



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Doutorado em Biologia

**O Papel da Variação do Número de Cópias
Genômicas no Fenótipo Clínico de Deficiência
Intelectual em uma Coorte Retrospectiva da Rede
Pública de Saúde do Estado de Goiás**

Rodrigo Roncato Pereira

Goiânia, GO

Março, 2014

Rodrigo Roncato Pereira

**O Papel da Variação do Número de Cópias
Genômicas no Fenótipo Clínico de Deficiência
Intelectual em uma Coorte Retrospectiva da Rede
Pública de Saúde do Estado de Goiás**

Tese apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás**, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **Doutor em Biologia**.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD. Departamento de Biologia, PUC-GO.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva, Instituto de Ciências Biológicas, UFG.

Goiânia, GO

Março, 2014

**Às duas mulheres da minha vida:
minha mãe, Ângela, e minha esposa,
Sara, pelo incondicional apoio, amor
e carinho que me dedicam em todos
os projetos que me disponho a
realizar e pela incrível capacidade
que ambas têm de despertar, em mim,
toda a força e coragem que necessito
para vencer os meus maiores
obstáculos**

Dedico

Agradecimentos

A presente tese é o resultado final de todo um esforço, trabalho e dedicação às pesquisas Citogenéticas que venho desenvolvendo desde minha iniciação em laboratórios de Biologia. Ao longo da minha caminhada até aqui, sempre apareceram pessoas especiais que foram fundamentais para o meu crescimento, tanto moral quanto acadêmico, e que sem as quais meus objetivos seriam muito mais difíceis de serem alcançados ou até mesmo inatingíveis. Por este motivo, aproveito o momento para declarar o meu reconhecimento e profunda gratidão:

A Deus, por guiar todos os meus passos; por se fazer presente e me amparar nos momentos mais difíceis, dando-me a força necessária para superar os problemas que preciso enfrentar para crescer; pela vida e pela família com a qual fui presenteado; pelas oportunidades que me são dadas; por me suprir em todas as necessidades; por Sua proteção e todo o amor que recebo (e sinto), que me faz enxergar apenas o caminho do bem e me fornece tudo o que preciso para seguir em frente, sempre. Muito obrigado, meu Pai.

Ao primeiro grande amor da minha vida, minha mãe Ângela, que além de me trazer com todo amor e carinho a este mundo, dedicou, cuidou e doou incondicionalmente seu sangue e suor por mim, tudo na forma de amor e trabalho, despertando e alimentando em minha personalidade, desde cedo, a sede pelo conhecimento e a importância deste em minha vida. Por me ensinar o melhor sentimento que um ser humano poderia sentir, o amor. Por apoiar todos os meus projetos. Por me fazer sentir a pessoa mais importante do mundo, sempre quando estou ao seu lado. Pela superproteção que me dá a segurança do tentar e jamais desistir. Por ser o maior exemplo de honestidade, força e coragem que me moldaram no que sou hoje. Por fazer o que parece impossível e suportar o inimaginável, só para ver bem a nossa família. Por ser a maior referência de Deus que tenho aqui na Terra. Por tudo isso (e muito mais), especialmente neste caso, eu preciso agradecer, também, e mais uma vez, a Deus, por ter me enviado um anjo como mãe. Eu te amo, mãe.

Ao meu segundo grande amor, a minha esposa Sara, companheira de todas as horas, meu ponto de equilíbrio. Além de todo amor e carinho que sempre me dedicou, ajudou-me durante o percurso de toda minha vida acadêmica, jamais deixando que eu desanimasse ou desistisse em momentos críticos. Por ser a maior incentivadora do meu crescimento profissional. Por ensinar as múltiplas faces do amor, que eu desconhecia. Por

compreender e suportar as minhas duras horas de estresse. Por ser muitas vezes, minha “terapeuta” e conselheira, gerando em mim uma grande motivação para continuar com meus objetivos, sempre me fazendo acreditar que conseguiria chegar ao final desta difícil, mas gratificante etapa de minha vida. Por conseguir ver sempre o melhor em mim e nunca se cansar de tentar me mostrar isso. Por se manter sempre ao meu lado, mesmo quando estou errado. Pela sua grande capacidade de amar com uma intensidade que poucas pessoas conseguem atingir. Por sua incrível força para enfrentar as dificuldades, sua grande responsabilidade em tudo o que faz, sua sensibilidade em não medir esforços para ajudar a quem quer que seja, e sua fé inabalável que me encorajam e me servem como referência para buscar melhorar cada vez mais como pessoa e como profissional. Eu te amo, meu amor.

Ao meu pai, Reinaldo (*in memoriam*), que apesar do pouco tempo que tivemos para conviver, foi fundamental enquanto esteve presente, dando-me todo conforto, segurança e educação que foram imprescindíveis para minha caminhada até aqui. Por ter acreditado e investido em minha educação, mesmo com todas as dificuldades que enfrentávamos. Seus ensinamentos, exemplos de força e de superação, e a incrível dedicação à família até seus últimos momentos ainda estão presentes em meus pensamentos e tudo isso me fez admirá-lo e ter forças para chegar, academicamente, o mais longe o possível, afim de honrar todos os seus esforços e sacrifícios. Foi uma pessoa muito importante para mim, e por tudo o que ele fez por nossa família, continuará vivo em nossas lembranças. Jamais o esquecerei.

Aos meus irmãos, Leandro e Érico, pela paciência (muitas vezes exigida), pelo importante apoio, torcida e por ajudar a manter nosso lar sempre em constante harmonia, sendo tudo isso, fundamental para minha formação.

Ao professor, educador, motivador, orientador e também amigo, Peixoto, que me resgatou quando eu estava perdido, trabalhando em um campo desconhecido e sem expectativa de crescimento. Por sua dedicação, paciência e paixão à ciência e aos amigos. Por ter aceitado a difícil tarefa de orientar um aluno que vinha de outra linha de pesquisa, com o curso já em andamento e sem um projeto. Por ter acreditado neste estudo e por seu otimismo e alegria que sempre me animavam quando eu achava que não conseguiria. Por oferecer sua amizade sincera. Por ter contribuído decisivamente com a qualidade deste estudo. Pela disposição e fácil acessibilidade em todas as horas que precisei, mesmo quando estava sobrecarregado de afazeres. E ainda mais pela oportunidade de ter

convivido com uma pessoa com uma mente tão brilhante e espírito nobre. A você professor, que tem toda a minha admiração, muito obrigado de coração.

À minha co-orientadora e grande amiga, Daniela, que desde minha graduação vem me acompanhando e auxiliando em todos os meus projetos acadêmicos. Por ter me “salvado” em diversas situações durante essa longa caminhada. Por ter influenciado positivamente para o meu retorno ao melhor laboratório de que tenho notícias. Por sua competência e grande habilidade profissional, que foi determinante para o bom andamento do nosso projeto. Por sua disponibilidade e generosidade em ajudar a qualquer hora, e sempre com boas ideias e grandes soluções para todos os problemas que foram surgindo durante as diversas fases do nosso projeto. É sempre um privilégio conviver com pessoas assim, pois aprendo muito. Espero que possamos continuar essa longa parceria por muito mais tempo.

Ao professor e amigo Cláudio, por ter contribuído e ainda contribuir muito com o meu aprendizado. Minha admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, e pelo seu dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência. Além disso, agradeço pela valorosa contribuição com sugestões e aconselhamentos durante a banca de qualificação. Foi fundamental para o desenvolvimento final deste estudo.

Aos professores Rinaldo, Elisângela, Aline, Flávia e Kátia Karina por terem gentilmente aceitado participar da banca de defesa desta tese. É uma grande honra para mim poder contar com a brilhante contribuição de profissionais tão conceituados como vocês, para a melhoria da qualidade deste trabalho.

Ao núcleo de Pesquisas Replicon e às pessoas com quem convivi nesse espaço ao longo de quase 9 anos. O caloroso acolhimento, o ótimo ambiente de trabalho, a colaboração e cooperação mútua e a grande união e amizade entre todos que trabalhamos lá, são o maior diferencial entre este os outros laboratórios por onde passei. A produção científica compartilhada na comunhão com amigos e colegas nesse espaço, foi uma das melhores experiências da minha formação acadêmica. Nunca esquecerei os bons momentos que tivemos.

À nossa equipe de trabalho pela competência e persistência na realização de todos os experimentos deste estudo, assim como pela qualidade e delicadeza no atendimento aos pacientes e familiares envolvidos. Especialmente à Damiana, Gustavo e Cristiano pela colaboração nos experimentos citogenéticos e ao Aldáires e à Irene pela grande

contribuição na realização dos experimentos moleculares e nas análises dos dados. O apoio de vocês foi imprescindível para o bom andamento e a conclusão deste estudo.

Aos meus queridos avós, Renate e Vicente pela grande sabedoria que me transmitem através de conselhos e belos exemplos, nos quais eu busco sempre me espelhar. O grande amor que demonstram, a generosidade, a dedicação à família, a compreensão e os seus ensinamentos foram e continuam sendo muito importantes para mim.

Sempre dispostos a ajudar e apoiando todos os caminhos que decido seguir, meus avós são um dos principais pontos de apoio que tenho. Nunca mediram esforços para que eu pudesse vencer mais esta etapa de minha vida. Se hoje estou conseguindo me formar doutor, devo muito a eles que investiram, encorajaram e acreditaram muito em mim, fazendo com que eu me esforçasse cada vez mais para jamais decepcioná-los. Por isso, meu profundo agradecimento vô e vó.

Às tias mais especiais que tenho. Tia Vera, tia Maria, madrinha Solimar, tia Cida e Tia Suzy que sempre se preocuparam verdadeiramente comigo. Por torcerem e incentivarem minhas batalhas. Pelo carinho, apoio e dedicação que me ajudaram a crescer e a enfrentar melhor as situações difíceis que passei durante esta longa jornada.

Ao meu cunhado Halley pelas dicas, incentivo, torcida e pela disposição em ajudar todas as vezes quando precisei.

À uma série de outros familiares que mesmo não sendo muito presentes, sinceramente torceram por mim e nas oportunidades que nos encontrávamos, sempre demonstraram interesse e preocupação. É muito bom saber que posso contar com muitas pessoas queridas.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás, especialmente ao Departamento de Biologia, que me formou acadêmica-, científica- e profissionalmente, dando-me toda a base de conhecimento necessária para meu desenvolvimento.

À Universidade Federal de Goiás, especialmente ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia que através de excelentes professores, aprofundou meus conhecimentos em biologia celular, molecular e genética, dando-me a oportunidade de me formar primeiramente Mestre e agora Doutor.

Aos pacientes e seus familiares que se dispuseram a participar deste estudo, cooperando e tornando-o possível.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto que originou esta tese e à CAPES pela bolsa de estudos que me proporcionou a oportunidade de uma maior dedicação à elaboração deste estudo.

Às pessoas que me impuseram dificuldades, propositadamente ou não, pois sem elas eu jamais teria saído do lugar.

Finalmente, faço questão de agradecer profundamente a todos aqueles que torceram ou intercederam por mim, mesmo de forma anônima ou discreta, e que não foram citados aqui, mas que influenciaram positivamente minha caminhada.

Se o desafio era grande, as motivações que me cercaram foram ainda maiores, principalmente por causa das pessoas especiais que tive, tenho ou encontrei pelo meu caminho. A generosidade e o apoio que recebi, ajudaram a transformar instantâneos momentos de aflição, dúvida e sofrimento em aprimoramento, satisfação e recompensa.

A todos vocês, MUITO OBRIGADO!

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Bíblia Sagrada – Eclesiastes, 3:1

Sumário

	Página
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Apêndices e Anexos	xiv
Lista de Siglas e Abreviaturas	xv
Resumo	xviii
Abstract	xix
Capítulo I	
1. Introdução	1
1.1. Deficiência Intelectual	1
1.2. Etiologia	3
1.3. Investigações Genéticas	5
1.3.1. Cariótipo Convencional	5
1.3.2. Citogenética Molecular: <i>Fluorescent in situ Hybridization</i> (FISH)	6
1.3.3. Citogenética Molecular: <i>Multiplex Ligation-Dependant Probe</i> <i>Amplification</i> (MLPA)	7

1.3.4. Citogenética Molecular: <i>Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction</i> (QF-PCR)	8
1.3.5. Citogenética Molecular: <i>Chromosomal Microarrays</i> (CMA) ...	8
1.3.6. Variação no Número de Cópias (CNVs)	11
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. Material e Métodos	13
3.1. Grupo Amostral	13
3.2. Critérios de Inclusão	15
3.3. Critérios de Exclusão	15
3.4. Pacientes	16
3.5. Obtenção das Amostras Biológicas	18
3.6. Estudos Cromossômicos por Bandamento GTG	19
3.7. CMA	20
3.8. Análise das CNVs	22
4. Resultados	22

5. Discussão	39
6. Conclusão	51
7. Considerações Finais	52
8. Referências Bibliográficas	52
Apêndices e Anexos	75
Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
Apêndice 2: Protocolo de Atendimento (Anamnese)	80
Anexo 1: Protocolo de Extração de DNA - QIAamp® DNA Mini Kit	83
Anexo 2: Protocolo de Extração de DNA - Illustra™ GE Healthcare	93
Capítulo II	
Manuscrito de Artigo Científico 1: The First High-Resolution CMA Investigation in Patients from Central Brazil, Goiás State, with Intellectual Disability	98

Lista de Tabelas

Tabela	Página
Tabela 1: Classificação da deficiência intelectual de acordo com o quociente de inteligência	2
Tabela 2: Características clínicas e dados moleculares dos pacientes	35

Lista de Figuras

Figuras	Página
Figura 1: Fluxograma representativo do grupo amostral neste estudo	15
Figura 2: Fluxograma de trabalho	21
Figura 3: Metáfases e cariótipos convencionais com bandamento G de pacientes com indicação clínica de deficiência intelectual	23
Figura 4: Fenótipo facial dos pacientes que apresentam deficiência intelectual envolvidos neste estudo	24
Figura 5: Imagem capturada do <i>software</i> ChAS (<i>Affymetrix</i> , USA), mostrando a microduplicação patogênica em mosaico (50%) <i>de novo</i> em 17p11.2 de 3.677 kpb, observada no paciente 2	27
Figura 6: Imagem capturada do <i>software</i> ChAS (<i>Affymetrix</i> , USA), mostrando a microdeleção patogênica <i>de novo</i> em Xq27.3 de 4.176 kpb, observada no paciente 6	29
Figura 7: Imagem capturada do <i>software</i> ChAS (<i>Affymetrix</i> , USA), mostrando as duas alterações patogênicas em mosaico presentes no cromossomo 18 do	

paciente 7. A seta azul indica a microdeleção *de novo* em 18p11.32 de 1.233 kpb e a seta vermelha indica a duplicação *de novo* de 59.405 kpb de todo o braço longo deste cromossomo 31

Figura 8: Imagem capturada do *software* ChAS (*Affymetrix*, USA), mostrando a deleção patogênica *de novo* observada em 1p31.3 com 10.887 kpb, no paciente 11 32

Lista de Apêndices e Anexos

Apêndices	Página
1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
2. Protocolo de Atendimento (Anamnese)	80
 Anexos	
1. Protocolo de Extração de DNA – QIAamp® DNA Mini Kit	83
2. Protocolo de Extração de DNA – Illustra™ GE Healthcare	93

Lista de Siglas e Abreviaturas

- A: Adenina
- AAIDD: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities
- AAMR: American Association on Mental Retardation
- aCGH: Hibridação genômica comparativa por microarrays de DNA (do inglês, Microarray-based Comparative Genomic Hybridization)
- APA: American Psychological Association
- BACs: Cromossomos artificiais bacterianos (do inglês, Bacterial Artificial Chromosome)
- C: Citosina
- °C: Graus Celsius
- Ca(2+): Íons de Cálcio
- cAMP: Adenosina Monofosfato cíclica
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos
- cGMP: Guanosina Monofosfato cíclica
- ChAS: Chromosome Analysis Suite
- CID-10: Classificação Internacional de Doenças (código para deficiência mental)
- cm: Centímetros
- CMA: Chromosomal Microarray
- CNVs: variações no número de cópias (do inglês, Copy Number Variation)
- DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
- Del: Deleção
- DGV: Database of Genomic Variation
- DI: Deficiência Intelectual
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic acid)
- Dup: Duplicação
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
- F: Feminino
- FISH: Hibridização Fluorescente *in situ* (do inglês, Fluorescent *in situ* Hybridization)
- G: Guanina
- GO: Goiás

- HD: High Definition
- ISCA: The International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium
- Kb: Quilo base
- KCl: Cloreto de Potássio
- Kg: Quilogramas
- Kpb: Quilo pares de bases
- LaGene: Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana
- M: Masculino (na Tabela 2)
- M: Molar (no texto)
- MB: Mega bases
- mg: Miligramas
- MIM: Mendelian Inheritance in Man
- mL: Mililitros
- MLPA: Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification
- mM: Mili Molar
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- ng: Nanogramas
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- p: Braço curto do cromossomo
- PACs: Cromossomos artificiais P1 (do inglês, P1-Derived Artificial Chromosome)
- PBS: Tampão fosfato-salino (do inglês, phosphate buffered saline)
- PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)
- pH: Potencial Hidrogeniônico
- PUC/GO: Pontifícia Universidade Católica de Goiás
- q: Braço longo do cromossomo
- QF-PCR: Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction
- QI: Quociente de Inteligência
- ®: Registrado
- RefSeq: NCBI Reference Sequence Database
- RPM: Rotações por minuto
- SDS: Dodecil sulfato de sódio (do inglês, sodium dodecyl sulfate)
- SES: Secretaria de Estado da Saúde

- SNPs: Polimorfismos de um único nucleótido (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism)
- STRs: Pequenas repetições em tandem (do inglês, Short Tandem Repeat)
- T: Timina
- TBE: Tris-borate-EDTA
- TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TM: Trade Mark
- Tris-Cl: hydroxymethyl aminomethane chloride
- µg: Micro grama
- µL: Micro litro
- USA: United States of America
- V: Volts

Resumo

A deficiência intelectual é um sinal que compreende um conjunto de distúrbios clínicos e geneticamente heterogêneos em que o desenvolvimento e/ou a função do cérebro é comprometida. Esta deficiência é caracterizada por limitações significativas tanto no funcionamento intelectual quanto no comportamento adaptativo e se inicia antes dos 18 anos de idade. É caracterizada por um elevado grau de expressividade variável, e pela manifestação de uma grande gama de fenótipos, variando de diversas síndromes genéticas conhecidas a características não sindrômicas e desordens psicológicas e/ou psiquiátricas. A etiologia ainda é mal compreendida e cerca de metade dos casos não são esclarecidos. A análise cromossômica por microarray tem revolucionado, nos últimos anos, a avaliação de pacientes com atraso no desenvolvimento ou deficiência intelectual. Por este método, o genoma de um paciente é examinado para a detecção de ganhos ou perdas de material genético que, normalmente, são muito pequeno para serem detectados por estudos cromossômicos com bandamento G. Deleções e duplicações genômicas têm um papel importante na caracterização de doenças genéticas, incluindo muitas desordens neurológicas e do desenvolvimento neural. A identificação dessas alterações pode contribuir para o manejo clínico dos indivíduos afetados e auxiliar suas famílias, e além disso, pode também fornecer informações sobre os processos do desenvolvimento e funcionamento do cérebro. Neste contexto o objetivo principal deste estudo foi identificar possíveis alterações genômicas submicroscópicas associadas à deficiência intelectual, utilizando uma plataforma de *Chromosomal Microarray* de alta resolução, em pacientes referenciados por médicos da rede pública de saúde do Estado de Goiás e que tenham apresentado inicialmente um cariótipo normal. Desta forma foram testados 15 pacientes com deficiência intelectual, pela tecnologia de alta resolução CytoScan HD Array (*Affymetrix*) que detectou a presença de 33 variações no número de cópias genômicas em 10 (66,7%) dos probandos. Foram observadas 19 microduplicações (57,6%) e 14 microdeleções (42,4%), sendo que 17 CNVs (51,5%) eram neutras, 7 (21,2%) patogênicas, 5 (15,15%) potencialmente patogênicas e 4 (12,12%) de significado incerto. Cinco pacientes não apresentaram nenhuma alteração no número de cópias. Neste estudo foi possível propor uma etiologia genética para o fenótipo de 8 pacientes e dessa forma o rendimento diagnóstico, a título de pesquisa, da plataforma utilizada foi de 53,3%. Este estudo foi relevante já que esta tecnologia foi empregada pela primeira vez no estado de Goiás e com isso, pudemos contribuir com mais informação genética sobre esse complexo e heterogêneo sinal neurológico de grande importância para a saúde pública mundial.

Palavras-Chave: Chromosomal Microarrays, Deficiência Intelectual, CNVs, Cariótipo.

Abstract

Intellectual disability is a signal comprising a set of clinically and genetically heterogeneous disorders in which the development and/or function of the brain is compromised. This deficiency is characterized by significant limitations both in intellectual functioning and in adaptive behavior and is observed begins before 18 years of age. It is characterized by a high degree of variable expression, and the expression of a wide range of phenotypes, ranging from various genetic syndromes known to characteristics non-syndromic and psychological and/or psychiatric disorders. The etiology is still poorly understood and about half of the cases are unclear. In recent years, the chromosomal analysis by microarray has revolutionized the evaluation of patients with developmental delay or intellectual disability. By this method, the genome of a patient is examined to detect gains or losses of genetic material that are usually too small to be detected by chromosome banding studies. Genomic deletions and duplications have an important role in characterizing genetic diseases, including many neurological disorders and neural development. Identifying these changes may contribute to the clinical management of affected individuals and assist their families, and furthermore, can provide information on the processes of development and brain function. In this context the main objective of this study was identified possible submicroscopic genomic changes associated with intellectual disability, using a platform Chromosomal Microarray high resolution in patients referred by doctors of public health from Goiás state and had initially a normal karyotype. Thus 15 patients with intellectual disabilities were tested by high resolution HD CytoScan Array (Affymetrix) technology which detected the presence of 33 variations in the number of genome copies in 10 (66.7%) of the probands. Nineteen microduplications (57.6%) and 14 microdeletions (42.4%) were observed, and 17 CNVs (51.5%) were neutral, 7 (21.2%) pathogenic, 5 (15.15%) potentially pathogenic and 4 (12.12%) of uncertain significance. Five patients showed no change in the number of copies. In this study, we could propose a genetic etiology for the phenotype of 8 patients and thus the diagnostic yield of the platform used was 53.3%. Although modest, this study was significant because this technology was first employed in the state of Goiás and thus, could contribute more genetic information about this complex and heterogeneous neurological sign of great importance to global public health.

Keywords: Chromosomal Microarrays, Intellectual Disabilities, CNVs, Karyotype.

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Deficiência Intelectual

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a deficiência intelectual (DI), antigamente denominada retardo mental, como uma capacidade significativamente reduzida de compreender informações novas ou complexas e de aprender e aplicar novas habilidades (inteligência prejudicada). Ela é caracterizada, essencialmente, por alterações, durante o período de desenvolvimento, das faculdades que determinam o nível global de inteligência, isto é, das funções cognitivas, de linguagem, habilidades motoras e capacidade social e que tem um efeito duradouro sobre o desenvolvimento (World Health Organization, 2010).

A DI, que é registrada na Classificação Internacional de Doenças (CID-10), pode acontecer acompanhada por outros transtornos mentais ou anomalias físicas ou mesmo ocorrer isoladamente, sendo o único sinal presente em uma determinada pessoa.

A designação retardo mental, ainda aparece com uma certa frequência no meio científico, entretanto, atualmente, há um consenso internacional para a substituição deste termo por deficiência intelectual, embora, também, possa ser substituído no futuro (Salvador-Carulla e Bertelli, 2008).

A *American Association on Mental Retardation* (AAMR), que agora é conhecida como *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (AAIDD) criou uma definição para a DI enfatizando, além do grau do quociente de inteligência (QI) que mede o funcionamento intelectual, a capacidade de adaptação do indivíduo, referindo-se à inteligência prática (Grossman, 1983; Jacobson e Mulick, 1996; Luckasson *et al.*, 2002; Schalock *et al.*, 2010). Desta forma, a DI foi definida como uma incapacidade caracterizada por limitações significativas tanto no funcionamento intelectual quanto no comportamento adaptativo, que é expressa em habilidades conceituais, sociais e práticas e que se origina antes dos 18 anos de idade (Luckasson *et al.*, 2002).

Para que se possa avaliar as pessoas quanto ao funcionamento intelectual, deve-se levar em conta a diversidade cultural dos envolvidos e as diferenças em seus padrões de comunicação e comportamento. Os déficits no funcionamento adaptativo de um indivíduo se manifestam no contexto de ambientes comunitários típicos de sua faixa etária, e

dependem do grau de necessidades de apoio para realizar determinadas tarefas comuns. De acordo com Grossman (1983), o comportamento adaptativo é dividido em 8 áreas, e pelo menos 2 delas devem ser deficitárias em uma pessoa com deficiência intelectual: comunicação, cuidados pessoais, habilidades sociais, utilização de recursos comunitários, autonomia, saúde e segurança, habilidades acadêmicas e trabalho e lazer.

O termo atraso global do desenvolvimento (neuro)psicomotor é usado especificamente para crianças pequenas, menores de 5 anos de idade, nas quais a distinção entre um problema motor e um transtorno psiquiátrico e a caracterização mais ampla de deficiências do desenvolvimento, nem sempre pode ser realizada (Ritney, 2003; Shevell *et al.*, 2003). Na literatura, podemos encontrar muitas variações da definição de DI, mas a maioria delas classifica este sinal neurológico em 4 graus de gravidade (leve, moderado, grave e profundo) com base no QI (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação da deficiência intelectual de acordo com o quociente de inteligência.

Nível da DI	CID-10	AAMR	APA	
Leve	QI: 50–69 IM: 9-11 anos	QI: 50–55 a 70–75	QI: 55–70	+ pelo menos dois déficits adaptativos
Médio ou Moderado	QI: 35–49 IM: 6-8 anos	QI: 35–40 a 50–55	QI: 35–54	
Grave ou Severo	QI: 20–34 IM: 3-5 anos	QI: 20–25 a 35–40	QI: 20–34	+ Déficits em todas as oito categorias
Profundo	QI: < 20 IM: < 3 anos	QI: < 20–25	QI: < 20	

DI: Deficiência intelectual. QI: quociente de inteligência. IM: Idade mental de um adulto. CID-10: Classificação Internacional de Doenças para a DI de acordo com a Organização Mundial da Saúde. AAMR: *American Association on Mental Retardation/Deficiency*. APA: *American Psychological Association* (APA, 2000).

O QI pode ser medido por uma variedade de testes de inteligência que utilizam uma série de comunicação verbal e não-verbal. Eles geram um resultado normalizado obedecendo a uma distribuição Gaussiana cuja média é 100 e o desvio padrão é 15. O erro na medição do QI gira em torno de 5 pontos. Por definição, o QI é anormalmente baixo quando seus valores são inferiores a 70 (ou entre 70 e 75, tendo em conta o erro de medição) (Bartholomew, 2004). Matematicamente, esta definição sugere que cerca 1 a 3% da população mundial apresenta algum grau de déficit intelectual (Leonard e Wen, 2002; Battaglia e Carey, 2003; Kabra e Gulati, 2003).

A DI leve é muitas vezes diagnosticada tardiamente ou nem sequer é diagnosticada, já que na maioria das vezes ela se apresenta de forma não-sindrômica ou associada a

elementos dismórficos menores, que passam despercebidos durante uma avaliação médica. Ela é caracterizada por dificuldades de aprendizagem que não são muito graves. Muitos adultos com este sinal são propensos a trabalhar e adquirir boa autonomia pessoal e independência social (Schalock *et al.*, 2010).

A DI moderada está associada com dificuldades significativas de aprendizagem. Ela se caracteriza pela aquisição de competências simples, permitindo a comunicação social, um certo grau de auto-suficiência e uma vida semi-independente. As noções básicas de leitura e escrita são raramente adquiridas. Já a DI grave é acompanhada por uma completa dependência para a realização das tarefas e ações cotidianas. Enquanto que a DI profunda é caracterizada por uma redução severa do potencial de comunicação e de mobilidade (Schalock *et al.*, 2010).

Estudos com grupos de crianças norueguesas, finlandesas e norte-americanas mostraram que a prevalência de DI entre as crianças em idade escolar varia entre 1 e 2% (Stromme, 2000; Heikura *et al.*, 2003; Bhasin *et al.*, 2006). Há, ainda, uma estimativa de que 1% da população adulta apresenta algum grau de DI e geralmente os homens são mais afetados do que as mulheres (relação 3:2), fato atribuído à grande quantidade de mutações gênicas que podem ocorrer no cromossomo X, para o qual os homens são hemizigóticos (Patterson e Zoghbi, 2003).

1.2. Etiologia

As causas da DI são múltiplas e altamente heterogêneas, podendo ser genéticas ou não genéticas. Até 2005, estimou-se que 25% dos casos de DI eram de ordem genética, 25% de origem ambiental (adquirida) e 50% de causa desconhecida ou multifatorial (Rauch *et al.*, 2006). Em geral, metade dos pacientes que procuram ajuda médica não conseguem um diagnóstico, especialmente quando o atraso é leve e não há outros sinais associados (Xu e Chen, 2003).

As causas não genéticas envolvem eventos pré, peri e pós-natais, como a privação de oxigênio, prematuridade, traumatismo obstétrico, infecções, influências de teratógenos, transtornos endócrinos maternos, hipóxia intra-uterina, desnutrição materna, intoxicações maternas, alterações vasculares ou degenerativas encefálicas, traumatismos crânio-encefálico, intoxicação por chumbo, fenilcetonúria, erros inatos do metabolismo e desnutrição infantil (Yeargin-Allsopp *et al.*, 1997; Toscano e Guilarte, 2005).

Entre as causas genéticas estão envolvidas: desordens cromossômicas, como as aneuploidias, rearranjos cromossômicos terminais, rearranjos em regiões relacionadas com síndromes de microdeleção e microduplicação e outros rearranjos intersticiais; desordens complexas, causadas por mutações em vários genes e distúrbios monogênicos (Moeschler e Shevell, 2006; Kriek, 2007). Atualmente, um teste genético que vem sendo bastante difundido para a investigação de pacientes portadores desta deficiência é o CMA (*Chromosomal Microarray*).

Aproximadamente 15% da DI é atribuída a anomalias citogeneticamente visíveis, com, pelo menos, dois terços destes casos explicados por trissomias do cromossomo 21 (Leonard e Wen, 2002; Rauch *et al.*, 2006). Além disso, uma série de revisões recentes tem mostrado o crescente número de variantes genômicas associadas com a DI, e que muitas vezes têm levado à designação de novas síndromes clínicas (Morrow, 2010; Vissers *et al.*, 2010; Cooper *et al.*, 2011; Kaminsky *et al.*, 2011).

Atualmente, estima-se que cerca de 17,4 a 47,1% dos casos de DI são devido à presença de variações no número de cópias (CNVs) submicroscópicas, sendo que as frequências variam dependendo das diferentes técnicas usadas para a análise (Das, 2013). O rendimento adicional que os diagnósticos providos pelas análises por microarray sobre aquelas fornecidas pelo cariótipo é de 15-20% (Zahir e Friedman, 2007; Hochstenbach *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010).

Além das CNVs, um número substancial de mutações pontuais já foram identificadas em genes isolados que desempenham um papel importante no desenvolvimento inicial, tais como mutações no gene *RAI1* (Slager *et al.*, 2003) que causam a Síndrome de Smith-Magenis, mutações no gene *CREBBP* responsáveis pela Síndrome de Rubinstein Taybi e a expansão CTG do gene *FMR1* que representa cerca de 1:4.000 a 1:6.000 casos de DI em homens, denominada Síndrome do X Frágil (Pieretti *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 1997; Coffee *et al.*, 2009).

A utilização das tecnologias mais recentes, que envolvem microarrays, tem ajudado a reduzir a dúvida quanto a origem da DI em favor das causas genômicas (Sagoo, *et al.*, 2009). As análises de exomas pelos métodos de sequenciamento de alto rendimento (*Next Generation Sequencing*) estão sendo, aos poucos, implementados no meio clínico e acadêmico e devem aumentar muito rapidamente nosso conhecimento sobre os genes envolvidos na DI inespecífica quando comparado às tecnologias envolvendo microarrays. Isso, porque ao utilizar as técnicas de sequenciamento, os laboratórios deverão fornecer mais rapidamente os diagnósticos, com mais informações específicas (gene a gene) e em

paralelo, auxiliar na relação entre genes específicos e fenótipos alterados (Teer e Mullikin, 2010; Ku *et al.*, 2011; Kuhlenbaumer *et al.*, 2011; Singleton, 2011; Topper *et al.*, 2011).

O principal objetivo de um diagnóstico etiológico é buscar, principalmente, uma causa tratável ou uma causa possivelmente recorrente que implique em um aconselhamento genético. E enquanto o sequenciamento de próxima geração não substitui o CMA, a utilização dos microarrays tem elevado a identificação de numerosas microdeleções ou microduplicações patogênicas de segmentos cromossômicos que anteriormente escapavam da detecção por microscopia óptica e que agora, vem sendo comprovadamente causais da DI.

1.3. Investigações Genéticas

1.3.1. Cariótipo convencional

Desde a implantação das metodologias de bandamento cromossômico foi possível realizar com mais precisão o reconhecimento individual de cada par de homólogos (Caspersson *et al.*, 1970). Para o uso de rotina, em um ambiente clínico, a técnica de bandamento G, que se baseia na aplicação de tripsina em lâminas contendo metafases seguida de coloração por Giemsa, tornou-se o método mais aceito em todo o mundo, permitindo a detecção de diversas aberrações estruturais, como translocações, inversões, deleções e duplicações, além de aberrações numéricas (Smeets, 2004).

Apesar do aperfeiçoamento das metodologias de bandamento, a resolução dos estudos cromossômicos, pela cariotipagem, é de baixa sensibilidade já que atinge uma resolução de aproximadamente 450-550 bandas por genoma. A banda cromossômica representa de 5 a 10 megabases (MB) de DNA e contém, em média, cinquenta genes (Trask, 2002).

Yunis (1976) desenvolveu o bandamento de alta resolução que aumentou o poder de resolução do cariótipo para cerca de 1000 bandas por genoma, facilitando a detecção de alterações que ainda não haviam sido observadas. Ainda assim, muitas vezes não é possível detectar, a nível citogenético, inúmeras aberrações cromossômicas mesmo em pacientes que apresentam sinais clínicos de determinadas síndromes conhecidas (Smeets, 2004).

Com exceção da trissomia do 21 (que sozinha explica cerca de 10% de todos os casos de DI), o rendimento de diagnóstico do cariótipo normal é baixo, com cerca de 4% de resultados positivos (van Karnebeek *et al.*, 2005), onde aproximadamente 1% são

anomalias numéricas (na maioria das vezes trissomias nos cromossomos sexuais) e 3% são anomalias estruturais (como as síndromes de Cri-du-Chat, Wolf-Hirschhorn, Jacobsen e algumas translocações) (Regier *et al.*, 2010). Principalmente por este motivo, o cariótipo convencional vem sendo cada vez mais complementado por outras metodologias moleculares de maior resolução.

1.3.2. Citogenética Molecular: *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH)

A partir da segunda metade da década de 1980 surgiu uma técnica locus-específica que permitiu a identificação de pequenos rearranjos genômicos tanto em cromossomos metafásicos quanto em interfásicos, denominada FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) (Landegent *et al.*, 1986; Pinkel *et al.*, 1986; Lichter *et al.*, 1988). Ela é baseada na utilização de sondas específicas que são sintetizadas a partir de cromossomos artificiais bacterianos (BACs, *Bacterial Artificial Chromosome*) de aproximadamente 200 kilobases (kb), cromossomos artificiais P1 (PACs, *P1-Derived Artificial Chromosome*), clones de cosmídeos ou fosmídeos, ou a partir de produtos de PCR. A resolução depende do tamanho da sonda (> 50 kb - 2 Mb), mas é cerca de 20 a 40 vezes superior à do cariótipo convencional (Wiegant *et al.*, 1992).

A técnica de FISH não permite uma análise detalhada de todo o genoma, já que as triagens somente são realizadas de acordo com uma suspeita clínica de determinada síndrome conhecida (como as síndromes de DiGeorge, Williams e Smith-Magenis). Desta forma, muitos rearranjos genômicos desconhecidos que levam a um fenótipo alterado não podem ser detectados por esta metodologia, embora às vezes possam ser investigados alguns loci específicos quando há um fenótipo impreciso (como por exemplo, as deleções em 22q13 e 16p11.2 e a duplicação em 15q11 em casos de DI associadas a autismo) (Guerra, 2004).

Em 1996, foi desenvolvido um conjunto completo de sondas teloméricas (Ning *et al.*, 1996), e nos anos seguintes a utilização de FISH para a investigação telomérica tornou-se amplamente aceita como uma ferramenta clinicamente útil para identificar deleções e translocações envolvendo as extremidades dos braços dos cromossomos, que contêm genes únicos e muitos, quando alterados, causadores da DI (Knight *et al.*, 1997).

Nos pacientes que apresentam um cariótipo normal, o estudo dessas regiões identifica em média, cerca de 2,5 a 5% de anomalias e quase sempre envolvidas com fenótipos de DI (de Vries *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2005; Ravnán *et al.*, 2006). No entanto

esse trabalho é fastidioso e relativamente caro, já que é necessário a compra ou fabricação de sondas específicas e por isso, muito frequentemente vem sendo substituído por técnicas de biologia molecular quantitativa que também tem poder de resolução suficientes para detectar pequenas alterações, como a *multiplex ligation-dependant probe amplification* (MLPA) ou a *quantitative fluorescence polymerase chain reaction* (QF-PCR), que são mais práticas e mais baratas. Mas é importante lembrar que principalmente pelas técnicas de citogenética convencional e FISH é possível identificar um rearranjo equilibrado (como uma translocação ou inversão).

1.3.3. Citogenética Molecular: *Multiplex Ligation-Dependant Probe Amplification* (MLPA)

A técnica MLPA, trata-se de uma metodologia relativamente simples e robusta, semelhante à PCR multiplex, capaz de detectar alterações cromossômicas no número de cópias de DNA em múltiplos alvos (Schouten *et al.*, 2002). Estas alterações são identificadas através de sondas oligo-nucleotídicas muito pequenas. Esta metodologia permite a quantificação relativa do número de cópias de aproximadamente 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações pontuais conhecidas (Redeker *et al.*, 2008).

A quantificação é feita por cromatografia em sequenciador capilar e o método se presta a análise por séries. Os *kits* comercializados são usados para encontrar microalterações para um conjunto de loci sub-teloméricos e alguns loci intersticiais que incluem as microdeleções e microduplicações mais comuns dentre as conhecidas (Slater *et al.*, 2003; Rooms *et al.*, 2005).

Entre as vantagens do método estão o custo relativamente baixo, simplicidade, rapidez e sensibilidade, justificando a sua implantação em serviços direcionados para o estudo da etiologia de diversas doenças. Entretanto, as desvantagens do método incluem a incapacidade de detectar trissomias parciais ou em mosaico, desde que não sejam utilizadas sondas localizadas nos segmentos envolvidos nessas anomalias; não detecta anomalias estruturais equilibradas e exige DNA de qualidade superior ao que é requerido por outras técnicas moleculares, como por exemplo, a técnica de QF-PCR (Procter *et al.*, 2006).

1.3.4. Citogenética Molecular: *Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR)

A QF-PCR é um método que depende da disponibilidade de marcadores informativos da região de interesse e foi originalmente criado para facilitar a quantificação de RNAs, mas também pode ser utilizado para quantificar o número de cópias de uma sequência genômica, usando, para isso, uma combinação de PCR em tempo real e sondas fluorescentes (Adinolfi *et al.*, 1997; Zoua *et al.*, 2008).

A metodologia baseia-se na amplificação de sequências de DNA específicas de um cromossomo (STRs, *Short Tandem Repeat*, também conhecidos como marcadores genéticos) que são polimórficas no comprimento, entre os indivíduos. Por meio de *primers* fluorescentes, os segmentos amplificados pela PCR podem ser visualizados e quantificados como áreas de pico em *scanners* de DNA automatizados e o número de cópias de cada STR é indicativo do número de cópias do seguimento cromossômico (Pertl *et al.*, 1997).

QF-PCR fornece um diagnóstico rápido (em menos de 24 horas) de aneuploidias nos cromossomos analisados. Além disso, ela apresenta algumas vantagens sobre a FISH, como por exemplo, pode ser realizada com um menor número de células, e uma vez que a análise pode ser facilmente automatizada, muitas amostras podem ser processadas ao mesmo tempo, sendo que todo o processo leva em torno de 30 minutos (Cirigliano *et al.*, 2001; Hultén *et al.*, 2003).

Por se tratar de uma metodologia mais rápida e mais barata do que FISH e cariótipo com bandamento G, a QF-PCR foi proposta como uma investigação complementar ou mesmo como uma alternativa a aquelas, principalmente no diagnóstico pré-natal (Grimshaw *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2004).

1.3.5. Citogenética Molecular: *Chromosomal Microarrays* (CMA)

A busca por rearranjos genômicos usando técnicas de hibridação genômica sobre um suporte sólido, surgiu no final dos anos 1990 e alcançou um extraordinário desenvolvimento a partir de 2005 (Miller *et al.*, 2010). A hibridação genômica comparativa por microarrays de DNA (aCGH) é baseada em um princípio simples: o DNA de um paciente e de um controle são fragmentados e marcados por dois fluorocromos distintos, em seguida são cruzados com sondas de sequências de DNA normais depositados sobre uma lâmina de vidro e por fim, há a medição da emissão dos sinais, utilizando-se de um

scanner e a razão das intensidades de fluorescência dos dois fluorocromos, após hibridados, são os responsáveis pela detecção das deleções e/ou duplicações no genoma do paciente. O poder desta técnica se deve à sua capacidade de analisar um grande número de loci em paralelo (de Ravel *et al.*, 2007; Vermeesch *et al.*, 2007; Edelmann e Hirschhorn, 2009; Alkan *et al.*, 2011).

Inicialmente as sondas eram construídas utilizando-se BACs, idênticos aos utilizados para FISH. Os microarrays de DNA desenhados com a ajuda de BACs têm em média de 3.000 a 6.000 sondas. Cerca de milhares de clones de BACs mapeados e representativos do genoma são imobilizados em uma lâmina de vidro e são utilizados como a fase sólida (*chip*) para a hibridação (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Veltman, 2006).

Atualmente, a resolução desta metodologia específica é considerada baixa, mas ainda assim, é cerca de 100 vezes maior do que a do cariótipo convencional. A diferença média de distância entre duas sondas no genoma é de 0,5 a 1 MB, podendo variar consideravelmente, dependendo da região do genoma investigada (Pinkel *et al.*, 1998).

Em pouco tempo estes microarrays foram substituídos por microarrays de oligonucleotídeos que são comercialmente fabricados por fotolitografia, e consistem de 45 a 85 sondas de oligonucleotídeos permitindo uma maior cobertura de regiões genômicas, ou seja, maior resolução de análise. Os primeiros arrays propostos continham de 44.000 a 72.000 oligonucleotídeos (Miller *et al.*, 2008), e atualmente alguns arrays comercializados, ultrapassam 2 milhões de sonda, o que corresponde a uma resolução de cerca de 10 a 100 kb (100 a 1000 vezes maior do que a do cariótipo convencional).

A grande vantagem do aCGH é poder detectar simultaneamente, em um único ensaio, aneuploidias, deleções e duplicações de qualquer locus coberto pelas sondas, incluindo zonas intersticiais que não são cobertas por outros métodos alvo-dirigidos como FISH ou MLPA. Entretanto, a configuração estrutural de uma aberração cromossômica não pode ser detectada, limitando a técnica ao diagnóstico de microdeleções e microduplicações genômicas. Ainda assim, o método tem sido amplamente utilizado tanto para investigar pacientes com alterações cromossômicas aparentemente equilibradas (analisados por cariótipo convencional), mas com fenótipos anormais, quanto para o rastreamento ao longo do genoma de defeitos cromossômicos que podem representar a evidência inicial para a identificação de um ou mais genes associados a doenças genéticas (Vissers *et al.*, 2003).

Embora diferentes na sua concepção, os arrays de polimorfismos de um único nucleótido (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*), usam o mesmo princípio geral de

hibridação massiva de fragmentos de DNA humanos na forma de oligonucleotídeos depositados sobre uma lâmina de vidro. Enquanto no aCGH, dois DNAs são marcadas com corantes fluorescentes de cores diferentes e co-hibridados a um único array para obter uma comparação direta do número de cópias entre um teste e uma amostra de DNA controle, no SNP-array, apenas um único DNA teste é marcado e hibridado com o array genômico (Hoyer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Bruno *et al.*, 2009; McMullan *et al.*, 2009).

Os SNPs representam a mais importante fonte de variabilidade no genoma, sendo que 1 nucleotídeo a cada 400 é objeto de um polimorfismo. Eles são mutações pontuais que ocorrem natural e estatisticamente no curso da evolução e ocorrem com uma frequência alélica de aproximadamente 1% em uma dada população. Mais de 15 milhões de SNPs estão espalhados por todo o genoma humano (Botstein e Risch, 2003).

Para cada SNP, há um conjunto de sondas que identificam quatro variantes possíveis (A, C, T e G) da sequência contendo o SNP, o que permite a genotipagem. Os *chips* comumente utilizados, hibridados com os fragmentos de DNA de um paciente, permitem a genotipagem paralela de 10.000 a mais de 1 milhão de SNPs (Bernardini *et al.*, 2010).

Os softwares de análises bioestatísticas permitem deduzir o número de cópias de cada sequência em torno de um SNP a partir do perfil de hibridação, e, assim, pode também identificar microdeleções ou microduplicações. Além de tudo, essa metodologia permite ainda a identificação de disomias uniparentais e grandes regiões de homozigosidade ou regiões de perda de heterozigose (McCarroll *et al.*, 2006; Bacolod *et al.*, 2009).

Os dois métodos descritos acima, têm demonstrado a importância que as variações quantitativas têm no genoma, o que possibilitou, inclusive, a descoberta de que existem dezenas de segmentos deletados ou duplicados no genoma de todas as pessoas fenotipicamente normais (Iafrate *et al.*, 2004; Redon *et al.*, 2006). Estas variantes de tamanhos diversos, são chamadas de variações no número de cópias (CNVs) quando seu tamanho é superior a 1 kb (podendo exceder os 5 Mb) e *indels* (inserção/deleção) quando seu tamanho é menor (Gijssbers *et al.*, 2009).

As técnicas de aCGH e SNP-array ainda não atingiram a sua maturidade. Não há um consenso (internacional) sobre qual plataforma proporciona o melhor equilíbrio entre a densidade de sondas, a cobertura do genoma, e a menor complexidade das análises (Alkan *et al.*, 2011). E apesar disso, o poder de diagnóstico fornecidos por estas tecnologias tem sido impressionante (Stankiewicz e Beaudet, 2007; Zahir e Friedman, 2007).

Atualmente existem tecnologias que combinam os poderes das duas técnicas, como é o caso da plataforma CytoScan™ HD Array (*Affymetrix*, USA), que concilia o alto poder de resolução para detectar CNVs, dos microarrays de oligonucleotídeos, com a sensibilidade da detecção de consanguinidade, dissomia uniparental e uma maior sensibilidade para detectar baixos níveis de aneuploidias em mosaico, dos SNP-arrays, apresentando, ainda, uma das maiores resoluções do mercado atual.

Muitas equipes de pesquisadores, incluindo um consórcio internacional de citogeneticistas, o ISCA (*The International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium* - <https://www.iscaconsortium.org>), recomendaram abandonar o cariótipo convencional e realizar a investigação inicial de pacientes com DI, autismo ou malformações, com as tecnologias do CMA. O cariótipo deve ser usado apenas para suspeitas de síndromes conhecidas (como a síndrome de Down) e o FISH apenas para validar os achados verificados nos *chips* de DNA (Gijsbers *et al.*, 2009; Koolen *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010; Vissers *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Wincent *et al.*, 2011).

As translocações aparentemente equilibradas (que, estritamente falando, não implicam em uma perda de material cromossômico) não são detectáveis pelas tecnologias do CMA, sendo esta a sua principal desvantagem. Entretanto, quase metade das translocações aparentemente equilibradas são acompanhadas por um rearranjo detectável por testes de microarrays e além disso, há estimativas de que as translocações equilibradas são identificadas em apenas 0,3% a 0,7% dos pacientes com DI, testados por análises cariotípicas (Hochstenbach *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010; Dermody *et al.*, 2012).

1.3.6. Variação no Número de Cópias (CNVs)

No primeiro estudo mais abrangente sobre CNVs, estimou-se que cerca de 12% de todo o genoma humano é composto por CNVs que não causam prejuízos fenotípicos (Redon *et al.*, 2006). Achados como este, impõe um grande desafio investigativo aos pesquisadores para determinar se uma CNV está ou não relacionada com determinado fenótipo.

McCarroll *et al.* (2006) demonstraram que variações nos genomas dos indivíduos resultam em diferenças no nível de expressão dos genes envolvidos, o que indica que as variantes presentes em indivíduos saudáveis, possivelmente estão relacionadas com a adaptação. Por outro lado, a maioria das alterações encontradas estão localizadas em regiões pobres ou ausentes de genes e podem, portanto, serem neutras ou ter efeitos

reguladores modestos, devido à presença de regiões altamente conservadas (Conrad *et al.*, 2006).

Desta forma, as CNVs que são encontradas em grandes grupos controle (populações não afetadas), e que, por este motivo, não parecem estar associadas a nenhum quadro clínico, devem ser classificadas como CNVs neutras (Gijbers *et al.*, 2009). A ausência de genes em uma CNV não permite necessariamente classificá-la como neutra, já que na região afetada pode conter sequências reguladoras essenciais para a expressão de genes vizinhos.

O percentual de variantes genômicas detectadas varia consideravelmente entre os diferentes estudos. Isto se deve aos diferentes critérios para a seleção dos pacientes, as diferentes técnicas utilizadas e, nos pequenos grupos de pacientes, por fatores estocásticos. Aparentemente, o número de CNVs detectadas cresce de acordo com o aumento da complexidade e da gravidade dos problemas clínicos dos indivíduos investigados (Kriek *et al.*, 2006).

A patogenicidade de algumas CNVs é muitas vezes difícil de interpretar, devido à expressão variável do alelo remanescente e à incompleta penetrância que podem causar consequências clínicas em diferentes membros da família (Ensenauer *et al.* 2003; Yobb *et al.*, 2005). Exemplificando esta afirmação, uma duplicação de 1,5 Mb na banda cromossômica 16p13.1 foi detectada em quatro pacientes com autismo grave do sexo masculino. A mesma duplicação também foi observada em membros da família menos afetados e até mesmo em membros não afetados (Ullmann *et al.*, 2007).

Existem algumas iniciativas que criaram plataformas para coletar e comparar dados citogenéticos moleculares de diversos centros clínicos de genética espalhados pelo mundo, que estão ajudando a gerar uma melhor compreensão sobre o papel das CNVs na DI e em outros distúrbios genéticos. Um deles é o *Database of Genomic Variation* (DGV - <http://projects.tcag.ca/variation/>) que é um dos bancos de dados genômicos que apresentam maior número de depósitos de CNVs oriundas de diversos grupos de estudos. Já o banco de dados DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* - <https://decipher.sanger.ac.uk/application/>) compila dados sobre micro-alterações patogênicas (Firth *et al.*, 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste estudo foi identificar alterações genômicas submicroscópicas, utilizando uma plataforma de análise cromossômica em microarranjos, em uma coorte retrospectiva de pacientes com deficiência intelectual, referenciados por médicos da rede pública de saúde do Estado de Goiás.

2.2. Objetivos Específicos

- Classificar as CNVs encontradas quanto à patogenicidade;
- Estabelecer as CNVs potencialmente associadas à deficiência intelectual na coorte estudada;
- Determinar a origem das CNVs observadas;
- Determinar a extensão física e o número de genes presentes em cada CNV;
- Relatar os genes que possam estar envolvidos em associação causal com o fenótipo dos pacientes, mediante análise de bancos de dados genômicos públicos.

3. Material e Métodos

3.1. Grupo Amostral

No período de Janeiro de 2010 a Março de 2012 foram realizados 995 exames de cariótipo convencional em pacientes de várias regiões do Estado de Goiás com diversas indicações clínicas, pelo Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana (*LaGene-SES/GO*).

Inicialmente foi realizado um levantamento de todos os pacientes examinados neste período e que apresentavam indicação clínica de DI sem causa definida, totalizando 305

pacientes. Destes, 85 casos foram esclarecidos pelo exame cariotípico com bandamento G; 97 casos foram inconclusivos devido ao baixo índice mitótico obtido, o que impossibilitou as análises cromossômicas em quantidade satisfatória para diagnosticar os pacientes; e 123 casos não puderam ser esclarecidos pelo exame citogenético convencional devido à baixa resolução desta metodologia empregada e, portanto, apresentaram notação cariotípica normal: 46, XY e 46, XX para pacientes do sexo masculino e feminino, respectivamente.

Dos 123 casos de DI não esclarecida listados após a análise do cariótipo, 3 foram excluídos deste estudo devido ao óbito dos pacientes. Em outros 44 casos, não foi possível entrar em contato com o paciente ou responsável, devido à mudança de endereço, de número de telefone ou por não atenderem às ligações. Por causa dos objetivos deste estudo, foram necessárias as coletas de material biológico tanto dos pacientes como de seus pais biológicos, e, por este critério, mais 39 casos foram excluídos, já que pelo menos um dos pais estava indisponível. Em 22 situações não houve interesse por parte de algum membro da família em participar deste estudo.

Os pais biológicos dos 15 pacientes restantes, aderiram ao nosso propósito e receberam informações sobre os objetivos deste estudo, assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e responderam individualmente à anamnese com respeito à história individual de cada família (Anexo 2), sendo abordadas questões sobre gestação, parto, antecedentes familiares, hábitos dos pais, escolaridade, entre outros. O fluxograma representado na Figura 1, resume a forma como foi obtido os 15 pacientes participantes deste estudo.

Desta forma, obtivemos um grupo amostral composto por 45 indivíduos, sendo 15 pacientes (6 meninos e 9 meninas) e 30 pais biológicos fenotipicamente normais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEP-PUC/GO), sob o protocolo nº 1721/2011.

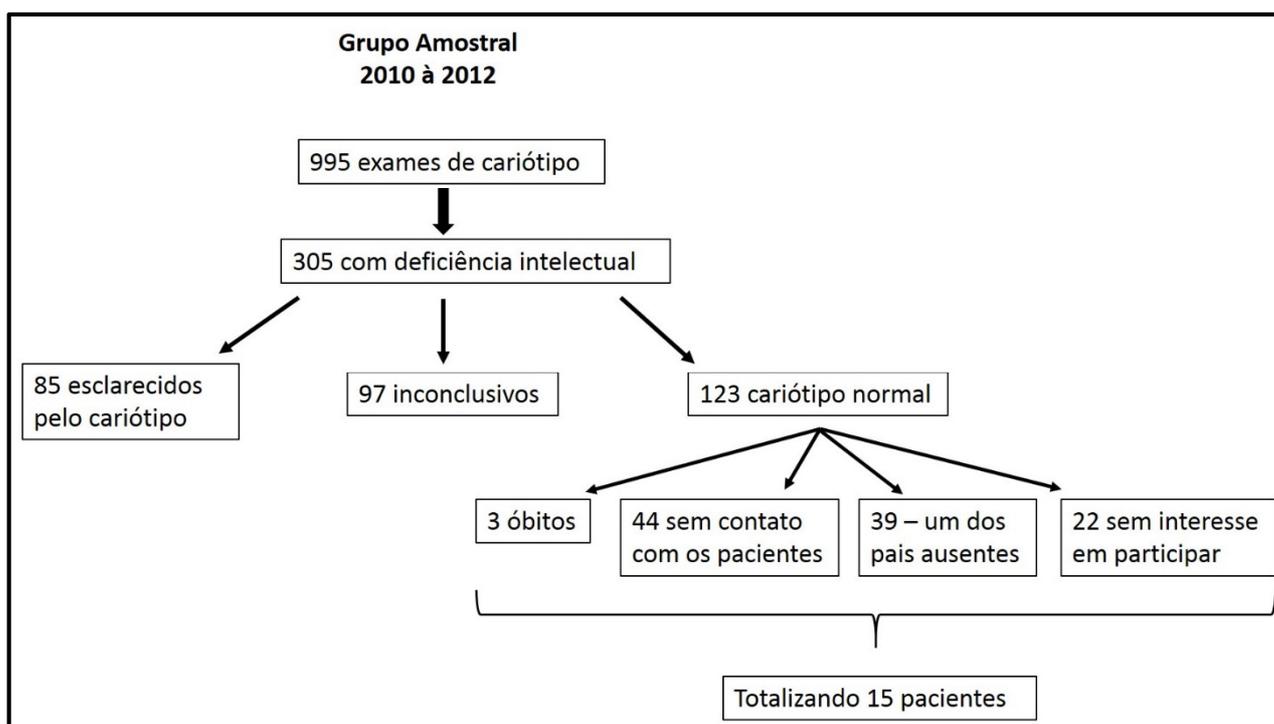


Figura 1: Fluxograma representativo do grupo amostral neste estudo.

3.2. Critérios de Inclusão

- Pacientes com indicação clínica de deficiência intelectual, associada ou não a outras alterações fenotípicas e que cujo cariótipo convencional não tenha fornecido um diagnóstico;
- A disponibilidade dos pais biológicos dos pacientes em participar do estudo, a fim de determinar a herança de possíveis CNVs herdadas;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes e/ou responsáveis.

3.3. Critérios de Exclusão

- Pacientes com diagnóstico já elucidado por citogenética convencional;
- Indisponibilidade de pelo menos um dos pais biológicos;
- Não concordância na assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.4. Pacientes

Segue uma breve descrição de cada paciente e histórico familiar:

Paciente 1, era uma menina de 10 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica pediatra, pois apresentava deficiência intelectual leve, acompanhado de baixa estatura e sem características dismórficas. Pesava 34,8 Kg e media 126,5 cm. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas. Durante a gestação a mãe apresentou diabetes gestacional.

Paciente 2, era um menino de 12 anos de idade, filho de pais primos em terceiro grau e normais, de cor de pele branca e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhado a participar deste estudo por uma médica pediatra, pois apresentava deficiência intelectual moderada, mas nenhuma característica dismórfica. Pesava 32,5 Kg e media 139,5 cm. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas. A mãe teve toxoplasmose e dois abortos anteriores.

Paciente 3, era um menino de 18 anos de idade, filho de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhado a participar deste estudo por um médico pediatra, pois apresentava deficiência intelectual e déficit de coordenação motora. Já sofreu convulsões e fazia acompanhamento psicológico. Pesava 82,6 Kg e media 177 cm. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas.

Paciente 4, era um menino de 3 anos de idade, filho de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que não frequentava a escola. Foi encaminhado a participar deste estudo por uma médica pediatra, pois apresentava atraso global no desenvolvimento, era ainda, hiperativo e não havia desenvolvido a fala. A suspeita médica era de síndrome de Down. Pesava 14 Kg e media 100 cm. Tinha um irmão de 12 anos de idade com déficit de atenção e uma prima materna de 10 anos com deficiência intelectual de etiologia desconhecida.

Paciente 5, era um menino de 9 anos de idade, filho de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele morena e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhado a participar deste estudo por um médico pediatra, pois apresentava deficiência intelectual

e face sindrômica. O médico suspeitava de síndrome de Down. Pesava 35 Kg e media 129 cm. Tinha um primo com deficiência intelectual.

Paciente 6, era uma menina de 12 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele morena e que frequentava uma escola para alunos com deficiências. Foi encaminhada a participar deste estudo por um médico pediatra, pois apresentava deficiência intelectual, acompanhada de atraso no desenvolvimento. Pesava 47 Kg e media 155 cm. Tinha dois primos paternos autistas e um primo materno com deficiência intelectual. Nasceu com o cordão umbilical enrolado no pescoço.

Paciente 7, era uma menina de 5 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que não frequentava a escola. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica pediatra, pois apresentava características sindrômicas e atraso global no desenvolvimento. Pesava 9,5 Kg e media 94,5 cm. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas.

Paciente 8, era uma mulher de 26 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que estudou até o ensino fundamental. Foi encaminhada a participar deste estudo por um médico neurologista, pois apresentava deficiência intelectual grave. Tinha dois tios e uma tia maternos com heredoataxia e os avós maternos eram primos de primeiro grau.

Paciente 9, era uma menina de 11 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele morena e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica neuropediatra, pois apresentava deficiência intelectual, características sindrômicas, múltiplos estigmas, atraso no desenvolvimento e autismo. Pesava 30 Kg e media 144 cm. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas.

Paciente 10, era uma menina de 10 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele morena e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica pediatra, pois apresentava deficiência intelectual, características sindrômicas e atraso no desenvolvimento. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas. Nasceu com o cordão umbilical enrolado no pescoço.

Paciente 11, era uma menina de 8 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que frequentava o ensino fundamental. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica neuropediatra, pois apresentava deficiência intelectual grave e distúrbios de comportamento. Iniciou a fala somente após os 4 anos de

idade. Pesava 33 Kg e media 126 cm. Tinha duas tias paternas que apresentavam deficiência intelectual. Nasceu com o cordão umbilical enrolado no pescoço.

Paciente 12, era um menino de 6 anos de idade, filho de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele parda e que frequentava o jardim de infância. Foi encaminhado a participar deste estudo por uma médica neuropediatra, pois apresentava deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento. Pesava 19 Kg e media 112 cm. Tinha dois primos paternos que apresentavam deficiência intelectual e um irmão com características síndrômicas.

Paciente 14, era um menino de 14 anos de idade, filho de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que frequentava o ensino médio. Foi encaminhado a participar deste estudo por uma médica neuropediatra, pois apresentava deficiência intelectual e múltiplas dismorfias. A suspeita médica era de síndrome de Dubowitz. O paciente apresentava um distúrbio de atividade elétrica cerebral, caracterizado pela presença de atividade lenta difusa. Pesava 19 Kg e media 112 cm. Tinha uma prima que apresentava síndrome de Tourett. Teve diversas complicações pós-parto, incluindo infecção hospitalar.

Paciente 15, era uma menina de 8 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que não era alfabetizada. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica neuropediatra, pois apresentava deficiência intelectual e diversas alterações dismórficas. Tinha uma prima materna que apresentavam deficiência intelectual. Sofreu de privação de oxigênio ao nascer.

Paciente 16, era uma menina de 5 anos de idade, filha de pais não consanguíneos e normais, de cor de pele branca e que frequentava o jardim de infância. Foi encaminhada a participar deste estudo por uma médica neuropediatra, pois apresentava atraso global do desenvolvimento neuropsicomotor. Não apresentava nenhum parente com deficiências físicas ou mentais ou com síndromes genéticas conhecidas.

3.5. Obtenção das Amostras Biológicas

Foram coletados, no Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 10 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos contendo *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) de cada participante e de seus pais biológicos. Após a coleta, foram realizadas extrações de DNA, utilizando o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, USA) (Anexo 3) ou o Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit

(*GE Healthcare Life Science*, USA) (Anexo 4) seguindo todas as instruções dos fabricantes.

3.6. Estudos Cromossômicos por Bandamento GTG

O primeiro passo laboratorial deste estudo, foi a realização do exame de cariótipo nos pacientes encaminhados pelos médicos assistentes da rede pública de saúde do Estado de Goiás. Para isso, foram realizadas culturas de linfócitos T do sangue periférico a curto prazo, conforme os protocolos convencionais para a obtenção de cromossomos metafásicos, para a avaliação cariotípica.

As amostras de sangue periférico foram cultivadas em meio de cultura *RPMI-1640* com L-glutamina (*Gibco® Life Science*, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco® Life Science*, USA), fitohemaglutinina (*Gibco® Life Science*, USA) e antibióticos por 48 horas. As culturas celulares foram bloqueadas pela adição de colcemid® (*Sigma-Aldrich®*, USA) a 16µg/mL, seguida pela hipotonização por KCl (*MERCK®*, Germany) a 0,075M e fixadas em solução álcool-ácida de Carnoy.

As amostras foram, então, gotejadas em lâminas limpas e desengorduradas sob temperatura de 60°C, secas à temperatura ambiente e envelhecidas por sete dias em câmara escura, também à temperatura ambiente, para a realização do bandamento GTG. Posteriormente, as lâminas contendo o material biológico foram tratadas em solução de tripsina (*Invitrogen™ Life Technologies*, USA) diluída em tampão PBS (*Invitrogen™ Life Technologies*, USA) a 0,25% e coradas em solução Giemsa (*Gibco® Life Science*, USA) a 4%.

Para cada paciente foram analisadas 20 metáfases, utilizando microscopia óptica *Axio Imager 2®* (*Carl Zeiss, Germany*) com platina motorizada, controlada pelo sistema de escaneamento de lâminas *Metafer4®* (*Metasystems*, USA). A análise cromossômica e o pareamento dos cromossomos foram realizados utilizando o software *IKAROS®* (*Metasystems*, USA). Após a análise, todas as amostras e lâminas foram arquivadas no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana (LaGene-SES/GO) localizado junto ao Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás/Departamento de Biologia.

3.7. CMA

Neste estudo, a plataforma escolhida para a identificação de variação estrutural no genoma dos pacientes selecionados com deficiência intelectual e de seus pais biológicos normais, a fim de determinar a origem das CNVs, foi a plataforma de alta densidade CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). A escolha foi devido a esta ser uma das tecnologias, do mercado atual, mais sensíveis na detecção de CNVs, sendo caracterizada por apresentar marcadores para mais de 2.600.000 CNVs genômicas, tendo, ainda, aproximadamente 750.000 sondas de SNPs, e cerca de 2.000.000 de sondas não polimórficas que cobrem amplamente o genoma humano, sendo encontrada 1 sonda a cada 25 kb.

Um diferencial desta plataforma, é que é possível analisar tanto número de cópias alelo-específicas quanto genótipos de SNPs. Além disso, ela confirma independentemente as variações no número de cópias com informações alélicas de SNPs. Tudo isso garante que essa tecnologia de microarray tenha uma das mais abrangentes e relevantes coberturas de genes constitucionais em um único array. Assim, há uma cobertura de 100% dos genes constitucionais do *The International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium* (ISCA- <https://www.iscaconsortium.org>), cobrindo ainda, cerca de 12.000 genes do OMIM® e mais de 36.000 genes do RefSeq (NCBI *Reference Sequence Database*).

Para a realização deste experimento, o DNA genômico (250ng) extraído dos pacientes e de seus respectivos pais biológicos mais um controle negativo e um controle positivo (fornecido), foi digerido pela enzima de restrição *NspI*, seguindo as recomendações do fabricante (Affymetrix, USA). Depois de digeridas, as amostras foram ligadas a adaptadores e em seguida, um *primer* universal que reconhece a sequência do adaptador ligado ao DNA genômico foi utilizado para amplificar as sequências obtidas por meio de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). As condições da PCR foram otimizadas para amplificar preferencialmente fragmentos de 150-2.000 pb de comprimento, que foram confirmados posteriormente em gel de agarose a 2% em TBE 1X.

Na sequência estes produtos foram purificados utilizando *Beads Magnéticas* e quantificados no espectrofotômetro *NanoVue Plus™* (GE Healthcare Life Science, USA). O passo seguinte foi a fragmentação das amostras purificadas em 50-200 pb, que em seguida foram confirmados em um gel de agarose a 4% em TBE 1X, a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1h.

Os fragmentos de DNA com 50-200 pb foram revelados pela coloração do gel em solução de brometo de etídeo (5mg/mL). Posteriormente, a imagem foi capturada utilizando o sistema de vídeo-documentação/ImageMaster® VDS – *Video-documentation System* (Pharmacia Biotech, USA).

Seguindo o protocolo, os fragmentos de DNA foram marcados por terminal *deoxynucleotidyl transferase* e então aplicados no *Affymetrix GeneChip®* e hibridados por 16-18 horas a 50°C e 60 rpm no *GeneChip® Hybridization Oven 645* (Affymetrix, USA). Os *chips* foram então, lavados e corados na *GeneChip® Fluidic Station 450* (Affymetrix, USA) e escaneados no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix, USA) operados pelo *Affymetrix GeneChip® Command Console* (AGCC, Versão 3.2.2).

A partir daí foram gerados arquivos “.CEL” que foram convertidos em “.CYCHP” para serem lidos e analisados no *Affymetrix® Chromosome Analysis Suite* (ChAS) 2.0 *Software*. Todo procedimento leva de 3 a 4 dias para ser concluído e foram realizadas 2 ou 3 famílias por reação (6 a 9 amostras). Uma esquematização das realizações de cada um dos passos descritos está representada na Figura 1.

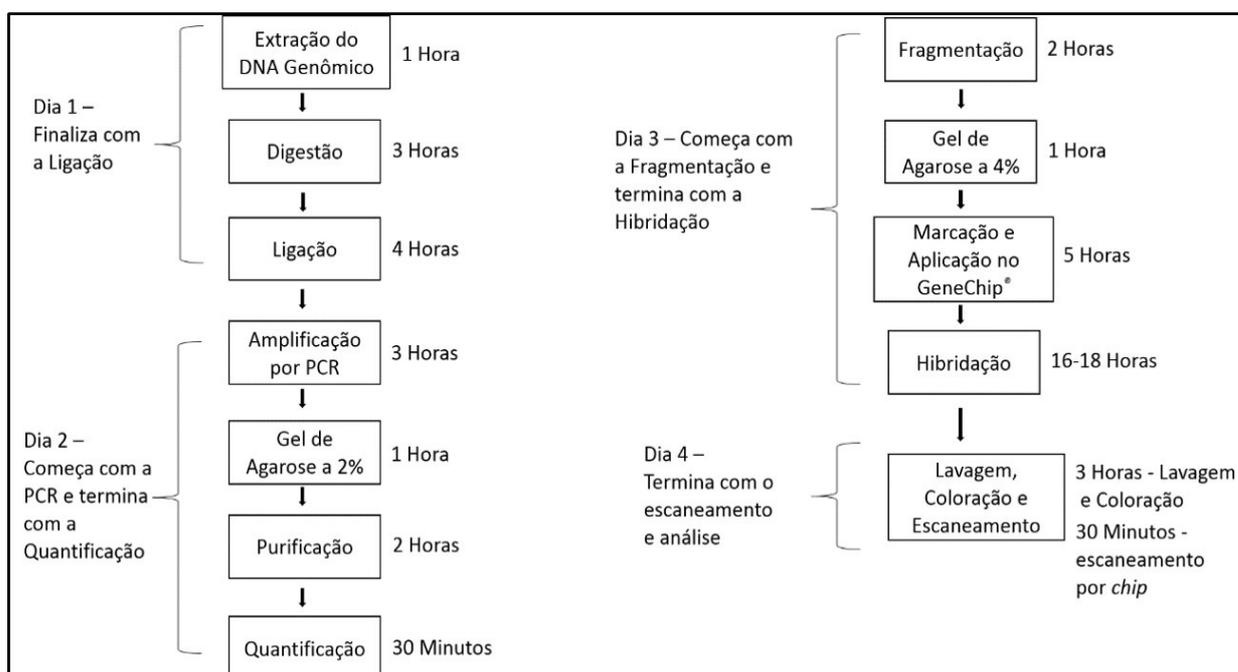


Figura 2: Fluxograma de trabalho. Protocolo da plataforma *Affymetrix® CytoScan™ HD* Array, com o tempo aproximado para a realização de cada passo.

3.8. Análise das CNVs

A análise dos dados gerados pela hibridação do genoma de todos os pacientes e de seus pais biológicos foi realizada com a utilização do *Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software*. Foram fixados como filtros: 50 marcadores e 100 kpb para detectar duplicações e 25 marcadores e 100 kpb para detectar deleções (inclusive em mosaico), seguindo sugestão do fabricante. Os dados genômicos só foram analisadas após terem passado pelos controles de qualidade do software.

Todas as alterações no número de cópias foram rigorosamente analisadas e os ruídos (alterações encontradas em regiões cobertas por menos de 75% de marcadores) foram descartados deste estudo. Além disso, as CNV encontradas em cada paciente foram comparadas com bancos de dados de grupos controle (*Database of Genomic Variants - DGV - <http://projects.tcag.ca/variation>* - e *CytoScan™ HD Array Database*, fornecido pelo *software ChAS*), bancos de dados de síndromes genéticas conhecidas (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources - DECIPHER - <https://decipher.sanger.ac.uk/application/>*) e com o genoma de seus pais biológicos. Elas foram classificadas como patogênicas, possivelmente patogênicas, neutras e de significado desconhecido, de acordo com o proposto por Miller *et al.* (2010). Informações como: tipo (deleção ou duplicação), extensão da CNV, número de cópias envolvidas, cromossomo e banda cromossômica, tamanho e número de marcadores e genes envolvidos nas alterações, foram coletadas.

4. Resultados

Dos 995 cariótipos realizados desde Janeiro de 2010 a Março de 2012, foram selecionados 305 casos (30,6%) em que os pacientes foram encaminhados para realizar o exame por suspeita de deficiência intelectual. Destes, 182 (59,7%) foram excluídos ou por terem sido satisfatoriamente diagnosticados pela metodologia de cariotipagem convencional, ou por não ter sido possível analisar um número suficiente de metáfases para gerar um diagnóstico, devido ao baixo índice mitótico obtido das culturas de sangue periférico. Os 123 casos restantes (40,3%) se enquadravam no critério inicial de inclusão proposto para este estudo, no entanto, somente 15 famílias (12,2%) estavam disponíveis e concordaram em participar.

Inicialmente a metodologia de cariotipagem convencional (> 550 bandas) com bandamento GTG, detectou cariótipos normais em todos os 15 pacientes participantes (46, XX ou 46, XY) (Figura 2). Os probandos apresentavam o fenótipo de deficiência intelectual e seus pais biológicos apresentavam um fenótipo normal e todos foram analisados pela mesma plataforma de CMA de alta resolução (*CytoScan™ HD Array*, *Affymetrix*, USA).

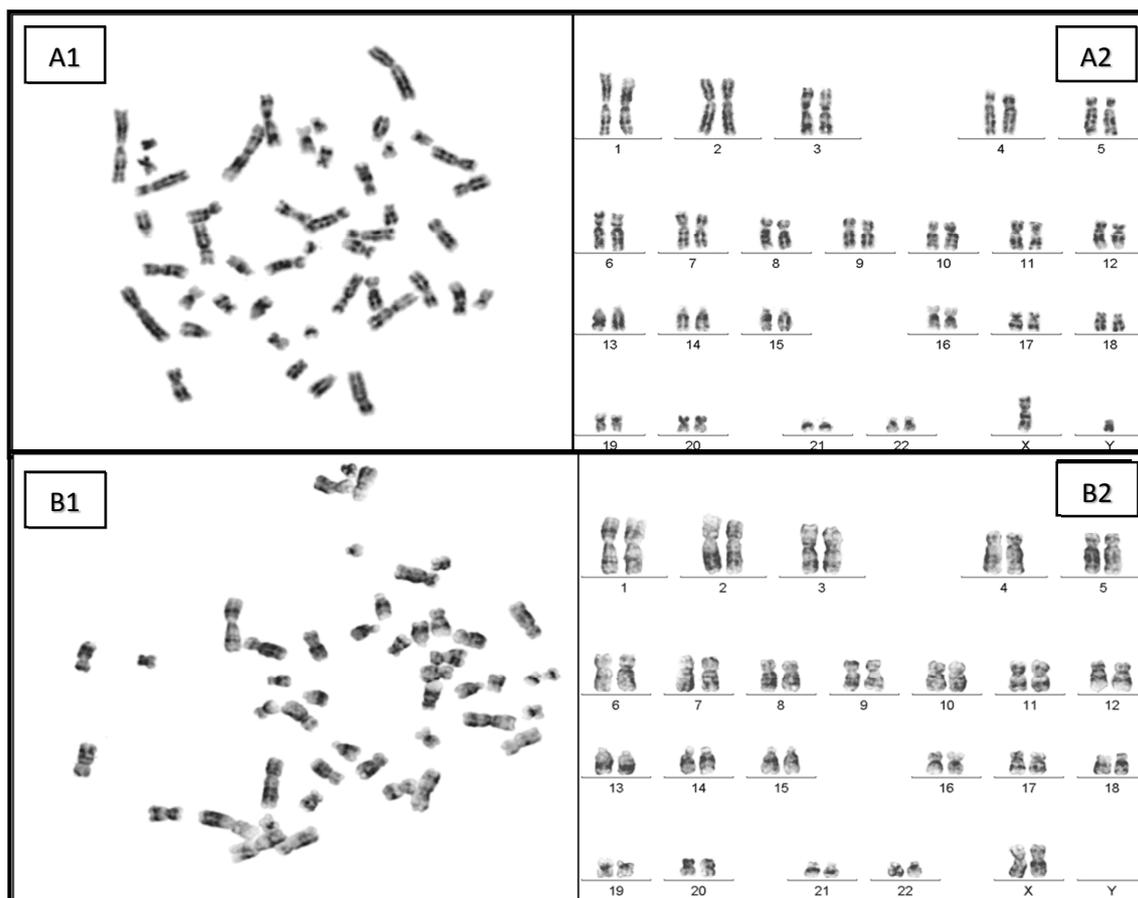


Figura 3: Metáfases e cariótipos convencionais com bandamento G de pacientes com indicação clínica de deficiência intelectual. Notação cariotípica normal. As imagens A1 e A2 correspondem, respectivamente, à metáfase e ao cariótipo de um paciente do sexo masculino (paciente 2), enquanto as imagens B1 e B2 correspondem à metáfase e ao cariótipo de uma paciente do sexo feminino (paciente 1).

O fenótipo facial de 14 dos 15 pacientes envolvidos neste estudo pode ser observado na Figura 3. A exceção é o paciente 5, para o qual não há o registro fotográfico. Todas as imagens, dos pacientes, incluídas neste estudo foram obtidas com o consentimento informado dos pais.



Figura 4: Fenótipo facial dos pacientes que apresentam deficiência intelectual envolvidos neste estudo. O número encontrado no canto superior esquerdo de cada foto, representa o número registrado do paciente.

Um total de 45 indivíduos tiveram seus genomas hibridizados no *Affymetrix™ GeneChip®* e os dados obtidos foram analisados no *Affymetrix™ Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software*. A análise detectou a presença de 33 variações no número de cópias em 10 (66,7%) dos 15 pacientes, sendo 19 microduplicações (57,6%) e 14 microdeleções (42,4%). Dezesete das 33 CNVs (51,5%) foram classificadas como neutras por terem se sobreposto, em mais de 90%, às CNVs observadas em bancos de dados de grupos controle normais.

Outras 7 CNVs (21,2%) foram consideradas patogênicas por envolver genes que tem relações importantes na formação e/ou manutenção do sistema nervoso central, sendo assim alterações de relevância clínica evidente, ou por se sobreporem a regiões conhecidas, envolvidas em síndromes já descritas e que tem como uma das características fenotípicas algum grau de DI e por não serem observadas em bancos de dados genômicos de grupos controle.

Cinco CNVs (15,15%) foram classificadas como potencialmente patogênicas já que não se sobrepuseram às regiões conhecidas de síndromes descritas, não foram relatadas em outros estudos, mas envolveram genes que participam de vias do neurodesenvolvimento, independentemente de terem ou não sido herdadas dos pais normais.

Por fim, quatro CNVs (12,12%) foram consideradas de significado incerto já que não se sobrepuseram às regiões de síndromes conhecidas e não envolveram genes com alguma influência evidente em vias de manutenção do sistema nervoso central ou em desordens neurológicas.

Utilizando os filtros de análise citados em Material e Métodos, uma média de 2,2 CNVs foram observadas por paciente, variando de nenhuma a 6 CNVs em um mesmo indivíduo, com tamanhos que variaram de 59.493 kpb (mosaico) a 102 kpb. A herança das alterações estruturais também foi analisada. Em 9 das 33 CNVs (27,3%) o desequilíbrio cromossômico estrutural não foi observado nos pais, e portanto, ocorreu *de novo*, enquanto que 24 foram herdadas de um ou de ambos os pais (72,7%).

Os principais resultados obtidos nesse estudo, como os dados das análises das CNVs identificadas pelo CMA, o número de sondas presentes em cada região cromossômica afetada, os principais genes envolvidos, a classificação e a origem das CNVs e as características clínicas de cada paciente estão listados na Tabela 2.

Resumidamente, destes 15 pacientes, 5 (casos 1, 5, 9, 10, e 16) não apresentaram alterações genômicas detectadas pela tecnologia do CMA de alta definição. Ganhos no cromossomo 1, foram observados apenas no caso 2, enquanto que perda neste cromossomo, foi observada apenas no caso 11. CNV presente no cromossomo 2 foi observada apenas no caso 8 e se tratou de um ganho.

No cromossomo 3 foi observada apenas uma alteração genômica, que ocorreu no caso 6. Somente um caso (3) apresentou uma microduplicação genômica envolvendo o cromossomo 7 e um caso (7) apresentou uma microdeleção envolvendo este mesmo cromossomo.

Dois casos (4 e 12) apresentaram uma microdeleção no cromossomo 8, entretanto em regiões distintas. O caso 4 apresentou as únicas alterações genômicas envolvendo o cromossomo 10 e o 12, observadas neste estudo.

O cromossomo 14, especificamente a banda 14q11.2, esteve envolvido com microdeleções herdadas e *de novo* em 6 pacientes (2, 4, 7, 12, 14 e 15), no entanto não havia a presença de genes nessa região e de acordo com os bancos de dados de populações não afetadas esta CNV é comum. Um ganho genômico no cromossomo 15 (caso 7) e uma perda genômica neste mesmo cromossomo (caso 15), também foram registrados.

A banda cromossômica 16p11.2 apresentou-se microduplicada em 3 pacientes (2, 4 e 12). Apenas uma CNV foi detectada no cromossomo 17 e ocorreu em mosaico, no paciente 2. Alterações no cromossomo 18, também aconteceram em mosaico e foram observadas apenas no caso 7. O paciente 11 foi o único a apresentar uma CNV no cromossomo 19.

Três casos envolveram alterações no cromossomo 22 (casos 2, 8 e 14). O cromossomo X apresentou CNVs em 4 pacientes (3, 6, 7 e 15). Considerando nossos 15 probandos, nenhuma CNV foi detectada nos cromossomos 4, 5, 6, 9, 11, 13, 20, 21 e Y.

Abaixo segue uma descrição especificando os achados em cada paciente:

Paciente 1

Este paciente não apresentou nenhuma CNV, detectável pela metodologia empregada neste estudo, em seu genoma.

Paciente 2

Este paciente apresentou 6 alterações no número de cópias genômicas. Duas microduplicações de herança maternas, ambas em 1q44, de 528 kpb e 336 kpb. Como os genes envolvidos não tem relação aparente com vias metabólicas do sistema nervoso central e as alterações observadas são em regiões não reportadas pelos bancos de dados do *CytoScanHD* e DGV, esta variação foi classificada como de significado incerto.

Uma microdeleção *de novo* em 14q11.2 de 528 kpb, que de acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas, por isso e por não haver genes envolvidos nessa região, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação de herança paterna em 16p11.2 de 267 kpb, que de acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por isso e por ser herdada do pai que apresenta um fenótipo normal, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação em mosaico (50% das células, de acordo com o software ChAS) *de novo* em 17p11.2 de 3.677 kpb (Figura 4), que envolveu 64 genes, sendo que muitos deles relacionados a síndromes que tem como uma das características, a deficiência intelectual, como a síndrome de Smith-Magenis, de Meckel e de Potocki-Lupski.

Uma busca pelo OMIM[®] *Phenotype Loci* mostrou que essa região duplicada se sobrepõe ao fenótipo de déficit de atenção e distúrbios de hiperatividade. De acordo com o banco de dados DECIPHER esta região se sobrepõe à síndrome de Potocki-Lupski (ou síndrome da microduplicação 17p11.2). Por este motivo, está CNV foi classificada como patogênica e a causa da DI observado no paciente. Não há casos semelhantes em bancos de dados de populações não afetadas.

Uma microduplicação de herança paterna em 22q11.1 de 350 kpb. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por isso e por ser herdado do pai que apresenta um fenótipo normal, esta variação foi classificada como neutra.

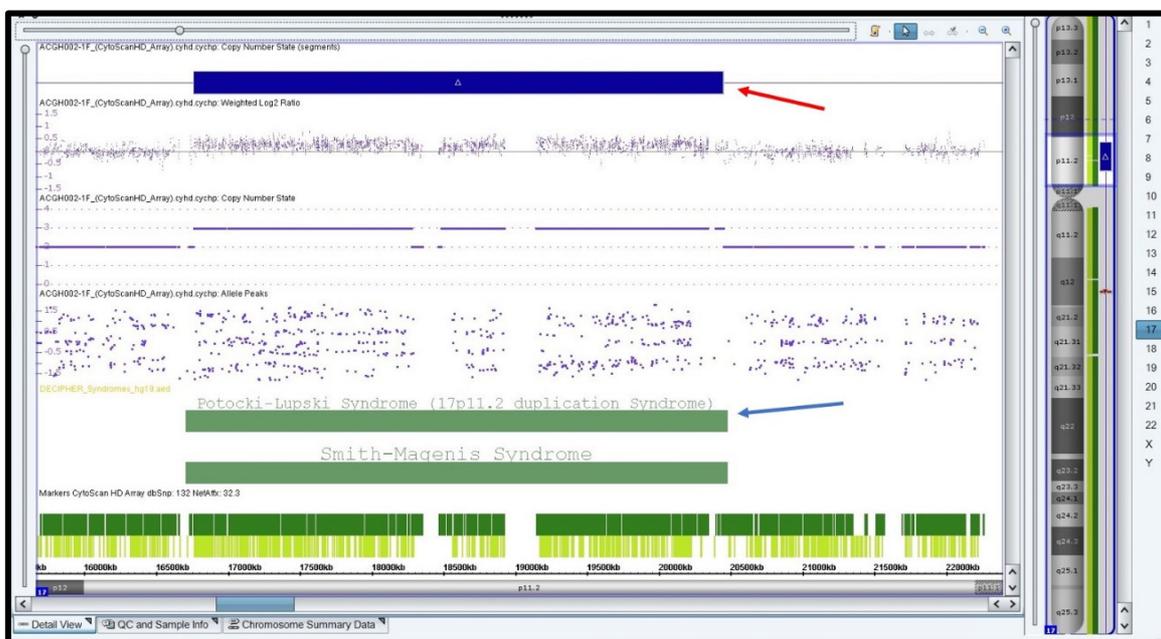


Figura 5: Imagem capturada do *software* ChAS (Affymetrix, USA), mostrando a microduplicação patogênica em mosaico (50%) *de novo* em 17p11.2 de 3.677 kpb (seta vermelha), observada no paciente 2. Esta duplicação se sobrepõe à síndrome de Potocki-Lupski de acordo com o DECIPHER (seta azul).

Paciente 3

Este paciente apresentou 2 alterações no número de cópias genômicas. Uma microduplicação de herança paterna em 7q31.32 de 669 kpb, que envolveu três genes, sendo que um tem papel importante no desenvolvimento (*CADPS2*). Por este motivo, e por ter sido herdado do pai fenotipicamente normal, esta variação foi classificada como potencialmente patogênica. Não há casos semelhantes em bancos de dados de populações não afetadas.

Uma microduplicação de herança materna em Xp22.33 de 147 kpb. Como esta alteração envolve apenas um gene (*CRLF2*) que não tem relação aparente com vias metabólicas do sistema nervoso central e as alterações observadas são em regiões não reportadas pelos bancos de dados *CytoScanHD* e DGV, esta variação foi classificada como de significado incerto.

Paciente 4

Este paciente apresentou 5 CNVs. Uma microdeleção herdada de ambos os pais em 8p11.22 de 139 kpb, envolvendo dois genes que não tem relação direta com vias metabólicas do sistema nervoso central ou com fenótipos de DI. E, além disso, de acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, essa deleção não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por todos estes motivos, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação de herança materna em 10q11.21 de 157 kpb, envolvendo um gene que não tem relação com vias metabólicas do sistema nervoso central ou com fenótipos de DI. Além disso, de acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Desta forma, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação *de novo* em 12q13.13 de 517 kpb, envolvendo 19 genes, sendo que um (*PDE1B*) está envolvido com o neurodesenvolvimento, mas não há relatos na literatura de seu envolvimento com o fenótipo de DI. O banco de dados ISCA mostra algumas relações de alterações de duplicação nesta região com atraso no desenvolvimento. Por estes motivos, esta variação foi classificada como potencialmente patogênica.

Uma microdeleção de herança materna em 14q11.2 de 208 kpb. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, essa deleção não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas, por isso, por não haver genes envolvidos nessa região e por ser herdada da mãe que é fenotipicamente normal, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação de herança paterna em 16p11.2 de 284 kpb e que envolve três genes que não tem relação com vias metabólicas do sistema nervoso central ou com fenótipos de DI. Além disso, de acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica já que é comum em populações não afetadas. Assim, esta variação foi classificada como neutra.

Paciente 5

Este paciente não apresentou nenhuma CNV, detectável pela metodologia empregada neste estudo, em seu genoma.

Paciente 6

Este paciente apresentou 2 alterações no número de cópias genômicas. Uma microduplicação herdada do pai em 3q12.2 de 102 kpb, e que envolveu dois genes que não tem relação aparente com vias metabólicas do sistema nervoso central ou com o fenótipo do paciente. Além disso, de acordo com os bancos de dados pesquisados, essa alteração não tem importância clínica já que é comum em populações não afetadas. Desta forma, esta CNV foi classificada como neutra.

Uma microdeleção *de novo* em Xq27.3 de 4.176 kpb (Figura 5), que envolveu 34 genes, sendo que muitos deles tem relação com o fenótipo de DI e desordens neurológicas. Não há casos semelhantes em populações não afetadas. Por este motivo, esta variação foi classificada como patogênica. De acordo com o OMIM® Phenotype Loci esta é uma região de susceptibilidade à dislexia.

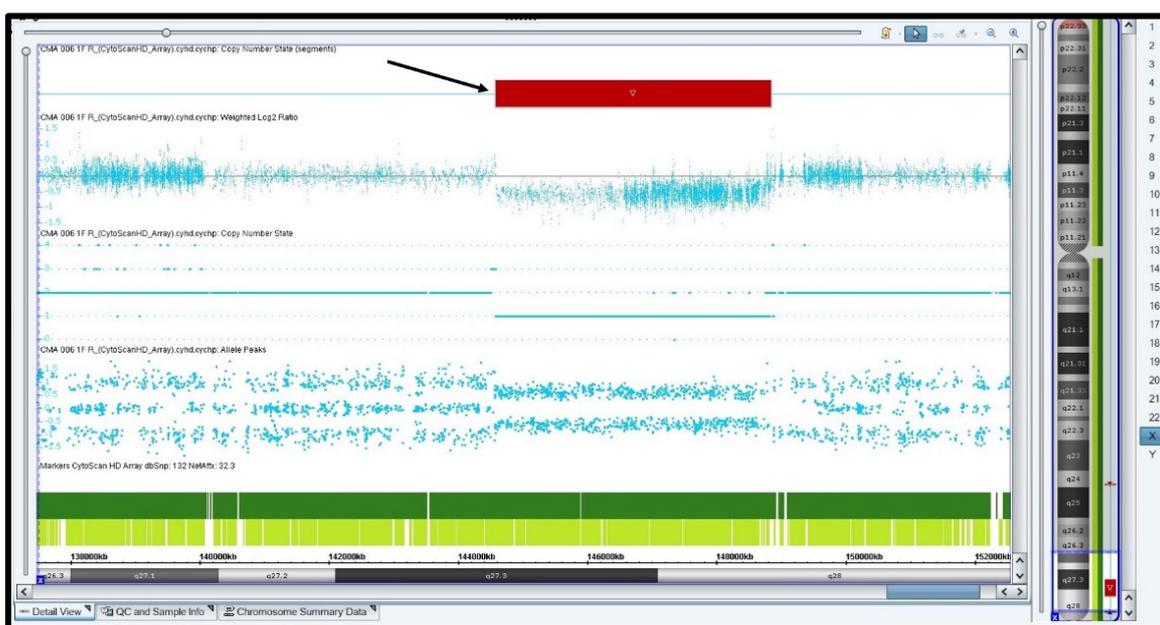


Figura 6: Imagem capturada do *software* ChAS (Affymetrix, USA), mostrando a microdeleção patogênica *de novo* em Xq27.3 de 4.176 kpb (seta), observada no paciente 6.

Paciente 7

Este paciente apresentou 6 alterações no número de cópias genômicas. Uma microdeleção de herança materna em 7q31.1 de 386 kpb, que envolveu um gene (*IMMP2L*) com papel importante em vias do desenvolvimento neurológico, estando relacionado a déficit de atenção, hiperatividade, síndrome de Tourette e autismo. De acordo com os bancos de dados DECIPHER e ISCA, alterações neste gene foram observadas em pacientes

com fenótipos de DI. Por este motivo, e apesar de ser herdado da mãe não afetada, esta variação foi classificada como patogênica. Não há casos semelhantes em populações não afetadas.

Uma microdeleção de herança materna em 14q11.2 de 308 kpb, que não envolveu genes. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa deleção não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por estes motivos, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação de herança paterna em 15q11.2 de 311 kpb, que envolveu 4 genes que têm relação com o desenvolvimento neural (*TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA1* e *NIPA2*). De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD*, essa alteração ocorre em populações não afetadas, além disso ela é herdada do pai que apresenta um fenótipo normal, mas pelo fato dos genes envolvidos apresentarem envolvimento em síndromes que envolvem DI, esta alteração foi classificada como potencialmente patogênica.

Uma microdeleção *de novo* em mosaico (30% das células, de acordo com o software ChAS) em 18p11.32 de 1.233 kpb (Figura 6), que envolveu 11 genes, incluindo *USP14* e *ADCYAP1* que estão relacionados às vias metabólicas do sistema nervoso central. Não há casos semelhantes em populações não afetadas e de acordo com o OMIM® *Phenotype Loci* esta região se sobrepõe a regiões que estão associadas à síndrome da deleção do cromossomo 18p, onde há o fenótipo de DI, e à região envolvida na DI autossômica recessiva em 18p11.3. Por ser uma alteração *de novo* e que envolveu genes que quando alterados contribuem para o fenótipo do paciente, esta variação foi classificada como patogênica.

Uma duplicação (trissomia) *de novo* do braço longo (q) do cromossomo 18 em mosaico (40% das células, de acordo com o software ChAS) de 59.405 kpb (Figura 6), envolvendo todos os 247 genes em 18q. Não há casos semelhantes em populações não afetadas. A trissomia total do cromossomo 18 leva à síndrome de Edwards que tem como característica a DI. Duplicações em 18q também tem relação com o fenótipo do paciente. Por todos estes motivos, esta variação foi classificada como patogênica.

Uma microduplicação *de novo* em Xp22.33-Xp21.23 de 25.685 kpb, que envolveu 147 genes, sendo que muitos deles quando alterados estão diretamente envolvidos com fenótipos de DI. Não há casos semelhantes em populações não afetadas. De acordo com o OMIM® *Phenotype Loci* esta região se sobrepõe a regiões de susceptibilidade ao autismo e à síndrome FG que também tem relação com a DI. Por esses motivos, esta variação foi classificada como patogênica.

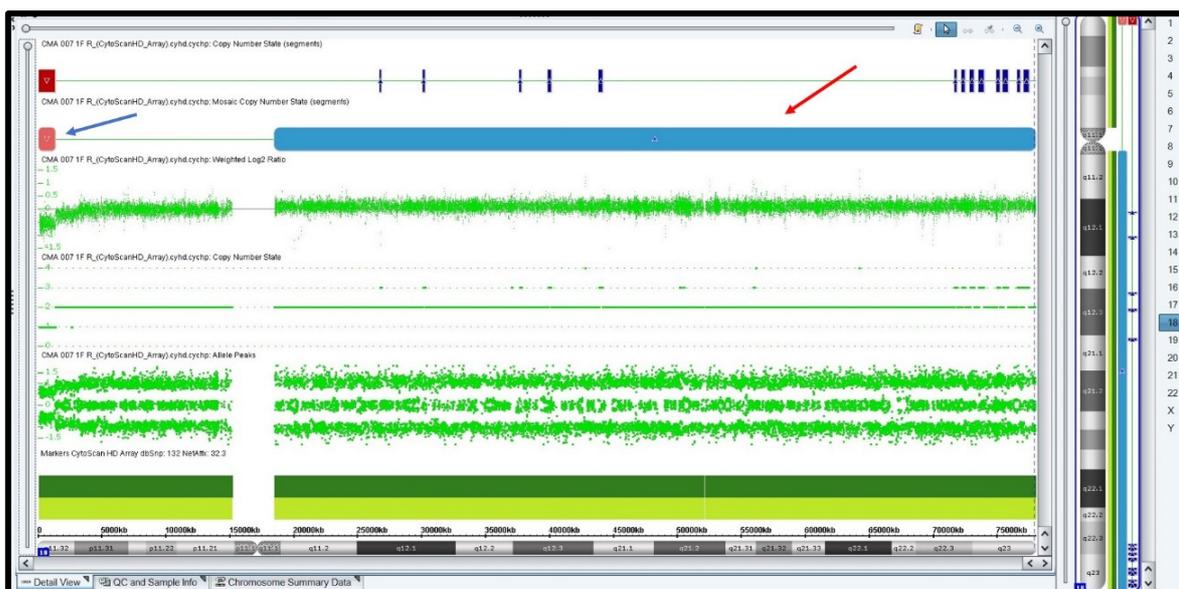


Figura 7: Imagem capturada do *software* ChAS (Affymetrix, USA), mostrando as duas alterações patogênicas em mosaico presentes no cromossomo 18 do paciente 7. A seta azul indica a microdeleção *de novo* em 18p11.32 de 1.233 kpb e a seta vermelha indica a duplicação *de novo* de 59.405 kpb de todo o braço longo deste cromossomo.

Paciente 8

Este paciente apresentou 2 alterações no número de cópias genômicas. Uma microduplicação herdada do pai em 2p16.1 de 291 kpb que não envolvendo genes conhecidos. Não há casos semelhantes em populações não afetadas. Por não envolver genes e por ser herdado do pai fenotipicamente normal, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação de herança paterna em 22q11.23 de 164 kpb, que envolveu dois genes que não tem qualquer relação com o vias metabólicas ou de desenvolvimento do sistema nervoso central. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Dessa forma, esta variação foi classificada como neutra.

Paciente 9

Este paciente não apresentou nenhuma CNV, detectável pela metodologia empregada neste estudo, em seu genoma.

Paciente 10

Este paciente não apresentou nenhuma CNV, detectável pela metodologia empregada neste estudo, em seu genoma.

Paciente 11

Este paciente apresentou 2 alterações no número de cópias genômicas. Uma deleção *de novo* em 1p31.3 de 10.887 kpb (Figura 7), envolvendo 49 genes, incluindo *LRRC7*, *PTGER3*, *AK5*, *NEGR1* e *LHX8*, que estão envolvidos em vias do desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central. Não há casos semelhantes em populações não afetadas. Por estes motivos, esta variação foi classificada como patogênica.

Uma microdeleção herdada de ambos os pais em 19p12 de 122 kpb, envolvendo apenas um gene (*ZNF826P*) que não está envolvido em vias do sistema nervoso central. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Assim, esta variação foi classificada como neutra.

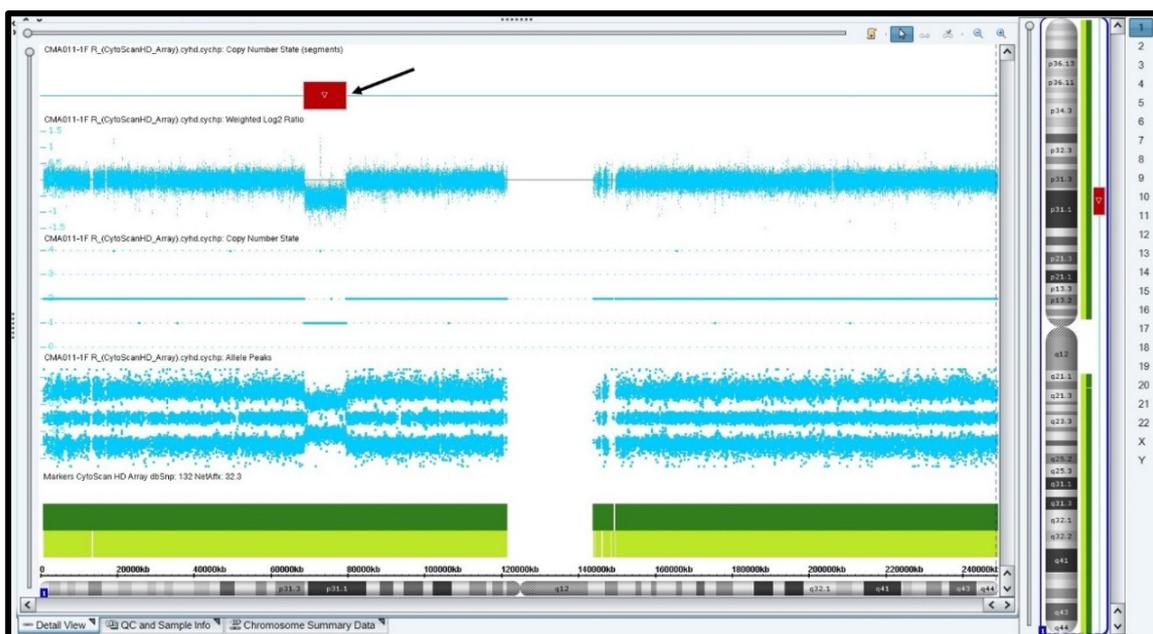


Figura 8: Imagem capturada do *software* ChAS (Affymetrix, USA), mostrando a deleção patogênica *de novo* observada em 1p31.3 (seta) com 10.887 kpb, no paciente 11.

Paciente 12

Este paciente apresentou 3 alterações no número de cópias genômicas. Uma microdeleção de herança materna em 8q24.23 de 184 kpb, que não envolveu nenhum gene

conhecido. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Dessa forma, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microdeleção *de novo* em 14q11.2 de 344 kpb, que não envolveu genes conhecidos. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por estes motivos, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação herdada de ambos os pais em 16p11.2 de 306 kpb, que envolveu três genes que não tem relações aparentes com vias metabólicas do sistema nervoso central. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas e por isso, ela foi classificada como neutra.

Paciente 14

Este paciente apresentou 2 alterações no número de cópias genômicas. Uma microdeleção de herança materna em 14q11.2 de 144 kpb, que não envolveu nenhum gene conhecido. Além disso, de acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por tudo isso, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microduplicação de herança materna em 22q11.23 de 338 kpb que envolveu 4 genes conhecidos, incluindo o *ADRBK2* que tem um papel importante no desenvolvimento. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração ocorre em populações não afetadas. Apesar de herdado da mãe que apresenta um fenótipo normal, envolve um gene que é altamente expresso no principal órgão do sistema nervoso central, por isso esta variação foi classificada como potencialmente patogênica.

Paciente 15

Este paciente apresentou 3 alterações no número de cópias genômicas. Uma microdeleção de herança materna em 14q11.2 de 136 kpb, que não envolveu genes conhecidos. De acordo com os bancos de dados DGV e *CytoScanHD* essa alteração não tem importância clínica, já que é comum em populações não afetadas. Por tudo isso, esta variação foi classificada como neutra.

Uma microdeleção de herança materna em 15q23 de 136 kpb, que envolveu um gene (*THSD4*) que não participa de vias do sistema nervoso central. Não há casos

semelhantes em populações não afetadas. Por estes motivos, esta variação foi classificada como de significado incerto.

Uma microduplicação de herança materna em Xq28 de 140 kpb, que envolveu 4 genes conhecidos, incluindo o *ATP2B3* que é altamente expresso no cérebro e está envolvido em vias metabólicas do sistema nervoso central. Não há casos semelhantes em populações não afetadas. Por esses motivos, esta variação foi classificada como potencialmente patogênica.

Paciente 16

Este paciente não apresentou nenhuma CNV, detectável pela metodologia empregada neste estudo, em seu genoma.

Tabela 2: Características clínicas e dados moleculares dos pacientes.

Paciente	Características Clínicas*	Idade (Anos)	Sexo	CNV	Mosaico (%)	Banda Cromossômica	Tamanho (pb)	Número de Marcadores	Nomenclatura do Microarray	Número de Genes **	Genes***	Origem	Interpretação
001	Baixa Estatura, Atraso Global do Desenvolvimento	10	F	NAE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
002	Atraso Global do Desenvolvimento, Distúrbios Comportamentais	12	M	Dup	-	1q44	528.302	600	1q44(246,174,090-246,702,392)x3	-	-	Materna	Significado Incerto
				Dup	-	1q44	336.368	348	1q44(247,080,457-247,416,825)x3	-	-	Materna	Significado Incerto
				Del	-	14q11.2	528.399	767	14q11.2(22,441,152-22,969,551)x1	-	-	de novo	Neutra
				Dup	-	16p11.2	267.367	160	16p11.2p11.1(34,471,297-34,738,664)x3	-	-	Paterna	Neutra
				Dup	50	17p11.2	3677.02	4.151	17p11.2(16,769,800-20,446,820)x3	64	<i>COPS3, SMCR9, RAI1, SMCR5, TOM1L2, LRR48, ATPAF2, DRG2, MYO15A, ALKBH5, FLII, SMCR8, SHMT1, USP32P2, CCDC144B, B9D1, MFAP4, RNF112</i>	de novo	Patogênica
				Dup	-	22q11.1	350.130	148	22q11.1(16,888,899-17,239,029)x3	-	-	Paterna	Neutra
003	Atraso Global do Desenvolvimento, Déficit de Coordenação	18	M	Dup	-	7q31.32	669.708	785	7q31.32(122,366,542-123,036,250)x3	3	<i>CADPS2</i>	Paterna	Potencialmente Patogênica
				Dup	-	Xp22.33	147.232	114	Xp22.33(1,240,318-1,387,550)x3	-	-	Materna	Significado Incerto
004	Atraso Global do Desenvolvimento, Baixa Estatura, Múltiplos Estigmas	3	M	Del	-	8p11.22	139.854	76	8p11.22(39,247,097-39,386,952)x0	-	-	Materna e Paterna	Neutra
				Dup	-	10q11.21	157.114	116	10q11.21(45,210,689-45,367,803)x3	-	-	Materna	Neutra

O Papel da Variação do Número de Cópias Genômicas no Fenótipo Clínico de Deficiência Intelectual em uma Coorte Retrospectiva da Rede Pública de Saúde do Estado de Goiás

				Dup		12q13.13.	517.598	396	12q13.13q13.2(54,462,464-54,980,062)x3	19	<i>PDE1B</i>	<i>de novo</i>	Potencialmente Patogênica
				Del		14q11.2	208.757	298	14q11.2(22,732,618-22,941,375)x1	-	-	Materna	Neutra
				Dup		16p11.2	284.519	172	16p11.2p11.1(34,471,297-34,755,816)x3	-	-	Paterna	Neutra
005	Face Síndrômica, Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas	9	M	NAE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Dup		3q12.2	102.443	108	3q12.2(100,340,054-100,442,497)x4	-	-	Paterna	Neutra
006	Atraso Global do Desenvolvimento	12	F	Del		Xq27.3	4.176.458	10.150	Xq27.3q28(144,580,614-148,757,072)x1	34	<i>SLITRK2, CXorf1, FMR1, AFF2, IDS, TMEM185A</i>	<i>de novo</i>	Patogênica
				Del		7q31.1	386.725	265	7q31.1(110,923,434-111,310,159)x1	1	<i>IMMP2L</i>	Materna	Patogênica
				Del		14q11.2	308.999	486	14q11.2(22,635,508-22,944,507)x1	-	-	Materna	Neutra
				Dup		15q11.2	311.907	712	15q11.2(22,770,421-23,082,328)x3	4	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1</i>	Paterna	Potencialmente Patogênica
7	Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas, Múltiplas Anômalias Congênitas	5	F	Del	30	18p11.32	1.233.578	1.400	18p11.32(136,226-1,369,804)x1	11	<i>USP14, ADCYAP1</i>	<i>de novo</i>	Patogênica
				Dup	40	18q	59.405.75	53.197	18q11.1q23(18,608,373-78,014,123)x2-3	247	Todos os genes de 18q	<i>de novo</i>	Patogênica
				Dup		Xp22.33	25.685.582	31.424	Xp22.33p21.3(168,546-25,887,307)x3	147	<i>PLCXD1, ASMT, NLGN4X, VCX3A, STS, KALI, CLCN4, HCCS, FRMPD4, OFD1, GLRA2, ASB11, APIS2, GRPR, NHS, RAI2, CDKL5, PPEF1,</i>	<i>de novo</i>	Patogênica

O Papel da Variação do Número de Cópias Genômicas no Fenótipo Clínico de Deficiência Intelectual em uma Coorte Retrospectiva da Rede Pública de Saúde do Estado de Goiás

													<i>RPS6KA3, MBTPS2, SMS, PTCHD1, EIF2S3, ARX</i>	
008	Características Sindrômicas, Baixa Estatura	26	F	Dup	2p16.1	291.964	196	2p16.1(57,521,834-57,813,798)x3	-	-	Paterna	Neutra		
				Dup	22q11.23	164.526	60	22q11.23q12.1(25,746,029-25,910,555)x3	-	-	Paterna	Neutra		
009	Múltiplos Estigmas, Atraso Global do Desenvolvimento, Comportamento Autista	11	F	NAE	-	-	-	-	-	-	-	-		
010	Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas	10	F	NAE	-	-	-	-	-	-	-	-		
011	Desordens Comportamentais, Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas	8	F	Del	1p31.3	10.887.787	10.080	1p31.3p31.1(68,693,129-79,580,916)x1	49	<i>LRRC7, PTGER3, NEGR1, LHX8, AK5</i>	<i>de novo</i>	Patogênica		
				Del	19p12	122.170	82	19p12(20,598,535-20,720,705)x0	-	-	Materna e Paterna	Neutra		
012	Atraso Global do Desenvolvimento	6	M	Del	8q24.23	184.540	120	8q24.23(137,677,895-137,862,435)x1	-	-	Materna	Neutra		
				Del	14q11.2	344.218	580	14q11.2(22,599,355-22,943,573)x1	-	-	<i>de novo</i>	Neutra		
014	Distúrbio de atividade elétrica cerebral, Face Sindrômica, Atraso Global do Desenvolvimento	14	M	Dup	16p11.2	306.222	176	16p11.2p11.1(34,449,594-34,755,816)x4	-	-	Materna e Paterna	Neutra		
				Del	14q11.2	144.717	188	14q11.2(22,799,790-22,944,507)x1	-	-	Materna	Neutra		
015	Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas	8	F	Del	22q11.23	338.089	140	22q11.23q12.1(25,656,237-25,994,326)x3	4	<i>ADRBK2</i>	Materna	Potencialmente Patogênica		
				Del	14q11.2	136.530	168	14q11.2(22,804,536-22,941,066)x1	-	-	Materna	Neutra		
015	Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas	8	F	Del	15q23	136.017	180	15q23(71,537,904-71,673,921)x1	-	-	Materna	Significado Incerto		
				Dup	Xq28	140.489	344	Xq28(152,720,466-152,860,955)x3	4	<i>ATP2B3</i>	Materna	Potencialmente Patogênica		

016	Atraso Global do Desenvolvimento, Múltiplos Estigmas	5	F	NAE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-----	--	---	---	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---

* Características Clínicas, exceto a deficiência intelectual que é comum a todos os pacientes envolvidos neste estudo;

** Número total de genes envolvidos nas alterações patológicas;

*** Genes relacionados ao desenvolvimento neural que foram envolvidos nas alterações patológicas;

F: Feminino; M: Masculino; Del: Deleção; Dup: Duplicação; NAE: Nenhuma alteração encontrada; CNV: Copy Number Variation.

5. Discussão

O CMA engloba todos os tipos de análises do número de cópias genômicas baseadas em *arrays*, assim como aCGH e SNP-arrays e oferece um rendimento médio de diagnósticos para indivíduos com DI de origem desconhecida relativamente maior (10% - 20%) do que pode render os exames de cariótipo convencional (aproximadamente 3%, excluindo as síndromes cromossômicas mais conhecidas), principalmente por causa de sua alta sensibilidade em detectar microdeleções e microduplicações (Sagoo *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010).

Neste estudo, foram realizados testes de CMA em 15 pacientes com fenótipo de DI, revelando alterações no número de cópias em 10 pacientes. Destes, foi possível propor uma etiologia genética para a deficiência intelectual em 8 (53,3% de rendimento). O rendimento observado neste estudo é maior do que os observados em outros estudos (Fan *et al.*, 2007; Vermeesch *et al.*, 2007; Regier *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2010), possivelmente porque o grupo de pacientes analisados aqui é relativamente menor do que o analisado nos outros estudos, mas, ainda assim, foi suficiente para reforçar a informação de que o rendimento diagnóstico de tecnologias de CMA para casos de DI de causa desconhecida é maior do que aquele gerado por metodologias de citogenética convencional. Além disso, é importante frisar que o rendimento obtido aqui para a detecção de CNVs patológicas foi gerado em um estudo voltado para a pesquisa científica e não a nível de diagnóstico.

Foi possível observar que nenhuma alteração, daquelas consideradas causativas dos fenótipos analisados, foi encontrada repetida em dois ou mais pacientes. Desta forma, cada paciente diagnosticado apresentou uma ou mais CNVs diferentes das outras detectadas neste estudo. Isso sugere o quão ampla e heterogênea é a etiologia genética da deficiência intelectual.

A frequência de CNVs patogênicas foi de aproximadamente 21%, enquanto que de potencialmente patogênicas foi de cerca de 15%. Esses dois tipos de alterações foram fundamentais para o diagnóstico proposto para os 8 pacientes.

Nenhuma alteração no número de cópias foi observada nos pacientes 1, 5, 9, 10 e 16. Desta forma, não foi possível sugerir uma causa genética detectável pela tecnologia do CMA de alta resolução para estes casos. Entretanto, é importante dizer que os testes de microarrays não interrogam todas as partes do genoma, e um resultado normal não implica que o respectivo indivíduo não tenha uma alteração genética.

A possibilidade de testar estes indivíduos com tecnologias genômicas mais sensíveis ou específicas, como o *next-generation exome sequencing*, deve ser levada em consideração, já que essa abordagem poderá detectar mutações pontuais em genes que possam estar ocasionando o fenótipo alterado (Lalonde *et al.*, 2010; Ku *et al.*, 2011; Topper *et al.*, 2011). Uma mutação pontual pode levar a uma desregulação epigenética que influencia a transcrição e/ou o silenciamento de outros genes, levando a fenótipos alterados (Graff e Mansuy, 2009; Urdinguio *et al.*, 2009).

Estima-se que as desordens genéticas são a causa de cerca de 30% a 50% dos casos de deficiência intelectual e os fatores ambientais explicam de 10% a 30% desses casos (Flint e Wilkie, 1996). Desta forma, há também, a possibilidade de a causa, para estes cinco probandos, não ser genética e sim metabólica ou adquirida devido a circunstâncias não relatadas pela família durante a coleta dos dados do histórico de cada paciente, já que todos foram encaminhados por médicos que realizaram outras investigações antes de submetê-los a uma investigação genética de alta resolução.

Para os casos 8 e 12 foram detectadas a presença de algumas CNVs genômicas, entretanto nenhuma delas foi classificada como patogênica ou potencialmente patogênica, o que nos impediu de sugerir uma possível causa genética para explicar a alteração fenotípica destes pacientes.

Variantes no número de cópias têm sido identificadas desde o início da era genômica. No entanto, a extensão total da variabilidade e da plasticidade do genoma humano ainda não é conhecida (Iafate *et al.*, 2004). Conrad *et al.* (2010) constataram que uma parcela significativa do nosso genoma é composto por polimorfismos que não causam qualquer consequência fenotípica prejudicial ou incapacitante.

Além disso, outros testes de triagem médica, especialmente técnicas de imagem radiológica (como ultra-som e ressonância magnética), frequentemente desvendam resultados imprevistos ou que não puderam ser detectados geneticamente (Cioni *et al.*, 1997; Nosarti *et al.*, 2004).

O caso 2 apresentou seis alterações genômicas, sendo três classificadas como neutras, duas microduplicações de herança materna em 1q44 que, juntas, envolveram 10 genes não relacionados com vias do sistema nervoso central e que foram classificadas como de significado desconhecido e um ganho em mosaico (50% das células) patogênico *de novo* em 17p11.2 que envolveu 64 genes (incluindo o *RAI1*). Esta última CNV se sobrepôs (100%) à síndrome de Potocki-Lupski (MIM 610883) de acordo com o DECIPHER.

A síndrome de Potocki-Lupski é caracterizada por hipotonia infantil, déficit de crescimento, anomalias cardiovasculares congênitas, apneia do sono, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, distúrbios comportamentais significativos e comportamento autista (Potocki *et al.*, 2007; Treadwell-Deering *et al.*, 2010). A apresentação clínica do paciente é bem consistente com as características desta síndrome. A alteração de um número relativamente grande de genes em um intervalo considerável do genoma (aproximadamente 3,7 Mb) certamente acarretou nas características físicas e neurológicas observadas.

Ganho ou perda de material genômico na banda cromossômica 17p11.2, inevitavelmente leva a um fenótipo de DI, já que esta mesma região quando deletada conduz à síndrome de Smith-Magenis (MIM 182290), que tem como características uma voz rouca e profunda, atraso na fala com ou sem perda auditiva associada, sinais de neuropatia periférica, níveis variáveis de deficiência intelectual e problemas neurocomportamentais (Smith *et al.*, 1998).

A sobreposição de fenótipos que envolvem o desenvolvimento neurológico e que resultam tanto na perda quanto no ganho de função das mesmas proteínas fortalece a ideia de que a cognição e o comportamento normal dependem dos estreitos mecanismos de controle homeostático neuronais. Os neurônios são altamente flexíveis em relação ao seu grau de excitabilidade em resposta às constantes mudanças dos fatores ambientais. Em um modelo de homeostase neuronal, tanto as mutações de ganho quanto as de perda podem conduzir a um conjunto de disfunções neurais que dificultam a flexibilidade sináptica, levando à função prejudicada de todo o sistema (Ramocki e Zoghbi, 2008).

O paciente 3 demonstrou uma microduplicação de herança paterna em 7q31.32 de 670 kpb que envolveu três genes, incluindo o *CADPS2* (*calcium-dependent activator protein for secretion 2*). De acordo com *NCBI Reference Sequences* (RefSeq), este gene codifica um membro da família de proteínas dependentes de cálcio (*CAPS*), que são proteínas que se ligam ao cálcio para regular a exocitose de vesículas sinápticas e de núcleo denso nos neurônios e em células neuronais, sendo altamente expresso no cérebro (Nagase *et al.*, 2000; Cisternas *et al.*, 2003; Speidel *et al.*, 2003).

Sadakata *et al.* (2007) observaram que mutações neste gene podem contribuir à susceptibilidade ao autismo e Green *et al.* (2010) observaram que alterações genômicas que envolvem este gene estão associadas a distúrbios que afetam as capacidades cognitivas.

Utilizando um modelo animal (rato), Sadakata *et al.* (2007) demonstraram, ainda, que o *CADPS2* é importante para a secreção do *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) pelos neurônios neocorticais e cerebelares, para que haja a diferenciação dos neurônios hipocâmpais e neocorticais, e para a sobrevivência de células de Purkinje no cerebelo.

Mais recentemente, Hattori *et al.* (2012) sugeriram que mutações no *CADPS2* podem ser a causa do baixo QI observado em alguns pacientes, afetando tanto a inteligência quanto a memória. Além disso, de acordo com os bancos de dados DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk>) e ISCA (*The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* - <https://www.iscaconsortium.org>) já foram relatados pacientes que apresentavam DI com alterações genômicas envolvendo o gene *CADPS2*. Desta forma, os resultados que nós obtivemos nos estudos por CMA, para o paciente 3, nos indica que a super-expressão deste gene possivelmente foi a causa do fenótipo observado.

A microduplicação *de novo* detectada na banda cromossômica 12q13.13 de aproximadamente 517 kpb, presente no caso 4, envolveu 19 genes, dentre eles o gene *PDE1B* (*phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent*) que ainda não apresenta uma associação relatada com a DI. Entretanto, de acordo com RefSeq, este gene codifica uma proteína fosfodiesterase que é estimulada pelo complexo cálcio-calmodulina. Esta fosfodiesterase tem dupla especificidade para os segundos mensageiros, adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e guanosina monofosfato cíclica (cGMP), com uma preferência para cGMP como substrato. cAMP e cGMP funcionam como reguladores de muitos processos fisiológicos importantes.

A sinalização de cAMP e de cGMP têm sido associada com a neuroplasticidade e neuroproteção, e sua alteração a nível celular, mediante influencia da codificação da fosfodiesterase, tem se tornado um alvo muito estudado para o tratamento de uma ampla gama de distúrbios, incluindo neurológicos (Bollen e Prickaerts, 2012).

Os nucleotídeos cíclicos são vitais na sinalização intracelular e para a neuroplasticidade em todo o cérebro. Portanto, disfunções na sinalização podem levar a alterações relevantes no funcionamento celular e causar alterações fenotípicas importantes (Cui e So, 2004; Lakics *et al.*, 2010). Desta forma, a expressão normal do gene *PDE1B* é essencial para a sinalização e para uma variedade de funções celulares, estando envolvida, inclusive, na sobrevivência da célula neuronal (Jancic *et al.*, 2009).

Os bancos de dados DECIPHER e ISCA relataram alguns pacientes com duplicação e deleção na banda cromossômica 12q13.13 que apresentavam algum grau de deficiência intelectual. Ainda de acordo com esses bancos de dados, dos 19 genes envolvidos na microduplicação encontrada em nosso paciente, 11 foram relatados como presentes em pacientes com DI quando super-expressos.

Sendo assim, supomos que a causa da DI do paciente 4 ocorreu principalmente devido à super-expressão do gene *PDE1B*. Obviamente, o envolvimento dos outros genes também devem ter contribuído indiretamente com o fenótipo observado, já que o funcionamento normal do cérebro depende de uma série de processos biológicos que por sua vez são controlados pela expressão de vários genes que atuam direta ou indiretamente em diversas vias metabólicas, garantindo o funcionamento correto do organismo.

O paciente 6 apresentou uma microdeleção patogênica *de novo* em Xq27.3, de aproximadamente 4.2 Mb que envolveu 34 genes. Dentre os genes envolvidos, estão o *SLITRK2* (*SLIT and NTRK-like family, member 2*), o *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*), o *IDS* (*iduronate 2-sulfatase*), o *AFF2* (*AF4/FMR2 family, member 2*), o *CXorf1* (*TMEM257 - transmembrane protein 257*) e o *TMEM185A* (*transmembrane protein 185A*), sendo que todos estes têm relação conhecida com a DI.

O gene *SLITRK2* é expresso predominantemente em tecidos neurais e tem atividade de modulação de neuritos (Aruga *et al.*, 2003). A proteína codificada por este gene também têm regiões Carboxi-terminais que partilham homologia com receptores de neurotrofina, e as neurotrofinas, por sua vez, atuam como fatores de sobrevivência e diferenciação no sistema nervoso, coordenando estágios do desenvolvimento neuronal simpático (Kuruvilla *et al.*, 2004). Alterações genômicas que envolvem este gene já foram reportadas em pacientes que apresentavam DI, de acordo com os bancos de dados DECIPHER e ISCA.

FMR1 é o gene envolvido na síndrome do X-frágil que é mais comum em homens, mas também pode ocorrer em mulheres, e é conhecida por ser uma grave anomalia do desenvolvimento neurológico e a forma hereditária mais comum da deficiência cognitiva (Loesch e Hagerman, 2012). A síndrome é causada pelo silenciamento epigenético do gene *FMR1* levando à ausência da proteína *FMRP* (*fragile X mental retardation protein*). Apesar do grande número de estudos sobre esta síndrome, ainda não está claro como a ausência da *FMRP* afeta a fisiologia do sistema nervoso levando à neurogenese anormal (Beaulieu, 2013; Hagerman e Hagerman, 2013; Telias *et al.*, 2013).

O *IDS* codifica uma proteína que pertence à família sulfatase, e está localizada nos lisossomos, estando envolvida na degradação do sulfato de heparan e sulfato de dermatan. Uma mutação neste gene pode levar à atividade deficiente da enzima iduronato-2-sulfatase que causará um acúmulo de glicosaminoglicanos, acarretando na Mucopolissacaridose do tipo II (MPS II, também conhecida como síndrome de Hunter). Esta desordem é caracterizada por uma série de alterações fenotípicas e as formas mais graves envolvem o fenótipo da deficiência intelectual (Brusius-Facchin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Outra forma de DI ligada ao X é causada pela interrupção do gene *AFF2* (*FMR2*), seja pela expansão de uma repetição CCG, ou por sua deleção (Gecz *et al.*, 1997; Mila *et al.*, 1997; Tzeng *et al.*, 2000). Além disso, alterações no gene *CXorf1* ou *TMEM257* que é altamente expresso no cérebro, por neurônios e células da glia e no gene *TMEM185A* estão estritamente relacionados à fenótipos de atraso mental (Redolfi *et al.*, 1998; Strelnikov *et al.*, 1999).

Levando em conta a deleção de cada um destes genes podemos supor que o fenótipo alterado da paciente 6 foi devido à haploinsuficiência dos genes que sabidamente, quando genomicamente alterados, são causadores de DI, assim como de outras características específicas.

A análise por microarray detectou cinco alterações genômicas relevantes no caso 7. Uma microdeleção de herança materna de 387 kbp em 7q31.1, envolvendo o gene *IMMP2L* (*IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like*); uma microduplicação de herança paterna de 312 kpb em 15q11.2, que envolveu os genes *TUBGCP5* (*tubulin-gamma complex-associated protein 5*), *CYFIP1* (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 1*), *NIPA2* (*non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2*) e *NIPA1* (*non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1*); uma microdeleção de 1.23 Mb *de novo* em 18p11.32 em mosaico (30%), envolvendo os genes *USP14* (*ubiquitin-specific protease 14*) e *ADCYAP1* (*adenylate cyclase-activating polypeptide 1*); uma trissomia *de novo* em 18q em mosaico (40%), afetando todos os genes do braço longo deste cromossomo e uma duplicação de 25.72 Mb *de novo* em Xp22.33-Xp21.3, que envolveu 147 genes.

O gene *IMMP2L* codifica uma proteína envolvida no processamento de sequências de peptídeos sinalizadores que agem direcionando proteínas mitocondriais para as mitocôndrias. Entretanto, este gene já foi relatado como envolvido em vias do desenvolvimento neurológico, já que alterações de dosagem podem acarretar na

syndrome Gilles de la Tourette, uma complexa desordem neuropsiquiátrica (Petek *et al.*, 2001).

Saus *et al.* (2010) utilizando ensaios de MLPA, encontraram deleções deste gene em seu grupo controle, mas curiosamente não em indivíduos com desordens neuropsiquiátricas. Apesar disso, alterações de dosagens também já foram associadas à déficit de atenção e a desordens de hiperatividade (Elia *et al.*, 2010).

TUBGCP5 é altamente expresso no cérebro (Nagase *et al.*, 2001). Schenck *et al.* (2001) demonstraram que a proteína codificada por *CYFIP1* interage com a proteína *FMRP* (envolvida na síndrome do X-frágil) e com a pequena GTPase, codificada pelo *RAC1*, que apresenta diversas funções biológicas, estando, inclusive, implicada no desenvolvimento e na manutenção de estruturas neuronais (Kobayashi *et al.*, 1998; Napoli *et al.*, 2008).

De acordo com o RefSeq, os genes *NIPA1* e *NIPA2* codificam proteínas transportadoras de magnésio que se associam à endossomas e à superfície de células neuronais e epiteliais e desempenham um papel importante no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Estes genes estão localizados adjacentes ao domínio impresso na região deletada nas síndromes de Prader-Willi e Angelman no cromossomo 15 (Chai *et al.*, 2003).

O gene *USP14* codifica uma enzima de deubiquitinação. Lee *et al.* (2010) mostraram que a inibição da função da proteína codificada por este gene está implicada em doenças neurodegenerativas. Já Wilson *et al.* (2002), utilizando um modelo animal (camundongo), observaram que alterações da dosagem desse gene levaram à defeitos na transmissão sináptica tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. Estes resultados sugeriram que estas proteases de deubiquitinação são importantes na regulação da atividade sináptica em mamíferos.

Segundo o RefSeq, o gene *ADCYAP1* codifica uma pró-proteína secretada que é subsequentemente processada em múltiplos peptídeos maduros. Estes péptídeos estimulam a adenilato-ciclase e aumentam os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), resultando na ativação da transcrição de genes alvo. Os produtos deste gene são mediadores importantes de respostas neuroendócrina ao stress.

Freson *et al.* (2004) relataram 2 pacientes que apresentavam a duplicação deste gene e tinham uma série de alterações que incluía a deficiência intelectual. Já Mercer *et al.* (2004) concluíram que a proteína codificada pelo gene *ADCYAP1* é um importante mediador da proliferação de células tronco neurais e Waschek (2002) e Dorus *et al.*

(2004), mostraram que este gene tem um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso.

Além do envolvimento dos genes citados nos parágrafos anteriores, este paciente apresentou duas, relativamente, grandes CNVs que envolveram uma enorme quantidade de genes em cada uma. A trissomia do braço longo do cromossomo 18 foi observada em mosaico e por este motivo pode ter passado facilmente despercebida pela análise por cariótipo convencional. Entretanto, estranhamente, uma duplicação de mais de 25 Mb no braço curto do cromossomo X não foi detectada pela metodologia tradicional, possivelmente devido à baixa qualidade das metáfases obtidas durante as culturas dos linfócitos do sangue periférico do paciente.

Esse fato reforça ainda mais a utilidade de tecnologias de CMA de alta resolução em diagnósticos clínicos de fenótipos causados por alterações no número de cópias genômicas, já que determinados fatores podem influenciar no resultado e na análise cromossômica por microscopia óptica, permitindo, eventualmente, que uma CNV de tamanho maior do que 10 Mb passe despercebida pela avaliação.

A trissomia do braço longo do cromossomo 18 envolveu 247 genes e o tamanho desta CNV se aproximou de 60 Mb. Por ela se apresentar em mosaico (40% das células), o paciente possivelmente não desenvolveu um fenótipo mais grave. A trissomia completa do cromossomo 18 é conhecida por causar a síndrome de Edwards, mas trissomias parciais deste cromossomo, especialmente no braço q, há muito tempo vem sendo relatadas como causadoras de fenótipos peculiares à síndrome, como a deficiência cognitiva, entretanto mais suaves e sem a malformação de órgãos internos, o que aumenta a sobrevivência dos portadores (Fryns *et al.*, 1978; Turleau *et al.*, 1980; de Muelenaere *et al.*, 1981; Mewar *et al.*, 1993; Boghosian-Sell *et al.*, 1994; revisão de Quiroga *et al.*, 2011).

CNVs que envolveram a deleção parcial ou total do braço q do cromossomo 18, em pacientes que, dentre outras características, apresentavam deficiência intelectual, também já foram relatadas em estudos mais recentes (Versacci *et al.*, 2005; Linnankivi *et al.*, 2006; Turleau, 2008).

Por fim, uma grande duplicação em Xp22.33-Xp21.3 foi observada no paciente 7. O envolvimento de 147 genes, também gerou um forte indício de causalidade do fenótipo observado. Após uma extensa busca pelos bancos de dados DECIPHER, ISCA e NCBI *Reference Sequences* (RefSeq), foi possível detectar 24 genes que tem forte relação direta com a DI ou com vias do desenvolvimento neurológico.

Estes genes envolvidos são: *PLCXD1*, *ASMT*, *NLGN4X* (codifica proteínas da superfície celular neuronal e está associado ao autismo, à síndrome de Asperger e à DI não síndrômica), *VCX3A*, *STS*, *KALI* (codifica uma proteína que tem função na adesão das células neurais e migração axonal), *CLCN4* (contribui para a patogênese de distúrbios neuronais), *HCCS* (associado à síndrome de Rett), *FRMPD4* (regula a formação da espinha dendrítica neuronal), *OFD1* (síndrome de Simpson-Golabi-Behmel), *GPM6B* (ligado à síndrome de Rett), *GLRA2*, *ASB11* (expresso no sistema nervoso central), *APIS2*, *GRPR* (regula diversas funções do sistema nervoso central e tem relação com o autismo), *NHS* (síndrome Nance-Horan), *RAI2* (prejuízo cognitivo), *CDKL5* (síndromes de West e Rett), *PPEF1* (codifica uma proteína com função neuro-sensorial), *RPS6KA3* (síndrome de Coffin-Lowry), *MBTPS2*, *SMS*, *PTCHD1*, *EIF2S3*, *ARX*.

Este caso foi o que apresentou maior grau de complexidade genômica dentre os pacientes analisados neste estudo, já que envolveu cinco alterações relevantes e inúmeros genes que sabidamente, quando alterados, causam distúrbios neurológicos. Por estes motivos não foi possível detectar qual CNV, especificamente, causou o fenótipo de DI no paciente. Isoladamente, a presença de qualquer uma destas cinco CNVs seria suficiente para a conclusão de um diagnóstico que explicasse a causa da DI no probando. Isso reforça ainda mais a ideia da enorme variabilidade que este complexo sinal neurológico apresenta.

O mais provável é que a associação das alterações genômicas tenha contribuído para a condição adquirida. Desta forma, com base nos nossos resultados, concluímos que as sub-regiões analisadas contêm genes importantes envolvidos em vias metabólicas do sistema nervoso central cuja alteração deva estar envolvida no fenótipo da DI.

O caso 11 revelou uma microdeleção patogênica *de novo* na região cromossômica 1p31.3 que envolveu 49 genes, incluindo *LRRC7* (*leucine-rich repeat-containing protein 7*), *PTGER3* (*prostaglandin E receptor 3*), *AK5* (*adenylate kinase 5*), *NEGR1* (*neuronal growth regulator 1*) e *LHX8* (*LIM homeobox gene 8*).

O *LRRC7* codifica uma proteína sináptica específica do cérebro (Densina-180) que age na adesão específica entre as membranas pré-sinápticas e pós-sinápticas nas sinapses glutamatérgicas (Izawa *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Carlisle *et al.* (2011) demonstraram que a ausência dessa proteína leva à perturbação da organização e/ou dinâmica de complexos de sinalização pós-sinápticas em sinapses excitatórias, resultando em fenótipos caracterizados por comportamentos anormais associados à distúrbios mentais.

De acordo com o RefSeq, o gene *PTGER3* codifica uma proteína que é um membro da família de receptores acoplados à proteína G. Esta proteína forma um dos quatro receptores identificados para a prostaglandina E2 (*PGE2*). Este receptor pode ter diversas funções biológicas, que envolvem a digestão, o sistema nervoso, a reabsorção renal, e as atividades de contração uterina.

Utilizando um modelo animal (rato), Funatsu *et al.* (1999) observaram que o gene *NEGR1* é predominantemente expresso em neurônios piramidais no córtex cerebral e no hipocampo. Já no cerebelo ele é mais expresso nos dendritos das células de Purkinje, influenciando na transmissão de sinapses.

O gene *LHX8* codifica uma proteína que está envolvida no padrão e diferenciação de vários tipos de tecidos, inclusive na oogênese e na diferenciação neuronal (Zhao *et al.*, 1999). Zhao *et al.* (2003), utilizando um modelo animal (rato), observaram que mutações que deletam este gene, levam à deficiência no desenvolvimento dos neurônios colinérgicos no prosencéfalo, levando à redução do número destes neurônios. Também em um modelo animal, Flandin *et al.* (2011) constataram que o silenciamento dos genes *LHX8* e *LHX6* resulta em defeitos interneuronais em diversas regiões do cérebro.

AK5 codifica uma proteína adenilato quinase envolvida na regulação da composição do nucleotídeo adenina, catalisando a fosforilação reversível entre nucleosídeos trifosfatos e monofosfatos. A expressão deste gene ocorre exclusivamente no cérebro (van Rompay *et al.*, 1999).

De acordo com os bancos de dados DECIPHER e ISCA, todas essas reduções das dosagens gênicas já foram observadas em outros pacientes que apresentavam dentre outras características, um fenótipo de atraso no desenvolvimento e/ou deficiência intelectual, o que reforça a nossa proposta de que as alterações observadas nestes genes possivelmente são as responsáveis pela deficiência do paciente 11.

O paciente 14 apresentou uma microduplicação de 338 kpb de herança materna em 22q11.23 que envolveu 4 genes, dentre eles o *ADRBK2* (*adrenergic, beta, receptor kinase 2*) que codifica uma proteína responsável pela fosforilação das formas agonistas que se ligam a receptores beta adrenérgicos. Benovic *et al.* (1991) reportaram que essa proteína é expressa predominantemente em tecidos neuronais, em ratos.

Há poucos estudos com esse gene, descritos na literatura, e nenhum deles envolveu mutações que levavam especificamente à deficiência intelectual, mas já foi relatado o seu envolvimento em distúrbios neurológicos e psiquiátricos por alterar a neurotransmissão (Barrett *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2009).

Gratacos *et al.* (2009) trabalhando com grupos de pacientes com diagnósticos psiquiátricos variados, demonstraram que uma variante genética comum pode conferir suscetibilidade a fenótipos clinicamente relacionados e muitas vezes uma alteração gênica que sabidamente leva à determinada desordem psiquiátrica em alguns pacientes pode estar relacionada a outros fenótipos do desenvolvimento neurológico em outros pacientes, isso tudo dependendo de fatores genéticos e/ou ambientais que precisam ser melhor elucidados.

Um exemplo é que uma fração significativa de indivíduos com DI tem sido diagnosticados como autistas. No estudo de Bryson *et al.* (2008), essa proporção foi de 28%. Por outro lado, uma fração ainda maior de indivíduos com autismo têm sido descritos como apresentando algum grau de DI (Fombonne, 2003). Esta co-ocorrência de quadros clínicos é observada tanto nos testes que avaliam genes únicos, como os sequenciamentos de alto rendimento, quanto nos estudos que detectam CNVs. Há uma grande variabilidade fenotípica em indivíduos com DI, não só em níveis de QI, mas também em relação a outras manifestações neurológicas e neurocomportamentais (Mefford *et al.*, 2012).

Desta forma, o nosso achado nos leva a sugerir o gene *ADRBK2*, quando alterado no genoma, como um candidato ao desenvolvimento da deficiência intelectual. Estudos futuros poderão nos mostrar se outros pacientes com fenótipos semelhantes ao do paciente 14 (Tabela 2) também apresentam alteração na dosagem deste gene. O compartilhamento dos achados em bancos de dados de CNVs genômicas e/ou em publicações na literatura nos auxiliarão na resolução de muitos casos como este.

Por fim, o paciente 15 apresentou uma pequena deleção de herança materna em 15q23 que envolveu apenas um gene (*THSD4*) que até o momento não foi relatado como tendo qualquer influência no neurodesenvolvimento. Por este motivo, classificamos essa CNV como de significado incerto. Outra alteração presente neste paciente, também de herança materna, foi uma microduplicação em Xq28 que envolveu 4 genes, incluindo o *ATP2B3* (ATPase, Ca(2+)-transporting, plasma membrane, 3). Este gene codifica uma ATPase transportadora de cálcio e é predominantemente expresso no cérebro (Brown *et al.*, 1996).

A presença de cálcio nos neurônios é vital para processos como a neurotransmissão, desenvolvimento das sinapses e expressão de genes. Interrupções da homeostasia do cálcio, nestas células, levam a desordens do desenvolvimento neurológico

(Zanni *et al.*, 2012), sendo assim, mutações ou alterações de dosagem do gene *ATP2B3*, podem interferir nessa homeostasia, alterando o funcionamento neuronal.

Para todos os 8 pacientes que apresentaram uma ou mais CNV(s) patogênicas ou potencialmente patogênicas foram observadas alterações que afetaram a regulação gênica. Como o objetivo deste estudo foi a busca por CNVs que explicassem a etiologia genética da deficiência intelectual, nós nos focamos em investigar os genes que apresentavam algum envolvimento conhecido direto ou indireto com vias do desenvolvimento neurológico ou do sistema nervoso central ou mesmo que já tenham sido relatados na literatura ou em bancos de dados genômicos, como envolvidos, quando alterados, em pacientes portadores de DI.

Desta forma, pudemos sugerir uma etiologia para cada um destes 8 pacientes. A confirmação de que determinada CNV é realmente a causa do fenótipo avaliado, para alguns dos casos, aguarda estudos confirmatórios com outros grupos de pacientes que apresentem características semelhantes às dos pacientes testados neste estudo e CNVs que envolvam os mesmos genes.

Por enquanto, os genes sugeridos devem ser formalmente considerados como candidatos a desempenharem um papel no desenvolvimento intelectual. Isso porque todos os genes que foram observados neste estudo e que ainda não foram descritos como envolvidos na DI são candidatos bastante atraentes, com base nas suas funções específicas no cérebro e/ou por causa de suas interações com genes/proteínas conhecidas, causais desta deficiência. Além disso, a identificação de genes candidatos para DI e testes iminentes destes genes em grandes populações, deverão ajudar a determinar a sua contribuição agregada ao espectro mutacional dos casos de DI.

Uma grande dificuldade na interpretação dos dados adquiridos pela tecnologia do CMA, se deve especialmente aos efeitos deletérios de pequenas variações, como as mutações monogênicas nas doenças mendelianas, que muitas vezes têm expressão variável e penetrância incompleta (Paciorkowski e Fang, 2009).

Assim, uma CNV transmitida de um pai saudável para uma criança afetada pode ser a responsável pela patologia deste último, e uma CNV *de novo* pode não ser necessariamente patogênica. Alguns pais podem apresentar penetrância incompleta e o fenótipo ser leve ou quase imperceptível podendo escapar facilmente à atenção durante uma avaliação clínica que está focada na condição da criança (Sharp, 2009).

O conhecimento da função dos genes comprovadamente causadores da DI pode ajudar a avaliar o potencial patogênico dos novos genes candidatos recém identificados.

Estas análises dependem de duas áreas do conhecimento: as vias fisiológicas específicas e a interação com proteínas associadas (Kaufman *et al.*, 2010).

Se uma proteína codificada por um novo gene candidato interagir com a proteína produzida por um gene conhecidamente relacionado com a DI, esse gene candidato torna-se mais provável de estar contribuindo para o fenótipo afetado. Essa probabilidade também é aumentada quando o gene candidato opera em vias que contém um ou mais genes associados ao fenótipo em questão.

Mais estudos envolvendo as vias metabólicas e as proteínas ou genes relacionados, além da contínua análise genótipo-fenótipo, deverão melhorar a nossa compreensão da fisiopatologia de desordens neurocognitivas complexas, como é o caso da deficiência intelectual.

6. Conclusão

- Neste estudo, todas as alterações genômicas submicroscópicas contempladas pelo filtro estabelecido para a plataforma do CMA foram identificadas e classificadas quanto ao grau de patogenicidade.

- Foi identificada a presença de deleções e/ou duplicações potencialmente associadas à deficiência intelectual, na coorte estudada.

- Como o experimento foi realizado em trios (paciente mais pais biológicos), foi possível determinar a origem parental de todas as CNVs encontradas.

- Determinamos a extensão física em kpb ou Mb e o número de genes envolvidos em cada uma das 33 CNVs observadas neste estudo.

- A partir das análises dos nossos achados em comparação com dados depositados em bancos de dados genômicos, associamos os genes envolvidos nas CNVs com significância de patogenicidade com o fenótipo da deficiência intelectual observado nos pacientes.

- O estudo foi relevante e inédito, já que uma pesquisa envolvendo a tecnologia do CMA foi utilizada pela primeira vez no estado de Goiás (Brasil Central), contribuindo para o conhecimento de genes ou regiões críticas associadas com a deficiência intelectual, cujo grau de heterogeneidade clínica (fenotípica) é variado.

7. Considerações Finais

É de grande valia e importância a coleta de dados de populações de diferentes partes do mundo, pois sabe-se que o genoma humano pode variar entre populações étnicas (Redon *et al.*, 2006). E o Brasil, por se tratar de um país miscigenado, tem muito a contribuir com este tipo de informação genética para vários estudos na área.

Os testes baseados em microarrays são tecnologias relativamente novas e que provavelmente continuarão a evoluir nos próximos anos. Estes testes não oferecem intervenções terapêuticas ou curativas para uma disfunção cognitiva, mas os resultados obtidos podem ter algum impacto sobre outras comorbidades que não poderiam ser previstas por outros exames.

Encontrar um diagnóstico para pessoas com DI pode ser muito importante tanto para a família quanto para o paciente. Em muitos casos, pode evitar o desgaste de iniciar um tratamento ineficaz ou interrompe-lo caso já tenha sido iniciado. Poderiam gerar mudanças na forma de tratamento médico, para uma terapia mais apropriada. No caso de crianças, abre-se a possibilidade da criação de um novo planejamento educacional e alivia o fato de realizar incontáveis e incômodos exames a fim de encontrar um diagnóstico.

Os resultados podem ainda determinar às famílias o risco de futuros filhos nascerem com essa condição, influenciando o planejamento familiar. Auxilia também na redução de gastos desnecessários com novos exames e tratamentos médicos podendo gerar mudanças significativas na assistência médica e talvez um dia, a tecnologia do CMA possa ser reconhecida como uma metodologia de grande valor para a saúde pública no Brasil.

8. Referências Bibliográficas

Adinolfi, M., Pertl, B., Sherlock, J. 1997. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat. Diagn.* 17: 1299-1311.

Alkan, C., Coe, B.P., Eichler, E.E. 2011. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* 12: 363-376.

American Psychiatric Association (APA). 2000. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington, DC: American Psychiatric Association.

Aruga, J., Yokota, N., Mikoshiba, K. 2003. Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene*. 315: 87-94.

Bacolod, M.D., Schemmann, G.S., Giardina, S.F., Paty, P., Notterman, D.A., Barany, F. 2009. Emerging paradigms in cancer genetics: some important findings from high-density single nucleotide polymorphism array studies. *Cancer Res*. 69: 723-727.

Barrett, T.B., Emberton, J.E., Nievergelt, C.M., Liang, S.G., Hauger, R.L., Eskin, E., *et al.* 2007. Further evidence for association of GRK3 to bipolar disorder suggests a second disease mutation. *Psychiatr. Genet*. 17: 315-322.

Bartholomew, D.J. 2004. *Measuring Intelligence, Facts and Fallacies*. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 186p.

Battaglia, A. e Carey, J.C. 2003. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am. J. Med. Genet. C*. 117: 3-14.

Beaulieu, M.A. 2013. Linking the Fragile X mental retardation protein to the lipoxygenase pathway. *Med. Hypotheses*. 80: 289-291.

Benovic, J.L., Onorato, J.J., Arriza, J.L., Stone, W.C., Lohse, M., Jenkins, N.A., *et al.* 1991. Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2: a new member of the receptor kinase family. *J. Biol. Chem*. 266: 14939-14946.

Bernardini, L., Alesi, V., Loddo, S., Novelli, A., Bottillo, I., Battaglia, A., *et al.* 2010. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *Eur. J. Hum. Genet*. 18: 178-185.

Bhasin, T.K., Brocksen, S., Avchen, R.N., van Naarden Braun, K. 2006. Prevalence of four developmental disabilities among children aged 8 years--Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Surveillance Program, 1996 and 2000. *MMWR. Surveill. Summ.* 55: 1-9.

Boghossian-Sell, L., Mewar, R., Harrison, W., Shapiro, R.M., Zackai, E.H., Carey, J., *et al.* 1994. Molecular mapping of the Edwards syndrome phenotype to two noncontiguous regions on chromosome 18. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 476-483.

Bollen, E. e Prickaerts, J. 2012. Phosphodiesterases in neurodegenerative disorders. *IUBMB Life.* 64: 965-970.

Botstein, D. e Risch, N. 2003. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* 33: 228-237.

Brown, B.J., Hilfiker, H., DeMarco, S.J., Zacharias, D.A., Greenwood, T.M., Guerini, D., Strehler, E.E. 1996. Primary structure of human plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3. *Biochim. Biophys. Acta.* 1283: 10-13.

Bruno, D.L., Ganesamoorthy, D., Schoumans, J., Bankier, A., Coman, D., Delatycki, M. *et al.* 2009. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J. Med. Genet.* 46: 123-131.

Brusius-Facchin, A.C., De Souza, C.F., Schwartz, I.V., Riegel, M., Melaragno, M.I., Correia, P., Moraes, L.M., Llerena, J.Jr., Giugliani, R., Leistner-Segal, S. 2012. Severe phenotype in MPS II patients associated with a large deletion including contiguous genes. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A:1055-1059.

Bryson, S.E., Bradley, E.A., Thompson, A., Wainwright, A. 2008. Prevalence of autism among adolescents with intellectual disabilities. *Can. J. Psychiatry.* 53: 449-459.

Carlisle, H.J., Luong, T.N., Medina-Marino, A., Schenker, L., Khorosheva, E., Indersmitten, T., *et al.* 2011. Deletion of densin-180 results in abnormal behaviors associated with mental illness and reduces mGluR5 and DISC1 in the postsynaptic density fraction. *J. Neurosci.* 31: 16194-16207.

Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. 1970. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* 60: 315-319.

Chai, J.H., Locke, D.P., Grealley, J.M., Knoll, J.H.M., Ohta, T., Dunai, J., Yavor, A., *et al.* 2003. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 898-925.

Cioni, G., Di Paco, M.C., Bertuccelli, B., Paolicelli, P.B., Canapicchi, R. 1997. MRI findings and sensorimotor development in infants with bilateral spastic cerebral palsy. *Brain Dev.* 19: 245-253.

Cirigliano, V., Ejarque, M., Canadas, M., Paz Lloveras, A.P., del Mar Perez, M., Fuster, C., Egozcue, J. 2001. Clinical Application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol. Hum. Reprod.* 7: 1001-1006.

Cisternas, F.A., Vincent, J.B., Scherer, S.W., Ray, P.N. 2003. Cloning and characterization of human CADPS and CADPS2, new members of the Ca(2+)-dependent activator for secretion protein family. *Genomics.* 81: 279-291.

Coffee, B., Keith, K., Albizua, I., Malone, T., Mowrey, J., Sherman, S.L., Warren, S.T. 2009. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 85: 503-514.

Conrad, D.F., Andrews, T.D., Carter, N.P., Hurles, M.E., Pritchard, J.K. 2006. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat. Genet.* 38: 75-81.

Conrad, D.F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., *et al.* 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 464: 704-712.

Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., Vu, T.H., Baker, C., Williams, C., *et al.* 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat. Genet.* 43: 838-846.

Cui, Q. e So, K. F. 2004. Involvement of cAMP in neuronal survival and axonal regeneration. *Anat. Sci. Int.* 79: 209–212.

Das, D. 2013. Molecular aberration studies in cases of idiopathic mental retardation: An update. *Indian J. Hum. Gen.* 19: 123-124.

de Muelenaere, A., Fryns, J.P., van den Berghe, H. 1981. Familial partial distal 18q (18q22-18q23) trisomy. *Ann. Genet.* 24: 184-186.

de Ravel, T.J., Devriendt, K., Fryns, J.P., Vermeesch, J.R. 2007. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur. J. Pediatr.* 166: 637-643.

de Vries, B.B., van den Ouweland, A.M., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H.J., Mol, E., Gelsema, K., *et al.* 1997. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 660-667.

de Vries, B.B., Winter, R., Schinzel, A., van Ravenswaaij-Arts, C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J. Med. Genet.* 40: 385-398.

de Vries, B.B., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D.A., Vissers, L.E.L.M., Janssen, I.M., *et al.* 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 606-616.

Dermody, J., Tolias, P. e Toruner, G.A. 2012. Chromosomal microarrays: influential players in the diagnosis of developmental disorders. *Person. Med.* 9: 167-169.

Dorus, S., Vallender, E.J., Evans, P.D., Anderson, J.R., Gilbert, S.L., Mahowald, M., *et al.* 2004. Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell* 119: 1027-1040.

Edelmann, L. e Hirschhorn, K. 2009. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1151: 157-166.

Elia, J., Gai, X., Xie, H.M., Perin, J.C., Geiger, E., Glessner, J.T., D'arcy, M., *et al.* 2010. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol. Psychiatry.* 15: 637-646.

Ensenauer, R.E., Adeyinka, A., Flynn, H.C., Michels, V.V., Lindor, N.M., Dawson, D.B., *et al.* 2003. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1027-1040.

Fan, Y.S., Jayakar, P., Zhu, H., Barbouth, D., Sacharow, S., Morales, A., Carver, V., *et al.* 2007. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum. Mut.* 28: 1124-1132.

Firth, H.V., Richards, S.M., Bevan, A.P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., *et al.* 2009. DECIPHER: database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 524-533.

Flandin, P., Zhao, Y., Vogt, D., Jeong, J., Long, J., Potter, G., *et al.* 2011. *Lhx6* and *Lhx8* coordinately induce neuronal expression of *Shh* that controls the generation of interneuron progenitors. *Neuron* 70: 939-950.

Flint, J. e Wilkie, A.O. 1996. The genetics of mental retardation. *Br. Med. Bull.*, 52: 453-464.

Fombonne, E. 2003. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J. Autism Dev. Disord.* 33: 365-382.

Freson, K., Hashimoto, H., Thys, C., Wittevrongel, C., Danloy, S., Morita, Y., Shintani, N., *et al.* 2004. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a physiological inhibitor of platelet activation. *J. Clin. Invest.* 113: 905-912.

Fryns, J.P., Detavernier, F., van Fleteren, A., van den Berghe, H. 1978. Partial trisomy 18q in a newborn with typical 18 trisomy phenotype. *Hum. Genet.* 44: 201-205.

Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., *et al.* 1999. Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J. Biol. Chem.* 274: 8224-8230.

Gecz, J., Oostra, B.A., Hockey, A., Carbonell, P., Turner, G., Haan, E. A., *et al.* 1997. FMR2 expression in families with FRAXE mental retardation. *Hum. Molec. Genet.* 6: 435-441.

Gijsbers, A.C., Lew, J.Y., Bosch, C.A., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., van Haeringen, A., den Hollander, N.S., *et al.* 2009. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 1394-1402.

Graff J. e Mansuy, I.M. 2009. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur. J. Neurosci.* 30: 1-8.

Gratacos, M., Costas, J., de Cid, R., Bayes, M., Gonzalez, J.R., Baca-Garcia, E., de Diego, Y., *et al.* 2009. Identification of new putative susceptibility genes for several psychiatric disorders by association analysis of regulatory and non-synonymous SNPs of

306 genes involved in neurotransmission and neurodevelopment. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 150B: 808-816.

Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., *et al.* 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science.* 328: 710-722.

Grimshaw, G.M., Szczepura, A., Hultén, M., MacDonald, F., Nevin, N.C., Sutton, F., Dhanjal, S. 2003. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol. Assess.* 7: 1-77.

Grossman, H.J. 1983. Classification in mental retardation. Washington, DC: American Association on Mental Retardation. 228p.

Guerra, M. 2004. FISH (Fluorescent in situ Hybridization): Conceitos e Aplicações na Citogenética. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, 176p.

Hagerman, R. e Hagerman, P. 2013. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol.* 12: 786-798.

Hattori, K., Tanaka, H., Yamamoto, N., Teraishi, T., Hori, H., Kinoshita, Y., *et al.* 2012. Blood CADPS2ΔExon3 expression is associated with intelligence and memory in healthy adults. *Biol. Psychol.* 89: 117-122.

Heikura, U., Taanila, A., Olsen, P., Hartikainen, A.L., von Wendt, L., Jarvelin, M.R. 2003. Temporal changes in incidence and prevalence of intellectual disability between two birth cohorts in Northern Finland. *Am. J. Ment. Retard.* 108:19-31.

Hochstenbach, R., van Binsbergen, E., Engelen, J., Nieuwint, A., Polstra, A., Poddighe, P., Ruivenkamp, C., *et al.* 2009. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur. J. Med. Genet.* 52: 161-169.

Hoyer, J., Dreweke, A., Becker, C., Gohring, I., Thiel, C.T., Peippo, M.M., *et al.* 2007. Molecular karyotyping in patients with mental retardation using 100 K single-nucleotide polymorphism arrays. *J. Med. Genet.* 44: 629-636.

Hultén, M.A., Dhanjal, S., Pertl, B. 2003. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reprod.* 126: 279-297.

Iafate, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Y., Scherer, S.W., Lee, C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* 36: 949-951.

Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., Inagaki, M. 2002. Densin-180 interacts with delta-catenin/neural plakophilin-related armadillo repeat protein at synapses. *J. Biol. Chem.* 277: 5345-5350.

Jacobson, J. e Mulick, J. 1996. Manual of diagnosis and professional practice in mental retardation. Washington, DC: American Psychological Association. 540p.

Jancic, D., Lopez de Armentia, M., Valor, L. M., Olivares, R., Barco, A. 2009. Inhibition of cAMP response element-binding protein reduces neuronal excitability and plasticity, and triggers neurodegeneration. *Cereb. Cortex.* 19: 2535-2547.

Kabra, M. e Gulati, S. 2003. Mental retardation. *Indian J. Pediatr.* 70: 153-158.

Kaminsky, E.B., Kaul, V., Paschall, J., Church, D.M., Bunke, B., Kunig, D., Moreno-De-Luca, D., *et al.* 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet. Med.* 13: 777-784.

Kaufman, L., Ayub, M., Vincent, J.B. 2010. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J. Neurodev. Disord.* 2: 182-209.

Knight, S.J., Horsley, S.W., Regan, R., Lawrie, N.M., Maher, E.J., Cardy, D.L., *et al.* 1997. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur. J. Hum. Genet.* 5: 1-8.

Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., *et al.* 1998. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J. Biol. Chem.* 273: 291-295.

Koolen, D.A., Pfundt, R., de Leeuw, N., Hehir-Kwa, J.Y., Nillesen, W.M., Neefs, I., *et al.* 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum. Mutat.* 30: 283-292.

Kriek, M., White, S.J., Szuhai, K., Knijnenburg, J., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., Breuning, M.H. 2006. Copy number variation in regions flanked (or unflanked) by duplicons among patients with developmental delay and/or congenital malformations; detection of reciprocal and partial Williams-Beuren duplications. *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 180-189.

Kriek, M. 2007. The human genome; you gain some, you lose some. Center for Human and Clinical Genetics, Faculty of Medicine/Leiden University Medical Center (LUMC). Doctoral thesis, Leiden University, 208p.

Ku, C.S., Naidoo, N., Pawitan, Y. 2011. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum. Genet.* 129: 351-370.

Kuhlenbaumer, G., Hullmann, J., Appenzeller, S. 2011. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum. Mutat.* 32: 144-151.

Kuruvilla, R., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Lonze, B. E., Valdez, G., Ye, H., Ginty, D.D. 2004. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell.* 118: 243-255.

Lakics, V., Karran, E.H., Boess, F.G. 2010. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*. 59: 367-374.

Lalonde, E., Albrecht, S., Ha, K.C., Jacob, K., Bolduc, N., Polychronakos, C., *et al.* 2010. Unexpected allelic heterogeneity and spectrum of mutations in Fowler syndrome revealed by next-generation exome sequencing. *Hum. Mutat.* 31: 918-923.

Landegent, J.E., Jansen in de Wal, N., Fisser-Groen, Y.M., Bakker, E., van der Ploeg, M., Pearson, P.L. 1986. Fine mapping of the Huntington disease linked D4S10 locus by non-radioactive in situ hybridization. *Hum. Genet.* 73: 354-357.

Lee, B.H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.C., Elsasser, S., Chen, P.C., Gartner, C., *et al.* 2010. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 467: 179-184.

Leonard, H. e Wen, X. 2002. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8: 117-134.

Leung, W.C., Lau, E.T., Lao, T.T., Tang, M.H. 2004. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 4: 333-337.

Li, X.Y., Shi, X.Y., Ju, J., Hu, X.H., Yang, X.F., Zou, L.P. 2012. A novel iduronate 2-sulfatase mutation in a Chinese family with mucopolysaccharidosis type II. *World J. Pediatr.* 8: 281-283.

Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D.C. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80: 224-234.

Linnankivi, T., Tienari, P., Somer, M., Kahkonen, M., Lonnqvist, T., *et al.* 2006. 18q deletions: clinical, molecular, and brain MRI findings of 14 individuals. *Am. J. Med. Genet.* 140A: 331-339.

Loesch, D. e Hagerman, R. 2012. Unstable mutations in the FMR1 gene and the phenotypes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 769: 78-114.

Luckasson, R., Borthwick-Duffy, S., Buntinx, W.G.E., Coulter, D.L., Craig, E.M., *et al.* 2002. Mental retardation, definition, classification and systems of supports. Washington, DC: American Association on Mental Retardation. 238p.

McCarroll, S.A., Hadnott, T.N., Perry, G.H., Sabeti, P.C., Zody, M.C., Barrett, J.C. *et al.* 2006. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat. Genet.* 38: 86-92.

McMullan, D.J., Bonin, M., Hehir-Kwa, J.Y., de Vries, B.B., Dufke, A., Rattenberry, E., *et al.* 2009. Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Hum. Mutat.* 30: 1082-1092.

Mefford, H.C., Batshaw, M.L., Hoffman, E.P. 2012. Genomics, intellectual disability, and autism. *N. Engl. J. Med.* 366: 733-743.

Mercer, A., Ronnholm, H., Holmberg, J., Lundh, H., Heidrich, J., Zachrisson, O., *et al.* 2004. PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 76: 205-215.

Mewar, R., Kline, A.D., Harrison, W., Rojas, K., Greenberg, F., Overhauser, J. 1993. Clinical and Molecular Evaluation of Four Patients with Partial Duplications of the Long Arm of Chromosome 18. *Am.J. Hum. Genet.* 53: 1269-1278.

Mila, M., Sanchez, A., Badenas, C., Brun, C., Jimenez, D., Villa, M.P., *et al.* 1997. Screening for FMR1 and FMR2 mutations in 222 individuals from Spanish special schools: identification of a case of FRAXE-associated mental retardation. *Hum. Genet.* 100: 503-507.

Miller, D.T., Shen, Y., Wu, B.L. 2008. Oligonucleotide microarrays for clinical diagnosis of copy number variation. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 8: Unit. 8.12.

Miller, D.T., Adam, M.P., Aradhya, S., Biesecker, L.G., Brothman, A.R., Carter, N.P., *et al.* 2010. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am. J. Med. Genet.* 86, 749-764.

Moeschler, J.B. e Shevell, M. 2006. Clinical Genetic Evaluation of the Child With Mental Retardation or Developmental Delays. *Pediatrics.* 117: 2304-2316.

Morrow, E.M. 2010. Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 49: 1091-1104.

Murray, A., Youngs, S., Dennis, N., Latsky, L., Linehan, P., McKechnie, N., *et al.* 1996. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum. Mol. Genet.* 5: 727-735.

Nagase, T., Kikuno, R., Nakayama, M., Hirosawa, M., Ohara, O. 2000. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 7: 273-281.

Nagase, T., Kikuno, R., Ohara, O. 2001. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXI. The complete sequences of 60 new cDNA clones from brain which code for large proteins. *DNA Res.* 8: 179-187.

Napoli, I., Mercaldo, V., Boyl, P.P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., Di Marino, D., *et al.* 2008. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell.* 134: 1042-54.

Ning, Y., Roschke, A., Smith, A.C.M., Macha, M., Precht, K., Riethman, H., *et al.* 1996. A complete set of human telomeric probes and their clinical application.

National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine collaboration. *Nat. Genet.* 14: 86-89.

Nosarti, C., Rushe, T.M., Woodruff, P.W., Stewart, A.L., Rifkin, L., Murray, R.M. 2004. Corpus callosum size and very preterm birth: relationship to neuropsychological outcome. *Brain.* 127: 2080-2089.

Paciorkowski, A.R. e Fang, M. 2009. Chromosomal microarray interpretation: what is a child neurologist to do? *Pediatr. Neurol.* 41: 391-398.

Park, S.J., Jung, E.H., Ryu, R.S., Kang, H.W., Ko, J.M., Kim, H.J., *et al.* 2011. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Mol. Cytogenet.* 4:12.

Patterson, M.C. e Zoghbi, H.Y. 2003. Mental retardation. X marks the spot. *Neurology.* 61: 156-157.

Pertl, B., Kopp, S., Kroisel, P.M., Hausler, M., Sherlock, J., Winter, R., Adinolfi, M. 1997. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177: 899-906.

Petek, E., Windpassinger, C., Vincent, J.B., Cheung, J., Boright, A.P., Scherer, S.W., *et al.* 2001. Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 848-858.

Pieretti, M., Zhang, F.P., Fu, Y.H., Warren, S.T., Oostra, B.A., Caskey, C.T., Nelson, D.L. 1991. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 66:817-822.

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2934-2938.

Pinkel, D., Se graves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., *et al.* 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* 20: 207-211.

Potocki, L., Bi, W., Treadwell-Deering, D., Carvalho, C.M., Eifert, A., Friedman, E.M., Glaze, D., *et al.* 2007. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 633-649.

Procter, M., Chou, L.S., Tang, W., Jama, M., Mao, R. 2006. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin. Chem.* 52: 1276-1283.

Quiroga, R., Monfort, S., Oltra, S., Ferrer-Bolufer, I., Roselló, M., Mayo, S., *et al.* 2011. Partial Duplication of 18q Including a Distal Critical Region for Edwards Syndrome in a Patient with Normal Phenotype and Oligoasthenospermia: Case Report. *Cytogenet. Genome Res.* 133: 78-83.

Ramocki, M.B. e Zoghbi, H.Y. 2008. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature.* 455: 912-918.

Rao, J.S., Rapoport, S.I., Kim, H.W. 2009. Decreased GRK3 but not GRK2 expression in frontal cortex from bipolar disorder patients. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12: 851-860.

Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., *et al.* 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am. J. Med. Genet. Part A.* 140: 2063-2074.

Ravnan, J.B., Tepperberg, J.H., Papenhausen, P., Lamb, A.N., Hedrick, J., Eash, D., *et al.* 2006. Subtelomere FISH analysis of 11,688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J. Med. Genet.* 43: 478-489.

Redeker, E.J.W., de Visser, A.S.H., Bergen, A.A.B., Mannens, M.M.A.M. 2008. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. *Mol. Vis.* 14: 836-840.

Redolfi, E., Montagna, C., Mumm, S., Affer, M., Susani, L., Reinbold, R., Hol, F., *et al.* 1998. Identification of CXorf1, a novel intronless gene in Xq27.3, expressed in human hippocampus. *DNA Cell. Biol.* 17: 1009-1016.

Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., *et al.* 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 444: 444-454.

Regier, D.A., Friedman, J.M., Marra, C.A. 2010. Value for money? Array genomic hybridization for diagnostic testing for genetic causes of intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 765-772.

Ritney, C.D. 2003. Learning difficulties: what the neurologist needs to know. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* 74: 30-36.

Rooms, L., Reyniers, E., Kooy, R.F. 2005. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum. Mutat.* 25: 513-524.

Sadakata, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., Katoh-Semba, R., *et al.* 2007. Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients. *J. Clin. Invest.* 117: 931-943.

Sagoo, G.S., Butterworth, A.S., Sanderson, S., Shaw-Smith, C., Higgins, J.P., Burton, H. 2009. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and metaanalysis of 19 studies and 13.926 subjects. *Genet. Med.* 11: 139-146.

Salvador-Carulla, L. e Bertelli, M. 2008. “Mental retardation” or “intellectual disability”: time for a conceptual change. *Psychopathology* 41: 10-16.

Saus, E., Brunet, A., Armengol, L., Alonso, P., Crespo, J.M., Fernández-Aranda, F., Guitart, M., *et al.* 2010. Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients. *J. Psychiatr. Res.* 44: 971-978.

Schalock, R.L., Borthwick-Duffy, S.A., Bradley, V.J., Buntinx, W.H.E., Coulter, D.L., Craig, E.M., *et al.* 2010. Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports. American Association on Intellectual and Developmental Disabilities, Washington, DC.

Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., Mandel, J. L. 2001. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 8844-8849.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30: e57.

Sharp, A.J. 2009. Emerging themes and challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum. Mutat.* 30: 135-144.

Shevell, M., Ashwal, S., Donley, D., Flint, J., Gingold, M., Hirtz, D., *et al.* 2003. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay. *Neurology.* 60: 367-380.

Singleton, A.B. 2011. Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol.* 10: 942-946.

Slager, R.E., Newton, T.L., Vlangos, C.N., Finucane, B., Elsea, S.H. 2003. Mutations in RAI1 associated with Smith-Magenis syndrome. *Nat. Genet.* 33: 466-468.

Slater, H.R., Bruno, D.L., Ren, H., Pertile, M., Schouten, J.P., Choo, K.H. 2003. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J. Med. Genet.* 40: 907-912.

Smeets, D.F. 2004. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin. Biochem.* 37: 439-446.

Smith, A.C., Dykens, E., Greenberg, F. 1998. Behavioral phenotype of Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Am. J. Med. Genet.* 81: 179-185.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H. *et al.* 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Gen. Chrom. Cancer.* 20: 399-407.

Speidel, D., Varoqueaux, F., Enk, C., Nojiri, M., Grishanin, R.N., Martin, T.F., *et al.* 2003. A family of Ca²⁺-dependent activator proteins for secretion: comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *J. Biol. Chem.* 278(52): 52802-52809.

Stankiewicz, P. e Beaudet, A.L. 2007. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 182-192.

Strelnikov, V., Nemtsova, M., Chesnokova, G., Kuleshov, N., Zaletayev, D. 1999. A simple multiplex FRAXA, FRAXE, and FRAXF PCR assay convenient for wide screening programs. *Hum. Mutat.* 13: 166-169.

Stromme, P. 2000. Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Dev. Med. Child. Neurol.* 42: 76-86.

Teer, J.K. e Mullikin, J.C. 2010. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum. Mol. Genet.* 19: 145-151.

Telias, M., Segal, M., Ben-Yosef, D. 2013. Neural differentiation of Fragile X human Embryonic Stem Cells reveals abnormal patterns of development despite successful neurogenesis. *Dev. Biol.* 374: 32-45.

Topper, S., Ober, C., Das, S. 2011. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin. Genet.* 80: 117-126.

Toscano, C.D. e Guilarte, T.R. 2005. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 49: 529-554.

Trask, B.J. 2002. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat. Rev. Genet.* 3: 769-78.

Treadwell-Deering, D.E., Powell, M.P., Potocki, L. 2010. Cognitive and behavioral characterization of the Potocki-Lupski syndrome (duplication 17p11.2). *J. Dev. Behav. Pediatr.* 31: 137-143.

Turleau, C., Chavin-Colin, F., Narbouton, R., Asensi, D., Grouchy, J.D. 1980. Trisomy 18q-. Trisomy mapping of chromosome 18 revisited. *Clinical Genet.* 18: 20-26.

Turleau, C. 2008. Monosomy 18p. *Orphanet J. Rare Diseases.* 3: 4.

Tzeng, C.C., Tzeng, P.Y., Sun, H.S., Chen, R.M., Lin, S.J. 2000. Implication of screening for FMR1 and FMR2 gene mutation in individuals with nonspecific mental retardation in Taiwan. *Diagn. Mol. Pathol.* 9: 75-80.

Ullmann, R., Turner, G., Kirchoff, M., Chen, W., Tonge, B., Rosenberg, C., *et al.* 2007. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum. Mutat.* 28: 674-682.

Urduingio, R.G., Sanchez-Mut, J.V., Esteller M. 2009. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol.* 8: 1056-1072.

van Karnebeek, C.D., Jansweijer, M.C., Leenders, A.G., Offringa, M., Hennekam, R.C. 2005. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 6-25.

van Rompay, A.R., Johansson, M., Karlsson, A. 1999. Identification of a novel human adenylate kinase: cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein. *Europ. J. Biochem.* 261: 509-516.

Veltman, J.A. 2006. Genomic microarrays in clinical diagnosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 18: 598-603.

Vermeesch, J.R., Fiegler, H., de Leeuw, N., Szuhai, K., Schoumans, J., Ciccone, R., *et al.* 2007. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 15: 1105-1114.

Versacci, P., Digilio, M. C., Sauer, U., Dallapiccola, B., Marino, B. 2005. Absent pulmonary valve with intact ventricular septum and patent ductus arteriosus: a specific cardiac phenotype associated with deletion 18q syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 138A: 185-186.

Vissers, L.E., de Vries, B.B., Osoegawa, K. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1261-1270.

Vissers, L.E., de Vries, B.B., Veltman, J.A. 2010. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J. Med. Genet.* 47: 289-297.

Wang, L., Xu, J., Wu, Q., Dai, J., Ye, X., Zeng, L., Ji, C., *et al.* 2003. Cloning and characterization of a novel splice variant of the brain-specific protein densin-180. *Int. J. Mol. Med.* 11: 257-260.

Waschek, J.A. 2002. Multiple actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in nervous system development and regeneration. *Dev. Neurosci.* 24: 14-23.

Wiegant, J., Kalle, W., Mullenders, L., Brookes, S., Hoovers, J.M., Dauwerse, J.G. *et al.* 1992. High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum. Mol. Genet.* 1: 587-591.

Wilson, S.M., Bhattacharyya, B., Rachel, R.A., Coppola, V., Tessarollo, L., Householder, D.B., Fletcher, C.F., *et al.* 2002. Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in *Usp14*, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nature Genet.* 32: 420-425.

Wincent, J., Anderlid, B.M., Lagerberg, M., Nordenskjold, M., Schoumans, J. 2011. High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting. *Clin. Genet.* 79: 147-157.

World Health Organization. Chapter V: mental retardation (F70-F79). The ICD-10. Classification of mental and behavioural disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines. 10th revision, edition 2010.

Xiang, B., Zhu, H., Shen, Y., Miller, D.T., Lu, K., Hu, X., Andersson, H.C., *et al.* 2010. Genome-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation: a multicenter experience of 1499 clinical cases. *J. Mol. Diagn.* 12: 204–212.

Xu, J. e Chen, Z. 2003. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 117: 15-24.

Yeargin-Allsopp, M., Murphy, C.C., Cordero, J.F., Decouflé, P., Hollowell, J.G. 1997. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. *Dev. Med. Child. Neurol.* 39: 142-149.

Yobb, T.M., Somerville, M.J., Willatt, L., Firth, H.V., Harrison, K., MacKenzie, J., *et al.* 2005. Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 865-876.

Yunis, J.J. 1976. High resolution of human chromosomes. *Science*. 191: 1268-1270.

Zahir, F. e Friedman, J.M. 2007. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clin. Genet*. 72: 271-287.

Zanni, G., Cali, T., Kalscheuer, V.M., Ottolini, D., Barresi, S., Lebrun, N., *et al*. 2012. Mutation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca²⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 14514-14519.

Zhang, Z.F., Ruivenkamp, C., Staaf, J., Zhu, H., Barbaro, M., Petillo, D., *et al*. 2008. Detection of submicroscopic constitutional chromosome aberrations in clinical diagnostics: a validation of the practical performance of different array platforms. *Eur. J. Hum. Genet*. 16: 786-792.

Zhao, Y., Guo, Y.J., Tomac, A.C., Taylor, N.R., Grinberg, A., Lee, E.J., *et al*. 1999. Isolated cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene *Lhx8*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 15002-15006.

Zhao, Y., Marin, O., Hermes, E., Powell, A., Flames, N., Palkovits, M., *et al*. 2003. The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100: 9005-9010.

Zoua, G., Zhang, J., Li, X.W., He, L., He, G., Duan, T. 2008. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction to detect chromosomal anomalies in spontaneous abortion. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 103: 237-240.

Recursos da Internet:

DECIPHER - *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* - <https://decipher.sanger.ac.uk/application/>. Acesso em Janeiro de 2014.

DGV - *Database Of Genomic Variation* - <http://projects.tcag.ca/variation/>. Acesso em Janeiro de 2014.

ISCA - *The International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium* - <https://www.iscaconsortium.org>. Acesso em Janeiro de 2014.

RefSeq - *NCBI Reference Sequences* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>. Acesso em Janeiro de 2014.

APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Investigação das Causas Genéticas e Genômicas do Retardo Mental Autossômico

Pesquisador Responsável: Dr. Aparecido Divino da Cruz

Nome (sujeito da pesquisa): _____,

RG/Certidão nascimento _____,

Naturalidade _____, Idade _____,

Endereço _____,

Neste ato representado por mim:

Nome dos representantes legais:

Pai _____,

Naturalidade _____, Idade _____,

Estado Civil _____, Profissão _____,

Endereço _____

Mãe _____

Naturalidade _____, Idade _____,

Estado Civil _____, Profissão _____,

Endereço _____

Está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado: Investigação das Causas Genéticas e Genômicas do Retardo Mental Autossômico cujos objetivos e justificativas são: propor a investigação genética do paciente com indicação clínica de retardo mental, visto que o diagnóstico de um paciente com essa síndrome estabelece uma oportunidade valiosa de fazer estudos na família, identificando outros afetados e

portadores, e de realizar um aconselhamento genético eficiente permitindo a prevenção de novos casos, possibilitando assim, um tratamento específico, diminuindo o impacto econômico, social e pessoal que esta síndrome acarreta.

Os critérios de inclusão são: pacientes encaminhados ao Núcleo de Pesquisas Replicon e LaGene com indicação clínica de retardo mental, acompanhados dos pais biológicos que concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os critérios de exclusão são: indivíduos maiores de 18 anos, com indicação clínica de retardo mental, que não concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, ou menores, cujos pais biológicos não aceitarem a participação do(a) filho(a) neste estudo, ou que não assinarem o TCLE, ou ainda, pacientes que apresentarem outras doenças genéticas já diagnosticadas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a doação voluntária de uma amostra de sangue de meu(minha) filho(a) biológico(a) para colaborar com o diagnóstico do retardo mental, juntamente com uma amostra, doada voluntariamente, de meu sangue para comparação com a finalidade de determinar causas genéticas e sua hereditariedade.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: a confirmação da causa do retardo mental (quando tiver uma etiologia genética). Estou ciente ainda, que a técnica proposta já foi realizada em outros estudos e é reprodutiva, evitando assim possíveis riscos.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Durante a coleta do sangue, você poderá sentir uma dor leve a moderado, em decorrência da aplicação da agulha. Podem, também, ocorrer a formação de hematomas que não são comuns, e caso isso ocorra, você será imediatamente encaminhado(a) ao Serviço Médico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Estou ciente de que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado, ou elemento, que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

O pesquisador responsável, envolvido com o referido projeto é: Aparecido Divino da Cruz, e com ele poderei manter contato pelos telefones: (62)3946-1443/3946-1086.

É assegurada a minha assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Tenho sido orientado ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, autorizo a participação de (nome do sujeito da pesquisa) _____ na referida pesquisa, e manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou pagar.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Goiânia, ____ de _____ de 201__.

(Assinatura do pai)

(Assinatura da mãe)

Pesquisador Dr. Aparecido Divino da Cruz

Apêndice 2

PROTOCOLO DE ATENDIMENTO (ANAMNESE)

Número do protocolo: CMA. _____ . _____
Paciente: _____ Sexo: () Mas () Fem
Data de nascimento: ____/____/____ Idade _____ Etnia _____
Escolaridade: _____
Filiação: _____
Número protocolo: CMA. _____ . _____
Mãe: _____ Idade: _____

Número protocolo: CMA. _____ . _____
Pai: _____ Idade: _____
Endereço: _____

Bairro: _____ Cep: _____
Cidade: _____
Telefones: Resid: () _____ Celular: () _____
Comercial: () _____ Recado: () _____
e-mail: _____
Faz uso de medicamentos? _____

Encaminhado pelo médico: _____
Instituição: _____
Indicação: _____
Observações: _____

DADOS E MEDIDAS DO PACIENTE

Altura: _____ Peso: _____ Perímetro cefálico: _____ Cintura: _____
Distância oculares: _____ Narina: _____ Mãos: _____ Braços: _____
Pernas: _____ Dedos: _____ Olhos: _____ Orelhas: _____
Tipo sanguíneo: _____ RH: _____ Implantação da orelha: _____ Arcada dentária: _____
Palato _____ Pescoço: _____ Pés: _____ Genitália: _____
Tônus muscular: _____ Ossos: _____ Abdômen: _____
Umbigo: _____ Palma das mãos: _____ Pigmentação da pele: _____
Irritabilidade: _____ Convulsões: _____ Data início: ____/____/____ Frequência _____
Movimentos anormais: () Mãos () Cabeça () Olhos. Descrição do movimento _____

Observação: _____

HABITOS

Pai:
Fuma? () Sim () Não. Se sim, há quanto tempo? _____
Consome bebida alcoólica? () Sim () Não. Se sim, há quanto tempo? _____
Já usou outras substâncias? () Sim () Não. Se sim, qual e há quanto tempo? _____
Trabalha? () Sim () Não. Se sim, qual a profissão e há quanto tempo? _____

Mãe:
Fuma? () Sim () Não. Se sim, há quanto tempo? _____
Se sim, fumou durante a gestação? _____
Consome bebida alcoólica? () Sim () Não. Se sim, há quanto tempo? _____
Se sim, bebeu durante a gestação? _____

Já usou outras substâncias? () Sim () Não. Se sim, qual e há quanto tempo? _____
Se sim, usou durante a gestação? _____
Trabalha? () Sim () Não. Se sim, há quanto tempo e qual profissão? _____
Observações: _____

DADOS FAMILIARES

Possui Irmãos? () Sim () Não.
Se sim, quantos e quais idades? _____

Possui irmãos com alguma doença genética conhecida ou com transtornos físicos ou mentais? _____

Possui algum parente próximo com alguma doença genética conhecida ou com transtornos físicos ou mentais? _____

Observações: _____

() Laqueadura () Vasectomia

CONSANGUINIDADE

Irmãos do pai (Idade, Est. Civil, Filhos N e/ou A): _____

Irmãos da mãe (Idade, Est. Civil, Filhos N e/ou A): _____

Casos semelhantes na família? _____
Observações: _____

ANTECEDENTES GESTACIONAIS:

Duração da gravidez? _____

() Febre – Período? _____ () Rubéola – Período? _____

() Toxoplasmose – Período? _____ () VDRL – Período? _____

() Hepatite – Período? _____ () HIV – Período? _____

Outras Infecções? _____ Período? _____

Outras Infecções? _____ Período? _____

Radiografias: () Não () Torácicas () Abdominais () Odontológicas

() Com Proteção () Sem Proteção – Período? _____

Outras exposições a radiação? _____

() Perdas Sanguíneas – Período? _____

() Medicações: Tipo: _____ Motivo: _____ Período: _____

() Medicações: Tipo: _____ Motivo: _____ Período: _____

() Medicações: Tipo: _____ Motivo: _____ Período: _____

() Anticoncepcionais: Tipo: _____ Período: _____

() Anticonvulsivantes : Tipo: _____ Período: _____

() Sofre de gota: Remédio: _____ Período: _____

Outras Informações: _____

Parto:

() Hospitalar () Domiciliar () Médico () Parteira

Hospital: _____

() Normal – Tipo de apresentação? _____

() Fórceps – Duração? _____

() Cesariana – Motivo? _____

Condições do RN:

Peso: _____ Comprimento: _____ Pc: _____ Pt: _____

Choro: () Sim () Não Apgar ____/____ Idade Gestacional: _____ semanas

Sucção: _____ Cianose () Perm. Matern.: _____

() Ictericia: Época: _____ () Fototerapia () Exsanguíneo Transfusão

Bilirrubina Máxima: _____ (Dir) _____ (Ind) _____ (Tot) _____

Outras intercorrências: _____

Momento da notícia/Quem: _____

Primeiro tratamento recebido no hospital:

() Nenhum () Medicação () RX () Sem Informação

() Outros: _____

Anexo 1

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA – QIAamp® DNA Mini Kit

ARMAZENAMENTO:

QIAamp® Mini Coluna Centrifugação e tampões podem ser armazenado à temperatura ambiente (15-25°C) por até 1 ano sem mostrar qualquer redução no desempenho. QIAGEN Protease liofilizada pode ser armazenada à temperatura ambiente por até 12 meses sem qualquer redução no desempenho. Para armazenamento maior do que 12 meses ou se temperatura ambiente constantemente exceder 25°C, QIAGEN Protease deve ser armazenada à 2-8°C.

QIAGEN Protease reconstituída é estável por 2 meses quando armazenada à 2-8°C. Manter QIAGEN Protease solução estoque à temperatura ambiente por períodos prolongados deve ser evitado. Armazenamento à -20°C prolongará sua vida, mas repetidos congelamentos e descongelamentos devem ser evitados. Dividir a solução em alíquotas e armazenar à -20°C é recomendado.

QIAamp® DNA Mini Kits contem solução de Proteinase K pronta para uso, no qual é dissolvida em um tampão de armazenamento especialmente formulado. A Proteinase K é estável por até 1 ano após a entrega quando armazenada à temperatura ambiente. Para prolongar de tempo de vida da Proteinase K, armazenamento de 2-8°C é recomendado.

INTRODUÇÃO:

QIAamp® DNA Mini e QIAamp® DNA Blood Mini Kits fornece método rápido e fácil para purificação do DNA total para uma segura PCR e Southern blotting. O DNA total pode ser purificado através de sangue total, plasma, soro, anel leucocitário, medula óssea, outros fluídos, linfócitos, cultura de células, tecido e espécies forenses.

O simples procedimento da QIAamp® centrifugação, no qual é ideal para processamento simultâneo de múltiplas amostras, produz puro DNA pronto para amplificação direta em apenas 20 minutos. O procedimento QIAamp® é disponível para uso com sangue total fresco ou congelado e sangue que foi tratado com citrato, heparina

ou EDTA. Separação de leucócitos prévia não é necessária. O DNA é eluído em tampão AE ou água, pronto para adição direta à PCR ou outra reação enzimática. Alternativamente, pode ser armazenado à – 20°C para uso posterior. O DNA purificado é livre de proteína, nucleases e outros contaminantes ou inibidores.

O tamanho do DNA purificado usando QIAamp® Kits é de até 50 kb, com fragmentos de aproximadamente 20-30 kb predominantemente. DNA deste tamanho é desnaturado completamente durante a ciclagem termal e pode ser amplificado com alta eficiência.

PRINCÍPIO E PROCEDIMENTO:

QIAamp® DNA Mini e QIAamp® DNA Blood Mini Kits são desenhados para purificação rápida de uma média de 6 µg de DNA total através de 200 µL de sangue total humano, e até 50 µg de DNA através de 200 µL de anel leucocitário. O procedimento é disponível para usar com sangue total tratado com citrato, heparina ou EDTA; anel leucocitário; linfócitos; plasma; soro; e fluídos corpóreos. Amostras podem estar frescas ou congeladas.

- Lise com QIAGEN Protease ou Proteinase K:

O QIAamp® DNA Blood Mini Kits contêm QIAGEN Protease. A QIAGEN Protease é enzima para uso com tampão lise fornecido no kit. QIAGEN Protease está completamente livre de atividade de DNase e RNase.

O QIAamp® DNA Mini Kit contêm proteinase K, no qual é a enzima de escolha para tampão lise contendo SDS usado no protocolo de tecido, mas no qual a performance é igualmente boa no protocolo de sangue e fluídos corporais.

PURIFICAÇÃO QIAamp® Mini Coluna Centrifugação:

O procedimento de purificação de DNA do QIAamp® compreende 4 passos e é realizado usando QIAamp® mini coluna centrifugação em uma microcentrífuga padronizada, em um distribuidor a vácuo, ou totalmente automatizado no QIAcube. Os procedimentos são desenhados para assegurar que não tenha contaminação cruzada de

amostra por amostra e permite manipulação segura de amostras potencialmente infecciosas.

QIAamp® mini coluna centrifugação cabe na maioria das microcentrífugas. No protocolo de centrifugação, devido ao volume do filtrado, 2 mL de tubos de coleta (fornecido) são necessários para dar suporte a QIAamp® mini coluna centrifugação durante os passos de carregamento e lavagem.

- Absorção da QIAamp® Membrana:

As condições dos lisados tamponantes são ajustadas para permitir uma ótima ligação do DNA à QIAamp® membrana antes da amostra ser carregada na QIAamp® mini coluna centrifugação.

O DNA é absorvido na QIAamp® membrana sílica durante um breve passo de centrifugação. Condições de sal e pH no lisado asseguram que proteínas e outras contaminações, nos quais podem inibir a PCR e outras reações enzimáticas *downstream*, não sejam retidas na QIAamp® membrana.

- Remoção de contaminantes residuais:

DNA ligado à membrana é lavado em 2 passos de centrifugação. O uso de 2 tampões de lavagem diferentes, tampão AW1 e tampão AW2, melhora significativamente a purificação do DNA eluído. Condições de lavagem asseguram completa remoção de qualquer contaminante residual sem afetar o DNA de ligação.

- Eluição de Ácidos Nucléicos puros:

O DNA purificado é eluído a partir da QIAamp® mini coluna centrifugação em uma forma concentrada do tampão AE ou água. Tampão de eluição deve ser equilibrado à temperatura ambiente (15-25°C) antes de ser aplicado à coluna. O rendimento será aumentado se a QIAamp® mini coluna centrifugação for incubada com o tampão de eluição à temperatura ambiente por 5 minutos antes da centrifugação. O DNA genômico eluído é de até 50 kb de comprimento (20-30 kb) e é adequado para uso direto na PCR ou *Southern-blotting*.

Se o DNA purificado for armazenado, a eluição no tampão AE (10mM Tris-Cl; 0.5mM EDTA; pH 9.0) e armazenagem à -20°C é recomendado. Se pH alto ou EDTA afetarem a sensibilidade de aplicações *downstream*, usar água para eluição. Porém, assegure que o pH da água é de pelo menos 7.0. DNA armazenado em água é sujeito à degradação por hidrólise ácida.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES:

- QIAGEN Protease solução estoque (armazenar à 2-8°C ou -20°C):

Quando se utiliza o QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50), pipetar 1,2 mL do solvente protease dentro do frasco contendo Protease QIAGEN liofilizada, como indicado no rótulo.

QIAGEN Protease dissolvida é estável por até 2 meses quando armazenada à 2-8°C. Armazenamento à -20°C é recomendado para prolongar a vida da Protease QIAGEN, mas repetidos congelamentos e descongelamentos devem ser evitados. Por essa razão, armazenamento de alíquotas de QIAGEN Protease é recomendado.

- Tampão AL (armazenar à temperatura ambiente, 15-25°C):

Misturar o tampão AL completamente por agitação antes do uso. Tampão AL é estável por 1 ano quando estocado à temperatura ambiente.

Nota: não adicionar QIAGEN Protease ou proteinase K diretamente ao tampão AL.

- Tampão AW1 (armazenar à temperatura ambiente, 15-25°C):

Tampão AW1 é fornecido como um concentrado. Antes do uso pela primeira vez, adicionar uma quantidade apropriada de etanol (96-100%) como indicado no rótulo.

Tampão AW1 é estável por 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente.

- Tampão AW2 (armazenar à temperatura ambiente, 15-25°C):

Tampão AW2 é fornecido como um concentrado. Antes do uso pela primeira vez, adicionar uma quantidade apropriada de etanol (96-100%) como indicado no rótulo.

Tampão AW1 é estável por 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente.

- DNA carregador:

Usar DNA carregador (ex.: poli dA, poli dT, poli dA:dT) quando a amostra tiver poucas cópias (ex.: quando < 10.000 cópias estão presentes). Para preparações de DNA a partir de partículas virais livre em fluídos ou suspensões (exceto urina) usando o protocolo de sangue ou fluídos corpóreos, recomenda-se a adição de 1 µL de uma solução aquosa contendo 5-10 µg de DNA carregador (ex.: poli dA, poli At, poli dA:dT) para 200 µL de tampão AL.

QUANTIDADE DE MATERIAL DE PARTIDA:

Sangue – 200 µL

Amostras pequenas devem ser ajustadas para 200 µL com PBS antes carregamento.

Para amostras maiores do que 200 µL, a quantidade de tampão de lise e outros reagentes adicionados à amostras antes do carregamento deve ser aumentada proporcionalmente.

Anel Leucocitário - 200 µL

Preparação do anel leucocitário:

O anel leucocitário é a fração enriquecida de leucócito do sangue total. Preparar uma fração de anel leucocitário em sangue total é simples e produz aproximadamente 5-10 vezes mais de DNA do que um volume equivalente no sangue total. Prepare o anel leucocitário por centrifugação do sangue total à 2.500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (15-25 °C). Após centrifugação, 3 diferentes frações são distinguível: a camada superior clara é o plasma, a camada intermediária é o anel leucocitário

(contendo concentrado de leucócitos) e a camada inferior contém eritrócitos concentrados.

MANIPULAÇÃO DO QIAamp® MINI COLUNAS:

Devido à sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções são necessárias quando para evitar contaminação cruzada entre as preparações de amostras:

- Aplicar a amostra ou solução cuidadosamente. Pipete a amostra dentro da QIAamp® Mini Coluna sem molhar a borda da coluna.
- Mude as ponteiros entre todos os líquidos transferidos. O uso de pipeta com barreira de aerossol é recomendado.
- Evite tocar a QIAamp® membrana com a ponteira.
- Depois de todos os passos de vórtex, centrifugue brevemente o 1.5 mL tubos microcentrífugas para remover gotas de dentro da tampa.

- Centrifugação:

Centrifugação do QIAamp® mini coluna é realizada à 6.000 x g (8.000 rpm). Centrifugação QIAamp® mini coluna à velocidade máxima não afetará o DNA produzido. Quando preparação DNA por anel leucocitário ou linfócitos, velocidade máxima de centrifugação é recomendada para evitar entupimento.

Todos os passos de centrifugação devem ser realizados à temperatura ambiente (15-25°C).

- Processamento QIAamp® Mini Colunas usando uma microcentrífuga (protocolos de centrifugação):

Feche a QIAamp® mini coluna antes de colocar na microcentrífuga. Centrifugue como descrito:

- Remova a QIAamp® mini coluna e tubo coletor da microcentrífuga. Coloque a QIAamp® mini coluna em um novo tubo coletor. Descartar o filtrado e o tudo coletor. Note que o filtrado pode conter resíduos perigosos e deve ser disposto adequadamente.

- Abra somente uma QIAamp® mini coluna de cada vez e tome cuidado para evitar a formação de aerossóis.

- Para processamento paralelo eficiente de múltiplas amostras, encher uma rack com tubos coletores para os quais a QIAamp® mini coluna podem ser transferidos depois centrifugação. O tubo coletor usado contendo o filtrado pode ser descartado, e o novo tubo coletor contendo a QIAamp® mini coluna pode ser colocado diretamente na microcentrífuga.

PROTOCOLO – PURIFICAÇÃO DNA DE SANGUE OU FLUÍDOS CORPÓREOS (PROTOCOLO DE ROTAÇÃO):

Este protocolo é para total purificação de DNA (genômico, mitocondrial e viral) através de sangue total, plasma, soro, anel leucocitário, linfócitos e fluídos corpóreos usando uma microcentrífuga.

- Importantes pontos antes de começar:

- Todos os passos da centrifugação são realizados em temperatura ambiente (15-25°C);

- Use DNA carregador se a amostra contiver < 10.000, equivalente genoma;

- 200 µL de sangue total produz 3 – 12 µg de DNA. Preparações de anel leucocitário são recomendadas se um rendimento mais elevado é necessário.

- Antes de começar:

- Equilibrar amostras à temperatura ambiente (15-25°C);

- Aquecer em banho-maria ou bloco de aquecimento à 56°C para uso no passo 4;

- Equilibrar tampão AE ou água destilada à temperatura ambiente para eluição no passo 11;

- Assegurar que o tampão AW1, tampão AW2 e QIAGEN Protease tenham sido preparados de acordo com as instruções acima referentes ao preparo dos reagentes;

- Se um precipitado tiver formado no tampão AL, dissolver por incubação à 56°C.

*** PROCEDIMENTO:**

1. Pipetar 20 µL QIAGEN Protease (ou proteinase K) no fundo de um tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 1,5 mL;

2. Adicionar 200 µL de amostra ao eppendorf. Usar até 200 µL de sangue total, plasma, soro, anel leucocitário, ou fluido corpóreos, ou até 5×10^6 linfócitos em 200 µL de PBS;

Se o volume da amostra for menos do que 200 µL, adicionar um volume apropriado de PBS. QIAamp® mini coluna centrifugação co-purifica RNA e DNA quando ambos estão presentes na amostra. RNA pode inibir algumas reações enzimáticas *downstream*, mas não PCR. Se for necessário DNA genômico livre de RNA, 4 µL de uma solução estoque de RNase A (100 mg/mL) deve ser adicionada à amostra antes adição do tampão AL;

Nota: é possível adicionar QIAGEN Protease (ou proteinase K) à amostra que já tenha sido colocada no *eppendorf*. Neste caso, é importante assegurar agitação adequada após a adição da enzima.

3. Adicionar 200 µL de tampão AL à amostra. Misturar no vórtex por 15 segundos;

Para assegurar eficiente lise, é essencial que a amostra e o tampão AL sejam misturados completamente para produzir uma solução homogênea.

Se o volume da amostra for maior que 200 µL, aumentar a quantidade de QIAGEN Protease (ou Proteinase K) e tampão AL proporcionalmente; por exemplo, uma amostra de 400 µL requererá 40 µL de QIAGEN Protease (ou Proteinase K) e 400 µL de tampão AL.

Nota: não adicionar QIAGEN Protease ou Proteinase K diretamente ao tampão AL.

4. Incubar à 56°C por 10 minutos;

O produto DNA atinge o máximo após a lise por 10 minutos à 56°C. Longos tempos de incubações não têm efeito no rendimento ou na qualidade do DNA purificado.

5. Centrifugar brevemente o *eppendorf* de 1,5 mL para remover gotas de dentro da tampa;

6. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) na amostra, e misturar novamente no vórtex por 15 segundos. Depois de misturar, centrifugar brevemente o *eppendorf* de 1,5 mL para remover gotas de dentro da tampa;

Se o volume da amostra é maior do que 200 µL, aumentar a quantidade de etanol proporcionalmente; por exemplo, uma amostra de 400 µL requererá 400 µL de etanol.

7. Cuidadosamente, aplicar a mistura do passo 6 à QIAamp® mini coluna centrifugação (no tubo coletor de 2 mL) sem molhar a borda. Feche a tampa, e centrifugue à 8.000 rpm por 1 minuto. Colocar a QIAamp® mini coluna centrifugação em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido), e descartar o tubo contendo o filtrado;

Feche cada coluna centrifugação para evitar formação de aerossóis durante a centrifugação. Se o lisado não tiver passado completamente através da coluna após a centrifugação, centrifugue novamente em uma velocidade mais elevada até a QIAamp® mini coluna centrifugação esteja vazia.

8. Cuidadosamente abra a QIAamp® mini coluna centrifugação e adicione 500 µL de tampão AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue 8.000 rpm por 1 minuto. Coloque a QIAamp® mini coluna centrifugação em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido), e descarte o tubo coletor contendo o filtrado;

Não é necessário aumentar o volume de tampão AW1 se o volume da amostra original for maior do que 200 µL.

9. Cuidadosamente abra a QIAamp® mini coluna centrifugação e adicione 500 µL de tampão AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a toda velocidade 14.000 rpm por 3 minutos;

10. Recomendado: Coloque o QIAamp® mini coluna centrifugação em um novo tubo coletor de 2 mL (não fornecido) e descarte o tubo coletor velho contendo o filtrado. Centrifugue a toda velocidade por 1 minuto;

Esse passo ajuda a eliminar a chance de possível contaminação com tampão AW2.

11. Colocar o QIAamp® mini coluna centrifugação em um eppendorf de 1,5 mL (não fornecido), e descarte o tubo coletor contendo o filtrado. Cuidadosamente abra o QIAamp® mini coluna centrifugação e adicione 200 µL de tampão AE ou água destilada. Incubar à temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e então centrifugar à 8.000 rpm por 1 minuto;

Incubação de QIAamp® mini coluna centrifugação carregado com tampão AE ou água por 5 minutos à temperatura ambiente antes da centrifugação geralmente aumenta o DNA produzido.

O segundo passo de eluição com mais 200 µL de tampão AE aumentará a produção em até 15%.

Volumes maiores do que 200 µL não devem ser eluídos em um *eppendorf* de 1,5 mL pois à coluna centrifugação poderá entrar em contato com o eluato, levando à possibilidade da formação de aerossóis durante a centrifugação.

Eluição com volumes menores do que 200 µL aumentam significativamente a concentração final de DNA no eluato, mas reduz levemente o total de DNA produzido. Para amostras contendo menos do que 1 µg de DNA, eluição em 50 µL de tampão AE ou água é recomendada.

Para armazenamento de DNA em longo prazo, eluição em tampão AE e armazenando à -20°C é recomendado, uma vez que o DNA armazenado em água está sujeito à hidrólise ácida.

Uma amostra 200µL de sangue total humano (aproximadamente 5×10^6 leucócitos/mL) tipicamente produz 6 µg de DNA 200 µL de água (30 ng/µL).

Anexo 2

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA – Illustra™ GE Healthcare

ARMAZENAMENTO:

Todos os componentes do kit devem ser armazenados à temperatura ambiente (20-25 °C). Uma vez reconstituída, armazenar a Proteinase K à 4 °C. A proteinase K reconstituída em água livre DNase é estável por 4 meses quando armazenada à 4 °C.

INTRODUÇÃO:

A Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit é projetada para rápida extração e purificação de DNA genômico de sangue total, tampão leucocitário, medula óssea e células vermelhas do sangue nucleadas. O protocolo é rápido e tem sido designado para minimizar rupturas, resultando em alta qualidade do DNA genômico. O kit pode processar de 50 – 1000 µL de sangue total. O DNA genômico purificado produzido é de 4 – 6 µg em 200 µL de sangue total com uma razão de pureza (A_{260}/A_{280}) maior do que 1.7. O procedimento pode ser feito em menos de 20 minutos para produzir DNA genômico com uma pureza e qualidade que é compatível com a maioria das técnicas de biologia molecular. O kit contém reagentes e colunas suficientes para 50 purificações.

PRINCÍPIO BÁSICO:

O uso do Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit envolve os seguintes passos:

- Lise das células sanguíneas:

As células sanguíneas são lisadas por um agente caotrópico presente no tampão de lise tipo 10, na presença da proteinase K.

- Ligação do DNA genômico:

O sal caotrópico presente no tampão de lise tipo 10 promove a ligação seletiva do DNA genômico à membrana de sílica. As proteínas desnaturada são coletadas em um fluxo contínuo.

- Lavagem:

O tampão de lise tipo 10, contendo o sal caotrópico, remove proteínas e outros contaminantes do DNA genômico ligado à membrana.

- Lavagem e secagem:

O tampão de lavagem tipo 6 contendo etanol remove o sal residual e outros contaminantes.

- Eluição:

DNA genômico é eluído em um tampão de baixa força iônica.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO:

- **PROTEINASE K** (armazenar à 2-8°C):

Dissolver a **Proteinase K** liofilizada em água livre de DNase. Adicionar 1,5 mL de água livre de DNase ao frasco da Proteinase K no kit 28-9042-64 ou 3 mL a cada frasco de **Proteinase K** no kit 28-9042-65. Em amostra de uso, adicionar 500 µL água livre de DNase no frasco da **Proteinase K**. Concentração final é de 20 mg/mL. Vortex para dissolver. Armazenar a solução redissolvida à 4 °C.

- **Tampão de Lavagem tipo 6** (armazenar à temperatura ambiente, 20-25°C):

Antes do uso, adicionar etanol absoluto ao frasco contendo **Tampão de Lavagem tipo 6**. Adicionar 24 mL de etanol absoluto ao **Tampão de Lavagem tipo 6** no kit 28-9042-64 ou 120 mL de **Tampão de Lavagem tipo 6** no kit 28-9042-65. Misturar por inversão. Indicar no rótulo que este passo tenha sido realizado.

Para 10 purificações de amostras, adicionar 6 mL de etanol absoluto ao **Tampão de lavagem tipo 6** antes do uso.

- Tampão Eluição tipo 5 (armazenar à temperatura ambiente, 20-25°C):
Aquecer à 70 °C o Tampão de Eluição tipo 5 antes de iniciar o passo de eluição.

QUANTIDADE DE MATERIAL DE PARTIDA:

Sangue – 300 µL

As amostras de sangue podem ser armazenadas à 4°C ou congeladas, mas se estiverem congeladas, devem ser descongeladas completamente à temperatura ambiente.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE 50 – 300 µL DE SANGUE TOTAL – Illustra™ GE Healthcare:

PROCEDIMENTO:

1. Pipetar 20 µL de PROTEINASE K no fundo de um tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 1,5 mL;

2. Adicionar até 300 µL de sangue total ao eppendorf (ideal 200 µL);

Este protocolo é adequado para 50 – 300 µL de sangue total, tampão leucocitário e células da medula óssea. A performance ótima é obtida com 200 µL de sangue total. Quando o volume for menos do que 200 µL, fazer o volume da amostra ficar até 200 µL com PBS.

3. Adicionar 400 µL de Tampão de Lise tipo 10 ao tubo com amostra. Misturar bem no vórtex por 15 segundos;

Para assegurar eficiente lise, é essencial que a amostra e o tampão AL sejam misturados completamente para produzir uma solução homogênea.

4. Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos com intermitentes misturas no vórtex para auxiliar a lise;

No final deste estágio a cor da reação terá mudado de vermelho para marrom escuro.

5. Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 no banho-maria à 70 °C;

6. Centrifugar brevemente o *ependorff* de 1,5 mL para remover gotas de dentro da tampa;

7. Aplicar, cuidadosamente, a amostra no centro da mini coluna com um tubo coletor fornecido, usando uma pipeta, sem molhar a borda. Feche a tampa da coluna e centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido);

8. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 µL de Tampão de Lise tipo 10 à coluna. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido);

Este passo assegura a completa lise das células e desnatura qualquer resíduo de proteína.

9. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 µL de Tampão de Lavagem tipo 6 à coluna. Centrifugar por 3 minutos à 12.000 rpm. Descartar o tubo coletor contendo o filtrado. Colocar a mini coluna em outro tubo coletor (não fornecido) e centrifugar novamente por 1 minuto à 12.000 rpm;

Se qualquer solução de lavagem venha a ter contato com a coluna, re-centrifugar por 1 minuto. A presença de etanol no DNA genômico eluído pode afetar muitas aplicações. O DNA genômico preso à matriz de sílica está altamente purificado e pronto para a eluição.

10. Colocar a mini coluna em um eppendorf de 1,5 mL (não fornecido). Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 200 µL de Tampão de Eluição tipo 5, pré-aquecido, diretamente no centro da coluna;

Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 à 70 °C ante do uso. O volume atual recuperado será de 80 – 100 % do volume do tampão aplicado na coluna. Mude de ponteira entre as amostras, para reduzir a variação de volume das amostras eluídas.

11. Incubar a coluna por 1 minuto à temperatura ambiente;

Não incubar muito mais do que 1 minuto, para obter um DNA genômico de boa qualidade.

12. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm para recuperar o DNA genômico. Armazenar o DNA genômico purificado à – 20 °C;