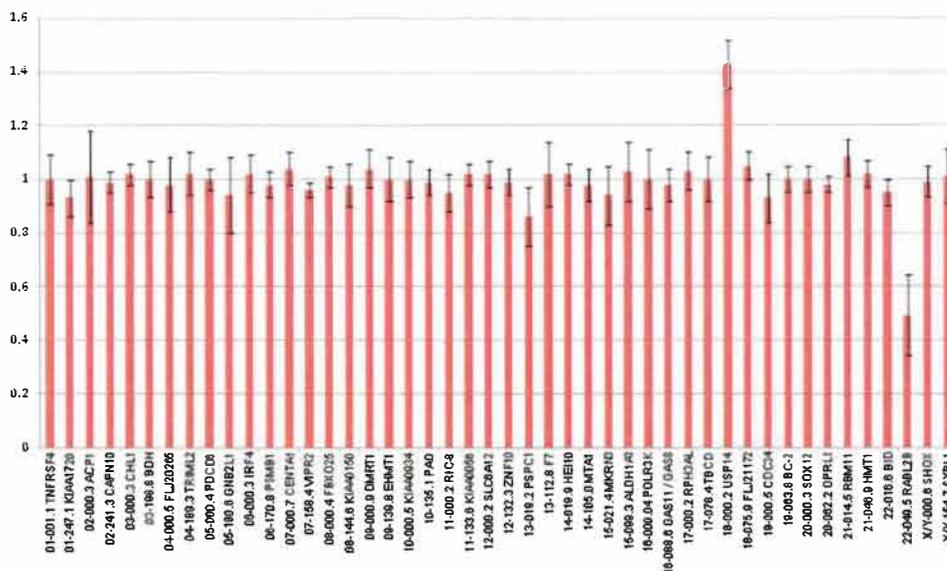
#### 5.1.1 Kits P036-E1 e P070-B2

Foram analisados através dos kits P036-E1 e P070-B2 56 indivíduos, incluindo 05 controles negativos (02 homens e 03 mulheres), 01 controle positivo (CP) do sexo feminino apresentando uma translocação não equilibrada entre os cromossomo 18 e 22, e o grupo de estudo formado por 50 indivíduos com DI idiopática (26 homens e 24 mulheres) procedentes das APAEs de Altinópolis-SP, Limeira-SP e Serrana-SP, suspeitos de possuírem alterações subteloméricas. Todos, com exceção do controle positivo, apresentaram cariótipo normal. Idades de referência variaram de 06 a 58 anos.

Ambos os kits de MLPA P036-E1 e P070-B2 foram capazes de identificar as anomalias cromossômicas previamente diagnosticadas no CP, o que permitiu a validação do método:

- duas alterações localizadas no CP, confirmando a translocação não equilibrada detectada no exame citogenético entre os cromossomos 18 e 22. Através do kit P036-E1 foi observado um padrão de amplificação alterado (1,45) da sonda 01736-L02051 (localização chr18:186,695-186,767 pb, NCBI36/hg18), referente a uma duplicação no gene *USP14* (OMIM \*607274) (localização chr18:148,483-203,739 pb, NCBI36/hg18; 158,483-213,739 pb, NCBI37/hg19) localizado na região 18p11.32, e também um produto de amplificação alterado (0,48) da sonda 01762-L08761 (localização chr22: 49,553,070-49,553,142 pb, NCBI36/hg18) (Figura11), condizente a uma deleção no gene *RABL2B* (OMIM\*605413)

(localização chr22:49,552,786-49,568,953 pb, NCBI36/hg18; 51,205,920-51,222,103 pb, NCBI37/hg19) posicionado na região 22q13.33, apresentando o resultado 46,XX.mlpA 18psubtel(P036)X3, 22qsubtel(P036)X1. Enquanto o kit P070-B2 revelou um padrão de amplificação alterado (1,47) da sonda 02789-L02231 (localização chr18:204,731-204,801 pb, NCBI36/hg18), relativo a uma duplicação no gene *THOC1* (OMIM\*606930) (localização chr18:204,520-258,059 pb, NCBI36/hg18; 214,520-268,059 pb NCBI37/hg19) disposto na porção subtelomérica 18p11.32, além de um padrão de amplificação da sonda 02707-L00661 (localização chr22:49,413,270-49,413,327 pb, NCBI36/hg18) compatível com uma deleção (0,46) no gene *ARSA* (OMIM \*607574) (localização chr22:49,408,048-49,413,467 pb, NCBI36/hg18; 51,061,182-51,066,601 pb, NCBI37/hg19) localizado em 22q13.33, fornecendo o resultado 46,XX.mlpA 18psubtel(P070)X3, 22qsubtel(P070)X1. No exame clínico do CP, sexo feminino, 1 ano e seis meses de idade, observou-se ADNPM, estrabismo convergente bilateral, epicanto, narinas antevertidas e filtro nasolabial longo e marcado (Figura 12);



**Figura 11** - Exame de MLPA do CP apresentando alterações nos padrões de amplificação das sondas 01736-L02051 e 01762-L08761 correspondentes ao gene *USP14* (duplicação 18p) e ao gene *RABL2B* (deleção 22q), respectivamente. Kit SALSA MLPA P036 E-1.

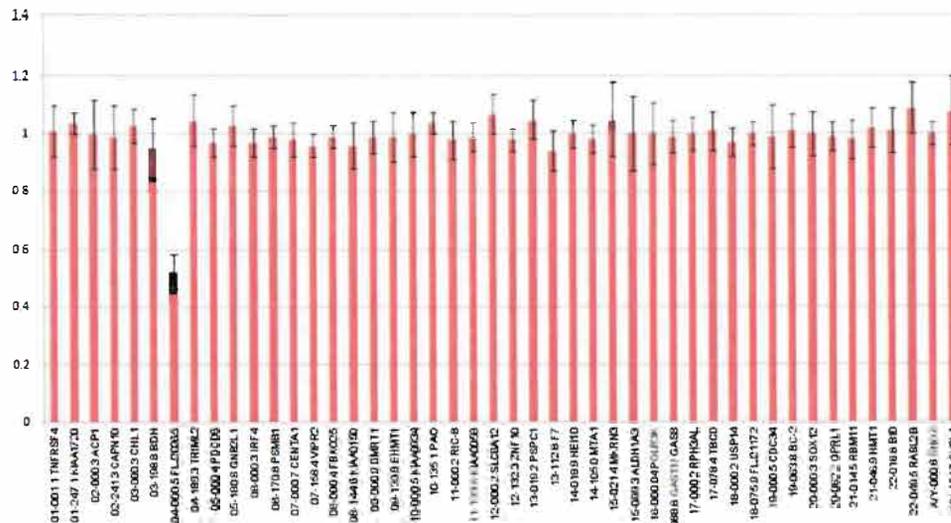


**Figura 12** - Controle positivo, cariótipo 46,XX,der(22) t(18;22)(p11.3;q13). Observam-se narinas antevertidas e filtro nasolabial longo e marcado.

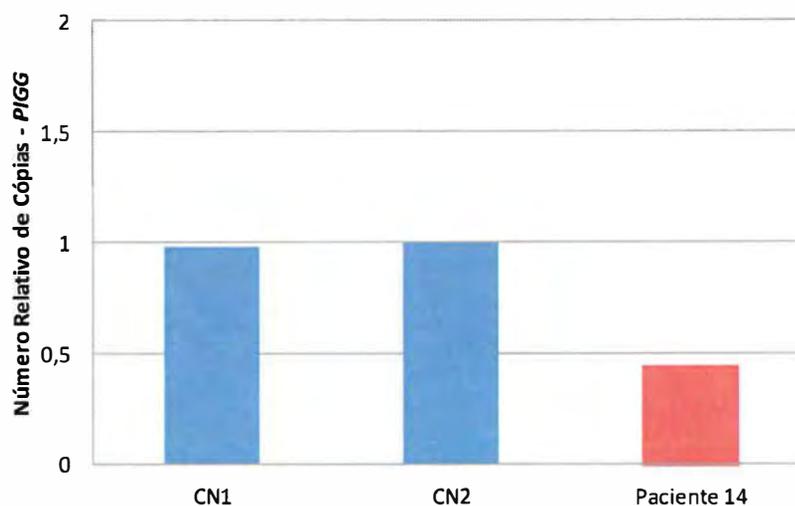
No grupo de indivíduos com DI idiopática foi identificada a presença de uma anomalia cromossômica subtelomérica (1/50), indicando uma prevalência de alterações cromossômicas subteloméricas nesse grupo de indivíduos de 2%:

- a paciente 14 revelou através do kit P036-E1 um padrão de amplificação alterado (0,52) da sonda 02005-L02047 (localização chr4:504,896-504,969 pb, NCBI36/hg18), condizente com uma microdeleção no gene *PIGG* (localização chr4:482,989-523,320 pb, NCBI36/hg18; 492,989-533,320 pb, NCBI37/hg19) localizado na região subtelomérica 4p16.3 (Figura 13), enquanto o kit P070-B2 apresentou um padrão de amplificação anômalo (0,50) da sonda 14440-L16146 (localização chr4:505,735-505,807 pb, NCBI36/hg18) também relacionado a uma microdeleção no gene *PIGG*, enquanto os pais da probanda apresentaram resultados normais em ambos os kits. A técnica de qPCR com *primers* específicos para o gene *PIGG* (localização chr4:514,875-514,964 pb, NCBI37/hg19) foi realizada para validação dos resultados de MLPA. Os valores relativos de cópias do gene *PIGG* apresentados pela paciente 14, controle negativo (CN) 1 e CN2 foram 0,45; 0,98; e 1,0, respectivamente (Figura 14). No exame clínico da paciente 14, sexo feminino, 22 anos, constatou-se DI grave, estatura (E) baixa com 145 cm (<3%), peso (P) igual a 48,000 g (10-25%), microcefalia com perímetro cefálico (PC) de 46 cm (<2%), hipertelorismo ocular com distância intercantal interna (DII) de 3,5 cm ( $\pm$ 95%) e distância intercantal externa (DIE) de 9,5 (75-97%), linha do cabelo frontal elevada, frontal alto, fâcias anormal, face triangular, hipoplasia de face média, sobrancelhas elevadas e arqueadas, olhos proeminentes, hélix anormal, apêndices pré-auriculares, lábios finos e palato alto. Também foi relatado atraso de

crescimento intrauterino e nascimento prematuro, além de crises convulsivas. Conforme parentes, não há histórico de DI na família. Foi conferido a probanda o diagnóstico clínico de Síndrome de Pitt-Rogers-Danks, posteriormente confirmado através das técnicas de MLPA e qPCR. A paciente 14 apresentou 6 pontos no *checklist* de *de Vries* (Figura 15).



**Figura 13** - Exame de MLPA da paciente 14 apresentando uma alteração no padrão de amplificação da sonda FLJ20265 correspondente ao *gene PIGG* (deleção 4p). Kit SALSA MLPA P036 E-1.



**Figura 14** – Resultado de qPCR indicando a deleção do *gene PIGG* na paciente 14.



**Figura 15** - Paciente 14 diagnosticada com Síndrome de Pitt-Rogers-Danks. Observou-se microcefalia, linha do cabelo frontal elevada, frontal alto, fâcies anormal, face triangular, hipoplasia de face média, sobrancelhas elevadas e arqueadas, hélix anormal e lábios finos.

### 5.1.2 Kit P245-A2

O kit P245-A2 é capaz de identificar vinte e uma síndromes de microdeleção associadas à DI. Esse kit foi utilizado em 55 pacientes: 05 CN (02 homens e 03 mulheres) e 50 indivíduos com DI idiopática provenientes das APAEs, com ou sem suspeita clínica de alguma das síndromes detectadas pelo kit P245-A2. Todos apresentaram cariótipo normal. Idades de referência variaram de 06 a 58 anos.

Os dados obtidos através do kit MLPA SALSA P245-A2 revelaram a presença de alterações cromossômicas submicroscópicas em 2 dos 50 (4%) indivíduos com DI idiopática procedentes das APAEs:

- no caso 14 (paciente diagnosticada com Síndrome de Pitt-Rogers-Danks descrita anteriormente), observou-se que a sonda 06058-L05513 (localização chr4:1,902,200-1,902,274 pb, NCBI36/hg18) apresentou um valor de amplificação condizente com uma microdeleção (0,48) no gene *WHSC1* (OMIM\*602952) (localização chr4:1,842,921-1,953,732 pb, NCBI36/hg18; 1,873,123-1,983,934 NCBI37/hg19) presente na região cromossômica 4p16.3 (Figura 16).

- o paciente 27 exibiu alterações nos padrões de amplificação de três sondas específicas para a região cromossômica 22q11.2: sonda 01218-L06270 (localização chr22:17,891,318-17,891,378 pb, NCBI36/hg18) apresentou uma amplificação (1,43) compatível com uma microduplicação no gene *CLDN5* (localização chr22:17,890,550-

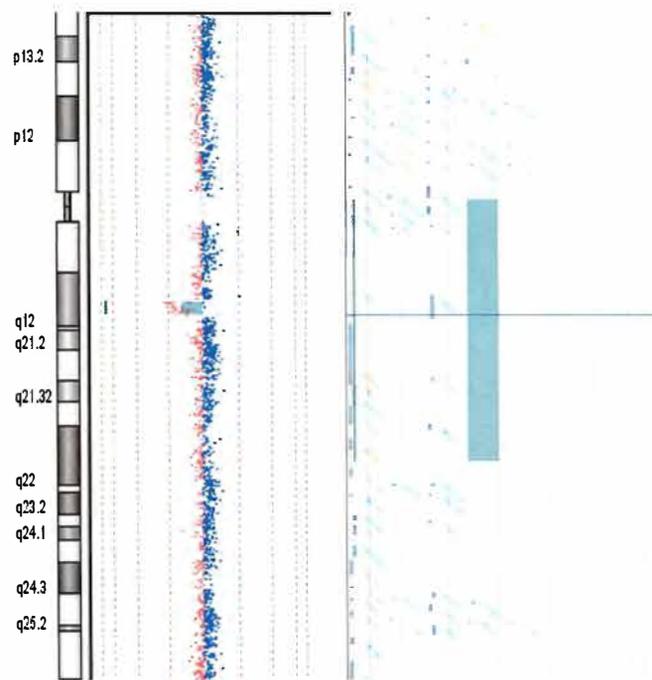


## 5.2 Array-CGH

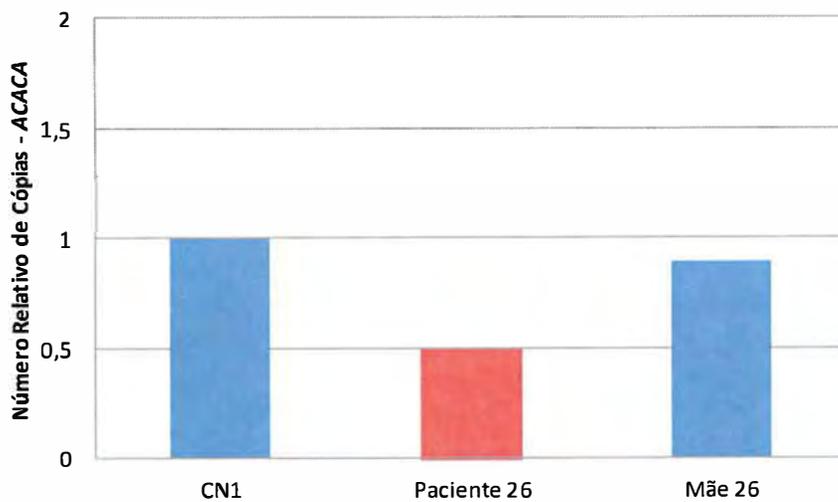
A técnica de *array*-CGH foi realizada exclusivamente nos 25 indivíduos com DI idiopática selecionados na APAE de Limeira-SP. Todos realizaram o exame citogenético com bandamento G e apresentaram resultado normal. Idades de referência variaram de 06 a 45 anos.

Dos 25 pacientes analisados por *array*-CGH, 14 (56%) apresentaram resultados alterados, somando 15 desequilíbrios genômicos:

- a análise de *array*-CGH identificou na paciente 26 uma deleção intersticial da região cromossômica 17q12 (localização chr17:34,817,433-36,168,104 pb, NCBI37/hg19), com extensão de 1,3 Mb, abrangendo os genes *ZNHIT3* (OMIM\*604500), *PIGW* (OMIM\*610275), *GGNBP2* (OMIM\*612275), *LHX1* (OMIM\*601999), *AATF* (OMIM\*608463), *ACACA*(OMIM\*200350), *TADA2A* (OMIM\*602276), *DUSP14* (OMIM\*606618), *APIGBP1* (OMIM\*607291), *DDX52*(OMIM\*612500) e *HNF1B* (OMIM\*189907) (Figura 18). A técnica de qPCR, desenvolvida com *primers* específicos para o gene *ACACA* (localização chr17:35,381,476-35,381,577 pb, NCBI37/hg19), foi realizada nas amostras de DNA de um indivíduo normal (CN1), da paciente 26 e da mãe da probanda (pai falecido), apresentando os respectivos números relativos de *amplicons*: 1,0, 0,5 e 0,90 (Figura 19). Ao ser examinada, a paciente 26, sexo feminino, 16 anos, apresentou DI moderada, déficit neuromotor (andar tardio e atraso acentuado de linguagem) e dificuldades de aprendizagem. Também foi constatada estatura E=163 cm (50-75%), P=45,200 g (10-25%), PC = 55 cm (50-98%), sobrelhas arqueadas, telecanto com DII=3,5 cm (75-97%) e DIE=10 cm (>97%), além de distúrbio visual corrigido pelo uso de óculos (alteração de refração), nariz longo, palato alto, insuficiência velopalatina com tom de fala alto e esgançado, respiração bucal, dentes mal implantados, sorriso constante, cúbito valgo leve, dedos longos e prega de *Hockey Stick*. Escoliose destro-convexa foi confirmada por exames de raios-X e um eletrocardiograma revelou prolapso da válvula mitral. Já utilizou oxcarbamazepina para controlar crises de epilepsia e, atualmente, faz uso de risperidona devido a problemas comportamentais, principalmente agressividade, e também recebe aplicações de insulina diariamente para o tratamento de diabetes insulino-dependente tipo I. Segundo a família a paciente 26 possui otites de repetição, já realizou cirurgia de amígdalas e adenoides e exibe ciclo menstrual regular desde os 12 anos. A paciente 26 possui histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, atingindo 6 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 20).



**Figura 18** – Perfil de *array*-CGH da paciente 26 com microdeleção del(17)(q12) de origem indeterminada.



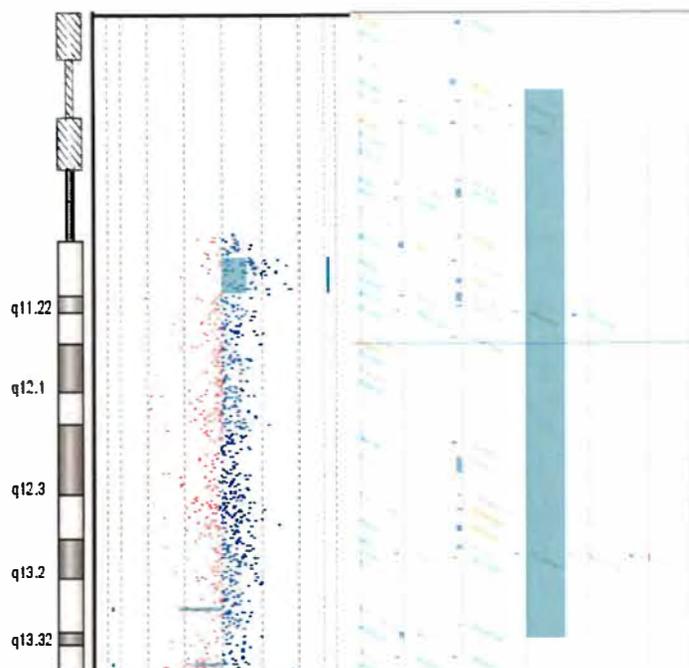
**Figura 19** – Resultado de qPCR indicando a deleção do gene *ACACA* na paciente 26.



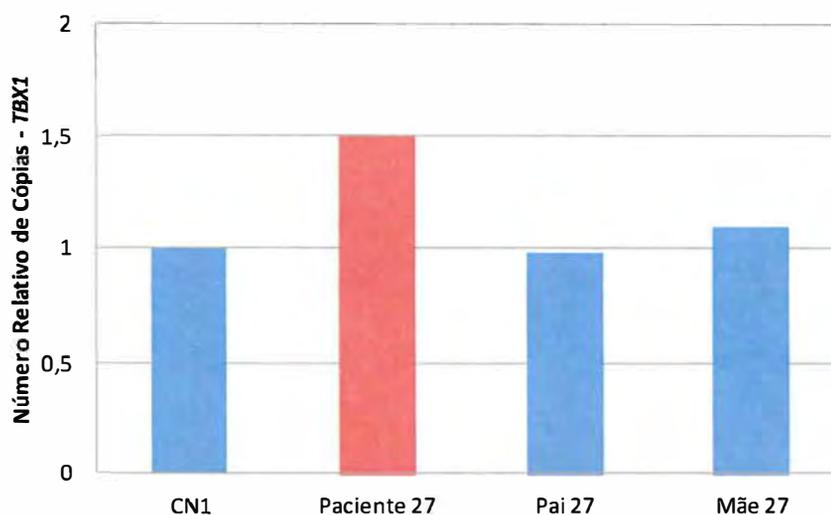
**Figura 20** - Paciente 26 com  $\text{del}(17)(q12)$  detectada por *array*-CGH. Observam-se sobrancelhas arqueadas, nariz longo, dentes mal implantados, sorriso constante, cúbito valgo leve, escoliose destroconvexa, dedos longos e prega de *Hockey Stick*.

- no indivíduo 27 o *array*-CGH detectou uma duplicação de 2,8 Mb da porção cromossômica 22q11.21 (localização chr22:18,953,012-21,801,661 pb, NCBI37/hg19) onde estão localizados os genes *DGCR2* (OMIM\*600594), *DGSI* (OMIM\*601755), *TSSK2* (OMIM\*610710), *GSC2* (OMIM\*601845), *SLC25A1* (OMIM\*190315), *CLTCL1* (OMIM\*601273), *HIRA* (OMIM\*600237), *MRPL40* (OMIM\*605089), *UFD1L* (OMIM\*601754), *CDC45L* (OMIM\*603465), *CLDN5* (OMIM\*602101), *SEPT5* (OMIM\*602724), *GP1BB* (OMIM\*138720), *TBX1* (OMIM\*602054), *GNB1L* (OMIM\*610778), *TXNRD2* (OMIM\*606448), *COMT* (OMIM+116790), *ARVCF* (OMIM\*602269), *DGCR8* (OMIM\*609030), *TRMT2A* (OMIM\*611151), *RANBP1* (OMIM\*601180), *ZDHHC8* (OMIM\*608784), *RTN4R* (OMIM\*605566), *DGCR6L* (OMIM\*609459), *RIMBP3* (OMIM\*612699), *ZNF74* (OMIM\*194548), *SCARF2* (OMIM\*613619), *MED15* (OMIM\*607372), *PI4KA* (OMIM\*600286), *HCF2* (OMIM\*142360), *SNAP29* (OMIM\*604202), *CRKL* (OMIM\*602007), *LZTR1* (OMIM\*600574), *THAP7* (OMIM\*609518), *P2RXL1* (OMIM\*608077), *SLC7A4*

(OMIM\*603752), *RIMBP3C* (OMIM\*612701), *RIMBP3B* (OMIM\*612700) e grande parte da sequência gênica de *HIC2* (OMIM\*607712) (Figura 21). A técnica de qPCR, realizada com *primers* específicos para o gene *TBX1* (localização chr22:20,227,278-20,227,393 pb, NCBI37/hg19), foi aplicada nas amostras de DNA do CN1, paciente 27, do pai e da mãe do probando, exibindo os respectivos números relativos de cópias do gene *TBX1*: 1,0; 1,5; 0,98 e 1,1 (Figura 22). No exame clínico do paciente 27, sexo masculino, 13 anos, constatou-se E=173 cm (> 97%), P=56,500 g (75%) e PC=55 cm (50-98%). Também foi observado atraso de linguagem, atraso motor e DI grave, distúrbio comportamental (agressividade), além de dismorfias incluindo face triangular, sobrancelhas arqueadas, hipertelorismo ocular com DII=3 cm (50-75%) e DIE=9,8 cm (>97%), frontal estreito, fissuras palpebrais para baixo, epicanto, nariz com ponta bulbosa, narinas antevertidas com columela saliente, orelhas proeminentes e displásicas um pouco rodadas com presença de pit pré-auricular (Figura 23). Ainda notou-se a presença de clinodactilia, prega flexão de transição, *pectus excavatum* com linha de hipopigmentação reta dividindo a região torácica central e pés chatos. O paciente 27 possui histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, totalizando 7 pontos no *checklist* de de Vries.



**Figura 21** - Perfil de *array*-CGH do paciente 27 com microduplicação dup(22)(q11.21) *de novo*.

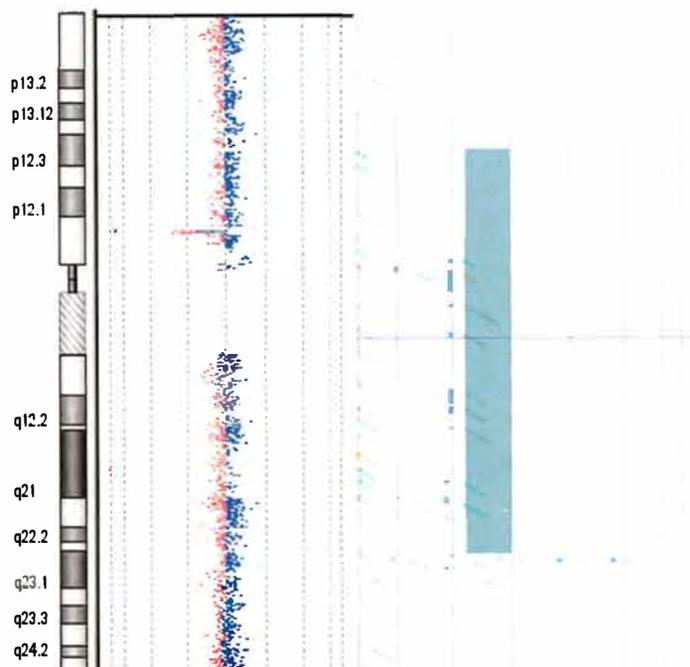


**Figura 22** - Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *TBX1* no paciente 27.



**Figura 23** - Paciente 27 com dup(22)(q11.21) detectada por *array*-CGH. Observa-se face triangular, sobrancelhas arqueadas, frontal estreito, nariz com ponta bulbosa, narinas antevertidas com columela saliente, orelhas proeminentes e displásicas um pouco rodadas, presença de clinodactilia, prega flexão de transição, *pectus excavatum* com linha de hipopigmentação reta dividindo a região torácica central.

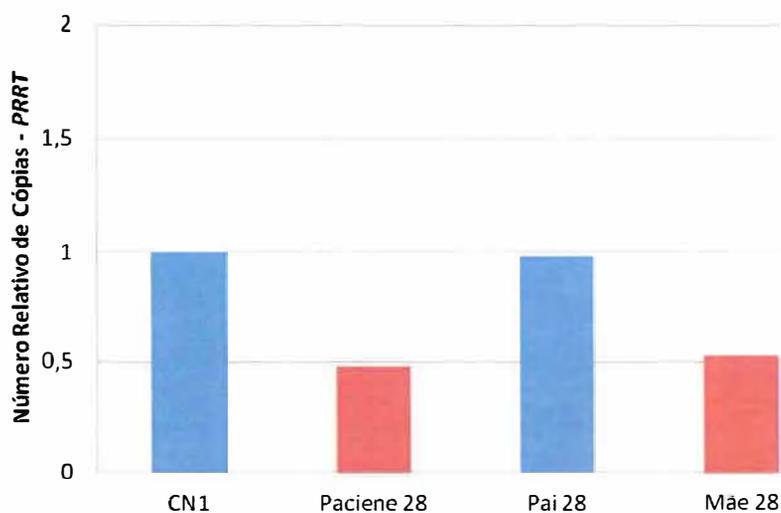
- no paciente 28 o exame de *array*-CGH identificou uma deleção intersticial na região 16p11.2 (localização chr16:29,673,954-30,198,600 pb, NCBI37/hg19) com extensão aproximada de 524 kb, onde estão situados os genes *SPN* (OMIM\*182160), *QPRT* (OMIM\*606248), *KIF22* (OMIM\*603213), *MAZ* (OMIM\*600999), *PRRT2* (OMIM\*614386), *PAGR1* (OMIM\*612033), *MVP* (OMIM\*605088), *CDIPT* (OMIM\*605893), *KCTD13* (OMIM\*608947), *TAOK2* (OMIM\*613199), *HIRIP3* (OMIM\*603365), *DOC2A* (OMIM\*604567), *FAM57B* (OMIM\*615175), *ALDOA* (OMIM\*103850), *PPP4C* (OMIM\*602035), *TBX6* (OMIM\*602427), *YPEL3* (OMIM\*609724), *MAPK3* (OMIM\*601795) e grande parte do gene *CORO1A* (OMIM\*605000) (Figura 24). Aplicou-se a técnica de qPCR com *primers* específicos para o gene *PRRT2* (localização chr16:29,826,084-29,826,188 pb, NCBI37/hg19) nas amostras de DNA do CN1, do paciente 28, do pai e da mãe do probando, que revelou, nessa ordem, os seguintes números relativos de cópias do gene *PRRT2*: 1,0; 0,48; 0,98 e 0,53 (Figura 25).



**Figura 24** - Perfil de *array*-CGH do paciente 28 com microdeleção del(16)(p11.2) de herança materna.

- no exame clínico do paciente 28, sexo masculino, 14 anos, verificou-se E=155 cm (10-25%), sobrepeso com P=87,200 g (>97%), PC=55 cm (50-98%), DII=3,2 cm (75%) e DIE=8,9 cm (50-75%), além de atraso motor grosso e fino (começou a andar aos 2 anos), DI leve, atraso de linguagem e dificuldade para completar o raciocínio. Foram observadas poucas dismorfias, incluindo estreitamento frontal do crânio, olhos fundos, fendas palpebrais para cima e narinas

antevertidas, além de apresentar problemas comportamentais que incluem atitude hostil e episódios de autoagressão. O paciente 28 exibe histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, somando 5 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 26).

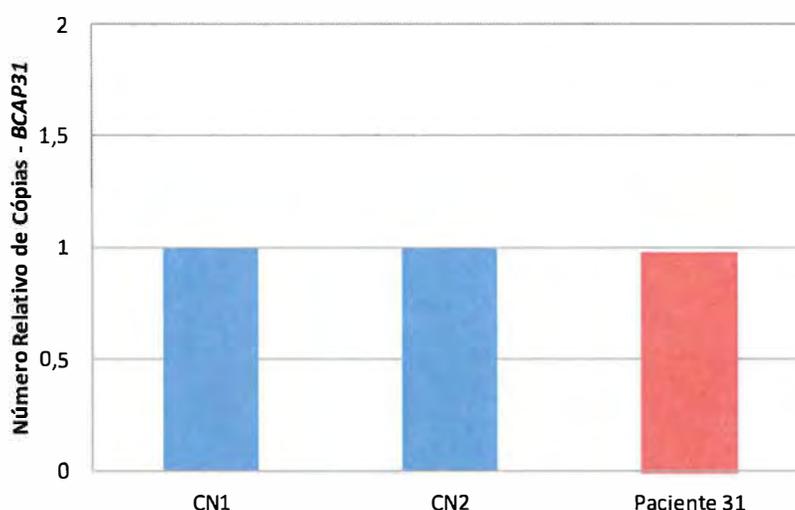


**Figura 25** - Resultado de qPCR indicando a deleção do gene *PRRT2* no paciente 28 e em sua mãe.



**Figura 26** - Paciente 28 com  $\text{del}(16)(\text{p}11.2)$  detectada por *array*-CGH. Observa-se estreitamento frontal do crânio, olhos fundos, narinas antevertidas e sobrepeso.

- na paciente 31 a análise de *array*-CGH detectou uma duplicação de 82,272 pb da região cromossômica Xq28 (localização chrX:152,949,788-153,032,059 pb, NCBI37/hg19), envolvendo os genes *SLC6A8* (OMIM\*300036), *BCAP31* (OMIM\*300398), *ABCD1* (OMIM\*300371) e parte do gene *PLXNB3* (OMIM\*300214). A técnica de qPCR, desenvolvida com *primers* específicos para o gene *BCAP31* (localização chrX:152,979,957-152,980,057 pb, NCBI37/hg19), foi realizada nas amostras de DNA do CN1, CN2 e da paciente 31, apresentando os respectivos números relativos de *amplicons*: 1,0; 1,0 e 0,99 (Figura 27). Realizou-se um segundo exame de *array*-CGH na amostra de DNA da paciente 31, entretanto, nenhuma alteração genômica foi encontrada. Dessa forma, a técnica de qPCR não foi aplicada nos pais da probanda. Como o *array*-CGH apresentou uma alteração falso-positiva o resultado não foi reproduzido.



**Figura 27** – Resultado de qPCR da paciente 31 indicando valor relativo de cópias do gene *BCAP31* normal.

Na avaliação clínica, a paciente 31, sexo feminino, 19 anos, apresentou DI leve, dificuldade de aprendizagem e déficit de atenção, baixa estatura E=144 cm (<3%), corpo esguio com P=36,000 g (<3%), microcefalia com PC=52 cm ( $\pm 2\%$ ), DII=2,6 cm ( $\pm 25\%$ ) e DIE=8,6 cm (50-75%). Também foram constatadas algumas dismorfias, incluindo assimetria de face, nariz com ponta bulbosa e narinas antevertidas, lábio superior fino, implantação irregular dos dentes superiores, prognatismo, prega de *Hockey Stick*, camptodactilia bilateral do 3°, 4° e 5° dedos e clinodactilia bilateral do 5° dedo. Exames de raios-X confirmaram acentuada escoliose à direita em S e irregularidades de vértebras torácicas. A mãe relatou que probanda apresentou atraso de crescimento intrauterino e malformações cardíacas (Tetralogia

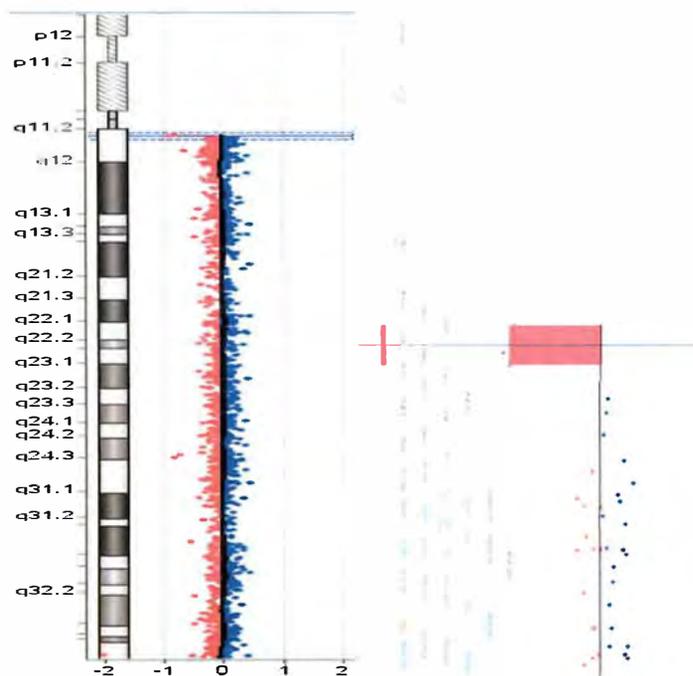
de Fallot) corrigidas cirurgicamente. A paciente 31 não apresenta histórico de DI na família, reunindo 8 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 28).



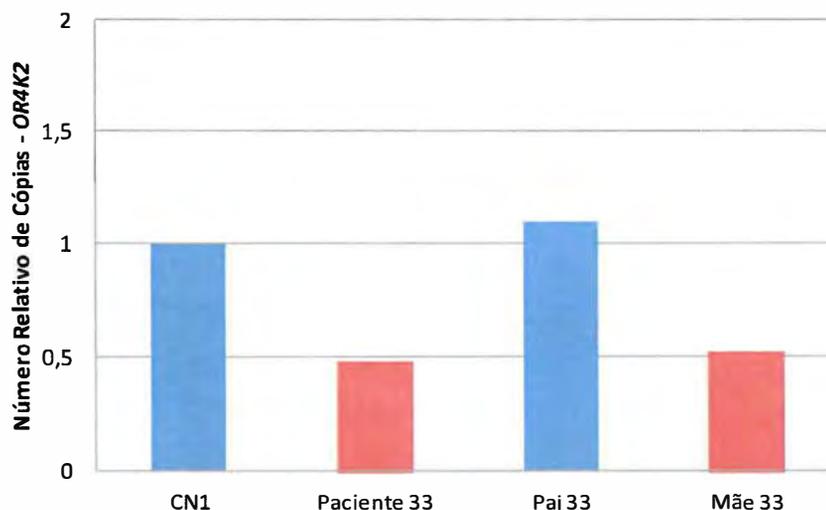
**Figura 28** – Paciente 31. Observa-se corpo esguio, microcefalia, assimetria de face, nariz com ponta bulbosa e narinas antevertidas, lábio superior fino, prognatismo e acentuada escoliose.

- a análise por *array*-CGH identificou no paciente 33 uma deleção intersticial da região cromossômica 14q11.2 (localização chr14:20,253,739-20,376,267 pb, NCBI37/hg19) com 122,529 pb de extensão envolvendo as sequências referências (*RefSeqs* - *reference sequence*) dos genes *OR4N2* (NM\_001004723) e *OR4K2* (NM\_001005501.1) (Figura 29). A técnica de qPCR, realizada com *primers* para a região *OR4K2* (localização chr14:20,269,502-20,269,608 pb, NCBI37/hg19), apresentou os seguintes números relativos de cópias para o CN1, paciente 33, pai e mãe do probando: 1,0; 0,48; 1,1; 0,52 (Figura 30). No exame clínico, o paciente 33, sexo masculino, 12 anos, apresentou E=164 cm (95-97%), P=77,500 g (97%),

PC=56 cm (75-98%), DII=3,3 cm (50-75%), DIE=10,6 cm (>97%). O probando também exibiu DI moderada, atraso de desenvolvimento motor (começou a andar aos dois anos), atraso de linguagem (primeiras palavras aos três anos), dismorfias incluindo face triangular, discreta sinofre, sobrancelha com pelos ao contrário na região de dentro, epicanto, estrabismo convergente, miopia, rotação posterior das orelhas, prega dividindo a ponta nasal em duas porções, palato arqueado, filtro curto e bem marcado, lábio superior proeminente em arco de cúpido, lábio inferior grosso e evertido, prognatismo acentuado e pescoço curto. Além disso, constatou-se clinodactilia do 5º dedo, braquidactilia dos dedos da mão, mão medindo 18,4 cm (75-97%) e dedo médio com 7,2 cm (50-75%) relação dedo/mão 39% (<3%), e dos pés, com intervalo aumentado entre o 1º e 2º artelhos e criptorquidia corrigida por cirurgia. Segundo familiares, o probando apresenta comportamento agressivo, com mania de morder os dedos. O paciente 33 possui histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, alcançando 7 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 31).



**Figura 29** – Perfil de *array*-CGH do paciente 33 com microdeleção del(14)(q11.2) de herança materna.

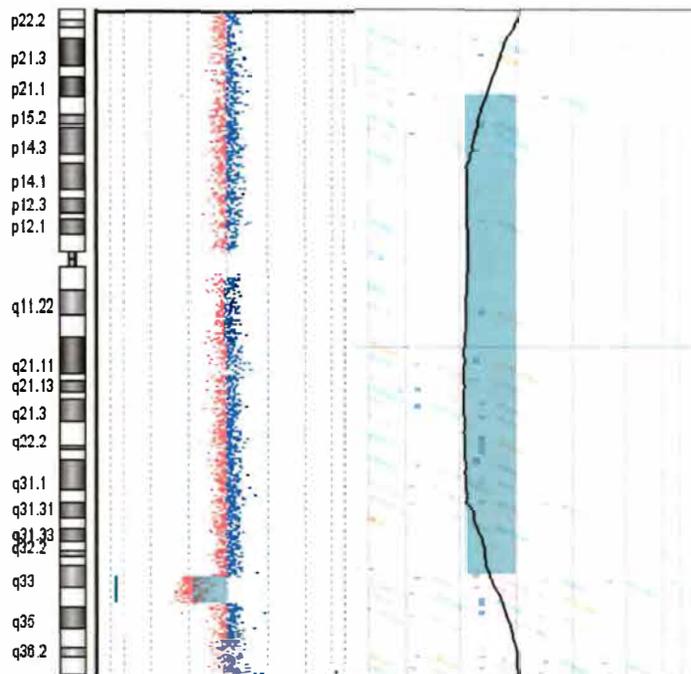


**Figura 30** - Resultado de qPCR indicando a deleção do gene *OR4K2* no paciente 33.

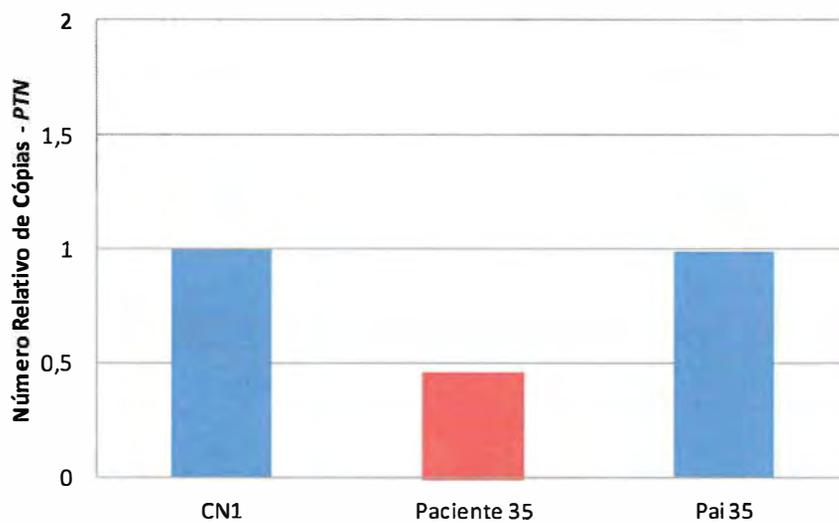


**Figura 31** – Paciente 33 com  $\text{del}(14)(q11.2)$  detectada por *array*-CGH. Observa-se face triangular, rotação posterior das orelhas, filtro curto e bem marcado, lábio superior proeminente em arco de cúpido, lábio inferior grosso e evertido, prognatismo acentuado, pescoço curto, clinodactilia do 5º dedo e braquidactilia dos dedos da mão.

- o exame de *array*-CGH da paciente 35 revelou uma deleção intersticial da porção cromossômica 7q33-q34 (localização chr7:134,870,494-141,359,194 pb, NCBI37/hg19) com cerca de 6,4 Mb de extensão. Nessa região situam-se os genes *STRA8* (OMIM\*609987), *CNOT4* (OMIM\*604911), *NUP205* (OMIM\*614352), *SLC13A4* (OMIM\*604309), *LUZP6* (OMIM\*611050), *MTPN* (OMIM\*606484), *CHRM2* (OMIM\*118493), *PTN* (OMIM\*162095), *DGKI* (OMIM\*604072), *CREB3L2* (OMIM\*608834), *AKR1D1* (OMIM\*604741), *TRIM24* (OMIM\*603406), *SVOPL* (OMIM\*611700), *ATP6V0A4* (OMIM\*605239), *KIAA1549* (OMIM\*613344), *ZC3HAV1* (OMIM\*607312), *UBN2* (OMIM\*613841), *LUC7L2* (OMIM\*613056), *HIPK2* (OMIM\*606868), *TBXAS1* (OMIM\*274180), *PARP12* (OMIM\*612481), *MKRNI* (OMIM\*607754), *NDUFB2* (OMIM\*603838), *BRAF* (OMIM\*164757), *MRPS33* (OMIM\*611993) e o gene *AGK* (OMIM\*610345) (Figuras 32). A técnica de qPCR foi realizada utilizando-se *primers* desenhados especificamente para o gene *PTN* (localização chr7:136,912,940-136,913,054 pb, NCBI37/hg19), indicando que o número relativo de cópias do gene *PTN* apresentado pelo CN1, paciente 35 e pai da probanda foi 1,0, 0,46 e 0,99, respectivamente (Figura 33). A mãe da probanda não pode ser estudada. Na avaliação clínica, a paciente 35, sexo feminino, 32 anos, exibiu baixa estatura E=140 cm (<3%), PC=53 cm (2-50%), hipertelorismo ocular com DII=3,2 cm (50-75%) e DIE=9,7 cm (97%), DI grave, atraso motor e de linguagem (fala disártrica), face grotesca, nariz proeminente com raiz alta e ponta bulbosa, orelhas com implantação baixa, ~~fil~~ro curto e marcado e boca grande com lábio superior fino. Também foram constatados hipotireoidismos, obesidade truncal com seios vastos, mãos com dedos longos e finos, afileamento das falanges distais, polegar com implantação alta e mobilidade diminuída. Familiares informaram que a probanda iniciou a puberdade precocemente, com períodos menstruais normais. Foi relatado ainda atraso de crescimento intrauterino, ocorrência de crises convulsivas neonatais (hipocalcemia) e crises nervosas, ambas tratadas com diazepam, além de comportamentos compulsivos (comer e mexer em feridas) e frequentes episódios de distúrbio do sono, apesar do emprego de remédios para insônia. A paciente 35 exibe histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, atingindo 8 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 34).



**Figura 32** - Perfil de *array*-CGH da paciente 35 com microdeleção del(7)(q33-q34) de origem indeterminada.



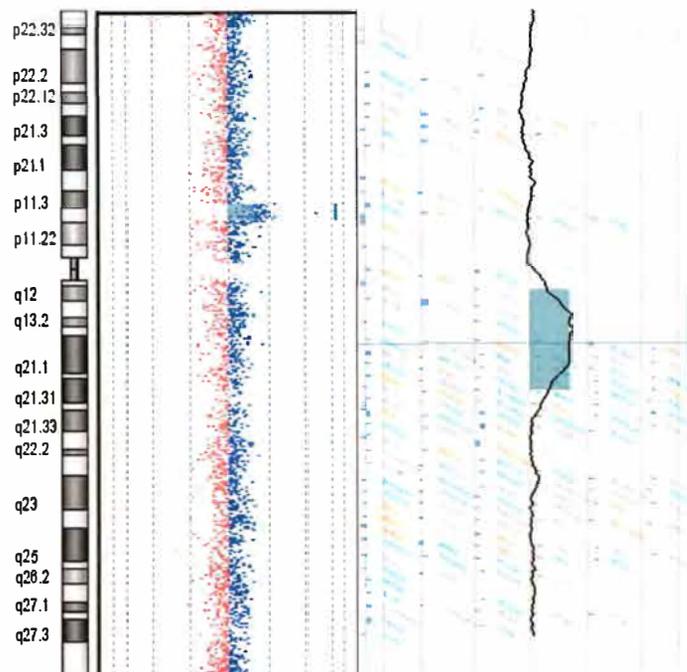
**Figura 33** – Resultado de qPCR indicando a deleção do gene *PTN* na paciente 35.



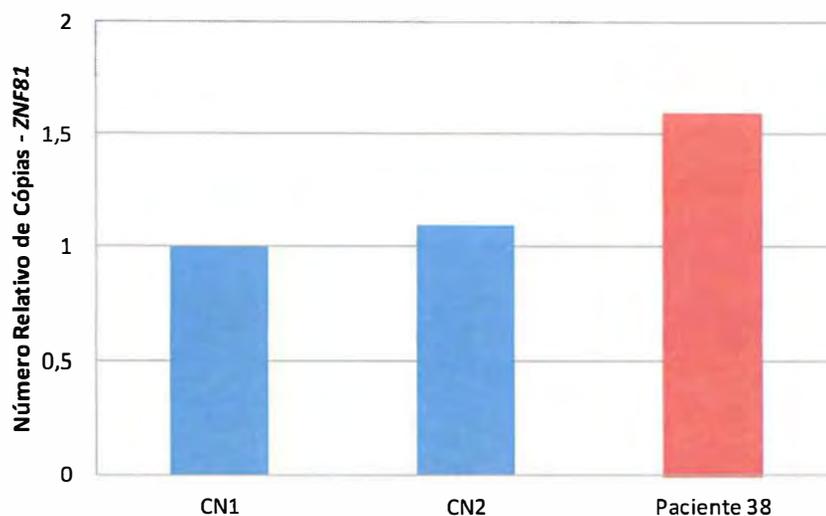
**Figura 34** - Paciente 35 com  $\text{del}(7)(\text{q}33\text{-q}34)$  detectada por *array*-CGH. Observa-se face grotesca, nariz proeminente com raiz alta e ponta bulbosa, filtro curto e marcado, boca grande com lábio superior fino, obesidade truncal com seios vastos, mãos com dedos longos e finos, afilamento das falanges distais e polegar com implantação alta.

- o *array*-CGH da paciente 38 apresentou uma duplicação intersticial na região cromossômica Xp11.3-p11.23 (localização chrX:44,375,988-48,372,445 pb, NCBI37/hg19), com dimensão de 3,996,458 pb, compreendendo os genes *FUNDC1* (OMIM\*300871), *DUSP21* (OMIM\*300678), *KDM6A* (OMIM\*300128), *MIR221* (OMIM\*300568), *ZNF673* (OMIM\*300585), *ZNF674* (OMIM\*300573), *CHST7* (OMIM\*300375), *SLC9A7* (OMIM\*300368), *RP2* (OMIM\*300757), *PHF16* (OMIM\*300618), *RGN* (OMIM\*300212), *NDUFB11* (OMIM\*300403), *RBM10* (OMIM\*300080), *UBA1* (OMIM\*314370), *INE1* (OMIM\*300164), *CDK16* (OMIM\*311550), *USP11* (OMIM\*300050), *ZNF157* (OMIM\*300024), *ZNF41* (OMIM\*314995), *ARAF1* (OMIM\*311010), *SYN1* (OMIM\*313440), *TIMP1* (OMIM\*305370), *CFP* (OMIM\*300383), *ELK1* (OMIM\*311040), *UXT* (OMIM\*300234), *ZNF81* (OMIM\*314998), *ZNF21* (OMIM\*314993), *SPACA5* (OMIM\*300593), *ZNF630* (OMIM\*300819), *SSX6* (OMIM\*300541), *SSX5* (OMIM\*300327), *SSX1* (OMIM\*312820), *SSX9* (OMIM\*300544), *SSX3* (OMIM\*300325), *SSX4* (OMIM\*300326), *SLC38A5* (OMIM\*300649), *FTSJ1* (OMIM\*300499) e parte do gene

*PORCN* (OMIM\*300651) (Figura 35). A técnica de qPCR foi empregada com *primers* construídos especificamente para o gene *ZNF81* (localização chrX:47,696,328-47,696,445 pb, NCBI37/hg19) e realizada nas amostras de DNA do CN1, CN2 e da paciente 38 que revelaram os respectivos números relativos de cópias: 1,0; 1,1 e 1,64 (Figura 36). Na avaliação clínica da paciente 38, sexo feminino, 44 anos, constatou-se DI moderada, atraso motor leve, déficit de linguagem acentuado, E=155 cm ( $\pm 25\%$ ), tendência para obesidade com sobrepeso com P=83,500 g (95-97%), macrocefalia com PC=60 cm ( $>98\%$ ), frontal proeminente, hipertelorismo ocular com DII=3,6 cm ( $>97\%$ ) e DIE 9,8 cm ( $\pm 97\%$ ), órbitas cheias, lábios finos, palato alto e pescoço curto. Segundo familiares a probanda teve menarca aos 12 anos de idade, apresentando ciclos regulares. Atualmente, devido a distúrbios comportamentais, faz uso dos fármacos haloperidol e carbamazepina. A paciente 38 apresenta histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, obtendo 5 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 37).



**Figura 35** - Perfil de *array*-CGH da paciente 38 com microduplicação dup(X)(p11.2-p11.23) de origem indeterminada.



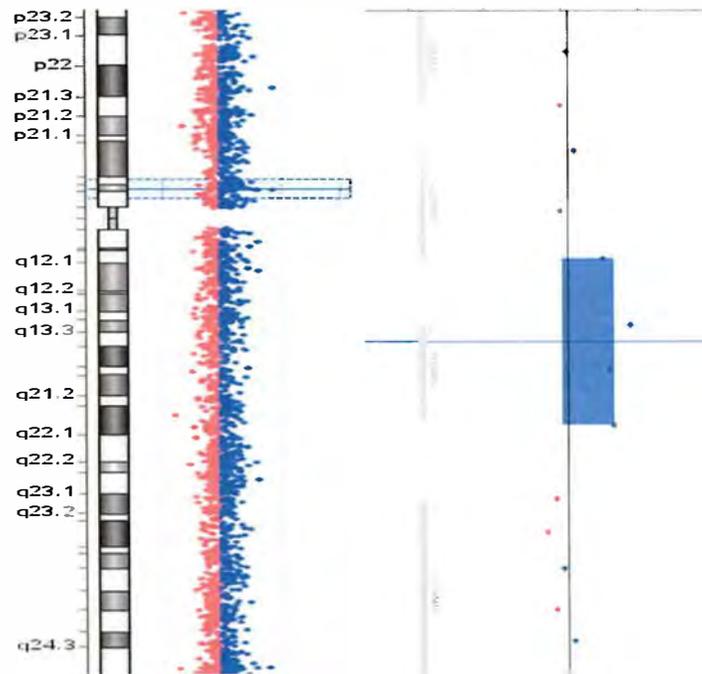
**Figura 36** – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *ZNF81* na paciente 38.



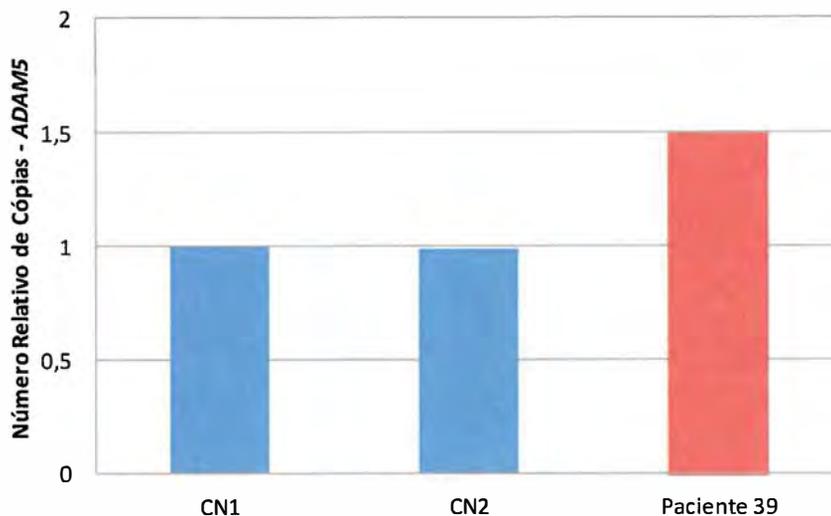
**Figura 37** - Paciente 38 com *dup(X)(p11.2-p11.23)* detectada por *array*-CGH. Observa-se macrocefalia, frontal proeminente, lábios finos, pescoço curto e sobrepeso.

- no paciente 39 foi revelado uma duplicação de 127,265 pb no segmento cromossômico 8p11.22 (localização chr8:39,258,894-39,386,158 pb, NCBI37/hg19), onde estão localizados parte dos pseudogenes *ADAM5* e *ADAM3A* (Figura 38). Realizou-se qPCR

com *primers* para o pseudogene *ADAM5* (chr8:39,307,441-39,307,557 pb, NCBI37/hg19) nas amostras de DNA do CN1, CN2 e do paciente 39 que apresentaram os valores relativos de cópias 1,0, 0,99 e 1,5, respectivamente (Figura 39). Os pais do probando não aceitaram participar da pesquisa.



**Figura 38** - Perfil de *array*-CGH do paciente 39 com microduplicação dup(8)(p11.22) de origem indeterminada.



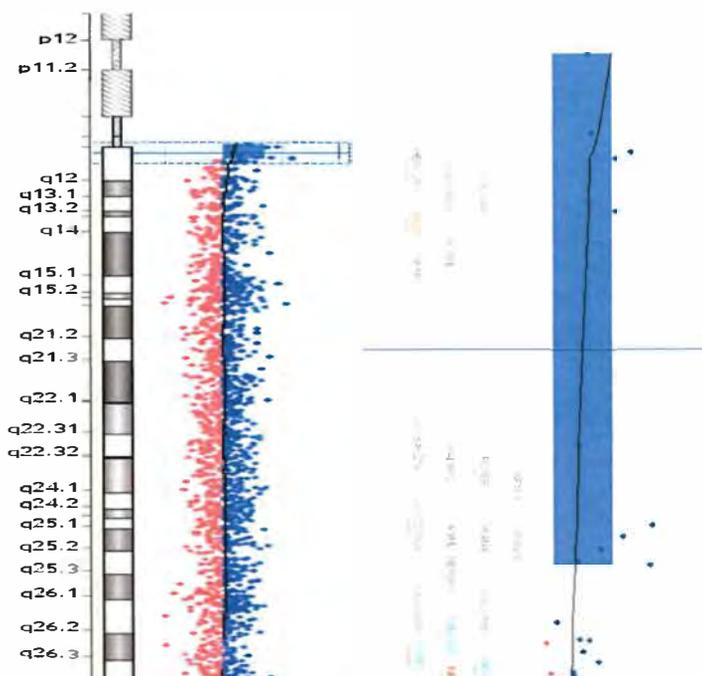
**Figura 39** – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *ADAM5* no paciente 39.

Na análise clínica o paciente 39, sexo masculino, 24 anos, apresentou DI moderada, E=1,76 cm (50-75%), P=79,000 g ( $\pm 75\%$ ), microcefalia com PC=53 cm (<2%), DII=3,0 cm (50%) e DIE=9,0 cm (50-75%). Foram relatadas crises convulsivas controladas com o uso de carbamazepina. O probando apresentou poucas dismorfias, incluindo raiz nasal baixa, orelhas proeminentes e espaçamento bilateral entre 1° e 2° artelhos. O paciente 38 possui histórico familiar (materno) de DI compatível com herança mendeliana, apresentando 4 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 40).

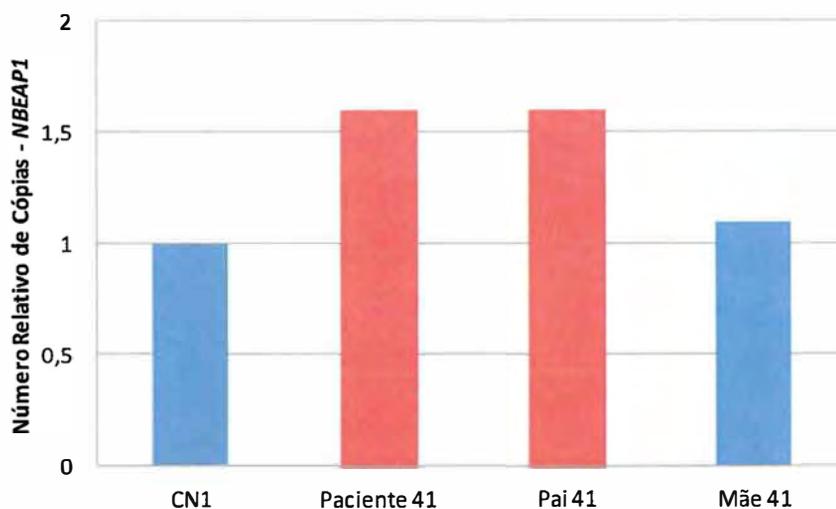


**Figura 40** – Paciente 39 com dup(8)(p11.22) detectada por *array*-CGH. Observa-se raiz nasal baixa e orelhas proeminentes.

- no paciente 41 a análise de *array*-CGH detectou uma duplicação da região cromossômica 15q11.1-q11.2 (localização chr15:20,481,702-22,378,143 pb, NCBI37/hg19) contendo 1,896,442 pb onde estão localizados os genes *NBEAP1*(OMIM\*601889) e *POTEB* (OMIM\*608912) (Figura 41). A técnica de qPCR realizada com *primers* para o gene *NBEAP1* (localização chr15:20,871,163-20,871,275 pb, NCBI37/hg19) revelou que o número relativo de cópias do gene *NBEAP1* apresentado pelo CN1, paciente 41, pai e mãe do probando foi 1,0; 1,6; 1,6 e 1,1, respectivamente (Figura 42).



**Figura 41** - Perfil de *array*-CGH do paciente 41 com microduplicação dup(15)(q11.1-q11.2) de herança paterna.



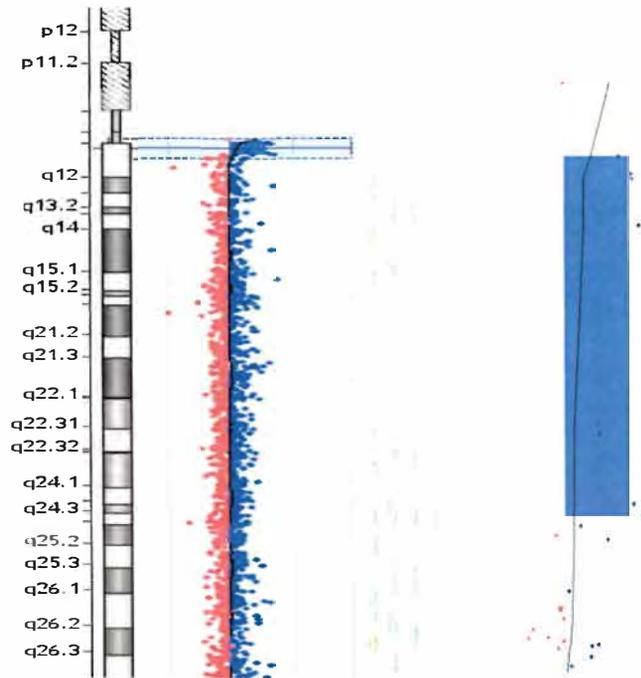
**Figura 42** – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *NBEAP1* no paciente 41 e no seu pai.

No exame clínico do paciente 41, sexo masculino, 16 anos, verificou-se baixa estatura E=158 cm (5-10%), P=62,400 g ( $\pm 50\%$ ), PC=54,5 cm ( $\pm 50\%$ ), DII=3,6 cm (>97%), telecanto com DIE=9,6 cm (75-97%), DI leve, déficit de aprendizagem e dismorfias incluindo epicanto com fenda palpebral oblíqua para cima, orelha rodada, frouxidão ligamentar, prega de *Hockey Stick* bilateral e intervalo aumentado entre 1° e 2° artelhos bilateralmente. O paciente 41 apresenta histórico familiar (materno) de DI compatível com herança mendeliana, somando 5 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 43).

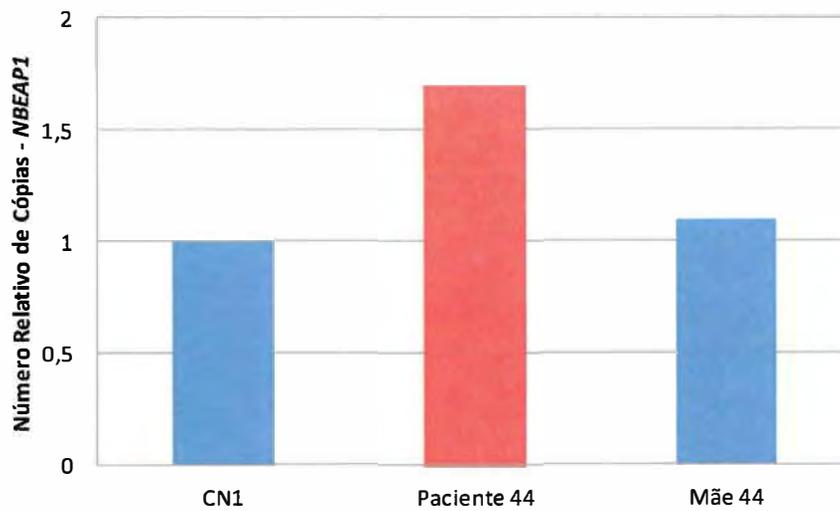


**Figura 43** – Paciente 41 com dup(15)(q11.1-q11.2) detectada por *array*-CGH. Observa-se orelha rodada e lábios salientes.

- o resultado de *array*-CGH do paciente 44 indicou uma duplicação do segmento cromossômico 15q11.1-q11.2 (localização chr15:20,102,541-22,509,254 pb, NCBI37/hg19) abrangendo aproximadamente 2,4 Mb e envolvendo os genes *NBEAP1*(OMIM\*601889) e *POTEB* (OMIM\*608912) (Figura 44). A técnica de qPCR, efetuada com *primers* desenhados especificamente para o gene *NBEAP1* (localização chr15:20,871,163-20,871,275 pb, NCBI37/hg19), mostrou que os números relativos de cópias do gene *NBEAP1* exibidos pelo CN1, paciente 44 e sua mãe foram, nessa ordem, 1,0; 1,7 e 1,1 (Figura 45). O pai do probando não aceitou participar da pesquisa. Na avaliação clínica, o paciente 44, sexo masculino, 17 anos, apresentou DI moderada, E=171 cm (50-75%), P=63,500 g (50-75%), PC= 54,5 cm ( $\pm$ 50%), DII=3,3 cm ( $\pm$ 75%), DIE=9,3 cm ( $\pm$ 75%), face alongada, epicanto com fenda palpebral medindo 3,1 cm (>95%), orelhas proeminentes, narinas antevertidas e lábio superior fino. O paciente 44 possui histórico familiar (paterno) de DI compatível com herança mendeliana, atingindo 3 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 46).



**Figura 44** - Perfil de *array*-CGH do paciente 44 com microduplicação dup(15)(q11.1-q11.2) de origem indeterminada.

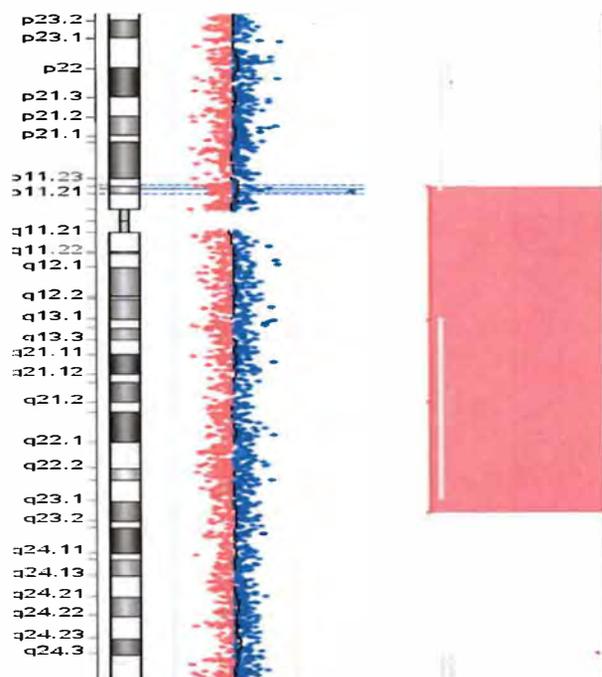


**Figura 45** – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *NBEAP1* no paciente 44.

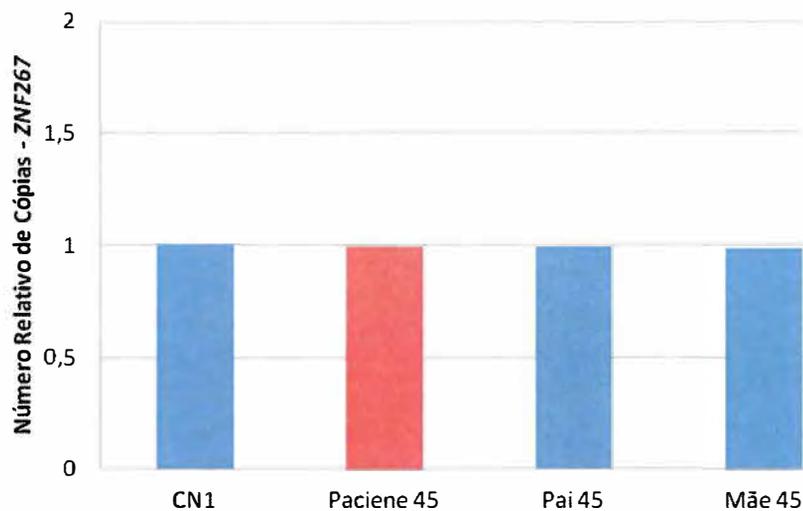


**Figura 46** – Paciente 44 com dup(15)(q11.1-q11.2) detectada por *array*-CGH. Observa-se face alongada, orelhas proeminentes, narinas antevertidas e lábio superior fino.

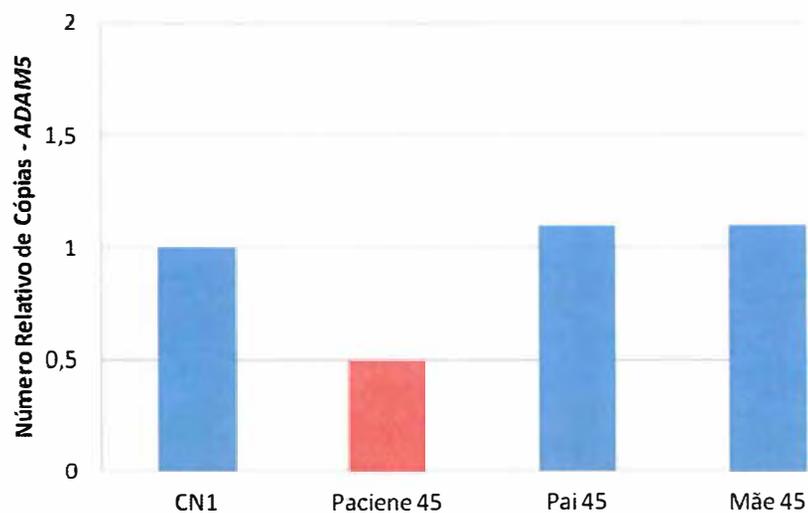
- na paciente 45 a análise de *array*-CGH revelou uma duplicação intersticial da região cromossômica 16p11.2 (localização chr16:31,897,383-33,604,468 pb, NCBI37/hg19) com extensão aproximada de 1,7 Mb, envolvendo parte do gene *ZNF267*, além de uma deleção de 127,265 pb no segmento cromossômico 8p11.22 (localização chr8:39,258,894-39,386,158 pb, NCBI37/hg19) compreendendo parte dos pseudogenes *ADAM5* e *ADAM3A* (Figura 47). A técnica de qPCR para verificação das alterações foi realizada com *primers* para o gene *ZNF267* (localização chr16:31,881,307-31,881,414 pb, NCBI37/hg19) e para o pseudogene *ADAM5* (chr8:39,307,441-39,307,557 pb, NCBI37/hg19). Os respectivos valores relativos de cópias do gene *ZNF267* para o CN1, paciente 45 e pai e mãe da probanda foram 1,0; 0,99; 0,99 e 0,98 (Figura 48). Enquanto o número relativo de cópias do pseudogene *ADAM5* apresentado pelo CN1, paciente 45, pai e mãe da probanda foram 1,0; 0,5; 1,1; e 1,1 respectivamente (Figura 49). No exame clínico a paciente 45, sexo feminino, 17 anos, apresentou DI leve, E= 164 cm (50%), sobrepeso com P=78,000 g ( $\pm 95\%$ ), microcefalia com PC= 51,5 cm (<2%) e desvio tibial importante do 4° e 5° artelhos. A paciente 45 exibe histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, alcançando 4 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 50).



**Figura 47** - Perfil de *array*-CGH da paciente 45 com microdeleção del(8)(p11.22) *de novo*.



**Figura 48** - Resultado de qPCR da paciente 45 indicando valor relativo de cópias do gene *ZNF267* normal.

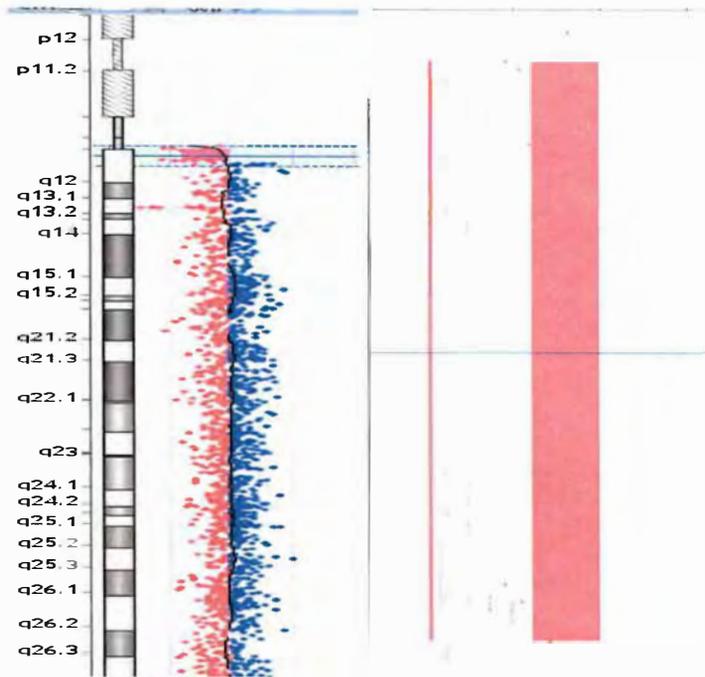


**Figura 49** – Resultado de qPCR indicando a deleção do gene *ADAM5* na paciente 45.

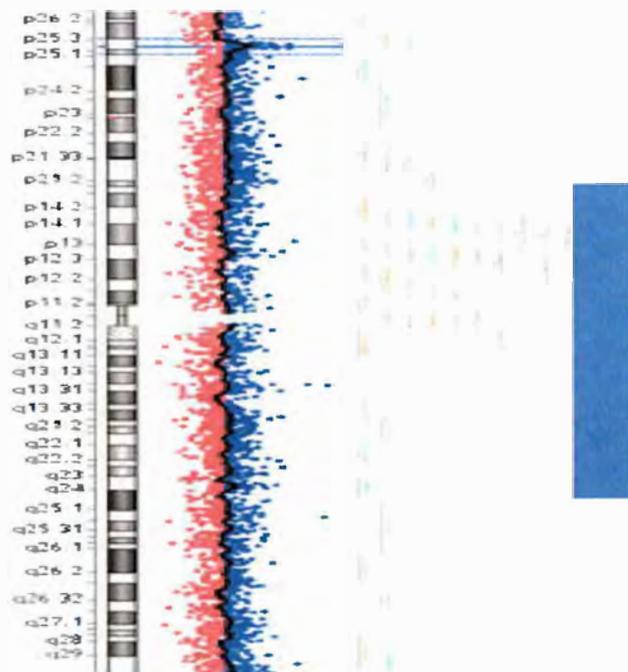


**Figura 50** – Paciente 45 com  $\text{del}(8)(\text{p}11.22)$  detectada por *array*-CGH. Observa-se microcefalia e sobrepeso.

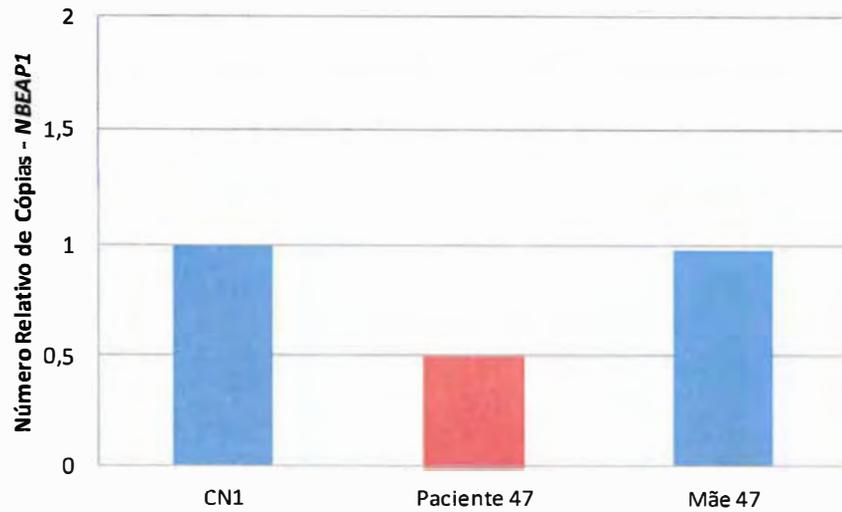
- no indivíduo 47 o exame de *array*-CGH identificou uma deleção de aproximadamente 1,9 Mb da região cromossômica 15q11.1-q11.2 (localização chr15:20,575,646-22,509,254 pb, NCBI37/hg19) compreendendo os genes *NBEAP1* (OMIM\*601889) e *POTEB* (OMIM\*608912) (Figura 51), além de uma duplicação do segmento cromossômico 3p25.3 (localização chr3:9,576,330-11,382,152 pb, NCBI37/hg19), com cerca de 1,8 Mb, abrangendo totalmente os genes *MTMR14* (OMIM\*611089), *BRPF1* (OMIM\*602410), *OGG1* (OMIM\*601982), *CAMK1* (OMIM\*604998), *TADA3* (OMIM\*602945), *ARPC4* (OMIM\*604226), *CIDEC* (OMIM\*612120), *IL17RE* (OMIM\*614995), *IL17RC* (OMIM\*610925), *CRELD1* (OMIM\*607170), *FANCD2* (OMIM\*613984), *BRK1* (OMIM\*611183), *VHL* (OMIM\*608537), *IRAK2* (OMIM\*603304), *GHRL* (OMIM\*605353), *SEC13L1* (OMIM\*600152), *ATP2B2* (OMIM\*108733), *SLC6A11* (OMIM\*607952), *SLC6A1* (OMIM\*137165) e *HRH1* (OMIM\*600167), e parcialmente os genes *LHFPL4* (OMIM\*610240) e *ATG7* (OMIM\*608760) (Figura 52). O exame de qPCR foi realizado com *primers* para os genes *NBEAP1* (localização chr15:20,871,163-20,871,275 pb, NCBI37/hg19) e *ATP2B2* (localização chr3:10,392,505-10,392,616 pb, NCBI37/hg19). Os valores relativos de cópias do gene *NBEAP1* para o CN1, paciente 47 e sua mãe foram, nessa ordem, 1,0; 0,5 e 0,98 (Figura 53). Enquanto o número relativo de cópias do gene *ATP2B2* apresentado pelo CN1, paciente 47 e sua mãe foram 1,0; 1,6 e 1,58, respectivamente (Figura 54). Ao ser examinado, o paciente 47, sexo masculino, 20 anos, apresentou DI leve, baixa estatura E=168,5 cm (10-25%), sobrepeso com P=90,000 g (90%), PC=56 cm (50%), DII=3,0 cm (50%), DIE=9,0 cm (50-75%), face levemente triangular, retração temporal e orelhas proeminentes e um pouco rodadas. Exibiu bom desenvolvimento puberal. O probando apresenta histórico familiar (materno) de DI compatível com herança mendeliana, somando 3 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 55).



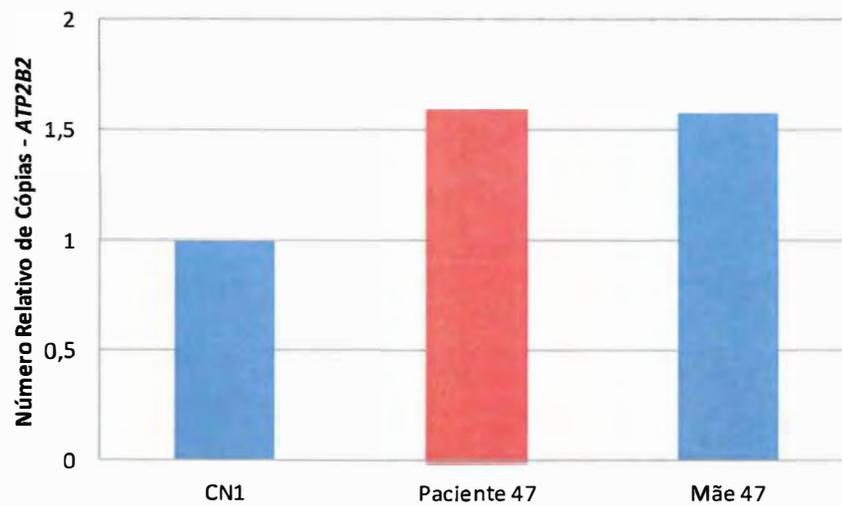
**Figura 51** - Perfil de *array*-CGH do paciente 47 com microdeleção del(15)(q11.1-q11.2) de origem indeterminada.



**Figura 52** - Perfil de *array*-CGH do paciente 47 com microduplicação dup(3)(p25.3) de herança materna.



**Figura 53** – Resultado de qPCR indicando a deleção do gene *NBEAP1* no paciente 47.



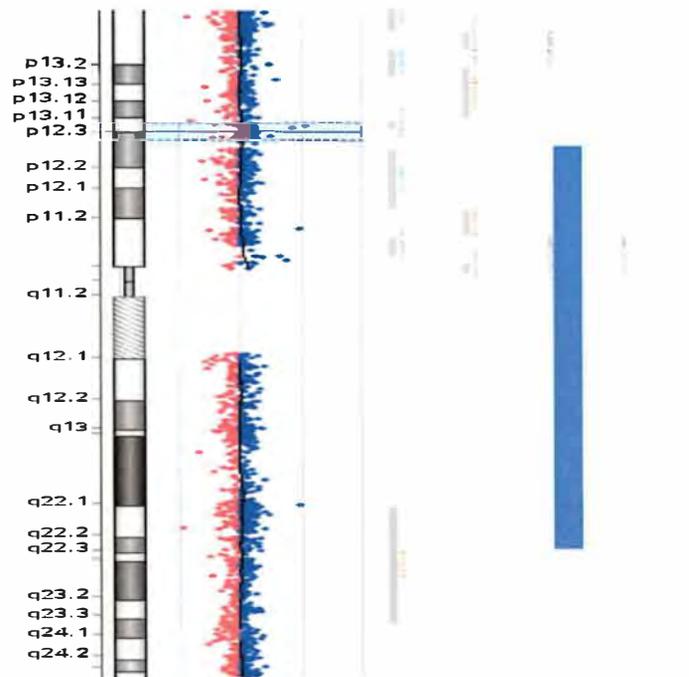
**Figura 54** - Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *ATP2B2* no paciente 47 e em sua mãe.



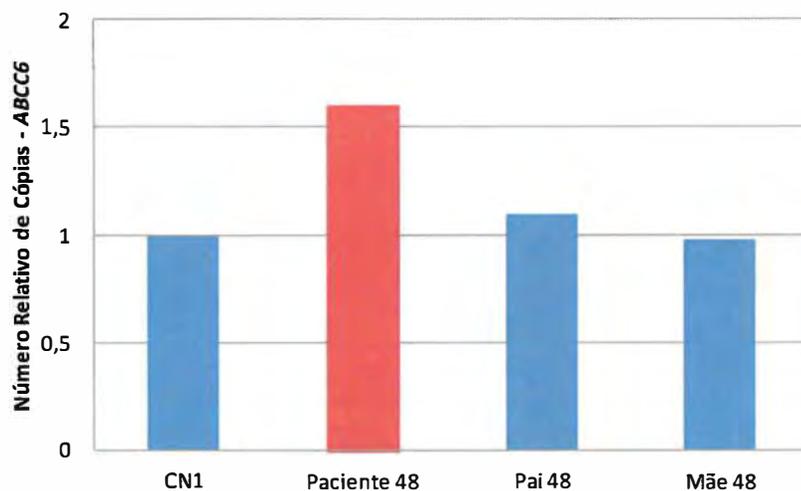
**Figura 55** – Paciente 47 com  $\text{del}(15)(\text{q}11.1\text{-q}11.2)$  e  $\text{dup}(3)(\text{p}25.3)$  detectadas por *array*-CGH. Observa-se face levemente triangular, retração temporal, orelhas proeminentes e um pouco rodadas. Foto não atual.

- na paciente 48 a análise de *array*-CGH revelou uma duplicação da região cromossômica 16p13.11-p12.3 (localização chr16:16,031,655-17,330,246 pb, NCBI37/hg19), com extensão aproximada de 1,3 Mb, incluindo os genes *ABCC1* (OMIM\*158343), *ABCC6* (OMIM\*603234), *NOMO3* (OMIM\*609159) e, parcialmente, o gene *XYLT1* (OMIM\*608124) (Figura 56). O método de qPCR, efetuado com *primers* para o gene *ABCC6* (localização chr16:16,232,260-16,232,367 pb, NCBI37/hg19), apresentou os seguintes valores relativos de cópias gênicas para o CN1, paciente 48, pai e mãe da probanda: 1,0; 1,6; 1,1; e 0,98, respectivamente (Figura 57). No exame clínico a paciente 48, sexo feminino, 14 anos, apresentou DI moderada, baixa estatura E=140,5 cm (<3%), baixo peso P=31,000 g (<3%), microcefalia com PC=49,5 cm (<2%), DII=2,7 cm (3-25%) e DIE=7,8 cm (3-25%), narinas antevertidas, filtro marcado, lábio superior delgado e em arco, prognatismo, alterações esqueléticas incluindo frouxidão ligamentar (dedos e artelho), dolicocefalia, aracnodactilia (punho e polegar) e camptodactilia da 3ª e 4ª falanges distais. Também foi relatado atraso de linguagem (primeiras palavras aos 5 anos) crises de ausência, alterações psicóticas, comportamento agressivo, temperamento disruptivo e episódios de epilepsia (exame de

eletroencefalograma alterado) tratados com uso de ácido valproico. A paciente 48 exibe histórico familiar de DI incompatível com herança mendeliana, atingindo 6 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 58).



**Figura 56** – Perfil de *array*-CGH da paciente 48 com microduplicação dup(16)(p13.11-p12.3) de origem indeterminada.



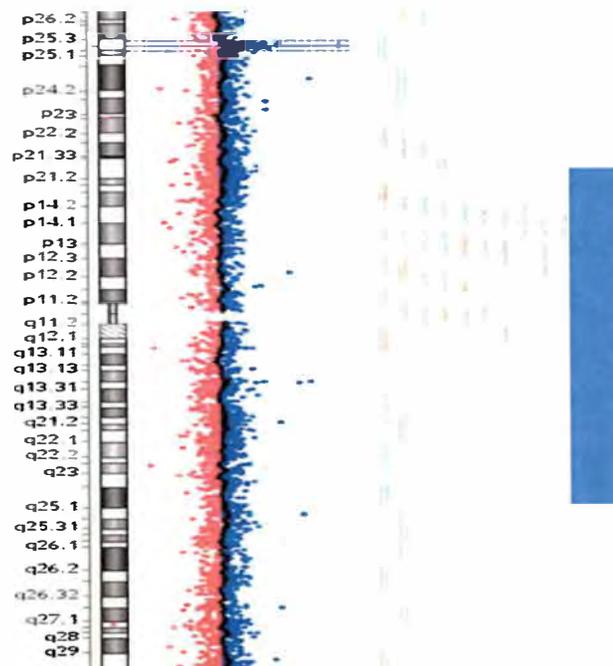
**Figura 57** – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *ABCC6* na paciente 48.



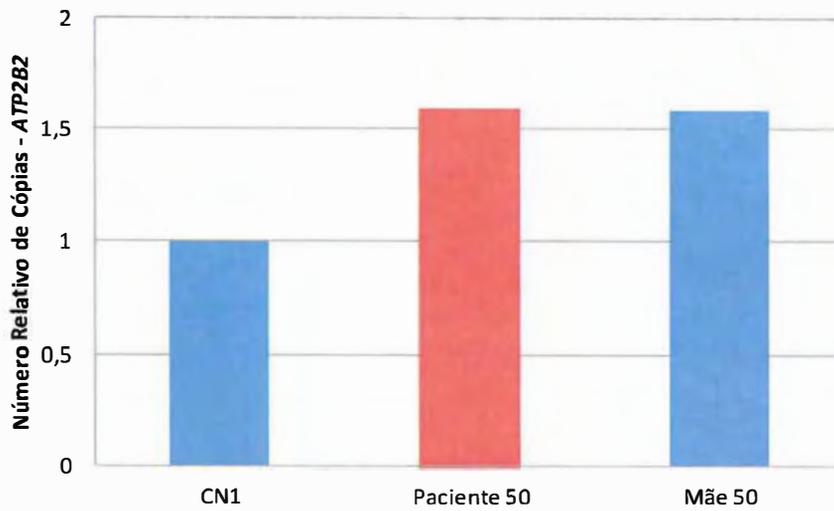
**Figura 58** – Paciente 48 com dup(16)(p13.11-p12.3) detectada por *array*-CGH. Observa-se baixo peso, microcefalia, narinas antevertidas, filtro marcado, lábio superior delgado e em arco, prognatismo e aracnodactília.

- o indivíduo 50 apresentou uma duplicação do segmento cromossômico 3p25.3 (localização chr3:9,576,330-11,382,152 pb, NCBI37/hg19), com cerca de 1,8 Mb, abrangendo totalmente os genes *MTMR14* (OMIM\*611089), *BRPF1* (OMIM\*602410), *OGG1* (OMIM\*601982), *CAMK1* (OMIM\*604998), *TADA3* (OMIM\*602945), *ARPC4* (OMIM\*604226), *CIDEC* (OMIM\*612120), *IL17RE* (OMIM\*614995), *IL17RC* (OMIM\*610925), *CRELD1* (OMIM\*607170), *FANCD2* (OMIM\*613984), *BRK1* (OMIM\*611183), *VHL* (OMIM\*608537), *IRAK2* (OMIM\*603304), *GHRL* (OMIM\*605353), *SEC13L1* (OMIM\*600152), *ATP2B2* (OMIM\*108733), *SLC6A11* (OMIM\*607952), *SLC6A1* (OMIM\*137165) e *HRH1* (OMIM\*600167), e parcialmente os genes *LHFPL4* (OMIM\*610240) e *ATG7* (OMIM\*608760) (Figura 59), idêntica a encontrada em seu irmão o paciente 47. A técnica de qPCR realizada com *primers* para o gene *ATP2B2* (localização chr3:10,392,505-10,392,616 pb, NCBI37/hg19) mostrou que os valores relativos de cópias gene do *ATP2B2* para o CN1, paciente 50 e sua mãe foram, nessa ordem, 1,0; 1,6 e

1,59 (Figura 60) . No exame clínico do paciente 50, sexo masculino, 22 anos, observou-se DI leve, E=165 cm ( $\pm 5\%$ ), sobrepeso com P=100,000 g ( $\pm 97\%$ ), PC=58 cm (98%), DII=3,2 cm (50-75%), DIE=9,1 cm (50-75%), implantação dos cabelos em tridente na nuca, retração temporal, sobrancelhas grossas, orelhas proeminentes e um pouco rodadas, pescoço curto e *pectus excavatum*. Apresentou bom desenvolvimento puberal. A mãe referiu déficit de crescimento intrauterino e relatou atraso de fala (com início aos sete anos, três meses após ser matriculado na APAE). Atualmente sabe ler e escrever, porém com dificuldade. O paciente 50 possui histórico familiar (materno) de DI compatível com herança mendeliana, somando 6 pontos no *checklist* de de Vries (Figura 61).



**Figura 59** – Perfil de *array*-CGH do paciente 50 com microduplicação dup(3)(p25.3) de herança materna.



**Figura 60** – Resultado de qPCR indicando a duplicação do gene *ATP2B2* no paciente 50 e em sua mãe.



**Figura 61** - Paciente 50 com  $\text{dup}(3)(\text{p}25.3)$  detectada por *array*-CGH. Observa-se implantação dos cabelos em tridente na nuca, retração temporal, sobrancelhas grossas, orelhas proeminentes e um pouco rodadas, pescoço curto, *pectus excavatum* e sobrepeso.

## 6 DISCUSSÃO

A DI afeta aproximadamente 3% da população, entretanto, não é possível fornecer um diagnóstico etiológico ou uma elucidação do problema a uma porcentagem considerável desses pacientes e suas famílias (PÉREZ et al., 2011). Dessa forma, empregamos as técnicas de MLPA e *array*-CGH em um grupo de indivíduos com DI idiopática provenientes de três APAEs, localizadas nas cidades de Altinópolis-SP, Limeira-SP e Serrana-SP, com o intuito de esclarecer as causas dessa condição e também demonstrar a capacidade diagnóstica do MLPA e do *array*-CGH na investigação de alterações cromossômicas crípticas em pacientes com DI idiopática.

### 6.1 Alterações detectadas pela técnica de MLPA

A análise de 50 indivíduos com DI procedentes das APAEs de Altinópolis-SP, Limeira-SP e Serrana-SP, através dos kits de MLPA P036 e P070 específicos para as regiões subteloméricas, detectou apenas 01 caso anômalo posteriormente confirmado por qPCR, representando, neste estudo, uma taxa de detecção de alterações subteloméricas crípticas de 2% (1/50). Esta frequência (2%) é inferior a encontrada nos estudos de Koolen et al. (2004) (4,3%), Rooms et al. (2004) (5,3%), Kirchhoff et al. (2007) (4,2%), Hila et al. (2009) (10,3%), Mandal et al. (2009) (4,6%), Li et al. (2009) (6,7%), Madrigal et al. (2010) (4,7%), Jehee et al. (2011) (4,2%), Verdú-Pérez et al. (2011) (4,5%), Pohovski et al. (2013) (7,3%), Mundhofir et al. (2013) (3,7%), Medina et al. (2014) (4,2%) e Boggula et al. (2014) (7,4%), onde a taxa média de alterações crípticas detectadas em indivíduos com DI idiopática através de kits de MLPA para regiões subteloméricas foi de 5,5%, variando de 3,7% a 10,3%.

Os 50 indivíduos com DI idiopática também foram examinados através do kit P245, para síndromes de microdeleção comuns, que identificou a presença de anomalias cromossômicas crípticas em dois pacientes (2/50), incluindo uma deleção na região 4p detectada anteriormente pelos kits P036 e P070 (paciente 14) e uma duplicação na região 22q11.2 (paciente 27). Portanto, no presente estudo, a prevalência de desequilíbrios cromossômicos crípticos detectados através do kit P245 foi de 4%, menor que as encontradas nos trabalhos de Kirchhoff et al. (2007) (5,8%), Jehee et al. (2011) (9,2%), Pohovski et al. (2013) (14%) e Boggula et al. (2014) (6,9%), que revelaram uma frequência média de detecção de 9%.

Considera-se que, as diferentes frequências encontradas nos estudos sobre indivíduos com DI idiopática analisados pela técnica de MLPA resultem das diferentes estratégias de seleção de pacientes, do tamanho amostral, dos variados padrões de avaliação clínica pré-triagem e da qualidade do exame cariotípico convencional (RAUCH et al., 2006).

Segundo Flint e Knight (2003), embora o cariótipo convencional seja considerado capaz de identificar anomalias cromossômicas com, no mínimo, 5-10 Mb de extensão, o tamanho médio das alterações detectadas por técnicas de triagem subtelomérica em indivíduos com DI idiopática que apresentaram exame cariotípico normal é de aproximadamente 10 Mb, sendo que 15% delas possuem tamanho superior a 20 Mb. Rauch et al. (2006) investigaram através de várias metodologias a presença de alterações cromossômicas em indivíduos com DI idiopática que apresentaram cariótipo normal. Entretanto, após a realização do *screening* subtelomérico os pacientes foram submetidos a novo exame cariotípico com foco especial em certa região suspeita de estar alterada devido ao quadro clínico ou pela análise de um citogeneticista mais experiente. O novo exame de cariótipo revelou 10 anomalias subteloméricas não detectadas anteriormente, que foram então excluídas da amostra. Com isso, a frequência de alterações subteloméricas realmente crípticas encontrada em indivíduos com DI idiopática foi de 1,8% (10/570).

Com a aplicação complementar do kit P245 aos kits P036 e P070, foi possível aumentar a taxa de detecção de alterações cromossômicas crípticas de 2% para 4%, uma vez que o kit para síndromes de microdeleção identificou uma microduplicação na região 22q11.2 não avaliada pelos kits para regiões subteloméricas. Considera-se a utilização de kits para regiões subteloméricas juntamente com o kit para síndromes de microdeleção uma ótima opção para a triagem diagnóstica de rotina de anomalias cromossômicas crípticas, proporcionando um rendimento diagnóstico consideravelmente maior e, algumas vezes, fornecendo um melhor delineamento da alteração cromossômica, como observado nos trabalhos de KIRCHHOFF et al. (2007) (10,1%) AHN et al. (2008) (5,5%) e BOGGULA et al. (2014) (9,3%).

## 6.2 Alterações detectadas pela técnica de *array*-CGH

A investigação por *array*-CGH identificou variações genômicas em 56% (14/25) dos indivíduos com DI idiopática provenientes da APAE de Limeira, totalizando 16 variantes genômicas crípticas, visto que dois pacientes apresentaram duas variações cada um. A técnica de qPCR, realizada para validação dos achados de *array*-CGH, confirmou 14 e invalidou duas

(dupXq28; dup16q11.2) das 16 variantes genômicas detectadas por *array*-CGH, revelando uma frequência de falso-positivo de 8% (2/25). Entretanto, das 14 variações genômicas identificadas por *array*-CGH, apenas 6 foram consideradas patogênicas (del7q33-q34; del16p11.2; del17q12; dup16p13.11-p12.3; dup22q11.21; dupXp11.3-p11.23), enquanto as restantes foram classificadas como variações neutras (del8p11.22; del14q11.2; del15q11.1-q11.2; dup8p11.22; e duas dup15q11.1-q11.2) ou de relevância clínica indeterminada (duas dup3p25.3). Portanto, após a análise por *array*-CGH de 25 indivíduos com DI idiopática, a frequência de alterações genômicas clinicamente relevantes detectada neste estudo foi de 24% (6/25).

Após a revisão de 18 estudos baseados na análise por *array*-CGH de indivíduos com DI/ADNPM, Hochstenbach et al. (2009) encontraram uma variação diagnóstica de 6 a 20% (fora um estudo com pequena amostra de pacientes que detectou alterações em 50% dos casos). Conforme os autores, uma das causas dessa variação é a diferença nas estratégias de seleção dos pacientes. Segundo Iorunov et al. (2012), a aplicação de *array*-CGH em pacientes altamente selecionados é capaz de demonstrar uma maior taxa de detecção de variações genômicas. Portanto, um dos fatores que contribuíram para a alta prevalência de anomalias genômicas encontradas no presente estudo foi o criterioso método de seleção realizado após intensa investigação genético-clínica.

Além disso, a plataforma de oligonucleotídeos 8X60K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utilizada nesta pesquisa possui uma resolução de aproximadamente 60 kb, o que permite a identificação de um maior número de alterações genômicas quando comparada a plataformas de *arrays* com menor resolução, como as construídas com BAC (WINCENT et al., 2011). No trabalho realizado por Kashevarova et al. (2013), 71 indivíduos com DI idiopática foram investigados por *array*-CGH através das plataformas 4X44K e 8X60K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), sendo identificados 14 (20%) indivíduos com alterações genômicas consideradas clinicamente relevantes, representando uma frequência próxima a detectada em no presente estudo.

Como observado nos trabalhos de Bernardini et al. (2010) (27%) plataforma Agilent 44K, Tucker et al. (2011) (30%) plataformas Affymetrix 500 K SNP *arrays*, Agilent 244K e NimbleGen 385K, Wincent et al. (2011) (13%) plataforma Agilent 244K; Lundvall et al. (2012) (26,3%) plataforma Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 *Array*), o emprego de plataformas de *array*-CGH de alta resolução, capazes de detectar CNVs com 50 a 100 kb, permite uma maior detecção de variações genômicas, apresentando um rendimento

diagnóstico de 13 a 31%, em grupos de indivíduos com DI idiopática, com frequência média de aproximadamente 24%

Consequentemente, plataformas de alta resolução são capazes de identificar novas variantes no número de cópias que podem não ser responsáveis pela DI do paciente (WINCENT et al., 2011). Preocupações vêm sendo levantadas de que o aumento da resolução de plataformas de *array* acarreta uma maior detecção de CNVs, algumas delas de significado incerto, representando um desafio para cientistas, médicos e familiares (PALMER et al., 2013). Além disso, nem sempre é possível obter amostras de ambos os pais para determinar a origem da variação genômica, como nos casos 39, 44 e 47, e também a possibilidade de não paternidade não pode ser totalmente descartada. A interpretação de um resultado pode ser ainda mais complicada pelo fato de que a CNV herdada de um dos pais fenotipicamente normal pode ser patogênica, como observado no caso 28; ou mesmo uma CNV *de novo* detectada por um *array* de alta densidade pode representar uma variante comum, como no caso 45 (MILLER et al., 2010). Por isso, sugere-se a realização da correlação genótipo-fenótipo em todos os casos que apresentaram anomalias genômicas.

Segundo Palmer et al. (2013), é demasiado simplista avaliar a potencial contribuição de CNVs detectadas em indivíduos com DI baseado puramente no tamanho da variação, na presença da CNV nos pais ou em alguns controles saudáveis, ou mesmo, pela falta de genes conhecidos por estarem associados a doenças. Pelo contrário, é melhor classificar a CNV detectada ao longo de uma escala qualitativa como mais ou menos provável de ser patogênica, dependendo dos níveis de evidência, e usar essa classificação para informar o aconselhamento e acompanhamento clínico dos pacientes.

### 6.3 Correlação Genótipo X Fenótipo

#### 6.3.1 Microdeleção 4p16.3 – Paciente 14

Microdeleção na região 4p, como a identificada na paciente 14 através de MLPA, são bem conhecidas pela manifestação fenotípica característica da síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS - *Wolf-Hirschhorn syndrome*) (OMIM#194190) (ESTABROOKS et al., 1995), uma vez que, a região crítica dessa síndrome (WHSCR - *Wolf-Hirschhorn syndrome critical region*) localiza-se no segmento cromossômico 4p16.3, onde está situado o gene *WHSC1* (OMIM\*602952). Entretanto, apesar da deleção 4p identificada na paciente 14 incluir o gene *WHSC1*, a mesma apresentou características fenotípicas um pouco distintas da WHS, sendo

diagnosticada com a síndrome de Pitt-Rogers-Danks (PRDS - *Pitt-Rogers-Danks Syndrome*) (OMIM#194190), considerada uma variante clínica da WHS por ambas resultarem de uma deleção na região 4p16.3 (CABRERA LÓPEZ et al., 2001). Atualmente, reconhece-se que WHS e PRDS apresentam espectro clínico associado a uma única síndrome, embora já tenham sido descritas como distúrbios distintos (BATTAGLIA et al., 2011).

O tamanho mínimo da deleção detectada na paciente 14 é de 1,4 Mb e, embora já tenha sido descrito uma correlação entre o tamanho da deleção 4p e o fenótipo apresentado, alguns pesquisadores concluíram que não existe essa correspondência (BATTAGLIA et al., 2011). Entretanto, presume-se que alguns defeitos estruturais associados, como fenda palatina e defeitos cardíacos, ocorrem mais frequentemente em indivíduos com deleções terminais superiores a 3 Mb de comprimento (ZOLLINO et al., 2008).

South et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de investigar o significado patogênico das deleções 4p16.3 distais em indivíduos com WHS. Os autores concluíram que monossomias dos primeiros 400 kb da região 4p16.3 provavelmente não são patogênicas e podem ser herdadas de pais fenotipicamente normais. Enquanto que, deleções terminais que se estendem a 1,4 Mb dessa região revelam-se patogênicas, com DI relativamente leve, possíveis convulsões e déficit de crescimento. Já as deleções distais que se estendem até 1,9 Mb da região 4p16.3 podem resultar em um fenótipo com significativa sobreposição, e talvez, até a classificação de um fenótipo mais brando de WHS, sugerindo que alguns genes nesta região desempenham um papel no desenvolvimento craniofacial e contribuem para o fenótipo global. Por fim, as deleções terminais maiores que 1,9 Mb resultam claramente em um completo fenótipo de WHS. Portanto, mesmo sem conhecer o tamanho exato da alteração cromossômica identificada na paciente 14, pode-se inferir, com base nos resultados de South et al. (2008), que a deleção envolve uma extensão maior que 1,4 Mb e menor que 1,9 Mb da região distal de 4p16.3.

### 6.3.2 Microdeleção 17q12 - Paciente 26

Deleções 17q12 envolvendo o gene *HNF1β* (OMIM\*189907), como a encontrada na paciente 26, estão associadas a algumas, todas ou nenhuma das seguintes características: anomalias renais, incluindo cistos; anomalias do trato genital; *Diabetes mellitus* tipo MODY 5 (maturity-onset diabetes of the young 5); características dismórficas leves; e DI, com ou sem distúrbios comportamentais (DIXIT et al., 2012). Apesar da maioria dos casos descritos na literatura de deleção 17q12 incluindo o gene *HNF1β* ser intelectualmente normal e apresentar

doença renal e/ou MODY, estudos recentes têm relatado pacientes com a mesma microdeleção que exibiram características dismórficas e DI, sem apresentar qualquer alteração renal (CHEROKI et al., 2008).

Cheroki et al. (2008) descreveram um caso de microdeleção 17q12 *de novo* envolvendo o gene *HNF1β*. A paciente com 45 anos apresentou DI, assimetria da face, ligeiro desvio da raiz nasal e do maxilar, palato ogival, braços e pernas longos e esguios, crises convulsivas e ausência completa do útero e da vagina, sem a ocorrência de diabetes ou malformações renais. Loirat et al. (2010) relataram três pacientes com microdeleção 17q12 e haploinsuficiência de *HNF1β* que exibiram DI, comportamentos estereotipados e cistos renais ou rins hiperecogênicos. Portanto, nota-se que muitas das características clínicas veiculadas pela microdeleção 17q12, como DI, distúrbios comportamentais e anomalias renais, mostram uma penetrância incompleta (DIXIT et al., 2012).

Palumbo et al. (2014) descreveram um caso de microdeleção 17q12 (chr17:34,816,256-36,244,358 pb, hg19), em que a região envolvida é muito semelhante a encontrada na paciente 26. O probando apresentou DI, atraso de fala, comportamentos estereotipados, assimetria de face, frontal estreita, hipotelorismo ocular, pavilhões auriculares grandes, malares salientes, filtro longo, lábio superior fino e clinodactilia do 5º dedo, porém, sem os aspectos clínicos típicos geralmente presentes em pacientes portadores desta deleção, como desordens renais e MODY 5. Conforme os autores, o fenótipo renal também pode estar sujeito a uma penetrância incompleta e expressividade variável, embora em menor grau em relação ao fenótipo neurocomportamental.

Trabalhos sugerem que, entre os genes envolvidos na região deletada 17q12, *LHX1* é um interessante candidato para explicar o fenótipo neurocognitivo (MORENO-DE-LUCA et al., 2010; PALUMBO et al., 2014). Como um potencial regulador transcricional que desempenha um papel na diferenciação de células neuronais e o controle transcricional de orientação axonal, ele é expresso no cérebro durante o desenvolvimento inicial (MORENO-DE-LUCA et al., 2010). No entanto, deleções únicas do gene *LHX1*, rupturas ou mutações que causam sua haploinsuficiência ainda não foram detectadas, não havendo ainda associação desse gene com doenças em seres humanos. Mais estudos são necessários para identificar o gene ou genes responsáveis pelo fenótipo neurocomportamental em pacientes com a deleção 17q12 (PALUMBO et al., 2014).

Portanto, o quadro clínico manifestado pela paciente 26, incluindo DI e problemas comportamentais, é decorrente da microdeleção 17q12, enquanto a ausência de desordens renais, diabetes do tipo MODY 5 e anomalias genitais, comuns a indivíduos com esta mesma

alteração, pode ser explicada pela penetrância incompleta e expressividade variável desta síndrome. Apesar da paciente 26 não manifestar o tipo de diabete comumente presente em indivíduos com microdeleção 17q12, a probanda apresenta diabete insulino-dependente tipo 1.

A microdeleção 17q12 detectada no caso 26 foi confirmada pela técnica de qPCR, enquanto a mãe da probanda apresentou dosagem gênica normal. Porém, como o pai não participou da pesquisa, não foi possível determinar a origem da alteração identificada na paciente 26.

### 6.3.3 Microduplicação 22q11.21 - Paciente 27

A microduplicação na região 22q11.21 identificada no paciente 27 foi inicialmente detectada pela técnica de MLPA através do kit P245 para síndromes de microdeleção/microduplicação. Posteriormente, foi empregado o exame de *array*-CGH que forneceu uma melhor caracterização da duplicação com 2,8 Mb de extensão e pontos de quebra em 18,9 Mb e 21,8 Mb do cromossomo 22. De acordo com a literatura, a maioria dos casos de duplicação 22q11.2 compreende uma região de 3 Mb correspondente a região tipicamente deletada descrita nas síndromes de DiGeorge (DGS - *DiGeorge Syndrome*) (OMIM#188400) e Velocardiofacial (VCFS - *Velocardiofacial Syndrome*) (OMIM#192430) (PORTNOÏ, 2009). Entretanto, duplicações de 1,5 Mb envolvendo a região crítica de DiGeorge (DGCR - *DiGeorge Critical Region*) também já foram relatadas (ENSENAUER et al., 2003; YU et al., 2008).

Tanto a região duplicada de 3 Mb, como a de 1,5 Mb, incluem o gene *TBX1* (OMIM\*602054), um membro da família T-box de fatores de transcrição que quando deletado é considerado responsável pela maioria das características fenotípicas das DGS/VCFS (CHRISTOPOULOU et al., 2013). Curiosamente, o aumento do número de cópias do gene *TBX1* resulta em um espectro fenotípico semelhante ao provocado por mutações de perda de função ou deleções, confirmando que a superexpressão de *TBX1* pode ser responsável pela síndrome de microduplicação 22q11.2 (PORTNOÏ, 2009). Isso explica porque algumas características clínicas associadas a microduplicação 22q11.2 se sobrepõem àquelas da síndrome de deleção 22q11.2, como defeitos cardíacos, insuficiência velofaríngea com ou sem fenda palatina, voz hipernasalizada e anomalias urogenitais (PORTNOÏ, 2009; SOYSAL et al., 2011).

As características fenotípicas associadas à síndrome de microduplicação 22q11.2 são extremamente variáveis, incluindo defeitos cardíacos, insuficiência velofaríngea (com ou sem fenda palatina), fala hipernasalizada, surdez, anomalias urogenitais, atraso de desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem, problemas comportamentais e várias dismorfias (SOYSAL et al., 2011). As características dismórficas faciais reportadas na síndrome de microduplicação 22q11.2 são microcefalia, frontal alto, sobrancelhas arqueadas, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais inclinadas para baixo, epicanto, ponte nasal larga, filtro pouco marcado, orelhas grandes e displásicas, hipoplasia da maxila, micro/retrognatia e face longa e estreita (ENSENAUER et al., 2003).

O paciente 27 apresentou déficit de desenvolvimento, DI, atraso de fala, distúrbios comportamentais com episódios de agressividade e algumas dismorfias, como sobrancelhas arqueadas, hipertelorismo ocular, epicanto, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, nariz bulboso, orelhas grandes e displásicas, pit pré-auricular e clinodactilia, características fenotípicas presentes na síndrome de duplicação 22q11.2 (SOYSAL et al., 2011). Ou et al. (2008) identificaram 10 casos de microduplicação 22q11.2 envolvendo a região comum de 3 Mb. Os autores encontraram uma grande variabilidade de manifestações clínicas nesses pacientes, sendo as características dismórficas mais comuns microcefalia, padrões incomuns de redemoinhos no couro cabeludo, hipoplasia de face média, orelhas grandes e displásicas, pit pré-auricular, características nasais variáveis, filtro suave e clinodactilia. Insuficiência velofaríngea ou hipernasalidade de fala também foram notadas em vários pacientes. O grau de transtorno no desenvolvimento variou de leve atraso no desenvolvimento global a atraso de fala isolado ou mesmo cognição normal.

Porém, problemas cardíacos, insuficiência velofaríngea com ou sem fenda palatina, hipernasalidade da voz, desordens urogenitais, microcefalia e micro/retrognatia não foram encontradas no paciente 27. Essa ampla variabilidade fenotípica observada em casos de microduplicação 22q11.2 envolvendo o gene *TBX1* pode ser consequência da expressividade variável desse gene, em conjunto com outros fatores genéticos, epigenéticos, ou não genéticos adicionais necessários para expressividade completa de *TBX1* (CHRISTOPOULOU et al., 2013), o que explica a ausência em nosso paciente de algumas características associadas a microduplicação 22q11.2.

A duplicação 22q11.2 detectada no paciente 27 foi confirmada pela técnica de qPCR, enquanto seus pais apresentaram dosagem gênica normal, evidenciando tratar-se de uma microduplicação 22q11.2 *de novo*.

### 6.3.4 Microdeleções 16p11.2 - Paciente 28

Microdeleções na região 16p11.2, como a identificada no paciente 28 através da técnica de *array*-CGH, têm sido encontradas com uma prevalência semelhante de 0,3% a 0,7% em amplos estudos compreendendo indivíduos com DI ou outros problemas de desenvolvimento e, em aproximadamente, 0,6% de todos os pacientes com desordens do espectro autista (CIULADAITÈ et al., 2011). O método de qPCR confirmou a alteração no paciente 28 e indicou valor de dosagem gênica normal para o pai do probando, enquanto a mãe apresentou um resultado condizente a uma deleção no mesmo segmento, mostrando que a alteração 16p11.2 detectada no paciente 28 foi herdada de sua mãe.

As características clínicas mais comuns da microdeleção 16p11.2 incluem atraso de fala e de linguagem, DI, déficit motor, distúrbios comportamentais, frontal amplo, micrognatia, hipertelorismo ocular, achatamento de terço médio da face, além de anomalias congênitas, incluindo hérnia diafragmática, fenda palatina, polidactilia, defeitos cardíacos, rim multicístico displásico, fusão de costelas inferiores e estenose pilórica (SHINAWI et al., 2010). Além disso, a prevalência de sobrepeso e obesidade em indivíduos com deleção 16p11.2 é maior do que na população em geral (WALTERS et al., 2010). Em um caso (5035) registrado no ECARUCA, (European-based database, <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>), o indivíduo apresentou atraso no desenvolvimento, QI abaixo da média, atraso de fala, comportamento autista e distúrbios comportamentais, sendo diagnosticado com uma microdeleção 16p11.2 com pontos de quebra (29,5 a 30,2 Mb/hg19) muito semelhantes aos detectados no paciente 28. Indivíduos com microdeleção 16p11.2 associada a DI, atrasos de fala e linguagem e obesidade também foram registrados no banco de dados DECIPHER (casos 248634, 248636, 251007 e 252407). Dessa forma, as características clínicas encontradas no paciente 28, como atraso de fala, déficit motor, DI, problemas comportamentais e sobrepeso, são comuns a outros casos de microdeleção 16p11.2 publicados, indicando que a microdeleção 16p11.2 detectadas no paciente 28 corresponde a uma CNV patogênica.

A região 16p11.2 inclui vários genes envolvidos na neurotransmissão ou na formação e manutenção sináptica, reforçando a existência de vias biológicas comuns nas desordens do desenvolvimento neurológico (HANSON et al., 2010). Um deles é o gene *SEZ6L2*, considerado um forte candidato para características comuns associadas a microdeleção 16p11.2 devido ao alto nível de expressão no cérebro, além da forte homologia com o gene *SRPX2* (OMIM\*300642) que desempenha um papel no desenvolvimento da fala e dos centros

de linguagem no cérebro (CIULADAITÉ et al., 2011). Outro gene é o *MAPK3* (OMIM\*601795), que codifica uma proteína-quinase ativada por mitógeno responsável por fosforilar uma série de fatores de transcrição, tais como CREB e Elk-1, permitindo a expressão de genes fundamentais, tanto para o remodelamento e eficácia sináptica, quanto para várias formas de aprendizagem (MAZZUCHELLI et al., 2002). Já a haploinsuficiência do gene *TBX6* (OMIM\*602427), que codifica um regulador de transcrição envolvido em processos de desenvolvimento, pode ser responsável pelas malformações vertebrais congênitas identificadas nos casos publicados (CIULADAITÉ et al., 2011).

Apesar de uma fração significativa de indivíduos com deleção 16p11.2 apresentar graves problemas de desenvolvimento e transtornos neuropsiquiátricos, alguns não possuem qualquer alteração física ou de desenvolvimento, ou podem, até mesmo, exibir vários graus de DI sem manifestar desordens do espectro autista (SHIMOJIMA et al., 2009). Isso indica que a microdeleção 16p11.2 exibe penetrância incompleta e expressividade variável (SHIMOJIMA et al., 2009; SHINAWI et al., 2010; CIULADAITÉ et al., 2011), o que pode explicar a ausência de algumas características fenotípicas no paciente 28, como também, o fenótipo aparentemente normal da mãe do probando. Como não é possível afirmar através da análise de qPCR que as deleções 16p11.2 do paciente 28 e de sua mãe sejam idênticas, pode ser que tais alterações possuam diferentes pontos de quebra, resultando, assim, em características fenotípicas distintas.

Conforme Shen et al. (2011), existem algumas explicações para a expressividade variável e heterogeneidade clínica em doenças genômicas. Uma delas é que os pontos de quebra das deleções podem não ser idênticos. No entanto, há relatos de casos familiares com a mesma deleção 16p11.2 que apresentaram variações fenotípicas e penetrância incompleta. Outra, é que a deleção herdada pode revelar uma mutação recessiva em outros alelos (SHIOW et al., 2010). Como consequência dessa variabilidade fenotípica, indivíduos com deleção 16p11.2 raramente podem ser identificados com base na história clínica ou exame dismorfológico, ressaltando a importância da realização de testes de análise cromossômica por *microarray* em pessoas com desordens de desenvolvimento neurológico, incluindo atrasos de fala e de linguagem, DI e autismo (HANSON et al., 2010).

### 6.3.5 Microdeleção 14q11.2 - Paciente 33

No paciente 33 o *array*-CGH identificou uma microdeleção na região 14q11.2 com aproximadamente 122,5 kb de extensão (20,2 a 20,3 Mb/hg19), incluindo os genes receptores

olfativos *OR4N2* e *ORKN2*. O método de qPCR confirmou a alteração no paciente 33 e indicou valor de dosagem gênica normal para o pai do probando, enquanto a mãe apresentou um resultado correspondente a uma deleção na mesma região cromossômica, mostrando que a alteração detectada no paciente 33 foi herdada de sua mãe.

Vários estudos sobre a presença de CNVs em indivíduos saudáveis, catalogados no Database Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>) (PINTO et al., 2007; ZOGOPOULOS et al., 2007; MATSUZAK et al., 2009; PANG et al., 2010; XU et al., 2011), apoiam que microdeleções 14q11.2, como a detectada no probando e sua mãe, são variantes neutras, sugerindo que as características fenotípicas observadas no paciente 33 não estão relacionadas a deleção 14q11.2.

### 6.3.6 Deleção 7q33-q34 - Paciente 35

A técnica de *array*-CGH detectou na paciente 35 uma microdeleção de 6,4 Mb na região 7q33-q34, ocorrendo a deleção de diversos genes, alguns deles de particular interesse, pois são expressos preferencialmente no cérebro, tais como os genes *MTPN* (OMIM\*606484), *CHRM2* (OMIM\*118493), *HIPK2* (OMIM\*606868), *DGKI* (OMIM\*604072), *PTN* (OMIM\*162095), *SVOPL* (OMIM\*611700) e *KIAA1549* (OMIM\*613344).

Todos esses genes, principalmente *MTPN*, *PTN* e *CHRM2*, estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso, sendo que, a haploinsuficiência ou a superexpressão dos mesmos pode explicar alguns dos sintomas presentes na probanda, incluindo atraso motor, DI e atraso de fala. O gene *MTPN* codifica a proteína miotrofina que apresenta um papel potencial na morfogênese cerebelar e pode estar envolvida na diferenciação de neurônios cerebelares, principalmente de células granulares (MALMGREN et al., 2005), enquanto o *PTN* codifica a pleiotrofina, proteína mitogênica de ligação à heparina que tem atividade de extensão de neuritos. Quanto ao gene *CHRM2*, ele é um dos cinco genes humanos responsáveis pela codificação de receptores muscarínicos de acetilcolina, e está envolvido na excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica e regulação por *feedback* da liberação de acetilcolina (GOSSO et al., 2007). Receptores muscarínicos estão envolvidos em muitos processos no cérebro, incluindo a atenção, aprendizagem, memória e cognição (PETRIN et al., 2010).

Rossi et al. (2008) publicaram um caso semelhante, em que descreveram uma paciente com diagnóstico clínico de autismo, DI, problemas do desenvolvimento neuromotor, atraso de

linguagem com fala disártrica, baixa estatura (E=150 cm), obesidade truncal, fâcies grotesca, hipertelorismo ocular, nariz grande com raiz alta, ponta nasal bulbosa, boca grande, dedos longos e delgados e polegares de implantação proximal. Segundo os autores, a paciente apresentou crises convulsivas (devido a hipocalcemia), episódios de distúrbio do sono, caracterizado por despertares noturnos frequentes, assim como, amenorréia primária e estágio 2 de Tanner para desenvolvimento mamário.

Entretanto, a região deletada de 12 Mb descrita por Rossi et al. (2008) mostrou-se significativamente maior do que a detectada na paciente 35 (6,4 Mb), causando a deleção de um maior número de genes, incluindo *NOBOX* (OMIM\*610934) e *CNTNAP2* (OMIM\*604569). Enquanto a haploinsuficiência do gene *NOBOX* está relacionada à insuficiência ovariana (QIN et al., 2009), a haploinsuficiência de *CNTNAP2* é fortemente associada a desordens do espectro autista e a distúrbios específicos de linguagem (MALMGREN et al., 2005), o que provavelmente explica a presença de amenorréia primária e diagnóstico de autismo no caso descrito por Rossi et al. (2008) e a ausência de tais características na paciente 35.

A deleção 7q33-q34 detectada na paciente 35 foi confirmada pela técnica de qPCR, enquanto seu pai apresentou dosagem gênica normal. Porém, como a mãe da probanda já faleceu, não foi possível determinar a origem da microdeleção.

### 6.3.7 Microduplicação Xp11.3-p11.23 - Paciente 38

A paciente 38, que exibiu uma microduplicação da região Xp11.3-p11.23 detectada por *array*-CGH, apresentou características fenotípicas em comum a outras mulheres portadoras de duplicações envolvendo a região Xp11.2 (MONNOT et al., 2008; GIORDA et al., 2009; HOLDEN et al., 2010), incluindo DI, atraso motor discreto, importante déficit de fala e de linguagem, frontal proeminente e hipertelorismo ocular (HOLDEN et al., 2010). Entretanto, os efeitos de duplicações no cromossomo X podem ser variáveis, em parte, devido à variação no padrão de inativação do cromossomo X entre mulheres portadoras (MONNOT et al., 2008). Geralmente, mulheres com alterações estruturais do cromossomo X apresentam inativação seletiva do cromossomo anormal, o que lhes confere um fenótipo leve ou até mesmo normal, porém, quando o padrão de inativação do cromossomo X ocorre de forma aleatória, essas pacientes podem manifestar um fenótipo mais grave (WOLFF et al., 2000). No presente estudo o padrão de inativação do cromossomo X não foi investigado. Entretanto, a paciente 38 apresentou alterações fenotípicas correspondentes às descritas em mulheres com

duplicação Xp11.2 que apresentaram padrão randômico de inativação do cromossomo X (GIORDA et al., 2009; HOLDEN et al., 2010), sugerindo que a inativação de X, em nossa paciente, ocorreu de forma aleatória.

Mutações ou deleções em vários genes localizados no segmento duplicado da paciente 38 são implicadas na DI ligada ao X, incluindo os genes *ZNF674* (OMIM\*300573), *ZNF41*(OMIM\*314995), *ZNF81* (OMIM\*300573), *FTSJI* (OMIM\*300499) e o gene *SYNI* (OMIM\*313440) que também está associado à epilepsia, problemas de aprendizagem e distúrbios comportamentais (HOLDEN et al., 2010). De fato, podemos supor que a superexpressão desses genes pode ser responsável pelas características clínicas observadas na paciente 38, uma vez que o segmento duplicado promove uma dissomia funcional para os genes que normalmente são inativados em mulheres XX normais (MONNOT et al., 2008). No entanto, deve-se considerar que a disrupção de genes ou de sequências regulatórias nos pontos de quebra da duplicação ou efeitos posicionais de genes também podem estar relacionados ao fenótipo (MONNOT et al., 2008).

A duplicação Xp11.3-p11.23 detectada na paciente 38 foi confirmada pela técnica de qPCR. Entretanto, como os pais não participaram da pesquisa (mãe muito doente e pai falecido) não sabemos a origem da alteração.

### **6.3.8 Microduplicação/Microdeleção 8p11.22 - Pacientes 39 e 45**

No exame de *array*-CGH do paciente 39 foi identificada uma microduplicação na região 8p11.22 entre os pontos de quebra 39,2 a 39,9 Mb, apresentando extensão de aproximadamente 127 kb e incluindo os pseudogenes *ADAM5* e *ADAM3A*. A microduplicação 8p11.22 foi confirmada por qPCR, entretanto não podemos afirmar se essa alteração ocorreu *de novo* ou foi herdada, uma vez que os pais do probando não aceitaram participar da pesquisa.

Na paciente 45 a análise de *array*-CGH identificou uma microdeleção na região 8p11.22, que mostrou pontos de quebra idênticos aos do paciente 39, além de uma microduplicação na região 16p11.2. O método de qPCR realizado na paciente 45 confirmou a microdeleção 8p11.22, porém, mostrou valores normais para a região 16p11.2, indicando um resultado falso-positivo. Enquanto que nos pais, os resultados de qPCR revelaram valores de dosagem gênica normais para a região 8p11.22, indicando que a microdeleção encontrada na paciente 45 ocorreu *de novo*.

Muitos trabalhos registrados no DGV mostram que CNVs localizadas na região 8p11.2, incluindo microduplicações e microdeleções, estão presentes em uma porção significativa de indivíduos fenotipicamente normais (PERRY et al., 2008; KIM et al., 2009; MATSUZAKI et al., 2009; PANG et al., 2010; XU et al., 2011) sugerindo que ambas as CNVs são neutras, não apresentando relação com a DI e demais características clínicas observadas nos pacientes 39 e 45.

### 6.3.9 Microduplicação/Microdeleção 15q11.1-q11.2 – Pacientes 41, 44 e 47

O *array*-CGH revelou alterações na região cromossômica 15q11.1-q11.2 em três pacientes: 41 e 44, que apresentaram duplicações no segmento 15q11.1-q11.2; e paciente 47, que exibiu uma microdeleção na porção 15q11.1-q11.2, além de uma microduplicação em 3p25.3 discutida mais adiante. A técnica de qPCR confirmou os desequilíbrios previamente detectados nos indivíduos 41,44 e 47 e também demonstrou que a microduplicação 15q11.1-q11.2 encontrada no paciente 41 foi herdada de seu pai fenotipicamente normal. Entretanto, nos casos 44 e 47 não foi possível estabelecer a origem das alterações, visto que, apenas as mães aceitaram participar da pesquisa, e ambas apresentaram resultados normais para a região 15q11.1-q11.2.

Microdeleções e microduplicações 15q11.1-q11.2, abrangendo os genes *NBEAP1* e *POTEB*, foram detectadas em vários trabalhos a cerca da presença de CNVs em indivíduos normais (PINTO et al., 2007; ZOGOPOULUS et al., 2007; PERRY et al., 2008; XU et al., 2011). Além disso, o aumento das dosagens gênicas de *NBEAP1* e *POTEB*, causado pela microduplicação 15q11.1-q11.2 presente nos indivíduos 41 e 44, ainda não foi associado à problemas neurológicos, mas já foi observado em indivíduos fenotipicamente normais (FANTES et al., 2002), como é o caso do pai do paciente 41. Ainda, de acordo com os trabalhos de Pinto et al. (2007), Zogopoulos et al. (2007), Perry et al. (2008) e Xu et al. (2011), a haploinsuficiência dos genes *NBEAP1* e *POTEB*, resultante de microdeleções 15q11.1-q11.2, também demonstra não causar nenhuma alteração clínica. Portanto, propõe-se que microduplicações/microdeleções na região 15q11.1-q11.2, envolvendo os genes *NBEAP1* e *POTEB*, constituam CNVs neutras, não contribuindo para as características fenotípicas presentes nos pacientes 41, 44 e 47.

Entretanto, microdeleção/microduplicação na região 15q11.2 incluindo os genes *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1* e *TUBGCP5*, com ou sem o envolvimento de *NBEAP1* e *POTEB*,

estão associadas a DI, atraso de linguagem, dismorfias e transtornos comportamentais sendo classificadas como variantes patogênicas (SEMPERE-PÉREZ et al., 2011).

### 6.3.10 Microduplicação 3p25.3 – Pacientes 47 e 50

A microduplicação 3p25.3, revelada nos irmãos 47 e 50 pela técnica de *array*-CGH, foi confirmada pelo método de qPCR que identificou também uma duplicação em 3p25.3 na mãe dos probandos. Casos de microduplicação 3p25.3 são muito raros na literatura. Existem três casos de duplicação 3p25.3 com pontos de quebra sobrepostos aos identificados nos pacientes 47 e 50 registrados no banco de dados DECIPHER (249791, 250889 e 251229). O caso 249791, com uma duplicação 3p25.3 (chr3:9,828,852-10,813,431 pb, hg19) envolvendo 21 genes, apresentou DI e cifose, entretanto não foi possível determinar a origem da alteração e nem sua patogenicidade. No caso 250889, que apresentou atraso de fala e de linguagem, a duplicação 3p25.3 (chr3:10,179,706-10,217,923, hg19) foi herdada de um dos pais fenotipicamente normal. Já no caso 251229, descrito com DI e polimicrogiria, a duplicação 3p25.3 incluiu apenas 5 genes, não sendo possível determinar a origem da alteração. Entretanto, em nenhum dos três casos foi possível definir a contribuição da microduplicação 3p25.3 para o fenótipo.

Dessa forma, não foi possível determinar se o comprometimento cognitivo observado no pacientes 47 e 50 está associado à microduplicação 3p25.3 herdada da mãe dos probandos.

### 6.3.11 Microduplicação 16p13.11-p12.3 - Paciente 48

Microduplicações na região 16p13.11-p12.3, como a detectada na paciente 48 por *array*-CGH, foram previamente associadas a dificuldades de aprendizagem, atraso na fala e alterações comportamentais como hiperatividade (ULLMANN et al., 2007). Estudo posterior considerou a duplicação 16p13.11 uma variante não patogênica, visto que, essa duplicação foi encontrada com uma frequência semelhante tanto no grupo de indivíduos com DI e/ou malformações congênitas, como na população controle (HANNES et al., 2009). No entanto, uma pesquisa realizada por Mefford et al. (2009) mostrou que duplicações 16p13.11, variando de 1,6 a 3,4 Mb de extensão, são significativamente frequentes em indivíduos com déficit cognitivo, respondendo por 1,1% das alterações detectadas em um grupo de 1 105 pacientes com DI idiopática, enquanto no grupo controle essa frequência foi de 0,08%. Segundo os

autores, duplicações na região 16p13.11 são de fato patogênicas, favorecendo a ocorrência de doenças neurocognitivas como autismo e esquizofrenia, porém com penetrância incompleta.

Após análise clínica de 10 indivíduos com duplicação 16p13.11-p12.3, Nagamani et al. (2011) notaram a presença de características fenotípicas variáveis, como manifestações esqueléticas ou malformações cardíacas, além de comprometimento cognitivo, déficit motor, atraso de linguagem, DI, alterações comportamentais (déficit de atenção, hiperatividade, agressividade e temperamento disruptivo) e dificuldades nas interações sociais indicativas de transtorno do espectro autista.

Portanto, as características fenotípicas observadas na paciente 48 estão relacionadas a microduplicação 16p13.11-p12.3, classificada como uma CNV patogênica. A técnica de qPCR confirmou a microduplicação na paciente 48, enquanto os pais da probanda apresentaram dosagem gênica normal, indicando que a alteração em 16p13.11-p12.3 ocorreu *de novo*.

Assim, das 15 variações genômicas identificadas por *array*-CGH, 6 (6/25=24%) foram consideradas clinicamente relevantes, incluindo: 3 duplicações (duas *de novo* e uma de origem indeterminada) e 3 deleções (duas de origem indeterminada e a outra correspondente a uma CNV patogênica herdada da mãe fenotipicamente normal). As outras 9 alterações foram: 6 (6/25=24%) CNVs neutras, compreendendo 3 duplicações (duas de origem indeterminada e uma herdada do pai fenotipicamente normal) e 3 deleções (uma *de novo*, uma de origem indeterminada e uma herdada da mãe fenotipicamente normal); uma variante genômica com relevância clínica indefinida detectada em dois irmãos e herdada da mãe fenotipicamente normal; e 2 (2/25=8%) resultados revelados pela técnica de qPCR como falso-positivos (Tabela 5).

#### 6.4 MLPA X *Array*-CGH

Após a análise de 50 indivíduos com DI idiopática através de MLPA com os kits P036, P070 e P245, apenas duas (2/50=4%) alterações cromossômicas crípticas foram detectadas. Desses 50 indivíduos, 25 foram avaliados também por *array*-CGH e, enquanto o emprego de três kits de MLPA permitiu identificar apenas uma anomalia cromossômica críptica (1/25=4%), o *array*-CGH detectou 13 (13/25=52%) variações genômicas, incluindo 6 (6/25=24%) alterações patogênicas e 7 (7/25=28%) variantes neutras ou de significado clínico indeterminado. Todas as 12 alterações crípticas encontradas exclusivamente por *array*-CGH

localizavam-se em regiões não cobertas pelas sondas de MLPA presentes nos kits P036, P070 e P245.

Observa-se que a técnica de *array*-CGH foi capaz de identificar um número muito maior de variações genômicas, quando comparada com o MLPA. Isso porque, a técnica de *array*-CGH permite investigar milhares de *loci* de um indivíduo simultaneamente, fornecendo uma análise total do genoma, enquanto no MLPA, o número de alvos que podem ser rastreados por paciente está limitado a menos de 60 *loci* por ensaio (KRIEK et al., 2007).

Entretanto, a técnica de MLPA apresenta algumas vantagens em relação ao *array*-CGH, e é considerada mais adequada para a triagem inicial de um grande número de pacientes, pois permite a investigação simultaneamente de cerca de 100 indivíduos, enquanto o *array*-CGH possibilita a análise concomitante de aproximadamente 10 pacientes; a avaliação dos dados de MLPA é relativamente mais fácil e mais rápida do que a de *array*-CGH; além disso, o MLPA é um exame de baixo custo, capaz de aumentar substancialmente a taxa de detecção de alterações cromossômicas crípticas (KRIEK et al., 2007; JEHHE et al., 2011).

### **6.5 Checklist de de Vries**

Segundo de Vries et al. (2001), os indivíduos que obtiveram três ou mais pontos no *checklist* devem ser incluídos para a investigação de desequilíbrios cromossômicos crípticos. No presente estudo, a pontuação exibida pelos pacientes que revelaram alterações genômicas patogênicas no exame de *array*-CGH variou de 5 a 8, com uma média de 6 pontos. Já os casos que exibiram resultados de *array*-CGH normais ou não apresentaram qualquer variação genômica considerada clinicamente relevante exibiram de 3 a 8 pontos, com pontuação média igual a 5. Portanto, sugerimos que a análise por *array*-CGH seja realizada, primeiramente, nos indivíduos com DI idiopática que somaram 5 ou mais pontos no *checklist* de de Vries.

**Tabela 5** – Resultados obtidos após a aplicação das técnicas de MLPA e *array*-CGH na amostra estudada.

APAE ID	G	P	Nível	DI	Alterações cromossômicas crípticas encontradas nos indivíduos com DI idiopática						
					por MLPA	por <i>array</i> -CGH	Tamanho (pb)	qPCR	Obs.		
					46,XX.mlpa4psubtel(P036) X 1						
ALT	14	F	6	G	46,XX.mlpa4psubtel(P070) X 1		Deleção *		+	<i>de novo</i>	
					46,XX.mlpa4p16.3(P245) X 1						
LIM	26	F	6	M		arr(hg19)17q12(34,817,433-36,168,104) X 1	Deleção *	1,350,683	+	origem indeterminada	
LIM	27	M	7	G	46,XY.mlpa22q11.2(P245) X 3	arr(hg19)22q11.21(18,953,012-21,801,661) X 3	Duplicação *	2,848,650	+	<i>de novo</i>	
LIM	28	M	5	L		arr(hg19)16p11.2(29,673,954-30,198,600) X 1 mat	Deleção * - CNV patogênica	524,646	+	herança materna	
LIM	31	F	8	L		arr(hg19)Xq28(152,949,788-153,032,059) X 3	Duplicação	822,271	-	Falso Positivo	
LIM	33	M	7	M		arr(hg19)14q11.2(20,253,739-20,376,267) X 1 mat	Deleção - CNV neutra	122,529	+	herança materna	
LIM	35	F	8	G		arr(hg19)7q33q34(134,870,494-141,359,194) X 1	Deleção *	6,488,700	+	origem indeterminada	
LIM	38	F	5	M		arr(hg19)Xp11.3p11.23(44,375,988-48,372,445) X 3	Duplicação *	3,996,458	+	origem indeterminada	
LJM	39	M	4	M		arr(hg19)8p11.22(39,258,894-39,386,158) X 3	Duplicação - CNV neutra	127,265	+	origem indeterminada	
LJM	41	M	5	L		arr(hg19)15q11.1q11.2(20,481,702-22,378,143) X 3 pat	Duplicação - CNV neutra	1,896,442	+	herança paterna	
LJM	44	M	3	M		arr(hg19)15q11.1q11.2(20,102,541-22,509,254) X 3	Duplicação - CNV neutra	2,406,713	+	origem indeterminada	
LJM	45	F	4	L		arr(hg19)16p11.2(31,897,383-33,604,468) X 3,	Duplicação	1,707,085	-	Falso Positivo	
						arr(hg19)8p11.22(39,258,894-39,386,158) X 1	Deleção - CNV neutra	127,265	+	<i>de novo</i>	
LIM	47	M	4	L		arr(hg19)15q11.1q11.2(20,575,646-22,509,254) X 1,	Deleção - CNV neutra	1,933,608	+	origem indeterminada	
						arr(hg19)3p25.3(9,576,330-11,382,152) X 3 mat	Duplicação #	1,805,822	+	herança materna	
LIM	48	F	6	M		arr(hg19)16p13.11p12.3(16,031,655-17,330,246) X 3	Duplicação *	1,298,591	+	<i>de novo</i>	
LJM	50	M	6	L		arr(hg19)3p25.3(9,576,330-11,382,152) X 3	Duplicação #	1,805,822	+	herança materna	
					<b>Total 2*/50 (4%)</b>	<b>Total 6*/25 (24%)</b>					

\*Alterações clinicamente relevantes.

# Alterações com relevância clínica indeterminada.

ID=Identificação. G=Gênero. P=Pontuação Checklist. ALT=Altinópolis; LIM=Limeira. F=Feminino; M=Masculino. L=Leve; M=Moderado; G=Grave.

## 7 CONCLUSÃO

- Recomenda-se a realização de MLPA com kits para regiões subteloméricas em indivíduos com exame cariotípico normal que apresentam fenótipo sugestivo de cromossomopatia, enquanto o kit para síndromes de microdeleção é indicado para indivíduos com cariótipo normal que apresentam fenótipo específico de alguma síndrome de microdeleção comum;

- O *array*-CGH deve ser utilizado em indivíduos com DI associada à dismorfias que apresentaram exames de cariótipo e de MLPA normais, e que, após intensa investigação genético-clínica permaneceram sem diagnóstico;

- O exame de *array*-CGH é mais indicado em pacientes que somaram 5 ou mais pontos no checklist de de Vries;

- A prevalência de alterações cromossômicas subteloméricas detectada por MLPA foi de 2%, inferior a frequência descrita na literatura que é de aproximadamente 5%, o que pode refletir a qualidade do exame citogenético e também a diferença no tamanho amostral;

- A taxa de variações genômicas encontrada através de *array*-CGH foi de 24%, maior que as frequências descritas nos estudos de *array*-CGH com plataformas de menor resolução, porém, muito semelhante aos valores obtidos em trabalhos utilizando plataformas com resolução maior, como neste estudo;

- Está indicado o uso dos exames de MLPA e *array*-CGH na rede institucional de auxílio aos deficientes intelectuais, pois tais técnicas são capazes de detectar um número expressivo de alterações genômicas patogênicas;

- Os casos de microduplicação 3p25.3 e microdeleção 16p11.2, apresentados neste trabalho, exibem características genômicas e clínicas pouco descritas na literatura, justificando, portanto, o relato dessas alterações na literatura especializada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERLID, B. M.; SCHOUMANS, J.; ANNERÉN, G. et al. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. **Am J Med Genet**, Feb 1;107(4):275-284, 2002.
- ADEYINKA, A.; ADAMS, S. A.; LORENTZ, C. P. et al. Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. **Am J Med Genet**, May 15;135(1):28-35, 2005.
- AHN, J. W.; MANN, K.; DOCHERTY, Z.; OGILVIE, C. M. Submicroscopic chromosome imbalance in patients with developmental delay and/or dysmorphism referred specifically for Fragile X testing and karyotype analysis. **Mol Cytogenet**, Mar 26;1:2, 2008.
- ALTHERR, M. R.; BENGTSSON, U.; ELDER, F. F. et al. Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. **Am J Hum Genet**, Dec;49(6):1235-1242, 1991.
- AMBROSINI, A.; PAUL, S.; HU, S.; RIETHMAN, H. Human subtelomeric duplicon structure and organization. **Genome Biol**, 8(7):R151, 2007.
- AMERICAN ASSOCIATION OF INTELLECTUAL AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES. **Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports**, 11th ed. Washington, DC: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities, 2010.
- ARADHYA, S.; CHERRY, A. M. Array-based comparative genomic hybridization: clinical contexts for targeted and whole-genome designs. **Genet Med**, Sep;9(9):553-539, 2007.
- BAROCINI, A.; RIVIERI, F.; CAPUCCINI, A. et al. FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. **Eur J Med Genet**, Oct-Dec;48(4): 388-396, 2005.
- BATTAGLIA, A.; SOUTH, S.; CAREY J. C. Clinical utility gene card for: Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. **Eur J Hum Genet**, Apr;19(4), 2011.
- BERNARDINI, L.; ALESÌ, V.; LODDO S. et al. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? **Eur J Hum Genet**, Feb;18(2):178-185, 2010.
- BIESECKER, L. G. The end of the beginning of chromosome ends. **Am J Med Genet**, Feb 1;107:263-266, 2002.
- BOCIAN, E.; HELIAS-RODZEWICZ, Z.; SUCHENEK, K. et al. Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. **Med Sci Monit**, Apr;10(4):CR143-51, 2004.

- BOEHM, D.; HEROLD, S.; KUECHLER A. et al. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. **Hum Mutat**, Apr;23(4):368-378, 2004.
- BOGDANOWICZ, J.; PAWLOWSKA, B.; ILNICKA, A. et al. Subtelomeric rearrangements in Polish subjects with intellectual disability and dysmorphic features. **J Appl Genet**, 51(2): 215-217, 2010.
- BOGGULA, V. R.; SHUKLA, A.; DANDA, S. et al. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. **Indian J Med Res**, Jan;139(1):66-75, 2014.
- BONAGLIA, M. C., GIORDA, R., TENCONI, R., PESSINA, M., PRAMPARO, T., BORGATTI, R., ZUFFARDI, O. A 2.3 Mb duplication of chromosome 8q24.3 associated with severe mental retardation and epilepsy detected by standard karyotype. **Eur J Hum Genet**, May;13(5):586-591, 2005.
- BROWN, J.; SARACOGLU, K.; UHRIG, S. et al. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). **Nat Med**, Apr;7(4):497-501, 2001.
- BROWN, W. M. Cytogenetic studies on humans: some population aspects. **Proc R Soc Med**, Feb;61(2):164-167, 1968.
- CABRERA LÓPEZ, J. C.; MARTI HERRERO, M.; FERNÁNDEZ BURRIEL, M. et al. Familial Pitt-Rogers-Danks: two new cases. **Rev Neurol Sep**, 1-15;33(5):439-443, 2001.
- CHELLY, J.; KHELFAOUI, M.; FRANCIS, F. et al. Genetics and pathophysiology of mental retardation. **Eur J Hum Genet Jun**, 14(6):701-713, 2006.
- CHEROKI, C.; KREPISCHI-SANTOS, A. C.; SZUHAI, K. et al. Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. **J Med Genet**, 45(4):228-232, 2008.
- CHIURAZZI, P.; SCHWARTZ, C. E.; GECZ, J.; NERI, G. XLMR genes: update 2007. **Eur J Hum Genet**, Apr;16(4):422-434, 2008.
- CHRISTOFOLINI, D. M.; ABBUD, E. M.; LIPAY, M. V. et al. Evaluation of clinical checklists for fragile X syndrome screening in Brazilian intellectually disabled males: proposal for a new screening tool. **J Intellect Disabil**, Sep;13(3):239-248, 2009.
- CHRISTOFOLINI, D. M.; DE PAULA RAMOS M. A.; KULIKOWSKI L. D. et al. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. **J Intellect Disabil**, Oct;54(10):938-942, 2010.
- CHRISTOPOULOU, G.; SISMANI, C.; SAKELLARIOU, M. et al. Clinical and molecular description of the prenatal diagnosis of a fetus with a maternally inherited microduplication 22q11.2 of 2.5Mb. **Gene**, Sep 25;527(2):694-697, 2013.

- CIULADAITĖ, Z.; KASNAUSKIENĖ, J.; CIMBALISTIENĖ, L. et al. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. **J Appl Genet**, Nov;52(4):443-449, 2011.
- CURRY, C. J.; STEVENSON, R. E.; AUGHTON, D. et al. Evaluation of mental retardation recommendations of Consensus Conference American College of Medical Genetics. **Am J Med Genet**, 72:468-477, 1997.
- DE SMITH, A. J.; TSALENKO, A.; SAMPAS, N. et al. Array-CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. **Hum Mol Genet**, Dec 1;16(23):2783-2794, 2007.
- DE VRIES, B. B.; WHITE, S. M.; KNIGHT, S. J. et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. **J Med Genet**, Mar;38(3):145-150, 2001.
- DE VRIES, B. B.; WINTER, R.; SCHINZEL, A.; RAVENSWAAIJ-ARTS, C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. **J Med Genet**, Jun;40(6):385-398, 2003.
- DIXIT, A.; PATEL, C.; HARRISON, R. et al. 17q12 microdeletion syndrome: three patients illustrating the phenotypic spectrum. **Am J Med Genet**, A Sep;158A(9):2317-2321, 2012.
- DORAK, M. T. **Real-time PCR** (Advanced Methods). Ed. Taylor and Francis. Newcastle-upon-Tyne, UK, 2006.
- ENSENAUER, R. E.; ADEYINKA, A.; FLYNN, H. C. et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. **Am J Hum Genet**, Nov;73(5):1027-1040, 2003.
- ESTABROOKS, L. L.; BREG, W. R.; HAYDEN, M. R. et al. Summary of the 1993 ASHG ancillary meeting "Recent research on chromosome 4p syndromes and genes". **Am J Med Genet**, Feb 13(55):453-458, 1995.
- FAN, Y. S.; ZHANG, Y.; SPEEVAK, M. et al. Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. **Genet Med**, Nov-Dec;3(6):416-421, 2001.
- FANTES, J. A.; MEWBORN, S. K.; LESE, C. M. et al. Organisation of the pericentromeric region of chromosome 15: at least four partial gene copies are amplified in patients with a proximal duplication of 15q. **J Med Genet**, Mar;39(3):170-177, 2002.
- FLINT, J.; BATES, G. P.; CLARK K, et al. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. **Hum Mol Genet**, 1997 Aug;6(8):1305-1313, 1997.
- FLINT, J.; KNIGHT, S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. **Curr Opin Genet Dev**, Jun;13(3):310-316, 2003.

- FLINT, J.; WILKIE, A. O.; BUCKLE, V. J. et al. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. **Nat Genet**, Feb;9(2):132-140, 1995.
- FORD, C. E.; JONES, K. W.; POLANI P. E. et al. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). **Lancet**, 1(7075):711-713, 1959.
- FREY, G. C.; TEMPLE, V. A. Health promotion for Latin Americans with intellectual disabilities. **Salud Publica Mex**, 50 Suppl 2:s167-S177, 2008.
- GIORDA, R.; BONAGLIA, M. C.; BERI, S. et al. Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(X)(p11.22-p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. **Am J Hum Genet**, Sep;85(3):394-400, 2009.
- GOSSO, F. M.; DE GEUS, E. J.; POLDERMAN, T. J. et al. Exploring the functional role of the CHRM2 gene in human cognition: results from a dense genotyping and brain expression study. **BMC Med Genet**, 8;8:66, 2007.
- GUITART-FEILIUBADALÓ, M.; BRUNET-VEJA, A.; VILLATORO-GOMEZ, S. et al. Chromosome causes that produce mental retardation: chromosome disorders that can be diagnosed in the patient. **Rev Neurol**, Jan 7;42 Suppl 1:S21-26, 2006.
- HANNES, F. D.; SHARP, A. J.; MEFFORD, H. C. et al. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. **J Med Genet**, Apr;46(4):223-232, 2009.
- HANSON, E., NASIR, R. H., FONG, A., LIAN, A., HUNDLEY, R., SHEN, Y., WU, B. L., HOLM, I. A., MILLER, D. T. Cognitive and behavioral characterization of 16p11.2 deletion syndrome. **J Dev Behav Pediatr**, Oct;31(8):649-657, 2010.
- HENGSTSCHLÄGER, M.; PRUSA, A.; REPA, C. et al. Subtelomeric rearrangements as neutral genomic polymorphisms. **Am J Med Genet**, Feb 15;133A(1):48-52, 2005.
- HILA, L.; TÉBOURBI, H.; ABAIED, L. et al. MLPA subtelomere analysis in Tunisian mentally retarded patients. **Biochem Genet**, Oct;47(9-10):727-733, 2009.
- HOCHSTENBACH, R., BUIZER-VOSKAMP, J.E., VORSTMAN, J.A.S., OPHOFF, R.A. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. **Cytogenet Genome Res**, 135(3-4):174-202, 2011.
- HOCHSTENBACH, R.; VAN BINSBERGEN, E.; ENGELLEN, J. et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. **Eur J Med Genet**, Jul-Aug;52(4):161-169, 2009.
- HOLDEN, S. T.; CLARKSON, A.; THOMAS, N. S. et al. A de novo duplication of Xp11.22-p11.4 in a girl with intellectual disability, structural brain anomalies, and preferential inactivation of the normal X chromosome. **Am J Med Genet A**, Jul;152A(7):1735-40, 2010.

- IOUROV, I. Y.; VORSANOVA, S. G.; KURINNAIA OS. et al. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. **Mol Cytogenet**, Dec 31;5(1):46, 2012.
- ISCN, 2005. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**, Shaffer, L. G.; Tommerup, N. (eds); S Karger, Basel, 2005.
- JACKSON L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. **Clin Obstet Gynecol**, Sep;45(3):622-639; discussion 730-732, 2002.
- JACOBS, P. A.; BAIKIE, A. G.; BROWN, W. M. et al. Evidence for the existence of the human "super female". **Lancet**, Sep 26;2(7100):423-425, 1959.
- JACOBS, P. A.; STRONG, J. A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. **Nature**, Jan 31;183(4657):302-303, 1959.
- JEHEE, F. S.; TAKAMORI, J. T.; MEDEIROS, P. F. et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. **Eur J Med Genet**, Jul-Aug;54(4):425-432, 2011.
- JOYCE, C. A.; DENNIS, N. R.; COOPER, S.; BROWNE, C. E. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. **Hum Genet**, Oct;109(4):440-451, 2001.
- KASHEVAROVA, A. A.; SKRYABIN, N. A.; CHEREMNYKH, A. D. et al. Clinical and genetic analysis of idiopathic intellectual disability based on array comparative genomic hybridization. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, ;113(9):70-74, 2013.
- KATZ, G.; LAZCANO-PONCE, E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. **Salud Publica Mex**, 50 Suppl 2:S132-S141, 2008.
- KIM, K. Y.; LEE, G. Y.; KIM, J. et al. Identification of significant regional genetic variations using continuous CNV values in aCGH data. **Genomics**, Nov;94(5):317-323, 2009.
- KIRCHHOFF, M.; BISGAARD, A. M.; BRYNDORF, T.; GERDES, T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. **Eur J Med Genet**, Jan-Feb;50(1):33-42, 2007.
- KIRCHHOFF, M.; GERDES, T.; BRUNEBJERG, S.; BRYNDORF, T. Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. **Am J Med Genet A**, Dec15;139(3):231-233, 2005.
- KNIGHT, S. J.; FLINT, J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. **J Med Genet**, Jun;37(6):401-409, 2000.

- KNIGHT, S. J.; REGAN, R.; NICOD, A. et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. **Lancet**, Nov 13;354(9191):1676-1681, 1999.
- KOOLEN, D. A.; NILSEN, W. M.; VERSTEEG, M. H. A. et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). **J Med Genet**, Dec;41(12): 892-899, 2004.
- KRIEK, M.; KNIJNENBURG, J.; WHITE, S. J. et al. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. **Am J Med Genet A**, Mar 15;143(6):610-614, 2007.
- KUWANO, A.; LEDBETTER, S. A.; DOBYNS, W. B. et al. Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by in situ hybridization. **Am J Hum Genet**, Oct;49(4):707-714, 1991.
- LEDBETTER, D. H. Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. **Am J Hum Genet**, Sep 51(3):451-456, 1992.
- LEDBETTER, D. H.; MARTIN, C. L. Cryptic telomere imbalance: a 15-year update. **Am J Med Genet**, Nov 15;145C(4):327-334, 2007.
- LEJEUNE, J.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfant mongoliens. **C R Hebd Seances Acad Sci**, 248(11):1721-1722, 1959.
- LI, M. R.; WANG, X. Z.; YANG, Y. L. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subtelomeric chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, Nov 3;89(40):2839-2842, 2009.
- LINARDOPOULOU, E. V.; WILLIAMS, E. M.; FAN, Y. et al. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. **Nature**, Sep 1;437(7055):94-100, 2005.
- LOIRAT, C.; BELLANNÉ-CHANTELOT, C.; HUSSON, I. et al. Autism in three patients with cystic or hyperechogenic kidneys and chromosome 17q12 deletion. **Nephrol Dial Transplant**, 25(10):3430-3433, 2010.
- LUCKASSON, R.; REEVE, A. Naming, defining, and classifying in mental retardation. **Ment Retard**, Feb;39(1):47-52, 2001.
- LUNDEVALL, M.; RAJAEI, S.; ERLANDSON, A.; KYLLERMAN, M. Aetiology of severe mental retardation and further genetic analysis by high-resolution microarray in a population-based series of 6- to 17-year-old children. **Acta Paediatr**, Jan;101(1):85-91, 2012.
- LYSAGHT, R.; OUELLETTE-KUNTZ, H.; LIN, C. J. Untapped potential: perspectives on the employment of people with intellectual disability. **Work**, 41(4):409-422, 2012.

- MACINA, R. A.; MORII, K.; HU, X. L. et al. Molecular cloning and RARE cleavage mapping of human 2p, 6q, 8q, 12q, and 18q telomeres. **Genome Res**, Oct;5(3):225-232, 1995.
- MADRIGAL, I.; RODRÍGUEZ-REVENGA, L.; BADENAS, C. et al. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. **Genet Med**, Feb;9(2):117-122, 2007.
- MADRIGAL, I.; RODRÍGUEZ-REVENGA, L.; COSTA, L. et al. A study of subtelomeric rearrangements in 300 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies: their clinical and molecular characterisation. **Rev Neurol**, Oct 16;51(8):465-470, 2010.
- MALMGREN, H.; MALM, G.; SAHLÉN, S. et al. Molecular cytogenetic characterization of an insertional translocation, ins(6;7)(p25;q33q34): deletion/duplication of 7q33-34 and clinical correlations. **Am J Med Genet A**, Nov 15;139(1):25-31, 2005.
- MANDAL, K.; BOGGULA, V. R.; BORKAR, M. et al. Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. **Indian J Pediatr**, Oct;76(10):1027-1031, 2009.
- MATSUZAKI, H.; WANG, P. H.; HU, J. et al. High resolution discovery and confirmation of copy number variants in 90 Yoruba Nigerians. **Genome Biol**, 10(11):R125, 2009.
- MAULIK, P. K.; DARMSTADT, G. L. Childhood disability in low and middle-income countries: overview of screening, prevention, services, legislation, and epidemiology. **Pediatrics** Jul;120 Suppl 1:S1-55, 2007.
- MAZZUCHELLI, C.; VANTAGGIATO, C.; CIAMEI, A. et al. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. **Neuron** May 30;34(5):807-820, 2002.
- MEDINA, A.; PIÑEROS, L.; ARTEAGA, C. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to subtelomeric rearrangements in idiopathic intellectual disability in Colombia. **Pediatr Neurol** Mar;50(3):250-254, 2014.
- MEFFORD, H. C.; COOPER, G. M.; ZERR, T. et al. A method for rapid, targeted CNV genotyping identifies rare variants associated with neurocognitive disease. **Genome Res** Sep;19(9):1579-1585, 2009.
- MEFFORD, H. C.; TRASK, B. J. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. **Nat Rev Genet** Feb;3(2):91-102, 2002.
- MEINS, M.; LEHMANN, J.; GERRESHEIM, F. et al. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. **J Med Genet** Feb;42(2):e12, 2005.

- MERCADANTE, M. T.; EVANS-LACKO, S.; PAULA, C. S. Perspectives of intellectual disability in Latin American countries: epidemiology, policy, and services for children and adults. **Curr Opin Psychiatry** Sep;22(5):469-474, 2009.
- MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum Genet** May 14;86(5):749-764, 2010.
- MONNOT, S.; GIULIANO, F.; MASSOL, C. et al. Partial Xp11.23-p11.4 duplication with random X inactivation: clinical report and molecular cytogenetic characterization. **Am J Med Genet A** May 15;146A(10):1325-1329, 2008.
- MORENO-DE-LUCA, D.; SGENE CONSORTIUM; MULLE, J. G. et al. Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia. **Am J Hum Genet** Nov 12;87(5):618-630, 2010.
- MUNDHOFIR, F. E.; NILLESEN, W. M.; VAN BON, B. W. et al. Subtelomeric chromosomal rearrangements in a large cohort of unexplained intellectually disabled individuals in Indonesia: A clinical and molecular study. **Indian J Hum Genet** Apr;19(2):171-178, 2013.
- NAGAMANI, S. C.; EREZ, A.; BADER, P. et al. Phenotypic manifestations of copy number variation in chromosome 16p13.11. **Eur J Hum Genet** 19(3):280-286, 2011.
- OU, Z.; BERG, J. S.; YONATH, H. et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. **Genet Med** Apr;10(4):267-277, 2008.
- PALMER, E.; SPEIRS, H.; TAYLOR, P. J. et al. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. **Am J Med Genet A** Feb;164A(2):377-385, 2014.
- PALUMBO, P.; ANTONA, V.; PALUMBO, O. et al. Variable phenotype in 17q12 microdeletions: clinical and molecular characterization of a new case. **Gene** Apr 1;538(2):373-378, 2014.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Mental health: stop exclusion - dare to care**. Washington, DC: Pan American Health Organization, 2001.
- PANG, A. W.; MACDONALD, J. R.; PINTO, D. et al. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. **Genome Biol** 11(5):R52, 2010.
- PATEL, D. R.; GREYDANUS, D. E.; CALLES, J. L. J. R.; PRATT, H. D. Developmental disabilities across the lifespan. **Dis Mon** Jun;56(6):304-397, 2010.
- PÉREZ A. V.; MURILLO, P. L.; CAMPOS, O. G. et al. Subtelomeric rearrangements in cryptogenic mental retardation. **An Pediatr** Dec;75(6):365-371, 2011.
- PERRY, G. H.; BEN-DOR, A.; TSALENKO, A. et al. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. **Am J Hum Genet** Mar;82(3):685-695, 2008.

- PETRIN, A. L.; GIACHETI, C. M.; MAXIMINO, L. P. et al. Identification of a microdeletion at the 7q33-q35 disrupting the CNTNAP2 gene in a Brazilian stuttering case. **Am J Med Genet A** Dec;152A(12):3164-3172, 2010.
- PINTO, D.; MARSHALL, C.; FEUK, L.; SCHERER, S. W. Copy-number variation in control population cohorts. **Hum Mol Genet** 16, Spec No. 2:R168-173, 2007.
- PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K. et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnol** Oct 13;3:18, 2003.
- PORTNOÏ, M. F. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. **Eur J Med Genet** Mar-Jun;52(2-3):88-93, 2009.
- QIN, Y.; SHI, Y.; ZHAO, Y. et al. Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. **Fertil Steril** Apr;91(4 Suppl):1507-1509, 2009.
- RAUCH, A.; HOYER, J.; GUTH, S. et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. **Am J Med Genet A** Oct 1;140(19):2063-2074, 2006.
- RAYNHAM, H.; GIBBONS, R.; FLINT, J.; HIGGS D. The genetic basis for mental retardation. **QJM** Mar;89(3):169-175,1996.
- RIEGEL, M.; BAUMER, A.; JAMAR, M. et al. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. **Hum Genet** Sep;109(3):286-294, 2001.
- RIETHMAN, H. Human subtelomeric copy number variations. **Cytogenet Genome Res** 123(1-4):244-252, 2008.
- RIETHMAN, H.; AMBROSINI, A.; PAUL, S. Human subtelomere structure and variation. **Chromosome Res** 13(5):505-515, 2005.
- ROOMS, L.; REYNIERS, E.; VAN LUIJK, R. et al. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). **Hum Mutat** Jan;23(1):17-21, 2004.
- ROSENBERG, C.; KNIJNENBURG, J.; BAKKER, E. et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **J Med Genet** Feb;43(2):180-186, 2006.
- ROSSI, E.; PICCINI, F.; ZOLLINO, M. et al. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. **J Med Genet** Jun;38(6):417-420, 2001.

- ROSSI, E.; VERRI, A. P.; PATRICELLI, M. G. et al. A 12Mb deletion at 7q33-q35 associated with autism spectrum disorders and primary amenorrhea. **Eur J Med Genet** Nov-Dec;51(6):631-638, 2008.
- RUSU, C.; SIRETEANU, A.; PUIU, M. et al. MLPA technique-principles and use in practice. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi** Oct-Dec;111(4):1001-1004, 2007.
- SACCONI, S.; DE SARIO, A.; DELLA VALLE, G.; BERNARDI, G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** Jun 1;89(11):4913-4917, 1992.
- SALVADOR-CARULLA, L.; REED, G. M.; VAEZ-AZIZI, L. M. et al. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability" in ICD-11. **World Psychiatry** Oct;10(3):175-180, 2011.
- SCHINZEL, A. **Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man**. 2nd edition. Berlin, New York: De Gruyter. p 91-101, 2001.
- SCHOUMANS, J.; RUIVENKAMP, C.; HOLMBERG, E. et al. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridization (array-CGH). **J Med Genet** Sep;42:699-705, 2005.
- SCHOUTEN, J. P.; McELGUNN C. J.; WAAIJER, R. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res** Jun 15;30(12):e57, 2002.
- SELLNER, L. N.; TAYLOR, G. R. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. **Hum Mutat** May;23(5):413-419, 2004.
- SEMPERE-PÉREZ, A.; MANCHÓN TRIVES, I.; PALAZÓN AZORÍN, I. et al. 15Q11.2 (BP1-BP2) microdeletion, a new syndrome with variable expressivity. **An Pediatr (Barc)** Jul;75(1):58-62, 2011.
- SHAW, C. J.; LUPSKI, J. R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet** Apr 1;13 R57-R64, 2004.
- SHAW-SMITH, C.; REDON, R.; RICKMAN, L. et al. Microarray based comparative genomic hybridization (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. **J Med Genet** 41:241-248, 2004.
- SHEN, Y.; CHEN, X.; WANG, L. et al. Intra-family phenotypic heterogeneity of 16p11.2 deletion carriers in a three-generation Chinese family. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** Mar;156(2):225-232, 2011.
- SHEVELL, M. I.; ASHWAL, S.; DONLEY, D. et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay. **Neurology** Feb 11;60(3)367-380. 2003.

- SHIMOJIMA, K.; INOUE, T.; FUJII, Y. et al. A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. **Eur J Med Genet** Nov-Dec 52(6):433-435, 2009.
- SHINAWI, M.; LIU, P.; KANG, S. H. et al. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. **J Med Genet** May;47(5):332-341, 2010.
- SHIOW, L. R.; PARIS, K.; AKANA, M. C. et al. Severe combined immunodeficiency (SCID) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) associated with a Coronin-1A mutation and a chromosome 16p11.2 deletion. **Clin Immunol** Apr;131(1):24-30, 2009.
- SIGGBERG, L.; ALA-MELLO, S.; JAAKKOLA, E. et al. Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients. **Am J Med Genet A** Jun;152A(6):1398-1410, 2010.
- SOTELO, J. The challenge of mental disability. *Salud Publica Mex* 50 Suppl 2:s121, 2008.
- SOUTH, S. T.; HANNES, F.; FISCH, G. S. et al. Pathogenic significance of deletions distal to the currently described Wolf-Hirschhorn syndrome critical regions on 4p16.3. **Am J Med Genet** Nov 15;148C(4):270-274, 2008.
- SOYSAL, Y.; VERMEESCH, J.; DAVANI, N. A. et al. Molecular characterization of microduplication 22q11.2 in a girl with hypernasal speech. **Genet Mol Res** Sep 21;10(3):2148-2154, 2011.
- STEGMANN, A. P.; JONKER, L. M.; ENGELN, J. J. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. **Eur J Med Genet** Mar-Apr;51 (2):93-105, 2008.
- STOEVA, R. E.; GROZDANOVA, L. I.; VERMEESCH, J. R. et al. Clinical and molecular-cytogenetic studies of cryptic chromosome aberrations in individuals with idiopathic mental retardation and multiple congenital malformations. **Folia Med** Oct-Dec;50(4):55-62, 2008.
- TJIO, J. H.; LEVAN, A. The chromosome number in man. **Hereditas** 42:1-6, 1956.
- TUCKER, T.; MONTPETIT, A.; CHAI, D. et al. Comparison of genome-wide array genomic hybridization platforms for the detection of copy number variants in idiopathic mental retardation. **BMC Med Genomics** Mar 25;4:25, 2011.
- ULLMANN, R.; TURNER, G.; KIRCHHOFF, M. et al. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. **Hum Mutat** 28(7):674-682, 2007.
- VAN BOKHOVEN, H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. **Annu Rev Genet** 45:81-104, 2011.

- VAN KARNEBEEK, C. D. M.; JANSWEIJER, M. C. E.; LEENDERS, A. G. E. et al. Diagnostic investigation in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. **Eur J Hum Genet** Jan;13(1): 6-25, 2005.
- VAN NAARDEN BRAUN, K.; AUTRY, A.; BOYLE, C. A population-based study of the recurrence of developmental disabilities. Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Surveillance Program, 1991-1994. **Paediatr Perinat Epidemiol** Jan;19(1):69-79, 2005.
- VERDÚ-PÉREZ, A.; GARCÍA MURILLO, P. L.; GARCÍA CAMPOS, O. et al. Subtelomeric rearrangements in cryptogenic mental retardation. **An Pediatr** Dec;75(6):365-371, 2011.
- WALTERS, R. G.; JACQUEMONT, S.; VALSESIA, A. et al. A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. **Nature** Feb 4;463(7281):671-675, 2010.
- WILKIE A. O. M. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. **Am J Hum Genet** Sep;53:688-701, 1993.
- WINCENT, J.; ANDERLID, B. M.; LAGERBERG, M. et al. High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting. **Clin Genet** Feb;79(2):147-157, 2011.
- WOLFF, D. J.; SCHWARTZ, S.; CARREL, L. Molecular determination of X inactivation pattern correlates with phenotype in women with a structurally abnormal X chromosome. **Genet Med** Mar-Apr;2(2):136-141, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Disability prevention and rehabilitation**. Report of the WHO Expert Committee on Disability Prevention and Rehabilitation. Geneva, WHO Technical Report Series, 668, 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas: global resources for persons with intellectual disabilities**. Geneva: World Health Organization, 2007.
- XU, H.; POH, W. T.; SIM, X. et al. SgD-CNV, a database for common and rare copy number variants in three Asian populations **Hum Mutat** Dec;32(12):1341-1349, 2011.
- YU, S.; COX, K.; FRIEND, K. et al. Familial 22q11.2 duplication: a three-generation family with a 3-Mb duplication and a familial 1.5-Mb duplication. **Clin Genet** 73:160-164, 2008.
- ZOGOPOULOS, G.; HA K. C.; NAQIB, F. et al. Germ-line DNA copy number variation frequencies in a large North American population. **Hum Genet** Nov;122(3-4):345-353, 2007.
- ZOLLINO, M.; MURDOLO, M.; MARANGI, G. et al. On the nosology and pathogenesis of Wolf-Hirschhorn syndrome: genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. **Am J Med Genet** Nov 15;148C:257-269, 2008.

**ANEXOS****ANEXO A****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Departamento de Genética

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

**I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE: .....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE N:.....SEXO: .....  
 DATA NASCIMENTO:.....  
 ENDEREÇO:.....  
 BAIRRO: .....CIDADE: .....  
 CEP:.....TELEFONE:.....

**2. RESPONSÁVEL**

**LEGAL:**.....  
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador):.....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE N:.....SEXO: .....  
 DATA NASCIMENTO:.....  
 ENDEREÇO:.....  
 BAIRRO: .....CIDADE: .....  
 CEP:.....TELEFONE:.....

**II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1.TÍTULO DA PESQUISA: "Investigação de alterações cromossômicas crípticas em indivíduos com deficiência intelectual idiopática"

2.PESQUISADOR: Ludmila Serafim de Abreu

CARGO/FUNÇÃO: Bióloga Citogeneticista - Aluna de Doutorado - Pós-Graduanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Departamento de Genética

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

X SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: Início: Abril de 2010

Término: Junho de 2014

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
Departamento de Genética  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

**III. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO**

Seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada "Investigação de desequilíbrios cromossômicos crípticos em indivíduos afetados por deficiência intelectual idiopática" que será realizada por médicos geneticistas assim como biólogos. Esta pesquisa consiste primeiramente em uma avaliação clínica a ser feita pelos próprios médicos acompanhados pela bióloga responsável pela pesquisa. Também serão tiradas fotos das crianças (estas fotos serão utilizadas estritamente pelos pesquisadores e não serão divulgadas em órgãos da imprensa em nenhuma hipótese). Os dados conseguidos na avaliação clínica e as fotos tiradas serão analisados posteriormente com o professor de medicina da área de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) para se descobrir a causa da deficiência mental.

Após a avaliação genético-clínica, os pacientes que permanecerem sem diagnóstico para a etiologia da deficiência intelectual e que estão dentro dos critérios de inclusão para a realização do exame de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) ou do exame de *array*-CGH (*Comparative Genomic Hybridization-array*) serão selecionados para esta pesquisa. O critério de inclusão utilizado nesta pesquisa para a consiste em: indivíduos com deficiência intelectual idiopática que apresentam fenótipos altamente sugestivos de desordens de origem cromossômica, incluindo características dismórficas e/ou malformações; sendo que o resultado do cariótipo desse indivíduo foi considerado normal; e que já houve a exclusão de outras possíveis etiologias da deficiência intelectual após uma investigação genético-clínica completa. A realização dos exames de MLPA e *array*-CGH têm como objetivo investigar a presença de alterações cromossômicas crípticas a fim de esclarecer as possíveis causas da deficiência intelectual.

Esta pesquisa é muito importante porque poderá nos ajudar a identificar se a causa da deficiência intelectual do seu filho é de origem genética. Para a realização desse exame é necessária a coleta, através de punção venosa com seringa e agulha descartáveis, de 5 ml de sangue periférico, que será realizada pelo médico responsável. Em geral, a doação não traz riscos para o doador. Porém, eventualmente, alguns doadores, aproximadamente 1%, podem apresentar reações durante ou após a doação de sangue, como por exemplo: queda de pressão arterial; tonturas; hematomas; náuseas e vômitos; sudorese fria; dor local e dificuldade de movimentar o braço. A maioria dessas manifestações é de natureza leve, não compromete a saúde do doador e necessita apenas de um tempo maior em repouso ou de infusão de soro fisiológico. A amostra de sangue será enviada para a realização do exame de MLPA no Laboratório de Genética Humana e Médica no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, enquanto a técnica de *array*-CGH será realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
Departamento de Genética  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

**IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO**

O responsável pela criança participante da pesquisa poderá, a qualquer momento, ter acesso aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. Poderá, também, solicitar qualquer esclarecimento à pesquisadora sobre as dúvidas que venham a surgir durante a realização da pesquisa.

Poderá retirar o consentimento da participação na pesquisa a qualquer momento e assim, deixar de participar do estudo. Esta atitude não trará nenhum tipo de prejuízo a continuidade de assistência que a criança possa vir a necessitar.

Todos os dados obtidos, bem como a identidade de cada sujeito participante da pesquisa, será mantido em sigilo e somente a pesquisadora responsável pelo estudo terá acesso aos dados para análise e discussão.

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos, o responsável pela criança poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, Ludmila Serafim de Abreu e Dr. João Monteiro de Pina Neto, pelo telefone 16 3602 3256 - Laboratório de Genética Humana e Médica FMRP - USP.

**V- INFORMAÇÃO DE NOMES, ENDEREÇOS, TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:**

Nome: Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto  
Ludmila Serafim de Abreu

Endereço: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.  
Av Bandeirantes, 3900  
Monte Alegre  
14049-900 - Ribeirao Preto, SP - Brasil  
Fone: (016) 36023104 Fax: (016) 36330069

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
Departamento de Genética  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

**VII. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

Ribeirão Preto,        de                    de 201 .

\_\_\_\_\_  
Nome completo do sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Nome completo do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Nome completo do pesquisador

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

**ANEXO B**  
**ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO**

Human Genetics



Draft Manuscript for Review

**16p11.2 microdeletion associated with intellectual disability: incomplete penetrance and variable expressivity**

Journal:	<i>Human Genetics</i>
Manuscript ID:	HumGen-14-0264
Manuscript Type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	11-Jun-2014
Complete List of Authors:	Abreu, Ludmila; Department of Genetics of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Genética Riegel, Mariluce; Laboratory of Molecular Cytogenetics. Experimental Research Center. Hospital of Clinical, Pina-Neto, João; Department of Genetics of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Genetic
Keywords:	mental retardtion, microdeletions, array CGH

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Date 11-06-2014

Title "16p11.2 microdeletion associated with intellectual disability: incomplete penetrance and variable expressivity"

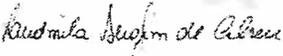
Authors:

The authors state that this is an original article, and has not been simultaneously presented to any other journal. It is understood that the submission of this original article is exclusive to *Human Genetics*.

The authors are aware of the above publication fee and understand that the paper (in case accepted) will undergo a final processing only after payment of this fee.

The authors agree that if the article is removed from the publishing process but has already undergone English revision, the cost for this revision must be covered.

Author: Ludmila Serafim de Abreu

Signature: 

Author: João Monteiro de Pina Neto

Signature: 

**CASE REPORT****16p11.2 microdeletion associated with intellectual disability: incomplete penetrance and variable expressivity**

Running title: 16p11.2 deletion associated with intellectual disability

Ludmila S. de Abreu<sup>1</sup>, João Monteiro de Pina-Neto<sup>1,2</sup>.

**Abreu, L. S.<sup>1</sup>; Pina Neto, J. M.<sup>1,2</sup>.**

1 Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

2 Division of Medical Genetics, Hospital de Clinicas, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

**Corresponding author: Abreu, L. S.**

**E-mail: ludiserafimabreu@usp.br**

Ludmila Serafim de Abreu

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo-USP

Laboratório de Genética Humana e Médica - Anexo D - Sala 04

Av. Bandeirantes, 3900 - Caixa Postal: 140409-900

Ribeirão Preto, SP – Brasil

Fone: +55 16 360-232-56/+55 16 816-263-35 /+55 48 881-218-27

Fax: +55 16 363-300-69

**ABSTRACT**

We present the clinical and molecular data of a patient with 16p11.2 microdeletion, inherited from his mother phenotypically normal, and discuss the function of the genes in this region and the effects of their haploinsufficiency on the clinical features described in the patients. The proband showed coarse and fine motor delay mild ID, language delay and difficulty reasoning. Few dysmorphic features were observed, including narrowing of the frontal skull, sunken eyes, palpebral fissures and anteverted nostrils above, and have behavioral problems that include hostile attitude and episodes of self-harm. Chromosomal analysis of the proband showed normal karyotype. Array-CGH was performed with the 8x60K platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) identifying in the proband an interstitial microdeletion in region 16p11.2. The copy number change was confirmed and its origin identified by real-time polymerase chain reaction. RT-PCR confirmed the deletion in the proband and revealed the familial transmitting of the 16p11.2 interstitial maternal origin deletion. The 16p11.2 region includes several genes involved in neurotransmission and synaptic formation or maintenance, reinforcing the existence of common biological pathways in neurodevelopmental disorders. Variability in the phenotype and incomplete penetrance observed in patients with the 16p11.2 deletion, despite common size of genomic imbalance, most likely arising from the haploinsufficiency of one or more genes in combination with other factors: mutation in the second allele, incomplete penetrance or other copy number variation (CNV) that may act as additional hits.

Key-words: Intellectual Disability; Array-CGH; Microdeletion; 16p11.2.

## INTRODUCTION

Since the large implementation of array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) in the diagnostic workup of intellectual disability (ID), new recurrent copy number variations (CNVs) and novel microdeletion/microduplication syndromes have been described. As more patients are identified carrying microdeletion/microduplication, it has become clear that some genomic disorders have high penetrance but a wide range of phenotypic severity. The recurrent CNVs that are found in multiple unrelated patients are usually associated with a broader range of phenotypes. The same deletions are sometimes transmitted from apparently unaffected parents and are found in 0.02% of controls. Likewise, the most common 16p11.2 microdeletion syndrome has been identified with a similar prevalence (0.3–0.7%) in large cohorts of patients with intellectual disability (ID) or other developmental problems (Rosenfeld et al. 2010; Shinawi et al. 2010) and in ~0.6% (varying from 0.3% to 1% based on various studies) of all patients with autism spectrum disorder (ASD) (Marshall et al. 2008; Weiss et al. 2008). Besides, some individuals carrying the deletion show no obvious developmental or physical abnormalities (Bijlsma et al. 2009; Shimojima et al. 2009).

The 16p11.2 deletion is a recurrent genomic event and a significant risk factor for autism. This genomic disorder also exhibits extensive phenotypic variability and diverse clinical phenotypes. The full extent of phenotypic heterogeneity associated with the 16p11.2 deletion and the factors that modify the clinical phenotypes are currently unknown. Several recent reports suggest a large number of candidate CNVs non-specific to disease involved in the expression of different behaviour phenotypes, including ID, ASD and schizophrenia (SZ) (Guilmatre et al. 2009; Shinawi et al. 2010). This implies the existence of shared biological pathways between these neurodevelopmental conditions. The dysfunction of specific neuronal networks of each clinical condition most likely depends on additional genetics, epigenetics and environmental factors which remain to be characterised.

Here, we present the clinical and molecular data of a patient with 16p11.2 microdeletion, inherited from his mother phenotypically normal, and discuss the function of the genes in this region and the effects of their haploinsufficiency on the clinical features described in the patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient

Clinical examination of the patient, male, 14 years old, was found to height of 155 cm (10–25%), weight 87.200 g (> 97%), head circumference of 55 cm (50–98%), internal intercantal distance 3.2 cm (75%) and external intercantal distance of 8.9 cm (50–75%), and coarse and fine motor delay (started walking at 2 years), mild ID, language delay and difficulty complete reasoning. Few dysmorphic features were observed, including narrowing of the frontal skull, sunken eyes, palpebral fissures and anteverted nostrils above, and have behavioral problems that include hostile attitude and episodes of self-harm (Figure 1).

Figure 1 - Patient with del(16)(p11.2) detected by array-CGH. Observed narrowing of the frontal skull, anteverted nostrils and overweight.

### Cytogenetic analysis

Chromosomal analysis of the patients was carried out on peripheral blood lymphocytes. Lymphocytes culture was established by the standard GTG-banding protocol. Analysis was performed at the ISCN band level 400–550.

### Array-CGH analysis

The Human Genome High-Definition CGH Microarray 8x60K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) platform was used for the array-CGH analysis. Array-CGH was carried out according to the recommendations of the manufacturer. Fragmentation and labeling was performed following the (Universal Labeling System) standard ULS method protocol recommended by Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Slides were scanned using the SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), data were extracted using Feature Extraction v10.1.1.1 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and the data were analysed with the Agilent Cytogenomics v2.7.8.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) for microarrays software (Agilent, USA).

### Real-Time PCR analysis

The copy number change was confirmed and its origin identified by real-time polymerase chain reaction with primer pair specific for *PRRT2* gene (location chr16:29.826.084-29.826.188 bp, NCBI37/hg19) in the DNA samples of normal control (CN), patient, father and mother of the proband.

## RESULTS

Chromosomal analysis revealed normal karyotype: 46, XY. The examination of array-CGH performed in the proband identified an interstitial microdeletion in region 16p11.2 (chr16:29,673,954-30,198,600 bp NCBI37/hg19) with an approximate length of 524 kb, where the genes are located *SPN* (OMIM\*182160), *QPR1* (OMIM\*606248), *KIF22* (OMIM\*603213), *MAZ* (OMIM\*600999), *PRRT2* (OMIM\*614386), *PAGR1* (OMIM\*612033), *MVP* (OMIM\*605088), *CDIPT* (OMIM\*605893), *KCID13* (OMIM\*608947), *TAK2* (OMIM\*613199), *HIRIP3* (OMIM\*603365), *DOC2A* (OMIM\*604567), *FAM57B* (OMIM\*615175), *ALDOA* (OMIM\*103850), *PPP4C* (OMIM\*602035), *TBX6* (OMIM\*602427), *YPEL3* (OMIM\*609724), *MAPK3* (OMIM\*601795) and much of the gene *CORO1A* (OMIM\*605000) (Figure 2). RT-PCR confirmed the deletion in the proband and revealed the familial transmitting of the 16p11.2 interstitial maternal origin deletion.

Figure 2 - Profile of array-CGH in the patients with microdeletion del(16)(p11.2) of maternal inheritance.

## DISCUSSION

Microdeletions in 16p11.2 region, as identified in the proband, by array-CGH technique, have been found with similar prevalence of 0.3% to 0.7% in extensive studies comprising subjects with DI or other problems from developing and approximately 0.6% of all patients with autism spectrum disorders (Ciuladaitè et al., 2011). The method of qPCR confirmed the alteration in the proband and indicated normal genic dosage for the father of the proband, while the mother had a reasonable opportunity to a deletion in the same segment result, showing that the microdeletion 16p11.2 detected in patient was inherited his mother.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The most common clinical features of 16p11.2 microdeletion include delayed speech and language, ID, motor deficit, behavioral disturbances, large front, micrognathia, ocular hypertelorism, flattened midface, and congenital anomalies including diaphragmatic hernia, cleft palate, polydactyly, cardiac defects, multicystic dysplastic kidney, fusion of the lower ribs and pyloric stenosis (Shinawi et al., 2010). Furthermore, the prevalence of overweight and obesity in individuals with 16p11.2 deletion is greater than in the general population (Walters et al., 2010). In one case (5035) recorded in ECARUCA, (European-based database, <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>), the individual had developmental delay, IQ below the average delay speech, autistic behavior and behavioral disorders, being diagnosed with a 16p11.2 microdeletion with breakpoints (29.5 to 30.2 Mb/hg19) very similar to those detected in our patient. Individuals with 16p11.2 microdeletion associated with ID, speech and language delays and obesity were also recorded in the database Decipher database (cases 248634, 248636, 251007 and 252407). Thus, the clinical characteristics found in the proband as speech delay, motor deficit, ID, overweight and behavioral problems are common to other cases of 16p11.2 microdeletion published, indicating that the 16p11.2 microdeletion detected in proband matches a pathogenic CNV.

The 16p11.2 region includes several genes involved in neurotransmission and synaptic formation or maintenance, reinforcing the existence of common biological pathways in neurodevelopmental disorders (Hanson et al., 2010). One is the SEZ6L2 gene, considered a strong candidate for common characteristics associated with 16p11.2 microdeletion due to the high level of expression in the brain, in addition to strong homology with SRPX2 gene (OMIM \* 300642) which plays a role in speech development and language centers in the brain (Ciuladaitè et al., 2011). Another gene is MAPK3 (OMIM \* 601795) that encodes a protein kinase mitogen-activated responsible for phosphorylating a number of transcription, such as Elk-1 and CREB factors, allowing the expression of essential genes for both remodeling and synaptic efficacy, and for various forms of learning (Mazzucchelli et al. 2002). Have haploinsufficiency of TBX6 gene (OMIM \* 602427), which encodes a transcriptional regulator involved in developmental processes may be responsible for congenital vertebral malformations identified in published cases (Ciuladaitè et al., 2011).

Although a significant fraction of individuals with 16p11.2 deletion have severe developmental problems and neuropsychiatric disorders, some have no physical or developmental change, or may even display various degrees of ID without manifesting autism spectrum disorders (Shimojima et al., 2009). This indicates that the 16p11.2 microdeletion displays incomplete penetrance and variable expressivity (Shimojima et al, 2009; Shinawi et al, 2010; Ciuladaitè et al, 2011), which may explain the absence of some phenotypic features in the proband as well as the apparently normal phenotype of the proband's mother. As it is not possible to say by qPCR analysis of the 16p11.2 deletions proband and his mother are identical, it may be that such changes have different break points, thus resulting in distinct phenotypic characteristics make.

As Shen et al. (2011), there are some explanations for the variable expressivity and clinical heterogeneity in genomic diseases. One is that the breakpoints of the deletions can not be identical. However, there are reports of familial cases with the same deletion 16p11.2 that showed phenotypic variability and incomplete penetrance. Another is that the deletion may reveal inherited a recessive mutation in the other allele (Shiow et al., 2010). As a consequence of phenotypic variability, individuals with 16p11.2 deletion can rarely be identified based on clinical examination or dysmorphological history, emphasizing the importance of performing microarray

analysis of chromosomal tests in people with neurodevelopmental disorders, including delayed speech and language, ID and autism (Hanson et al., 2010).

## CONCLUSIONS

The incomplete penetrance and variable expressivity of the clinical findings in patients with these rearrangements complicates both the clinical interpretation of the molecular data and the genetic counselling. Variability in the phenotype and incomplete penetrance observed in patients with the 16p11.2 deletion, despite a common size of genomic imbalance, most likely arising from the haploinsufficiency of one or more genes in combination with other factors: mutation in the second allele, incomplete penetrance or other copy number variation (CNV) that may act as additional hits.

## REFERENCES

- Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, et al. (2009) Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* 52(2-3): 77-87.
- Ciuladaitė Z, Kasnauskienė J, Cimbališienė L. et al. (2011) Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. *J Appl Genet* Nov;52(4):443-449.
- Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, et al. (2009) Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry* 66(9):947-956
- Hanson E, Nasir, RH, Fong, A. et al. (2010) Cognitive and behavioral characterization of 16p11.2 deletion syndrome. *J Dev Behav Pediatr* Oct;31(8):649-657.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, et al. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82(2):477-488.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, et al. (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* May 30;34(5):807-820.
- Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, et al. (2010) Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodevelop Disord* 2(1):26-38
- Shen. Y.; Chen, X.; Wang. L. et al. (2011) Intra-family phenotypic heterogeneity of 16p11.2 deletion carriers in a three-generation Chinese family. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* Mar;156(2):225-232.
- Shimajima, K.; Inoue, T.; Fujii, Y. et al. (2009) A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. *Eur J Med Genet* Nov-Dec 52(6):433-435.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Shinawi M, Liu P, Kang SH, et al. (2010) Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47(5):332–341.

Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, et al. (2010) A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* Feb 4;463(7281):671–675,

Weiss LA, Shen Y, Korn JM, et al. (2008) Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358:667–675.

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

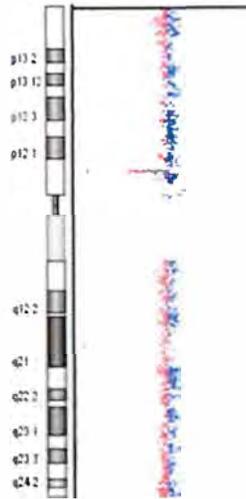


247x209mm (96 x 96 DPI)

view

Human Genetics

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60



44x89mm (96 x 96 DPI)

PreView